



Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals

Facultat de Veterinària.

Universitat Autònoma de Barcelona.

Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento

Carlos Martín Shiva Ramayoni



11 de Julio del 2007

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals

Facultat de Veterinària.

Universitat Autònoma de Barcelona.

Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento

**Tesis Doctoral** dirigida por:  
Dra. María dels Àngels Calvo Torras

Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor

Carlos Martín Shiva Ramayoni

11 de Julio del 2007

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este tiempo hay muchas personas que me han ayudado a realizar este trabajo, y también a ser mejor persona, a llevar mejor el estar fuera de casa y a pensar que si uno quiere conseguir algo deber proponerselo y conseguirlo, de manera limpia. que no somos perfectos, pero que si sabemos reconocer y aprender de nuestros errores, entonces aprenderemos a ser mejores personas.

Quiero agradecer María Angels Calvo, mi directora de tesis, además de considerarla una amiga, por confiar en mi, por ayudarme a levantarme cuando caía, por todo este tiempo de trabajo juntos, por lo aprendido, por su paciencia, pero sobre todo por su apoyo incondicional para que saliera todo adelante,

A mi madre, motor de mi familia, quien nos supo inculcar a mis hermanos y a mí valores humanos y el deseo por ser mejores, tanto como profesionales como mejores personas.

A mis hermanos, María Elena, Lucho, Susy y Marco, siempre les estare agradecidos por confiar en mi y hacer posible este momento y aunque la distancia nos mantenga separados, sabemos que siempre nos llevamos presentes.

A Renata, por darme tantos momentos felices y darme esa alegría que se llama David, gracias por tu paciencia y tu apoyo en todo momento.

A mi amigo Josué Montoya, por su apoyo en los momentos mas dificiles y demostrarme que en esos momentos es donde uno conoce a los amigos de verdad.

Al doctor Jordi Abella, por sus horas de paciencia con el microscopío electrónico.

A Leonardo Arosemena, por su amistad y apoyo incondicional.

A Christel, por su amistad, por creer en mi y por su apoyo incondicional.

A Roxana y Moises, por apoyarnos en todo, y saber que cuento con amigos.

A Pau Prior, por su apoyo constante y sus consejos, Carles Adelantado por los años compartidos de trabajo.

A Alvaro y Gaby, Mauricio y Teo, Billy, y quizás me olvide de mucha gente que han ayudado en todo este tiempo, para ellos y ellas va también este agradecimiento.

#### DEDICATORIA:

Dedico esta Tesis Doctoral a la memoria de mi Padre, fuente de inspiración para conseguir mis metas, ser mejor profesional y mejor persona. Gracias por tus enseñanzas.

# ÍNDICE

1	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1	<b>LOS ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO</b> .....	1
1.1.1	RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	2
1.2	<b>ESTRATEGIAS PARA EL REEMPLAZO DE ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO</b> .....	3
1.2.1	PROBIÓTICOS.....	5
1.2.2	PREBIÓTICOS.....	6
1.2.3	ENZIMAS.....	7
1.2.4	ACIDOS ORGÁNICOS.....	8
1.2.4.1	<b>Uso de Ácidos orgánicos en Producción animal</b> .....	10
1.2.4.1.1	<b>Ácidos orgánicos y rendimiento porcino</b> .....	10
1.2.4.1.1.1	<u>Morfología del intestino</u> .....	12
1.2.4.1.1.2	<u>Microbiota intestinal</u> .....	13
1.2.5	EXTRACTOS DE PLANTAS.....	14
1.2.5.1	<b>Aceites esenciales</b> .....	17
1.2.5.1.1	<b>Localización</b> .....	17
1.2.5.1.2	<b>Función</b> .....	18
1.2.5.1.3	<b>Extracción y aislamiento</b> .....	18
1.2.5.1.4	<b>Factores de variabilidad de los aceites esenciales</b> .....	20
1.2.5.1.4.1	<u>Quimiotipos</u> .....	20
1.2.5.1.4.2	<u>Influencia del ciclo vegetativo</u> .....	20
1.2.5.1.4.3	<u>Influencia de los factores extrínsecos</u> .....	20
1.2.5.1.4.4	<u>Influencia del proceso de obtención</u> .....	21
1.2.5.1.5	<b>Control de calidad de aceites esenciales</b> .....	21
1.2.5.1.6	<b>Toxicidad de los aceites esenciales</b> .....	22
1.2.5.1.7	<b>Empleo de aceites esenciales en Producción animal</b> .....	22
1.3	<b>MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS</b> .....	25
1.3.1	MÉTODOS EN AGAR.....	26
1.3.2	MÉTODOS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO.....	26
1.4	<b>BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA</b> .....	28
1.5	<b>MICOTOXINAS Y MICOTOXICOSIS EN PRODUCCIÓN ANIMAL</b> .....	31
1.5.1	CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS.....	32
1.5.2	MICOTOXINAS DE IMPORTANCIA EN VETERINARIA.....	34
1.5.2.1	<b>Aflatoxinas</b> .....	34
1.5.2.2	<b>Ocratoxinas</b> .....	35
1.5.2.3	<b>Fumonisin</b> .....	36

1.5.2.4	<b><u>Tricotecenos</u></b> .....	36
1.5.2.5	<b><u>Zearalenona</u></b> .....	37
2	<b><u>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</u></b> .....	38
2.1	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
2.2	<b>PLAN DE TRABAJO</b> .....	39
3	<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	41
3.1	<b>MATERIAL Y MÉTODOS PARA LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i></b> .....	41
3.1.1	<b>MATERIAL</b> .....	41
3.1.1.1	<b><u>Cepas Bacterianas</u></b> .....	41
3.1.1.2	<b><u>Cepas Fúngicas</u></b> .....	41
3.1.1.3	<b><u>Productos a evaluar</u></b> .....	42
3.1.1.4	<b><u>Medios de cultivo y soluciones utilizadas (composición y preparación)</u></b> .....	45
3.1.1.4.1	<b>Agar Mac Conkey</b> .....	45
3.1.1.4.2	<b>Agar Triptona Soja (TSA)</b> .....	45
3.1.1.4.3	<b>Agar SS (<i>Salmonella-Shigella</i>)</b> .....	46
3.1.1.4.4	<b>Agar Baird Parker</b> .....	46
3.1.1.4.5	<b>Agar Man Rogosa Sharpe (MRS)</b> .....	47
3.1.1.4.6	<b>Agar Cetrimide</b> .....	47
3.1.1.4.7	<b>Agar Sabouraud (SDA)</b> .....	48
3.1.1.4.8	<b>Agar Patata Glucosa ( PDA)</b> .....	48
3.1.1.4.9	<b>Agar Azida Sódica</b> .....	48
3.1.1.4.10	<b>Caldo Triptona Soja (TSB)</b> .....	49
3.1.1.4.11	<b>Caldo Sabouraud</b> .....	49
3.1.1.4.12	<b>Solución de Ringer</b> .....	49
3.1.1.5	<b><u>Productos químicos</u></b> .....	50
3.1.1.6	<b><u>Material general de laboratorio</u></b> .....	50
3.1.1.7	<b><u>Instrumentos de laboratorio</u></b> .....	51
3.1.2	<b>MÉTODOS</b> .....	52
3.1.2.1	<b><u>Preparación de inóculos bacterianos para las diversas pruebas</u></b> .....	52
3.1.2.2	<b><u>Preparación de inóculos fúngicos para las diversas pruebas</u></b> .....	53
3.1.2.3	<b><u>Métodos <i>in vitro</i> para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos</u></b> .....	54
3.1.2.3.1	<b>Método de difusión por discos en agar</b> .....	54
3.1.2.3.1.1	<b><u>Ensayo con bacterias</u></b> .....	54

3.1.2.3.1.2	<u>Ensayo con hongos miceliales</u> .....	55
3.1.2.3.2	<b>Evaluación de la actividad antimicrobiana por volatilización de componentes (técnica del Aromatograma)</b> .....	56
3.1.2.3.3	<b>Método de estudio de la capacidad de inhibición microbiana por dilución en microplacas</b> .....	57
3.1.2.3.3.1	<u>Ensayo con bacterias</u> .....	57
3.1.2.3.3.2	<u>Ensayo con hongos miceliales</u> .....	58
3.1.2.3.4	<b>Inhibición bacteriana y fúngica por aceites esenciales, ácidos orgánicos y mezclas de ambos, sobre pienso acabado y cebada en grano</b> .....	59
3.1.2.3.5	<b>Degradación <i>in vitro</i> de micotoxinas por una mezcla de aceites esenciales de Rutáceas y ácidos orgánicos</b> .....	61
3.1.2.3.5.1	<u>Metodología de ELISA aplicada a micotoxinas</u> .....	61
3.1.2.3.5.1.1	Aflatoxinas.....	61
3.1.2.3.5.1.1.1	<i>Preparación de la muestra y extracción</i> .....	61
3.1.2.3.5.1.1.2	<i>Procedimiento</i> .....	62
3.1.2.3.5.1.2	Ocratoxina A.....	63
3.1.2.3.5.1.2.1	<i>Preparación de la muestra y extracción</i> .....	63
3.1.2.3.5.1.2.2	<i>Procedimiento</i> .....	63
3.1.2.3.5.1.3	Deoxinivalenol.....	63
3.1.2.3.5.1.4	Zearalenona.....	63
3.1.2.3.6	<b>Método para evaluar la capacidad de inhibición de <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 2948 y de la producción de ocratoxina A sobre dos sustratos vegetales por aceites esenciales y una mezcla de estos con ácidos orgánicos</b> .....	64
3.1.2.3.6.1	<u>Productos</u> .....	64
3.1.2.3.6.2	<u>Microorganismo</u> .....	64
3.1.2.3.6.3	<u>Sustratos de cultivo</u> .....	64
3.1.2.3.6.4	<u>Procedimiento y determinación de crecimiento fúngico</u> .....	65
3.1.2.3.6.5	<u>Análisis de micotoxinas</u> .....	65
3.1.2.3.7	<b>Método para detectar la actividad enzimática de extractos de Rutáceas y evaluar la alteración <i>in vitro</i> de la actividad enzimática extracelular de <i>Escherichia coli</i> FVB467 y <i>Salmonella typhimurium</i> FVB576 por acción de éstos</b> .....	67
3.1.2.3.7.1	<u>Preparación del inóculo bacteriano</u> .....	67
3.1.2.3.7.2	<u>Preparación de las muestras</u> .....	68
3.1.2.3.7.3	<u>Lectura e interpretación</u> .....	68
3.1.2.3.8	<b>Observación mediante microscopía electrónica de la actividad de los extractos de Rutáceas sobre bacterias</b> .....	70
3.1.2.3.8.1	<u>Preparación de reactivos químicos</u> .....	70
3.1.2.3.8.2	<u>Obtención del cultivo</u> .....	71
3.1.2.3.8.3	<u>Condiciones de incubación</u> .....	71

3.1.2.3.8.4	<u>Fijación</u> .....	71
3.1.2.3.8.5	<u>Postfijación</u> .....	72
3.1.2.3.8.6	<u>Deshidratación</u> .....	72
3.1.2.3.8.7	<u>Desecación</u> .....	73
3.1.2.3.8.8	<u>Metalización</u> .....	73
3.2	<b>MATERIAL Y MÉTODOS PARA LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i></b> .....	75
3.2.1	EFFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXTRACTO DE RUTÁCEAS SOBRE LA MICROBIOTA ENTÉRICA DE CERDOS DESTETADOS.....	75
3.2.1.1	<b><u>Tratamientos</u></b> .....	75
3.2.1.2	<b><u>Duración de la prueba y sacrificio</u></b> .....	76
3.2.1.3	<b><u>Análisis de Laboratorio</u></b> .....	76
3.2.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE ENGORDE.....	79
3.2.2.1	<b><u>Piensos</u></b> .....	79
3.2.2.2	<b><u>Tratamientos</u></b> .....	79
3.2.2.3	<b><u>Controles</u></b> .....	80
3.2.2.4	<b><u>Pruebas en laboratorio</u></b> .....	80
3.2.2.5	<b><u>Interpretación de los resultados</u></b> .....	81
4	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	82
4.1	<b>RESULTADOS DE LOS MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS</b> .....	82
4.1.1	RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DIFUSION EN AGAR.....	82
4.1.1.1	<b><u>Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo A</u></b> .....	84
4.1.1.2	<b><u>Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo B</u></b> .....	86
4.1.1.3	<b><u>Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo C</u></b> .....	90
4.1.1.4	<b><u>Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo D</u></b> .....	92
4.1.2	RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR VOLATILIZACIÓN DE COMPONENTES DEL EXTRACTO (TÉCNICA DEL AROMATOGRAMA).....	94
4.1.3	RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL MÉTODO DE DILUCIÓN EN MICROPLACAS. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI).....	96
4.1.3.1	<b><u>Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo A</u></b> .....	97



4.1.3.2	<b><u>Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo B.</u></b>	99
4.1.3.3	<b><u>Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo C.</u></b>	103
4.1.3.4	<b><u>Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo D.</u></b>	105
4.1.4	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS INHIBICIÓN BACTERIANA Y FÚNGICA POR ACEITES ESENCIALES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y MEZCLAS DE AMBOS, SOBRE CEBADA EN GRANO.	107
4.1.4.1	<b><u>Resultados del ensayo sobre cebada en grano.</u></b>	107
4.1.4.2	<b><u>Resultados del Ensayo sobre pienso de finalización para gallinas.</u></b>	109
4.1.5	RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE LA DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MICOTOXINAS POR DOS MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE RUTÁCEAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.	111
4.1.6	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 2948 Y DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A SOBRE DOS SUSTRATOS VEGETALES POR ACEITES ESENCIALES Y UNA MEZCLA DE ESTOS CON ÁCIDOS ORGÁNICOS.	112
4.1.7	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y ALTERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE <i>Escherichia coli</i> FVB467 Y <i>Salmonella typhimurium</i> FVB567 POR ACCIÓN DE ESTOS.	114
4.1.7.1	<b><u>Resultados del estudio de actividad enzimática del extracto de Rutáceas.</u></b>	114
4.1.7.2	<b><u>Resultados de la evaluación de la alteración <i>in vitro</i> de la actividad enzimática extracelular de <i>Escherichia coli</i> FVB 467 y <i>Salmonella typhimurium</i> FVB56 por extractos de Rutáceas.</u></b>	115
4.1.8	RESULTADOS DE LA OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LA ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE RUTÁCEAS SOBRE BACTERIAS.	119
4.2	<b>RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>.</b>	123
4.2.1	RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXTRACTO DE RUTÁCEAS SOBRE LA MICROBIOTA ENTÉRICA DE CERDOS DESTETADOS.	123
4.2.2	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y ACIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE ENGORDE.	125
4.2.2.1	<b><u>Resultados sobre los parámetros productivos de los cerdos.</u></b>	125
4.2.2.2	<b><u>Resultados sobre recuentos bacterianos realizados mediante hisopados rectales a animales vivos.</u></b>	128

5	<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	133
5.1	<b>DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LOS MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS</b> .....	133
5.1.1	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	133
5.1.1.1	<b><u>Discusión sobre los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo A</u></b> .....	134
5.1.1.2	<b><u>Discusión sobre los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo B</u></b> .....	134
5.1.1.3	<b><u>Discusión sobre los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo C</u></b> .....	136
5.1.1.4	<b><u>Discusión sobre los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo D</u></b> .....	136
5.1.2	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR VOLATILIZACIÓN DE COMPONENTES DEL EXTRACTO (TÉCNICA DEL AROMATOGRAMA).....	137
5.1.3	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL MÉTODO DE DILUCIÓN EN MICROPLACAS. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI).....	138
5.1.3.1	<b><u>Discusión sobre los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo A</u></b> .....	138
5.1.3.2	<b><u>Discusión sobre los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo B</u></b> .....	139
5.1.3.3	<b><u>Discusión sobre los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo C</u></b> .....	140
5.1.3.4	<b><u>Discusión sobre los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo D</u></b> .....	141
5.1.4	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA Y FÚNGICA POR ACEITES ESENCIALES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y MEZCLAS DE AMBOS, EN CEBADA EN GRANO Y EN PIENSO.....	142
5.1.4.1	<b><u>Discusión sobre los resultados del ensayo sobre cebada en grano</u></b> .....	142
5.1.4.2	<b><u>Discusión sobre los resultados del ensayo sobre pienso de finalización para gallinas</u></b> .....	143
5.1.5	DISCUSION SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE LA DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MICOTOXINAS POR DOS MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE RUTÁCEAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	144
5.1.6	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 2948 Y DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A, ENDOS SUSTRATOS VEGETALES POR ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES CON ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	146

5.1.7	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y DE LA ALTERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE <i>Escherichia coli</i> FVB467 y <i>Salmonella typhimurium</i> FVB 567 POR ACCIÓN DE ÉSTOS.....	148
5.1.7.1	<b><u>Discusión sobre los resultados del estudio de la actividad enzimática del extracto de Rutáceas</u></b> .....	148
5.1.7.2	<b><u>Discusión sobre los resultados de la evaluación de la alteración <i>in vitro</i> de la actividad enzimática extracelular de <i>Escherichia coli</i> FVB 467 y <i>Salmonella typhimurium</i> FVB 567 por extractos de Rutáceas</u></b> .....	149
5.1.8	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LA OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y SUS MEZCLAS CON ÁCIDOS ORGÁNICOS, SOBRE BACTERIAS.....	150
5.2	<b>DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i></b> .....	152
5.2.1	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXTRACTO DE RUTÁCEAS SOBRE LA MICROBIOTA ENTÉRICA DE CERDOS DESTETADOS.....	152
5.2.2	DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE ENGORDE.....	154
6	<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	156
6.1	<b>CONCLUSIONES SOBRE LOS ENSAYOS <i>IN VITRO</i></b> .....	156
6.2	<b>CONCLUSIONES SOBRE LOS ENSAYOS <i>IN VIVO</i></b> .....	157
7	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	158

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 LOS ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO**

La descripción de las propiedades de los agentes antimicrobianos como promotores de crecimiento data de finales de los años 40 (35), este efecto se manifiesta al adicionar a los piensos cantidades subterapéuticas de antibióticos. Sin embargo ante el empleo masivo de antibióticos, especialmente en producción porcina y aviar, se planteó el probable riesgo de transferencia de resistencia a los antibióticos entre bacterias y en especial a aquellas que pueden ser agentes etiológicos de procesos en el hombre. Este tema ha sido materia de discusión durante muchos años hasta el punto que la Unión Europea desde el mes de julio de 1999 suspendió la licencia de muchos antibióticos adicionados en alimentación animal como promotores de crecimiento, decisión que ha tenido un fuerte impacto en producción animal, y ha determinado la necesidad de iniciar líneas de investigación encaminadas a la búsqueda de alternativas a los antibióticos como promotores de crecimiento.

En la actualidad, a nivel de la Unión Europea se encuentran prohibidos los antibióticos para su empleo como promotores de crecimiento en producción animal, si bien hasta diciembre del año 2005 estaba permitido el uso como promotores de crecimiento de cuatro antibióticos: Flavofosfolipol, Monensina sódica, Salinomicina sódica y Avilamicina.

Los efectos asociados a la inclusión de un aditivo antimicrobiano en un pienso, podemos resumirlos en: prevenir disturbios digestivos, incrementar el consumo del alimento y por ende mejorar el estado general del animal, factor que repercute económicamente ya que determina una reducción de los costos de producción (16).

El mayor beneficio de utilizar promotores de crecimiento podemos basarlo en que son capaces de controlar a la población microbiana del tracto gastrointestinal, fenómeno que se traduce en una mejora en la absorción de nutrientes y en consecuencia, en disminuir el sustrato para la proliferación de microorganismos patógenos.

### 1.1.1 RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

Con la detección cada vez de más casos de resistencia bacteriana a los antibióticos, en terapéutica humana, y también en producción animal debido al uso indiscriminado de antibióticos, muchos países y especialmente los integrantes de la Unión Europea, han ido prohibiendo paulatinamente el uso de éstos como promotores de crecimiento, en el intento de controlar la citada transferencia (144).

La microbiota intestinal debido a su alta concentración, facilita la transferencia de resistencias entre bacterias. En el caso de los animales, los genes de resistencia pueden ser diseminados fácilmente en el rebaño por contacto fecal. La resistencia de los microorganismos puede alcanzar al hombre directamente, a través de tratamientos e indirectamente por el consumo de carne y sus sub-productos (134).

Las bacterias de la microbiota endógena de los animales de consumo pueden colonizar y transferir genes de resistencia a la microbiota endógena humana, incrementando con una carga adicional el reservorio de resistencia ya presente en el hombre (6, 143).

A raíz de estos problemas de transferencia de resistencia a los antibióticos se han ido planteando diversas alternativas a los ya clásicos promotores de crecimiento de naturaleza antibiótica, resurgiendo algunos, como los ácidos orgánicos que venían siendo utilizados como antifúngicos en piensos, como es el caso del ácido propiónico. Otra alternativa es el empleo de aditivos naturales pero, en general, se utilizan en menor escala que los ácidos orgánicos.

## **1.2 ESTRATEGIAS PARA EL REEMPLAZO DE ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO.**

Las alternativas para el reemplazo de los antibióticos como promotores de crecimiento en producción animal, podemos enfocarnos bajo dos puntos de vista:

- Mejorando las estrategias de manejo en el sistema de producción, de tal manera que se eviten las enfermedades y se logre mantener los parámetros productivos. Estas estrategias deben ir dirigidas a reducir la incidencia de enfermedades en animales, consiguiendo que no disminuyan los niveles productivos.
- Proponiendo la utilización de otras sustancias que posean efectos similares sobre los niveles productivos de los animales que pertenezcan a la categoría de ‘aditivos’. Entre ellas podemos citar: Probióticos, Prebióticos, Enzimas, Ácidos orgánicos y Extractos naturales

En la Tabla núm. 1 se resumen las principales ventajas e inconvenientes de algunos aditivos usados en Producción animal.

Tabla núm. 1.-. Ventajas e inconvenientes de algunos aditivos usados en Producción animal.  
Adaptado de Carro y Ranilla, 2002 (20).

ADITIVO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Probióticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inocuos para el animal y el consumidor</li> <li>- Buena aceptación por el consumidor (siempre que no sean microorganismos modificados genéticamente).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevado coste</li> <li>- Eficacia variable</li> <li>- Menor eficacia que los APC</li> <li>- Posible transferencia de resistencia</li> </ul>
Prebióticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inocuos para el animal y el consumidor</li> <li>- Muy buena aceptación por el consumidor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resultados variables en las distintas especies</li> <li>- Menor eficacia que los APC</li> </ul>
Ácidos orgánicos y sus sales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inocuos para el animal y el consumidor</li> <li>- Buena aceptación por el consumidor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resultados variables en los animales rumiantes</li> <li>- Difícil manejo de los ácidos</li> <li>- Pueden afectar negativamente a la ingestión</li> <li>- Elevado coste</li> <li>- Menor eficacia que los APC</li> </ul>
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inocuos para el animal y el consumidor</li> <li>- Buena aceptación por el consumidor (posibles reticencias si proceden de microorganismos genéticamente modificados).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sólo son efectivas con el sustrato adecuado</li> <li>- Menor eficacia que los APC</li> <li>- Elevado coste</li> </ul>

APC: antibióticos promotores de crecimiento

### 1.2.1 PROBIÓTICOS

Bajo el término "probiótico" se definen a los cultivos viables de una o más especies de microorganismos, que cuando son administrados como aditivos a los animales desencadenan en ellos efectos beneficiosos, como consecuencia de las modificaciones en la microbiota de su tracto digestivo. La mayoría de los microorganismos que se suministran como probióticos a los animales de granja son especies de los géneros: *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus* entre las bacterias así como cepas de *Saccharomyces cerevisiae* entre las levaduras y de *Aspergillus oryzae* entre los hongos filamentosos (98).

Aunque se desconocen algunos aspectos de los mecanismos de acción de los probióticos, las últimas investigaciones aportan que éstos impiden a los microorganismos patógenos (p.e. *Salmonella* spp., *Escherichia coli*) colonizar el tracto digestivo, o al menos reducen su concentración o su capacidad de producir toxinas. Asimismo, se han registrado aumentos de la concentración de inmunoglobulinas en el tracto digestivo de cerdos tras la administración de *Bacillus clausii*, por lo que otro efecto de los probióticos podría ser la estimulación del sistema inmunológico (136).

Asimismo, se ha descrito la producción y acumulación de compuestos con capacidad inhibidora del desarrollo de otras bacterias (bacteriocinas) por parte de bacterias del ácido láctico cuya eficacia *in vitro*, ha sido plenamente demostrada por Chateau *et al.* en el año 1993 (22). La producción de bacteriocinas, determina un posible control ya que actúan frente una amplia gama de bacterias perjudiciales por diversos mecanismos.

La mayoría de los investigadores aceptan que la microbiota intestinal influye directa e indirectamente en el estado de salud del hombre y los animales a través de las siguientes funciones:

- Producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta
- Degradación de sustancias alimenticias no digeridas
- Integridad del epitelio intestinal
- Estímulo de la respuesta inmunitaria
- Protección frente a microorganismos enteropatógenos.



El probiótico ideal será aquel que no influya negativamente en ninguna de estas funciones.

### 1.2.2 PREBIÓTICOS

El término "prebiótico" incluye una serie de compuestos no digeribles por el animal, que mejoran su estado sanitario debido a que estimulan del crecimiento y/o la actividad de determinados microorganismos beneficiosos del tracto digestivo, y que además pueden impedir la adhesión de microorganismos patógenos. Las sustancias más utilizadas son los oligosacáridos, que alcanzan el tracto posterior sin ser digeridos y allí son fermentados por las bacterias intestinales. Con una cuidada selección de los oligosacáridos, se puede favorecer el crecimiento de las bacterias beneficiosas. Xu *et al.* en el año 2003 (145), observaron que a una concentración de 0,4% de fructo-oligosacáridos, incrementó el crecimiento de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. en el ciego de las aves y aumentaron así su ritmo de crecimiento.

En cerdos destetados se ha observado que la administración de manano-oligosacáridos produce mejoras en la ganancia de peso vivo similares a las observadas con algunos antibióticos promotores de crecimiento, esta actividad puede no ser manifestada si la cantidad de Zinc en dieta es excesiva (79). Debido a que estos compuestos son sustancias seguras para el animal y el consumidor, es de esperar que su utilización se incremente en el futuro, y que continúen las investigaciones para identificar las condiciones óptimas para su uso. Por otra parte, dado que los modos de acción de los probióticos y los prebióticos no son excluyentes, ambos pueden utilizarse simultáneamente sin que se pierda la actividad de uno de ellos (26), constituyen así los denominados "simbióticos" que permiten obtener un efecto sinérgico.

### 1.2.3 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar reacciones bioquímicas específicas. Se han utilizado desde hace cientos de años en procesos de fermentación tales como la fabricación de quesos, del pan, la elaboración del vino y de la cerveza, entre otros.

Los preparados enzimáticos utilizados como aditivos en la alimentación animal actúan a nivel del sistema digestivo, ejerciendo diferentes acciones como son: eliminar factores anti-nutritivos de los alimentos, aumentar la digestibilidad de determinados nutrientes, complementar la actividad de las enzimas endógenas de los animales y reducir la excreción de ciertos compuestos.

Un hecho fundamental es la especificidad de cada enzima por un sustrato determinado. Por ello, las preparaciones enzimáticas deben estar perfectamente caracterizadas y utilizarse únicamente en aquellos productos que contengan los sustratos adecuados. Por ejemplo en rumiantes podrían resultar muy útiles las enzimas fibrolíticas (celulasas, xilasas, etc). Eun, en el año 2005 (40), puso de manifiesto que la adición de enzimas proteolíticas a dietas de vacas mejora la absorción de nutrientes a lo largo de todo el tracto digestivo, fundamentalmente xilasas y endoglucanasas (fibrolíticas), cuya presencia facilita la absorción de fibra. En monogástricos, son de interés las enzimas:  $\alpha$ -galactosidasa, fitasas celulasas, proteasas, entre otras (55).

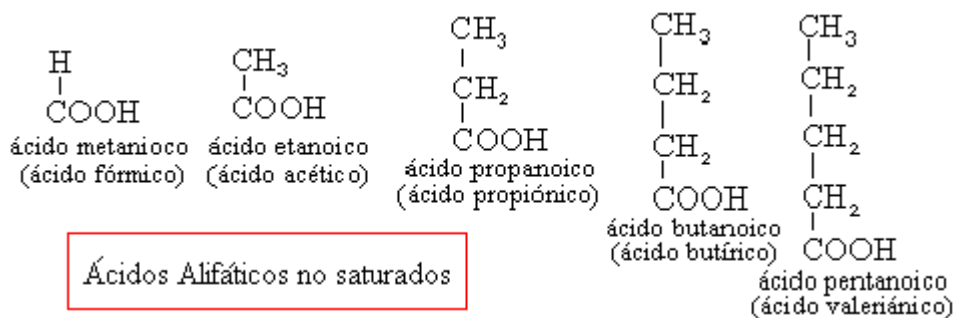
En el caso de la producción de ganado porcino, el empleo de enzimas acelera las reacciones químicas que permiten al animal asimilar del orden del 15 al 25% más de pienso, como consecuencia de que: favorecen la hidrólisis de la fibra y en consecuencia incrementan la disponibilidad de los nutrientes; metabolizan ciertos factores anti-nutritivos, mejorando la digestión y ayudando a prevenir alteraciones nutricionales y suplementan el sistema enzimático inmaduro de los lechones (100).

### 1.2.4 ACIDOS ORGÁNICOS

Durante muchos años, en la dieta de los animales de producción se han incluido ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos, con el fin de reducir el pH dentro del estómago, incrementar la proteólisis gástrica y la digestibilidad de los nutrientes. Los ácidos mas utilizados en producción porcina son los ácidos orgánicos, especialmente los de cadena corta (AOCC).

Los ácidos orgánicos, están presentes en los alimentos o pueden acumularse como resultado de procesos de fermentación o bien se añaden de forma intencionada en la formulación (11). Los rumiantes difieren de los no rumiantes en que en ellos, los microorganismos fermentan los alimentos y producen ácidos grasos volátiles de cadena corta que proveen la fuente primaria de energía que es absorbida y presentada al hígado (99). En el caso del ganado vacuno de leche suelen producirse diariamente hasta 1,5 litros de ácido propiónico por las bacterias fermentadoras del rumen (3). El ácido propiónico se absorbe por el hígado que lo metaboliza y da lugar a la glucosa, importante fuente de energía (99, 112).

A continuación se indican los principales ácidos orgánicos de interés en el control antimicrobiano y sus respectivas fórmulas químicas



Adaptado de Gillespie *et al.*, 1990 (50).

El empleo de ácidos orgánicos de cadena corta (AOCC), como el ácido fórmico, el láctico o el ácido propiónico, éste último utilizado durante años como inhibidor de hongos en pienso, (37, 71) ha adquirido su mayor importancia en producción ganadera. Estos ácidos, poseen un valor de pKa elevado, este hecho es muy importante ya que en el rango habitual de pH de las dietas, la proporción más alta de ácidos se encuentra en su forma no disociada. Cuando los ácidos orgánicos se utilizan como aditivos alimentarios, se debe tener en cuenta al formular el pienso su aporte de energía bruta, que varía considerablemente entre los diferentes compuestos. Se considera que en la mayoría de los casos la energía bruta es completamente metabolizada por el animal.

La Tabla núm. 2 resume las principales características de los principales ácidos orgánicos de cadena corta utilizados en Producción animal.

Tabla núm.2 Características principales de los ácidos orgánicos de cadena corta.

Ácido	Form. empírica	pKa	solubilidad en H <sub>2</sub> O	E.B., Kcal/Kg
Fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,75	Muy buena	1.386
Acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,75	Muy buena	3.537
Propiónico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4,87	Muy buena	4,971
Láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3,08	Buena	3.609
Fumárico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	3,0/4,4	Regular	2.748
Málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	3,4/5,1	Buena	2,390
Tartárico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	3,0/4,4	Buena	1.864

E.B. = Energía bruta    pKa= Constante de disociación

Adaptado de Basf, 2001(4)

En cuanto a los ácidos inorgánicos, podemos indicar que son ácidos fuertes ya que poseen un pH muy cercano a 1, pero se encuentran en estado completamente disociado a diferencia de los ácidos orgánicos que están en su mayoría en forma no disociada.

#### 1.2.4.1 **Uso de Ácidos orgánicos en Producción animal**

Los beneficios de los ácidos orgánicos en la mejora del rendimiento en producción animal se deben principalmente a que:

Ejercen una actividad antibacteriana. A partir de su forma no disociada, el hidrogenión ( $H^+$ ) reduce el pH del citoplasma, lo que obliga a la célula a incrementar sus gastos energéticos a fin de mantener su equilibrio osmótico (124) y el anión ( $A^-$ ) perjudica la síntesis de DNA, evitando la replicación de los microorganismos (23, 146). En consecuencia, es más interesante la adición de ácidos orgánicos de cadena corta con un pKa superior al pH fisiológico ya que permite que una mayor cantidad de ácido en forma no disociada penetre en el interior del microorganismo.

La forma disociada de los ácidos es un anión, por tanto no atraviesa la membrana plasmática de los microorganismos. En cambio la forma no disociada de los ácidos si la atraviesa, una vez en el interior, el ácido puede disociarse y afectar directamente al pH intracelular de la bacteria, altera el metabolismo bacteriano, por lo que la bacteria aumenta sus niveles de  $Na^+$ ,  $K^+$  y/o glutamato para compensar el aumento de aniones de los ácidos, esto conlleva a un aumento de la fuerza iónica intracelular y de la turgencia. Este mecanismo ejerce una presión mecánica sobre la pared del microorganismo, que determina que eventualmente pueda estallar.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado su actividad inhibitoria sobre bacterias Gram negativas y en menor medida sobre Gram positivas (64, 101), como también su actividad inhibitoria sobre hongos (17).

##### 1.2.4.1.1 **Ácidos orgánicos y rendimiento porcino**

La acidificación de la dieta por ácidos orgánicos puede suministrar una medida profiláctica que se utiliza como alternativa al empleo de antibióticos como promotores de crecimiento adicionados al alimento, aunque los resultados no son comparables a los obtenidos por los antibióticos (87). Mientras los antibióticos se han diseñado para inhibir el crecimiento en general, los acidificantes ayudan a que los microorganismos beneficiosos

proliferen en el tracto intestinal en lugar de los patógenos; aunque también suelen tener cierto efecto inhibitorio sobre ellos. La suplementación con acidificantes en dietas de destete para cerdos ha mostrado, en muchos casos, aumentar la ganancia de peso vivo y conversión de alimento, y reducir la incidencia de diarreas. Sin embargo, la respuesta al suplementar las dietas con acidificantes a menudo es variable y requiere de dosis muy alta de los mismos.

Al acidificar el pienso de los lechones, se reduce el pH de la dieta y su capacidad tampón (4). Para la digestión óptima de las proteínas en el intestino, se requiere la conversión de pepsinógeno en pepsina, para ello es necesario que el pH sea menor a 5,0; asimismo, la pepsina alcanza su máxima actividad a un pH comprendido entre 2,0 y 3,5 (99). En caso de lechones, al no tener bien desarrollada la digestión enzimática ni la producción de ácido clorhídrico a nivel de estómago, puede llevar a problemas de digestibilidad y diarreas.

Los ácidos orgánicos también tienen algunos inconvenientes, como su difícil manipulación, por lo que es más práctico utilizarlo como sal, la cual es menos efectiva que en su forma pura. Otro inconveniente es su alto poder corrosivo.

El ácido fumárico, al fórmico y el cítrico son los más estudiados en dietas porcinas de destete, su suplementación en los piensos mejora el rendimiento de los cerdos recién destetados (12, 45), aunque últimamente también hay un interés creciente hacia el ácido fórmico y sus sales, en general los ácidos orgánicos parecen mejorar la ganancia de peso diario en cerdos destetados, aunque los márgenes de ganancias suelen variar mucho de un estudio a otro. Las razones potenciales para este hecho podrían estar relacionadas al tipo y dosis del ácido usado, composición basal de la dieta, edad de los animales, entre otros (104).

El tipo y dosis del ácido a usar es muy importante, en general el ácido fórmico o los formiatos, el ácido cítrico y el ácido fumárico, mejoran la ganancia de peso en el lechón destetado, y el promedio de ganancia disminuye con el incremento de los niveles de ácido en la dieta. Los efectos promotores de crecimiento de los ácidos orgánicos suelen ser menores que los de los antibióticos promotores de crecimiento (APC), pero estos ácidos orgánicos pueden también aumentar los efectos de los antibióticos por su mejor absorción (111).

Los datos de los estudios realizados hasta el presente, indican que los diferentes ácidos orgánicos pueden tener diversos efectos en la ingesta de alimento, en general, el ácido fórmico o los formiatos en la dieta tuvieron un efecto positivo, el ácido fumárico no presentó efecto y el ácido cítrico determinó un efecto negativo, este ácido tiene menor efecto debido a que muchos microorganismos pueden metabolizarlos y también a que tiene un pKa bajo (104). Estos efectos pueden estar relacionados con la edad de los cerdos ya que los cerdos jóvenes son más sensibles a los cambios de palatabilidad en la dieta. En un estudio de Henry *et al.* en el año 1985 (61), donde facilitó el libre acceso a una dieta no acidificada y otra acidificada (ácido cítrico y ácido fumárico), los cerdos consumieron significativamente más de la dieta no acidificada que de la acidificada.

Otro aspecto a considerar es que los ácidos orgánicos al ser ingeridos provocan ciertos cambios en la morfología del intestino y en la microbiota intestinal.

#### 1.2.4.1.1.1 Morfología del intestino

Al producirse el momento del destete el intestino delgado de los cerdos experimenta una reducción en la altura y un incremento en la profundidad de las criptas, estos cambios van asociados a una notable disminución en la capacidad de absorción intestinal, también se observan cambios en el epitelio del intestino delgado con una reducción voluntaria de la ingesta (8, 59). Estos cambios son muy importantes porque reducen el crecimiento, asociado a una mala absorción intestinal, y al *stress*, lo cual aumenta el tiempo en que el animal alcanza su peso para matadero, y conlleva a un aumento en los costes de producción.

Para prevenir parcialmente el acortamiento de las vellosidades y la profundidad de las criptas se suele administrar una dieta suplementaria antes del destete, o bien una dieta líquida, o líquida parcialmente fermentada junto con la ingesta de alimento luego del destete (126).

Si bien los resultados de estudios de campo sobre la adición de ácidos orgánicos en lechones y su efecto sobre la morfología de las vellosidades y criptas han sido muy variados, Galfi y Bokori en el año 1991 (48) observaron que adicionando 0,17% de sales de ácido butírico en la dieta de lechones obtuvo un incremento substancial en el número de células

constituyentes de las microvellosidades así como en su longitud a nivel del íleon de cerdos en crecimiento. Se ha descrito que los ácidos orgánicos producidos por la fermentación microbiana de carbohidratos en el lechón, (ácido acético, ácido propiónico y ácido n-butírico) estimulan la proliferación celular epitelial (104).

Estos hechos permiten plantear la posibilidad de adicionar ácidos orgánicos en la dieta de lechones destetados, considerando como fundamentales así mismo las condiciones de crianza, el tipo de dieta y la edad del animal (62).

#### 1.2.4.1.1.2 Microbiota intestinal

El estrés asociado con el destete de los lechones altera la microbiota intestinal (18). Un pH ácido y un flujo rápido de la dieta en el animal pueden determinar un fenómeno de inhibición microbiana a lo largo del tracto intestinal. También se ha demostrado que las condiciones de acidificación favorecen el crecimiento de especies de *Lactobacillus* en el estómago, que puede con gran probabilidad inhibir la colonización por parte de *Escherichia coli*, como consecuencia del bloqueo de los sitios de adhesión o por la producción de ácido láctico y otros metabolitos, los cuales determinan un descenso en el pH, e inhiben a *Escherichia coli*.

Algunos estudios han mostrado que el empleo de ácidos orgánicos puede reducir la carga de coliformes a lo largo del tracto digestivo (18, 45).



### 1.2.5 EXTRACTOS DE PLANTAS

Los extractos de plantas se han utilizado desde hace siglos para el tratamiento de un gran número de procesos patológicos (56).

Si nos remontamos en la Historia, el descubrimiento de un hombre congelado en los Alpes de más de 5.300 años de antigüedad, perfectamente conservado y que tenía entre sus bienes, varios frutos de *Piptous betulinus*, de reconocida actividad antifúngica, antiparasitaria y frente a especies del género *Mycobacterium* (19) nos aporta una idea del conocimiento empírico por parte del poblador de aquellas épocas sobre el beneficio que producía el consumo de algunas plantas.

El primer texto escrito sobre plantas medicinales data del año 3.000 a.C. y se debe a los Sumerios (129). Más adelante, los griegos también emplearon las plantas en sus tratamientos. Dada la abundancia de vegetales en Creta, esta civilización, desempeñó un papel importante en el desarrollo de la medicina alrededor del mar Mediterráneo, especialmente entre los siglos I y II d.C., como principal exportador de plantas a los países del área del mediterráneo (113). El primer tratado Helénico completo en materia de plantas medicinales del que se tiene conocimiento fue escrito por Diocles de Carystos (Siglo IV d.C.). El tratado llamado *Phizotomicon*, expone el origen, el reconocimiento y el valor medicinal de diversas plantas (129).

El descubrimiento del nuevo Continente y la extensión de los Imperios Europeos por África y Oriente aportaron un sin número de nuevas plantas con propiedades medicinales por lo que se extendió su uso terapéutico para el tratamiento de múltiples enfermedades. Estas plantas se consumían de las formas más variadas: infusiones, vapores, ingesta directa, entre otras.

Probablemente una de las primeras drogas del folklore tradicional que se transformó en una moderna droga allá por finales del siglo XVIII, fue la digital (*Digitalis purpurea L.*), lo cual ilustra los principios de la farmacología moderna (51).

Posteriormente se inició la era de la quimioterapia moderna, cuando en 1928 Sir Alexander Fleming del Mary's Hospital de Londres evidenció que una sustancia producida por el hongo *Penicillium notatum* que había contaminado una placa con crecimiento de *Staphylococcus aureus*, inhibía el desarrollo de esta bacteria (92, 143). Como consecuencia de este descubrimiento, la fitoterapia se dejó de lado especialmente en los países desarrollados y en contraposición, la quimioterapia tuvo un desarrollo meteórico con el descubrimiento de nuevos antibióticos casi siempre aislados, purificados y procesados industrialmente a partir de fuentes naturales (60). El uso de antibióticos se hizo extensivo especialmente en producción animal con mayor auge en explotaciones porcinas y avícolas en las que no sólo se empleaban para tratar patologías sino que se adicionaban rutinariamente a los piensos, como promotores de crecimiento.

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de euros alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1.340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos (52), pero se conocen más de 250000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de componentes bio activos. Solo en el año 1999 el negocio de global de la venta de suplementos naturales de plantas en humanos excedió los 15 billones de dolares, de los cuales 7 billones fueron en Europa, 2,4 billones en Japón, 2,7 en el resto de Asia y 3 billones en Norte América (114).

A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que éstos por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. Se considera que la toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentran todos sus compuestos que cuando se encuentran purificados, este fenómeno se denomina *buffering* (110, 132).

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan: terpenos, aceites esenciales, cumarinas y flavonoides. (17, 31, 76, 80, 90, 116, 137, 140).

Los mecanismos exactos de acción, de muchos extractos naturales, no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente, deben su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a la que someten a la membrana celular de los microorganismos, hecho que determina que pierda su control e integridad. Además de la actividad

antimicrobiana de algunos extractos naturales, éstos suelen poseer otras actividades biológicas beneficiosas (17), así por ejemplo, plantas del género *Allium* se estudian por su efecto anticanceroso (96), o por su acción sobre el sistema enzimático, mejorando el apetito y optimizando la absorción de nutrientes (74).

Junto a su actividad antimicrobiana los extractos naturales poseen otras aplicaciones, entre las que podemos destacar: antiinflamatoria, inmunomoduladoras, espasmolíticas y sedantes.

Los bioflavonoides de algunas plantas, en especial cítricos, suelen producir efectos beneficiosos sobre el rendimiento de algunos animales, se propone que algunos de los mecanismos de acción de los extractos son: disminuyen la oxidación de los aminoácidos, ejercen una acción antimicrobiana sobre algunos microorganismos intestinales y favorecen la absorción intestinal, estimulan la secreción de enzimas digestivas, aumentan la palatabilidad de los alimentos (112) y estimulan su ingestión, y mejoran el estado inmunológico del animal.

Los extractos de plantas forman parte de un grupo de sustancias "toleradas" pero no admitidos como aditivos de manera estrictamente legal. Los extractos vegetales entrarían dentro del grupo de aditivos clasificado como "sustancias aromáticas y saborizantes", en el que se incluyen "todos los productos naturales y los productos sintéticos correspondientes", y que pueden utilizarse en todas las especies animales, sin restricción alguna en su edad o en la dosis de producto. Dada que estos productos son muy bien aceptados por el consumidor, son una de las alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento con más futuro, y la búsqueda de nuevas sustancias representa una importante área de investigación en el campo de los aditivos alimentarios.

Los principios activos de las plantas suelen ser: aceites esenciales (volátiles), resinas, alcaloides glicósidos y aceites fijos.

### 1.2.5.1 **Aceites esenciales**

Según la 8ª. Edición de la farmacopea francesa de 1965, los aceites esenciales son “productos de composición general muy complejas que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación”

Los aceites esenciales no se encuentran prácticamente más que en vegetales superiores. Se calculan que existen aproximadamente unas 17.500 especies aromáticas, son productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales, se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. (108, 125).

#### 1.2.5.1.1 **Localización**

Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructuras histológicas especializadas, a menudo localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta: células con aceites esenciales de las Lauraceae o las Zingiberaceae, pelos secretores de las Lamiaceae, glándulas secretoras de las Myrtaceae o las Rutaceae, canales secretores de las Apiaceae o las Asteraceae.

Los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de la planta:

- En las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.)
- En las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.).
- En el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.).
- En las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.).
- En el tallo (canela, caparrapí, etc.).
- En las flores (árnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.).
- En los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.).

#### 1.2.5.1.2 **Función**

En general, la función biológica de los terpenoides de los aceites esenciales sigue estando poco clara. Si embargo, es probable que tengan un papel ecológico. Apoya esta hipótesis el haber establecido experimentalmente el papel de algunos de ellos, tanto en el campo de las interacciones vegetales (agentes alelopáticos, especialmente inhibidores de la germinación) como en las interacciones vegetal-animal: protección contra los depredadores (insectos y hongos) y atracción de polinizadores.

#### 1.2.5.1.3 **Extracción y aislamiento**

Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales y extractos aromáticos, se resumen en la Tabla núm. 3 que se expone en la página siguiente.

En la Tabla núm. 3 de la página siguiente podemos observar los diferentes métodos de extracción de mezclas aromáticas.

Tabla núm. 3.- Métodos de extracción de mezclas aromáticas.

Adaptado de San Martín, R. 1977 (125)

MÉTODO	PROCEDIMIENTO		PRODUCTOS OBTENIDOS
<b>Métodos directos</b>	Expresión	Compresión de cáscaras	Aceites esenciales cítricos
		Raspado de cáscaras	
	Exudado	Lesiones mecánicas en cortezas	Aromas, resinas, bálsamos
<b>Destilación</b>	Directa		Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Por arrastre con vapor (directo, indirecto, a presión, al vacío)		
	Destilación-Maceración (liberación enzimática de aglicomas en agua caliente)		Almendras, mostaza, ajo, hojas de abedul
<b>Extracción con solventes</b>	Solventes volátiles	En caliente	Infusiones y resinoides alcohólicos en caliente, oleorresinas
		En frío	Concretos y absolutos, resinoides en frío, oleorresinas
	Solventes fijos (grasas y aceites)	En caliente	Pomadas en caliente, lavados y absolutos de pomadas
		En frío	Pomadas en frío, lavados y absolutos de enflorados
<b>Procesos de extracción con fluidos en condiciones subcríticas y supercríticas</b>			

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante diferentes métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, *enfleurage* y con fluidos supercríticos.

En la expresión, el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos.

#### 1.2.5.1.4 Factores de variabilidad de los aceites esenciales.

Entre los principales factores susceptibles de influir sobre la composición de los aceites esenciales tenemos:

##### 1.2.5.1.4.1 Quimiotipos

Los quimiotipos, llamados también razas químicas, son muy frecuentes en plantas productoras de aceites esenciales, citaremos como ejemplo el del Tomillo (*Thymus vulgaris*) del Mediterráneo occidental. Se cuentan para esta especie, morfológicamente homogénea y cariológicamente estable, siete quimiotipos diferentes, seis en los carrascales del sur de Francia (con timol, carvacrol, geraniol, linalol, alfa-terpinol, trans-4-tuyanol y cis-8-mircenol) y uno en España, con cineol. El mismo fenómeno se observa en otras especies del género *Thymus* y también en otras *Lamiaceae*.

##### 1.2.5.1.4.2 Influencia del ciclo vegetativo

Para una especie determinada la proporción de los diferentes constituyentes de un aceite esencial puede variar a lo largo de su desarrollo. Habitualmente se observa en especies conocidas como Menta piperita, hinojo, zanahoria, cilantro (en esta última el contenido de linalol es un 50% más elevado en el fruto maduro que en el fruto verde)

##### 1.2.5.1.4.3 Influencia de los factores extrínsecos

Pueden influir los factores del entorno y prácticas de cultivo. La temperatura, la humedad relativa, la duración total de la insolación y el régimen de los vientos ejercen una influencia directa, sobre todo en especies que poseen estructuras histológicas de almacenamiento superficiales (ej.: pelos secretores de las *Lamiaceae*). Cuando la localización es mas profunda la calidad es mucho más constante.

#### 1.2.5.1.4.4 Influencia del proceso de obtención

En el caso de los aceites obtenidos por hidrodestilación, su composición suele ser diferente de la mezcla de constituyentes inicialmente presente en los órganos secretores del vegetal. La cinética de la hidrodestilación no es idéntica para todos los constituyentes de un aceite esencial (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc.).

#### 1.2.5.1.5 **Control de calidad de aceites esenciales**

Es importante asegurar la calidad del producto estudiando, definiendo y controlando el conjunto de parámetros y del cultivo en la elaboración final.

Las farmacopeas prevén diferentes ensayos para el control de calidad de los aceites esenciales: evaluación de la miscibilidad en etanol, medidas físicas (índice de refracción, poder rotatorio, densidad relativa, etc.), determinación de los índices de acidez, éster, carbonilo, determinación del residuo de evaporación, etc. Exigen también un análisis del aceite esencial, por una técnica cromatográfica. El método más adecuado, habida cuenta de la volatilidad de los constituyentes y su rapidez es la cromatografía en fase gaseosa.

El perfil cromatográfico es el listado de los constituyentes seleccionados entre los que son representativos y característicos de un aceite esencial, acompañado, en cada caso, de límites de concentración y, en algunos casos de las relaciones entre estas concentraciones. Un constituyente es representativo cuando se encuentra en todas las muestras cuya dispersión estadística sigue la curva de Gauss. Un constituyente característico, es un constituyente representativo cuya concentración- que puede ser nula- es fundamental e intrínseca (ej.: ausencia de 10-epi- $\gamma$ -eudesmol en el geranio Bourbon, y su presencia en el geranio de África).



#### 1.2.5.1.6 Toxicidad de los aceites esenciales

Por regla general, los aceites esenciales por vía oral poseen una toxicidad débil o muy débil: la mayoría de los que se utilizan frecuentemente tienen una DL<sub>50</sub> comprendida entre 2 y 5 g/Kg (anís, eucalipto, clavo, etc.), o lo que es más frecuente, superior a 5 g/Kg (manzanilla, lavanda, etc.), similar caso se da con los componentes de los aceites esenciales. Son raros aquellos que tienen una DL<sub>50</sub> inferior a 2 g/Kg.

#### 1.2.5.1.7 Empleo de aceites esenciales en Producción animal

El empleo de los aceites esenciales en producción animal no está muy extendido, si bien es cierto que se utiliza en Veterinaria muchas veces mediante por ejemplo pomadas a base de esencia de trementina utilizadas en caballos, por la que se provoca aumento de la microcirculación, rubefacción y alguna actividad anestésica local. También se utiliza el eucalipto, la esencia de pino y el niaulí que estimulan las células con secreciones por lo que se administran muchas veces en tratamientos de enfermedades respiratorias.

El uso de aceites esenciales como aditivos en piensos a nivel de producciones medianas y grandes no está extendido, Hernández *et al.*, en el año 2004 (63), encontraron una ligera mejora en la digestibilidad y producción de broilers cuyas dietas fueron suplementadas con aceites esenciales de orégano, de canela y de pimienta. Jamroz *et al.*, en el año 2005 (72), expusieron una mejora de la conversión alimenticia de broilers suplementados con una mezcla de cinamaldehído, carvacrol y capsicum, 4,2% en las dietas con base de maíz, y 2% en las que usaron cebada como base de la dieta, también obtuvieron una reducción en la presencia de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, además de un aumento de *Lactobacillus spp.*

Guo *et al.*, en el año 2004 (53), en un estudio comparativo realizado con broilers hembras con una formulación suplementada con virginiamicina y otra con un preparado a base de extractos de hierbas chinas, observaron que los broilers con dietas suplementadas con el extracto tuvieron una mayor ingesta de alimento, y una mayor ganancia de peso comparado con los suplementados con virginiamicina y los del grupo control, entre los 7 y 21 días.

Allan y Bilkei en el año 2003 (1), encontraron una mejora de los parámetros reproductivos de cerdas a las cuales se les dio un suplemento con aceite esencial de orégano.

Los Aceites esenciales ensayados en nuestro estudio son un conjunto de aceites esenciales de plantas de la familia de las Rutaceae y Lauraceae específicamente obtenidos a partir de:

Rutaceae: *Citrus limonum*, *Citrus aurantium*, *Citrus bergamica* y *Barosma betulina*.

Lauraceae: *Cinnamomum verum*.

### Familia Rutaceae

**Tamaño:** 150 géneros, 1.500 especies.

**Distribución:** casi cosmopolita, la mayor parte tropical y subtropical y especialmente bien desarrollada en Sudáfrica y Australia.

Las tablas 4a, 4b, 4c y 4d nos muestran los principios activos de los extractos de rutáceas que se utilizaron en el estudio.

Tabla 4.- Principios activos del aceite esencial del limón (*Citrus limonum*)

MONOTERPENOS	Limoneno, alfa y gamma terpinenos, paracimeno, alfa y beta felandrenos terpinoleno
SESQUITERPENOS	Beta bisaboleno
ALCOHOLES ALIFATICOS	Hexanol, octanol, nonanol, decanol
ALDEHIDOS	Hexanal, heptanal, octanal, nonanal, geranial
CUMARINASY FURANOCUMARINAS	Escopoletina, umbeliferona, bergamotina, bergapteno, citropteno.
CITROFLAVONOIDES	Flavononas y algunas flavonas(Diosmósido, rutósido)

Tabla 4b.- Principios activos del aceite esencial de la naranja amarga (*Citrus aurantium*)

MONOTERPENOS	Mirceno, cis y trans para-miceno, limoneno, linalol, alfa terpineol, citronelol, nerol, geraniol
ESTERES	Acetatos de geranilo, nerilo, citronelilo y linalilo
ALDEHÍDOS	Nonanal, decanal, undecanal, dodecanal, geranialeral, citronelal
CUMARINAS Y FURANOCUMARINAS	Aurapteno, auraptenol, bergapteno, bargaptol, escoparona, citropteno, umbeliferota
ÁCIDOS	Diversos ácidos amargos, cítrico y málico

Tabla 4c.- Principios activos del aceite esencial de la Bergamota (*Citrus bergamica*)

MONOTERPENOS	Limoneno, linalol, nerol, geraniol, alfa -pineno, beta-pineno, paracimeno, terpineol
SESQUITERPENOS	Bergamotita, bargaptol, bergapteno
ALDEHÍDOS	Cítral
ESTERES	Acetato de nerilo, acetato de citronelilo, acetato de geranilo

Tabla 4d.- Principios activos del aceite esencial del Buchu (*Barosma betulina*)

MONOTERPENOS	Limoneno
CETOALCOHOLES	Diosfenol
CETONAS MONOTERPÈNICAS	Mentona, isomentona, pulegona, isopulegona

### 1.3 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.

No existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas (EP), como se establece para antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos.

Los métodos utilizados para evaluar actividad de extractos de plantas sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación (28).

Los métodos más comúnmente utilizados en laboratorio por su sencillez y rapidez, son:

La técnica de difusión por discos en agar, es utilizada para generar datos cualitativos principalmente, y los métodos de dilución en medio líquido de cultivo y en agar, ambos métodos nos permiten conocer datos cuantitativos (57).

#### 1.3.1 MÉTODOS EN AGAR.

Entre estos métodos el más utilizados por su sencillez y rapidez en la lectura de resultados es el método de difusión por discos, basados en la metodología utilizada por Bauer *et al.* (7). El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato, (usualmente discos de papel) en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio; se formará así, por difusión un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del producto en ese medio, de la temperatura y

de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria o microorganismos en estudio (70).

En caso de evaluación de antibióticos el medio mas utilizado es el Agar Mueller Hinton, pero en la evaluación de extractos de plantas se utilizan variedad de medios, siendo los mas utilizados, el Agar Mueller Hinton, Agar Triptona Soja, Agar Nutritivo, Agar Infusión Cerebro Corazón (15, 17, 42).

Otro método de evaluación en agar es el de dilución en agar, en éste método se incorpora el producto a evaluar a un medio con agar. El producto se añade cuando el medio aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de producto. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo (57).

Como medio de cultivo se suele utilizar el Agar Mueller Hinton como en el método de difusión por discos, aunque también se utilizan otros medios como TSA, Agar nutritivo, Agar BH, etc.

Los resultados de las pruebas de dilución en agar se expresan como Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

### 1.3.2 MÉTODOS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los aceites esenciales se realiza habitualmente, mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del aceite esencial, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo).

Se pueden realizar determinaciones empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de aceite (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La utilización de

micropipetas y de placas de microtitulación facilita la utilización del método de microdilución en caldo.

Este último método se ha venido usando para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de extractos de plantas, Carson *et al.*, en el año 1995 (21), describen la CMI como la menor concentración que mantiene o reduce la viabilidad del inóculo luego de 24 horas de contacto. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del producto a evaluar en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Teniendo en cuenta que la mayoría de microplacas tienen 96 pocillos (12x8) se puede aprovechar para ensayar hasta 11 diluciones de un producto, ya que la última columna se suele utilizar para controles de crecimiento microbiano y esterilidad del medio.

El medio de cultivo estándar utilizado para la evaluación de antibióticos por el método de dilución en caldo es el Caldo Mueller Hinton (MHB) aunque para la evaluación de CMI de extractos de plantas se utilizan caldo nutritivo (NB), Caldo Triptona Soja (TSB) y en ocasiones añadiendo suplementos como suero (14, 86, 131, 135).

#### 1.4 BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

La alimentación en Producción animal suele ser el principio de la cadena de seguridad alimentaria, es decir, una buena alimentación, con bajo riesgo de patógenos, disminuye la posibilidad de riesgo de que estos se diseminen entre los animales de la explotación y a su vez puedan pasar a la cadena alimenticia y llegar al consumidor final: el hombre. Un rebaño saludable depende de una dieta balanceada y libre de patógenos, de la calidad del agua y de reducir el *stress* por medio de un ambiente óptimo (25).

Los animales de producción: cerdos, rumiantes, aves, entre otros, son los principales reservorios para muchos de esos microorganismos, entre los que podemos citar especies de *Campylobacter*, de *Bacillus*, de *Salmonella*, de *Staphylococcus* y cepas de *Escherichia coli* entre otros (30).

A modo de ejemplo citaremos algunos patógenos de animales que pueden afectar a los humanos si ingresan en la cadena alimenticia.

Ciertas especies de *Bacillus* pueden producir toxinas como algunas cepas de *Bacillus cereus*. Kim *et al.*, en el año 2004 (75), encontraron en un aislamiento de 55 cepas de *Bacillus cereus* en Soja, que 53 de estas cepas fueron capaces de producir enterotoxina productora de diarrea. Luby *et al.*, en el año 1993 (82), reportaron un brote de diarrea en humanos por ingestión de carne de cerdo en una barbacoa, de 643 personas atendidas el 22% presentaron enfermedad, la bacteria implicada fue *Bacillus cereus* productor de toxina diarreica.

Especies de *Enterococcus* especialmente *E. faecalis* y *E. faecium*, son causa importante de hospitalizaciones, estas bacterias son patógenos que habitan en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, desde donde pueden pasar vía alimento al humano, estos patógenos suelen tener una multiresistencia a los antibióticos, y que posiblemente, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento haya contribuido a esto (34).

*Escherichia coli* es una de las bacterias que se encuentran de manera habitual en el tracto gastrointestinal de los animales, generalmente no suelen producir enfermedades en los animales, pero algunas, especialmente las cepas enterotoxigénicas y enterohemorrágicas son

responsables de brotes de enterotoxemias en humanos, la prevalencia de estas cepas en el sistema gastrointestinal de los animales, puede permitir su paso a la cadena alimenticia después del sacrificio o por consumo de alimentos o agua contaminadas por las heces de éstos. La principal vía de infección de los animales es el agua, seguida del alimento, en los animales muchas veces estas cepas no causan enfermedad visible, pero si en el humano (41).

Una de las bacterias consideradas como de principal importancia en sanidad animal y en salud pública es *Salmonella* spp, responsable de importantes brotes de salmonelosis en humanos a lo largo de la historia. Esta bacteria puede ingresar en la cadena alimenticia por infección de los animales, ya sea por el agua o el alimento, y luego diseminarse a los demás animales del corral por las heces. Si se toman las medidas adecuadas para evitar la presencia de animales portadores de la bacteria, se disminuye sin duda el riesgo de que esta llegue al hombre en un producto final.

La salmonelosis es una zoonosis considerada como la principal causa de toxiinfección alimentaria en medicina humana. Berends *et al.*, en el año 1998 (9), establecieron mediante un modelo matemático que en los Países Bajos un 15% de los brotes de *Salmonella* en el hombre estaban relacionados con procesos en cerdos. Miller *et al.*, en el año 2005 (91), mediante un modelo predictivo realizado en EEUU, cifraron en 99.430 el número de casos humanos de Salmonelosis asociados con cerdos y su correspondiente costo social en 81,53 millones de dólares.

El carácter ubicuo de las especies de *Salmonella* y la existencia de portadores asintomáticos entre las poblaciones humana y animal determinan que su control sea especialmente complejo.

A partir de diversas investigaciones se ha podido establecer que una fuente de contaminación por *Salmonella* son los piensos y las materias primas utilizadas en su elaboración (73). Davies y Wray en el año 1997 (33), en un estudio realizado en molinos de piensos, encontraron entre 1,1% a 41,7% de positivos a *Salmonella* spp, dependiendo del lugar donde se llevó a cabo el muestreo dentro del molino.



En los Estados Unidos el alimento para animales es frecuentemente contaminado con serotipos de *Salmonella* no *typhi*, que puede llevar a una infección y colonización de los alimentos derivados de estos animales.

Crump *et al.*, en el año 2002 (30), llevaron a cabo una revisión sobre la relación de la contaminación bacteriana en alimentos para animales y las enfermedades de origen alimentario en humanos, en el cual indicaron que en los Estados Unidos hay 1412498 enfermos, 16430 hospitalizaciones y 582 muertes anuales causadas por serotipos no *typhi* de *Salmonella enterica*. Estos mismos autores encontraron que una contaminación de alimentos para animales con serotipos de *Salmonella enterica* no *typhi* puede contribuir al aumento de los casos de salmonelosis en humanos.

Una alta carga de *Enterobacteriaceae* en el alimento para animales nos puede dar una indicación de probabilidad de contaminación por *Salmonella* spp en estos alimentos.

La contaminación de los insumos para piensos y de éstos mismos es muy importante, por eso una reducción de la carga bacteriana especialmente en relación con las enterobacterias es de vital importancia, lo cual nos ayudaría a reducir el riesgo de contaminación por *Salmonella* spp en el pienso acabado, este control podría realizarse mediante aditivos permitidos en la industria alimentaria. En consecuencia una correcta calidad microbiológica del pienso reduciría el riesgo de contaminación por *Salmonella* spp y otros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae* en el animal de granja, su diseminación por las heces al resto de animales de la granja, y por tanto esto podría incidir directamente en disminuir el riesgo de contaminación *post mortem* en mataderos.

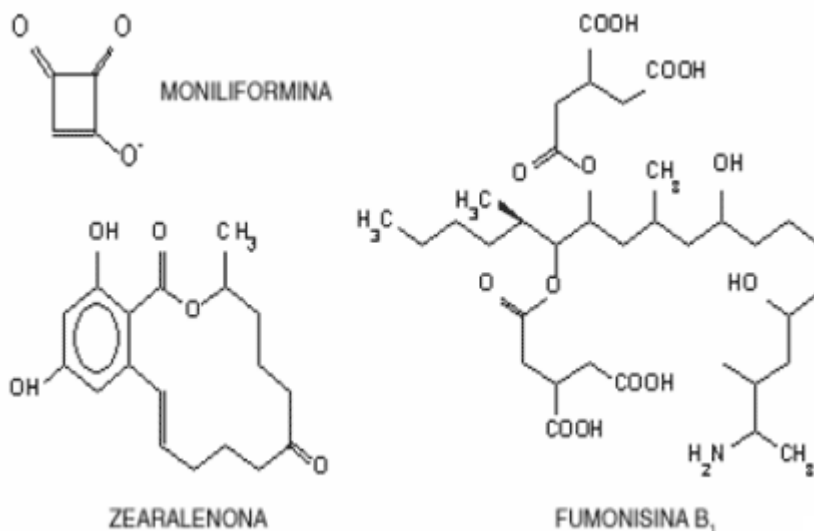
Asimismo, un factor que determina la reducción de la contaminación de carcasas de cerdos por *Salmonella* spp es la implementación de programas de análisis de riesgo y control de puntos críticos por parte de las empresas.

## 1.5 MICOTOXINAS Y MICOTOXICOSIS EN PRODUCCIÓN ANIMAL.

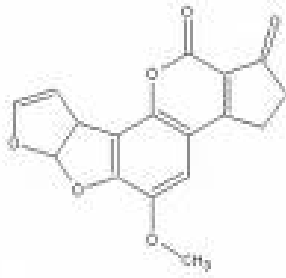
Otro problema importante en Producción animal deriva del consumo de productos que contengan micotoxinas y que originan micotoxiosis.

Definimos como micotoxiosis al grupo de procesos y trastornos originados en el hombre y los animales por unos metabolitos secundarios tóxicos denominados micotoxinas (67). Las micotoxinas son compuestos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos filamentosos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo.

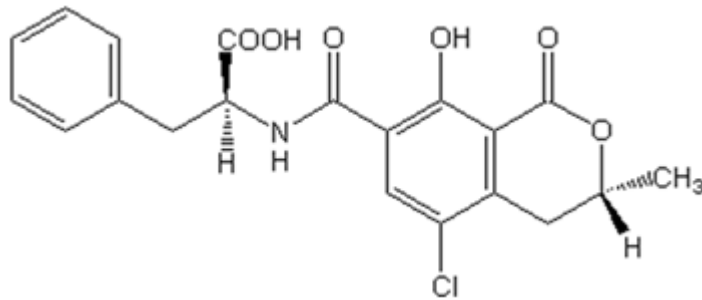
Estructuras químicas de algunas micotoxinas. Adaptado de Coulombe, R.A. 1993 (27).



Aflatoxina



Ocratoxina A



### 1.5.1 CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS.

En el caso de algunos insumos la contaminación con micotoxinas se da principalmente en el campo, como es el caso de las toxinas producidas por algunas cepas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, entre otras.

Entre las micotoxinas destacaremos a: las Aflatoxinas, las Ocratoxinas, los Tricotecenos (Deoxinivalenol o Vomitoxina, Toxina T2, Diacetoxipernol), la Zearalenona y las Fumonisinias.

Con frecuencia la presencia de micotoxinas está asociada a una contaminación fúngica capaz de ocasionar daños al propio cultivo por lo que la utilización de fungicidas es una práctica común. Sin embargo, el empleo de estos productos químicos debería hacerse con cuidado, ya que un uso inadecuado de ellos puede llevar incluso a un incremento en la contaminación debido al estrés ocasionado al hongo.

La contaminación de los granos después de la cosecha se debe principalmente a la presencia de cepas de *Aspergillus* spp y de *Penicillium* spp. Las cepas de *Aspergillus* pueden elaborar y acumular Aflatoxinas, pero también pueden producir Esterigmatocistina, ácido Ciclopiazónico, Ocratoxina A o Patulina, dependiendo de la especie que se desarrolle. En esta etapa la formación de micotoxinas se puede evitar mediante el control de la humedad desde la recepción en el almacén.

El objetivo de controlar la humedad es mantener los insumos libres de crecimiento fúngico y así evitar la formación de micotoxinas, no hay que olvidar que una vez iniciado el crecimiento fúngico, el agua producida por el metabolismo del hongo puede dificultar el secado. Es importante mencionar que el contenido de humedad considerado seguro depende del grano almacenado, por ejemplo a 20°C para el maíz, se considera alrededor del 14%, para el trigo del orden del 15% y para el cacahuete del 7%.

Rara vez se encuentra en forma aislada un solo tipo de hongo o micotoxina, y dos o más micotoxinas pueden ejercer un mayor efecto tóxico que cada una por separado, presentando un efecto sinérgico (29, 66).

La Comisión Europea mediante la directiva 2006/576/CE (diario oficial de la Unión Europea) ha adoptado una recomendación sobre la presencia en piensos de Deoxinivalenol, Zearalenona, Ocratoxina A, Toxinas T-2 y HT-2 y Fumonisinias B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, para que los Estados miembros aumenten la vigilancia de la presencia de micotoxinas en los piensos compuestos, los cereales y los productos a base de cereales destinados a la alimentación animal así como garantizar el análisis simultáneo de muestras para dichas toxinas. Por otra parte, los Estados deberían asegurar que se aplican los valores orientativos siguientes, expresados en ppm para piensos con un contenido de humedad del 12%, como criterio de aceptabilidad.

Deoxinivalenol

Cereales y productos a base de cereales: 8ppm.

Subproductos de maíz: 12ppm.

Piensos complementarios y completos para cerdos: 0,9ppm.

Zearalenona

Cereales y productos a base de cereales: 2ppm.

Subproductos de maíz: 3ppm.

Piensos complementarios y completos para lechones y nulíparas: 0,1ppm.

Para cerdas y cebo: 0,25ppm.

Ocratoxina A

Cereales y productos a base de cereales: 0,25ppm.

Piensos complementarios y completos para cerdos: 0,05ppm.

Fumonisinias B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub>

Maíz y productos a base de maíz: 60ppm.

Piensos complementarios y completos para cerdos: 5ppm.

**REAL DECRETO 465/2003 (punto 7)**Aflatoxina B<sub>1</sub>

Pienso para cerdos y aves de corral: 0.02ppm.

Piensos completos para ganado lechero. 0,005ppm

**1.5.2 PRINCIPALES MICOTOXINAS DE IMPORTANCIA EN VETERINARIA.**

Entre las principales micotoxinas por su importancia en veterinaria tenemos a las Aflatoxinas, Ocratoxinas, Fumonisinias, Tricotecenos y Zearalenona.

**1.5.2.1 Aflatoxinas**

Elaboradas y acumuladas principalmente por cepas de *Aspergillus flavus* y de *Aspergillus parasiticus*. Existen hasta el momento, 18 tipos de Aflatoxinas de las cuales la más tóxica es la Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) y la Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) (siendo ésta un derivado

metabólico de la Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) y que da como resultado un producto del metabolismo de algunos animales), que se acumula normalmente en la leche y la orina.

Siguen después en orden de mayor a menor toxicidad, las Aflatoxinas G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) y G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), siendo la Aflatoxina M<sub>2</sub>, un derivado metabólico de la Aflatoxina B<sub>2</sub> y que procede del metabolismo animal).

Las Aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales: maíz, trigo y arroz y subproductos de cereales, tortas de oleaginosas (algodón, cacahuete, colza, coco y girasol), mandioca y toda una serie de alimentos para humanos de los que destacamos productos de cereales, frutos secos, productos de salchichería, especias, vinos, leguminosas, frutas, leche y productos derivados.

Las Aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico (67), pudiendo también provocar problemas renales. Los principales órganos afectados son: el hígado, riñón y cerebro.

También son inmunosupresoras ya que inhiben la síntesis proteica interrumpiendo la síntesis del ADN y ARN, la Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) junto a la toxina T2 de *Fusarium* spp, inhibe la síntesis de proteínas y la proliferación celular (128). Estas inhibiciones pueden tener efectos selectivos en varias subpoblaciones de linfocitos.

#### 1.5.2.2 **Ocratoxinas**

Elaboradas y acumuladas esencialmente por cepas de *Aspergillus ochraceus*, de *Penicillium viridicatum* y de *Penicillium cyclopium*. Se han descrito siete tipos o derivados de Ocratoxinas, la más tóxica es la Ocratoxina A (36, 97) y por ello es la que se considera de mayor interés, descubierta en 1965 como metabolito secundario del *Aspergillus ochraceus* (138), la Ocratoxina A puede encontrarse como contaminante común en los cereales (127), subproductos de cereales, harina y torta de cacahuete y en una serie de alimentos para humanos como son, granos de café crudo, legumbres, quesos, carnes ahumadas ( jamón, tocino, embutidos).

El principal síndrome que produce es el nefrotóxico, (123). En el riñón de cerdos, el daño es caracterizado morfológicamente por atrofia de los túbulos proximales, fibrosis intersticial del cortex y una aparente preservación de los glomérulos en una fase inicial (109), pero también se producen trastornos en el hígado dando lugar a una acumulación de glucógeno en los tejidos hepático y muscular. Los órganos afectados son: el hígado y el riñón. Las Ocratoxinas son inmunosupresoras (128).

Esta toxina es particularmente importante en aves de granja y cerdos debido a que los animales monogástricos carecen de la habilidad de hidrolizar la ocratoxina A rápidamente en contraposición a los rumiantes que sí lo hacen y la convierten en Ocratoxina alfa, esta es menos tóxica (118). Los residuos de esta toxina pueden entrar en la cadena alimentaria humana por vías como la sangre o la carne.

#### 1.5.2.3 **Fumonisin**

Elaboradas principalmente por *Fusarium verticillioides*, se asocian al maíz contaminado, ingerido por personas y animales en todo el mundo (88).

Existen 6 tipos de Fumonisin, la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, la Fumonisin mas importante es la Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) (81). La exposición a la FB<sub>1</sub> produce leucoencefalomalacia (LEM) en ganado equino (27), y edema pulmonar en ganado porcino. A bajas dosis usualmente lo que se encuentra es una lesión hepática y pancreática (120). En aves produce alteración hepática, necrosis hepática e inmunodepresión. En las ovejas las Fumonisin producen nefrosis agudas.

#### 1.5.2.4 **Tricotecenos**

Entre las mas importantes tenemos toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS), Vomitoxina o Deoxinivalenol (DON) y Nivalenol (27).

Los Tricotecenos reciben este nombre por poseer en su molécula el esqueleto tetracíclico, 12,13-epoxitricotec-9-eno.

Las toxinas Tricotecenas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (maíz y subproductos, cebada, sorgo, avena, trigo y subproductos, arroz, centeno y mijo). El principal síndrome que provocan es el gastroentérico, los sistemas y órganos afectados son, el sistema digestivo, nervioso, circulatorio y la piel. Es característico de la Vomitoxina el provocar vómitos y rechazo del alimento. Los cerdos suelen ser comparativamente más sensibles a DON que otros animales con una pérdida de rendimiento, vómitos, daño hepático, y pueden llegar a morir.

#### 1.5.2.5. **Zearalenona**

Conocida anteriormente como toxina F2, la Zearalenona es una micotoxina con actividad estrogénica, aislada generalmente de una variedad de especies del género *Fusarium*, entre las que podemos citar: *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* y *F. semitectum*. Son hongos de aislamiento común en suelos y suelen contaminar los granos de cereales en países con clima templado, la contaminación ocurre generalmente antes de la cosecha (27, 148). En cerdas la Zearalenona origina problemas de hiperestrogenismo, la reducción de los animales de la camada, el efecto sobre el peso de los fetos, una alteración en el ciclo sexual (147). Estos efectos pueden variar de acuerdo a la dosis ingerida.



## 2 **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### 2.1 **OBJETIVOS**

El objetivo fundamental de esta Tesis es aportar una alternativa a los antibióticos como promotores de crecimiento animal. En este sentido se evalúan productos preparados a partir de extractos naturales, especialmente extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos.

Las hipótesis de trabajo planteadas son las siguientes:

H<sub>0</sub>: Los extractos naturales y sus mezclas con ácidos orgánicos son capaces de inhibir determinadas bacterias, hongos y sus micotoxinas, además de producir un efecto beneficioso sobre la mejora de los parámetros productivos.

H<sub>1</sub>: Los extractos naturales y sus mezclas con ácidos orgánicos no son capaces de inhibir determinadas bacterias, hongos y sus micotoxinas, ni de producir un efecto beneficioso sobre la mejora de los parámetros productivos.

Los objetivos específicos de esta investigación se resumen en:

1. Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de extractos naturales sobre bacterias y hongos de importancia en producción y sanidad animal, y su actividad al ser adicionados conjuntamente con ácidos orgánicos, determinando la metodología a seguir.
2. Evaluación de los parámetros microbiológicos y productivos de cerdos al suministrarles piensos adicionados de extractos naturales mezclados con ácidos orgánicos, como promotores de crecimiento.

## 2.2 PLAN DE TRABAJO

El Plan de Trabajo seguido, se resume en:

1. Revisión exhaustiva de la bibliografía sobre ácidos orgánicos, extractos naturales, con énfasis especial en actividades biológicas de los mismos y posible importancia y aplicación en Producción Animal.
2. Obtención de las muestras de productos a evaluar: extractos de Rutáceas, otros extractos naturales, ácidos orgánicos, y mezcla de extractos naturales y ácidos orgánicos. Los productos fueron elaborados y suministrados por diversas empresas del sector.
3. Ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los productos elegidos.
4. Obtención de Concentraciones mínimas inhibitorias de los productos evaluados, que nos permitan establecer la actividad del producto frente a determinados microorganismos.
5. Ensayos de actividad antimicrobiana de los productos seleccionados por las empresas proveedoras, en base a su relación eficacia-costo, con el fin de establecer la evolución de la contaminación microbiana en sustratos contaminados con bacterias y hongos y tratados con los productos en estudio.
6. Evaluación de la capacidad antifúngica de productos seleccionados sobre *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 así como de su capacidad de inhibición o control de la producción de ocratoxina A.
7. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido de la acción *in vitro* de un extracto de Rutáceas sobre *Salmonella typhimurium* FVB576 y *Bacillus subtilis* FVB19.

8. Evaluación de la actividad enzimática del extracto de Rutáceas y de la modificación de la capacidad enzimática observada en bacterias tratadas con el extracto.
9. Elección de productos para su evaluación en pruebas de campo con animales.
10. Estudio de la eficacia de los productos utilizados en la mejora de los parámetros productivos y evaluación de su actividad sobre la microbiota entérica de los animales.

### 3 **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### 3.1 **MATERIAL Y MÉTODOS PARA LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN *IN VITRO***

##### 3.1.1 MATERIAL

Los estudios experimentales *in vitro* se llevaron a cabo con siete cepas bacterianas y cuatro cepas fúngicas procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC) o de la Colección de cultivos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (FVB), elegidas entre aquellas consideradas de mayor interés como contaminantes de productos destinados al consumo animal.

##### 3.1.1.1 **Cepas Bacterianas**

*Escherichia coli* FVB467.

*Salmonella typhimurium* FVB576.

*Proteus mirabilis* FVB465.

*Bacillus subtilis* FVB19.

*Staphylococcus aureus* FVB13.

*Pseudomonas aeruginosa* FVB15.

*Enterococcus faecalis* FVB18.

##### 3.1.1.2 **Cepas Fúngicas**

*Aspergillus flavus* FVB51.

*Aspergillus ochraceus* ATCC 2948.

*Aspergillus parasiticus* ATCC 2681.

*Fusarium moniliforme* FVB52.

### 3.1.1.3 **Productos a evaluar**

Los productos a evaluar se dividen de acuerdo a su composición en:

- Extractos de Rutáceas (ER)
- Extracto no Rutáceo (EN)
- Ácidos orgánicos (AO)
- Mezclas de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos (ER/AO)
- Otros.

Los productos ensayados se dividieron en 4 grupos de acuerdo a la empresa suministradora: A, B, C y D.

En la Tabla 6.a, podemos apreciar los productos del grupo A.

Tabla 6.a.- Productos del grupo A.

<b>Código</b>	<b>Tipo de producto</b>
<b>1</b>	ER/AO
<b>2</b>	ER/AO
<b>3</b>	ER
<b>4</b>	Aceite de canela
<b>5</b>	ER/AO

ER: Extracto de Rutáceas    ER/AO: Extracto de Rutáceas más ácidos orgánicos

AO: Ácidos orgánicos    EN: Extracto no Rutáceo

En la Tabla 6.b se indican los productos del grupo B.

Tabla 6.b.- Productos del grupo B.

<b>Código</b>	<b>Tipo de producto</b>	<b>Código</b>	<b>Tipo de producto</b>
6	Formol	16	ER/AO
7	Ácido fórmico	17	ER/AO
8	Ácido propiónico	18	ER/AO
9	Ácido láctico	19	ER/AO
10	Ác. láctico+Ác. Acético	20	ER/AO
11	Ácido acético	21	ER/AO
12	Propionato sódico	22	ER/AO
13	ER	23	ER/AO
14	EN	24	ER/AO
15	ER/AO	25	ER/AO

ER: Extracto de Rutáceas ER/AO: Extracto de Rutáceas mas ácidos orgánicos

AO: Ácidos orgánicos EN: Extracto no Rutáceo

La Tabla 6.c, corresponde a los productos del grupo C.

Tabla 6.c.- Productos del grupo C.

<b>Código</b>	<b>Tipo de producto</b>	<b>Código</b>	<b>Tipo de producto</b>
26	EN	32	EN/AO
27	EN	33	EN/AO
28	EN	34	EN/AO
29	EN/AO	35	EN
30	EN/AO	36	EN
31	EN/AO		

ER: Extracto de Rutáceas ER/AO: Extracto de Rutáceas mas ácidos orgánicos

AO: Ácidos orgánicos EN: Extracto no Rutáceo

En la Tabla 6.d, se aportan los productos del grupo D.

Tabla 6.d.- Productos del grupo D

<b>Código</b>	<b>Producto</b>	<b>Tipo de producto</b>
<b>37</b>	1,8 Cineol	Monoterpeno
<b>38</b>	Acetato de Bencilo	Aromatizante
<b>39</b>	Geraniol	Alcohol monotérmico
<b>40</b>	Citronelal	Monoterpeno
<b>41</b>	Formiato de Bencilo	Aromatizante
<b>42</b>	Citronelol	Alcohol monotérmico
<b>43</b>	Salicilato de metilo	Aromatizante
<b>44</b>	Citral	Aldehido aromático

### 3.1.1.4 **Medios de Cultivo y Soluciones Utilizadas (Composición y Preparación)**

#### 3.1.1.4.1 **Agar Mac Conkey**

Digestivo pancreático de Gelatina	17,0g
Complejo de peptonas	3,0g
Lactosa	10,0g
Sales Biliares N° 3	1,5g
Cloruro de Sodio	5,0g
Rojo Neutro	0,03g
Cristal Violeta	0,001g
Agar	13,5g

Añadir 50g a 1000mL de agua destilada, llevar a ebullición hasta completa disolución, autoclavar a 121° C durante 15 minutos, enfriar a 45-50°C y distribuir en placas de Petri estériles.

#### 3.1.1.4.2 **Agar Triptona Soja (TSA)**

Digestivo Pancreático	15g
Peptona de Soja	5g
Cloruro de Sodio	5g
Agar	15g

Añadir 40g a 1000mL de agua destilada, llevar a ebullición, autoclavar a 121°C durante 15 minutos, enfriar a 45-50°C y distribuir en placas de Petri estériles.



**3.1.1.4.3 Agar SS (*Salmonella-Shigella*)**

Extracto de Carne	5,0g
Extracto de levadura	5,0g
Peptona	5,5g
Lactosa	10,0g
Citrato sódico	1,0g
Tiosulfato sódico	8,5g
Citrato Férrico de Amonio	1,5g
Sales Biliares nº 3	1,5g
Verde Brillante	0,00033g
Rojo Neutro	0,025g
Agar	15,0g

Suspender 52g en 1000mL de agua destilada, llevar a ebullición hasta completa dilución. Distribuir en placas de Petri estériles. No debe esterilizarse.

**3.1.1.4.4 Agar Baird Parker.**

Digestivo Pancreático de Caseína	10g
Extracto de carne	5g
Extracto de Levadura	1g
Cloruro de litio	5g
Glicina	12g
Piruvato sódico	10g
Agar	15g

Suspender 58g del medio deshidratado en 1000mL de agua destilada y disuélvase. Caliéntese hasta que disuelva completamente. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 45-50°C y adicionar 50mL de una solución de yema de huevo con telurito potásico al 1% (Liofilchem s.r.l) y se distribuye en placas de Petri estériles.

**3.1.1.4.5 Agar Man Rogosa Sharpe (MRS)**

Peptona	10g
Extracto de carne	8g
Extracto de levadura	4g
D (+) Glucosa	20g
Acetato de Sodio	5g
Citrato tri amonio	2g
Sulfato de Magnesio	0,20g
Sulfato de Manganeso	0,05g
Fosfato de Potasio	2g
Polisorbato 80	1g
Agar	14g

Suspender 66g del medio deshidratado en 1000mL de agua destilada y disuélvase. Calientese hasta que disuelva completamente. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 45-50°C, se distribuye en placas de Petri estériles.

**3.1.1.4.6 Agar Ceftrimida (base)**

Peptona de gelatina	20g
Cloruro de magnesio	1,4g
Sulfato potásico	10g
N-cetil-N,N,N,-trimetilamonibromuro (Ceftrimida)	0,3g
Agar-agar	13g

Disolver 44g en 1000mL de agua destilada, añadir 10mL de glicerina, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C) y verter en placas de Petri estériles. pH: 7,2 +/- 0,2.

**3.1.1.4.7 Agar Sabouraud (SDA)**

Caseína de digestión pancreática	5g
Tejido animal de digestión péptica	5g
Glucosa	40g
Agar	15g

Añadir 65g a 1000mL de agua destilada, llevar a ebullición, autoclavar a 121°C durante 15 minutos, enfriar a 45-50°C y distribuir en placas de Petri estériles.

**3.1.1.4.8 Agar Patata Glucosa (PDA)**

Infusión de Patatas	200g
Glucosa	20g
Agar Bios LL	17g

Añadir 42g a 1000mL de agua destilada, llevar a ebullición, autoclavar a 121°C durante 15 minutos, enfriar a 45-50°C y distribuir en placas de Petri estériles.

**3.1.1.4.9 Agar Azida Sódica**

Peptona	15,0g
Extracto de carne	4,5g
Cloruro de sodio	7,5g
Azida sódica	0,2g
Agar	15,0g

Suspender 34,7g en 1000mL de agua destilada, calentar hasta que disuelva completamente, distribuir en tubos y autoclavar a 121°C por 15 minutos.

**3.1.1.4.10 Caldo Triptona Soja (TSB)**

Digestivo Pancreático	17,9g
Digestivo Papaínico de Soja	4,0g
Cloruro de Sodio	6,0g
Fosfato monopotásico	2,5g
Agar	15,0g

Añadir 30,4g a 1000mL de agua destilada, hervir hasta la mezcla total del medio, distribuir en tubos y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

**3.1.1.4.11 Caldo Sabouraud**

Peptona	10g
Glucosa	40g

Añadir 30g a 1000mL de agua destilada, hervir hasta la mezcla total del medio, distribuir en tubos y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

**3.1.1.4.12 Solución de Ringer**

Cloruro de sodio	2,250g
Cloruro de calcio	0,120g
Bicarbonato de sodio	0,050g
Cloruro de potasio	0,015g

Disolver 2,5g/1000mL de agua destilada, para obtener una solución isotónica para células procariotas y 10g/1000mL de agua destilada, para una solución isotónica para células eucariotas.

### 3.1.1.5 **Productos químicos**

- Ácido Fórmico pureza 85%.
- Ácido Propiónico pureza 85%.
- Alcohol etílico.
- Alcohol isoamílico.
- Glutraldehído al 50%.
- Tetróxido de Osmio (Sigma).
- PBS (Calbiochem pH 7,4).
- Acido Cacodílico, sal sódica.

### 3.1.1.6 **Material general de laboratorio**

El material de uso común en laboratorio usado en nuestros trabajos tenemos: puntas para micropipetas (de 200 $\mu$ L, a 1000 $\mu$ L ) gradillas, tubos vidrio, microplacas fondo U x 96 pocillos, placas de Petri de 90mm diámetro, gradillas, embudos, matraces, probetas, cubetas de espectrofotómetro, asas de platino, hisopos estériles, guantes, mecheros bunsen, parafilm, etc.

### 3.1.1.7 **Instrumentos de laboratorio**

- Centrífuga refrigerada Sigma.13500 rpm. Modelo 202-M.
- Congelador (-20°C) Philips.
- Frigorífico (4-8°C) Zanussi.
- Cámara de flujo laminar vertical IDL 48 RV (INDELAB, Navarra. España).
- Espectrofotómetro Cecil<sup>®</sup> CE 303 Serie 2.
- Vortex de 0 a 3000rpm. (VELP SCIENTIFICA<sup>®</sup>. ZX Classic).
- Balanza 0,01- 1000 gramos Mettler PE 3600 (Delta Range<sup>®</sup>).
- pHmetro Hanna<sup>®</sup> (pH3-10 ± 0,01).
- Micropipetas de diversa graduación (5-40 µL, 40-200 µL,) Finnpiptette. ThermoLabsystems<sup>®</sup>.
- Pipeta multicanal,(40-200 µL) Finnpiptette . ThermoLabsystems.
- Estufa para aerobios 37°C modelo B 5060E, (Heraeus electronic ).
- Estufa 28°C (Heraeus electronic ).
- Autoclave Autester-E.
- Microscopio óptico bifocal. Lan Optics.
- Horno microondas 800 watts. Marca Taunus.
- Lector de densidad óptica para placas de Elisa. Stat Fax modelo 321/plus.
- Metalizador Ion Sputtering IQS-ELQUM-USO-I-0003.
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 5310.

### 3.1.2 MÉTODOS

La metodología desarrollada, en las diversas pruebas realizadas se describe a continuación.

#### 3.1.2.1 **Preparación de inóculos bacterianos para las diversas pruebas**

Para la preparación de los inóculos bacterianos se procedió en primer lugar a la siembra e incubación de las bacterias en las condiciones específicas para cada género, siguiendo las pautas indicadas en la Tabla núm. 7.

Tabla núm. 7.- Bacterias utilizadas en las pruebas y sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.

<b>Bacteria</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Condiciones de incubación</b>
<i>Escherichia coli</i> FVB467	Agar Mac Conkey	37°C por 24 horas
<i>Proteus mirabilis</i> FVB465	Agar Mac Conkey	37°C por 24 horas
<i>Salmonella typhimurium</i> FVB576	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	37°C por 24 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FVB15	Agar Cetrimida	37°C por 24 horas
<i>Bacillus subtilis</i> FVB19	Agar Triptona soja	37°C por 24 horas
<i>Staphylococcus aureus</i> FVB13	Agar Baird Parker	37°C por 24 horas
<i>Enterococcus faecalis</i> FVB18	Agar Azida Sódica	37°C por 24 horas

Obtenidos los cultivos y comprobado que se trata de cultivos axénicos, se prepara una suspensión de cada uno de ellos a partir de 3-4 colonias de cada bacteria que son inoculadas en un tubo con en 5mL de TSB. Los tubos así preparados se incubaron entre 3 a 5 horas a 37°C hasta observar turbidez.

A continuación, se ajustó el inóculo a la concentración correspondiente al 0,5 de la escala de Mac Farland y posteriormente y mediante un espectrofotómetro (Cecil® CE 303) con longitud de onda a 625 nanómetros, se valoró la suspensión obtenida que debe estar

ajustada en el rango de 0,08 a 0,1 equivalente a  $1-2 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonia/mililitro (UFC/mL).

### 3.1.2.2 Preparación de inóculos fúngicos para las diversas pruebas

El medio elegido fue Agar Patata Dextrosa, se procedió a sembrar una suspensión de la cepa con un hisopo sobre la superficie de la placa. Inoculadas las placas, se incubaron por espacio de 72-96 horas a 28°C con el fin de obtener una esporulación adecuada.

En la Tabla núm. 8, se indican muestra las cepas fúngicas utilizadas, el medio y condiciones de cultivo.

Tabla núm. 8.- Relación de hongos miceliares utilizados en las pruebas y sus respectivos medios y condiciones de cultivo.

Hongos	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATTC 2948	Agar Patata Glucosa	28°C 72-96 horas
<i>Aspergillus parasiticus</i> ATTC 2681	Agar Patata Glucosa	28°C 72-96 horas
<i>Aspergillus flavus</i> FVB51	Agar Patata Glucosa	28°C 72-96 horas
<i>Fusarium moniliforme</i> FVB52	Agar Patata Glucosa	28°C 72-96 horas

Se determinó el recuento de unidades formadoras de colonias por mL., para ello se procede en primer lugar a preparar una concentración inicial de conidios en solución de Ringer con un 0,05% de Tween 80. Con el fin de separar los restos de micelio que puedan interferir, se procedió a una filtración por medio de una gasa estéril. Una vez obtenida la suspensión de conidios, se procedió al recuento de las UFC/mL. Se preparó un banco de diluciones decimales. Posteriormente, se procedió a sembrar 100µL de las diluciones 4, 5, 6 y 7 en placas de agar Sabouraud.



Las placas se incubaron a 28°C por 48 horas, transcurrido este período de tiempo se lleva a cabo el recuento de unidades formadoras de colonias por placa y se estableció la concentración por mL (UFC/mL)

### 3.1.2.3 **Métodos *in vitro* para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos**

A continuación detallaremos la metodología utilizada para evaluar *in vitro* la capacidad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos.

#### 3.1.2.3.1 **Método de difusión en agar por discos.**

Este método lo aplicamos para evaluar la capacidad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos sobre bacterias y hongos.

##### 3.1.2.3.1.1 Ensayo con bacterias

El método es el descrito por Bauer *et al.* en el año 1966 (7), y modificado por Calvo y Asensio en el año 1999 (14). El medio de cultivo utilizado fue agar Triptona Soja (TSA). Los inóculos bacterianos utilizados fueron del orden de  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Las placas de Petri de 90mm de diámetro, contenían el medio de cultivo, que debe tener una profundidad del agar en la placa de 4mm para evitar alteraciones en la difusión del contenido de los discos (70).

De cada una de las cepas bacteriana se depositaban 0.1mL del inóculo en la placa y por medio de un escobillón estéril y siguiendo tres direcciones se conseguía una buena dispersión del inóculo que se dejaba reposar durante 15 minutos.

Paralelamente se esterilizan discos de 6mm de diámetro (Schleicher & Schuell®) que se impregnaban con los productos a ensayar a las concentraciones ya determinadas. Después de eliminar el exceso de producto, se depositaban los discos de forma simétrica, con ayuda de una pinza previamente esterilizada.

Las placas se incubaron por espacio de  $24 \pm 2$  horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa de aerobiosis y transcurrido el período de incubación indicado se procedía a la observación y medida de las zonas de inhibición de crecimiento que se expresan aplicando la fórmula:

$$\text{Valor de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{Diámetro del disco (6mm)}}{2}$$

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se realizan cultivos control de todas las cepas para comprobar su viabilidad.

#### 3.1.2.3.1.2 Ensayo con hongos miceliares

El medio de cultivo utilizado fue Agar Sabouraud (SDA). Los inóculos bacterianos utilizados son del orden de  $1-2 \times 10^6$  UFC/mL. Las placas de Petri de 90mm de diámetro, contenían el medio de cultivo que debe tener una profundidad del agar en la placa de 4mm. para evitar alteraciones en la difusión del contenido de los discos.

De cada una de las cepas fúngicas, se depositaban 0.1mL del inóculo en la placa y por medio de un escobillón estéril y siguiendo tres direcciones se conseguía una buena dispersión del inóculo que se dejaba reposar durante 15 minutos.

Paralelamente se esterilizan discos de 6mm de diámetro (Schleicher & Schuell®) que se impregnaban con los productos a ensayar a las concentraciones ya determinadas. Después de eliminar el exceso de producto, se depositaban los discos de forma simétrica, con ayuda de una pinza previamente esterilizada.

Las placas se incubaron por espacio de  $48 \pm 2$  horas a  $28^{\circ}\text{C}$  en estufa de aerobiosis y transcurrido el período de incubación indicado se procedía a la observación y medida de las zonas de inhibición de crecimiento que se expresan aplicando la misma fórmula que se aplica a bacterias y que se describe a continuación.

Valor de inhibición =  $\frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{Diámetro del disco (6mm)}}{2}$

2

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se realizan cultivos control de todas las cepas para comprobar su viabilidad.

### 3.1.2.3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana por volatilización de componentes (técnica del Aromatograma)

En los métodos de difusión en placa, algunos de los componentes de los aceites esenciales y sus componentes, al ser volátiles y/o tener poca solubilidad en agua (hidrofóbicos), no se puede llegar a evidenciar correctamente su posible actividad antimicrobiana. Para valorar este parámetro, los extractos ensayados en este estudio, fueron investigados por el método descrito por Ross *et al.*, en el año 2001 (119).

Para tal fin, se prepararon placas de TSA, inoculadas con *Escherichia coli* FVB467 como especie bacteriana representativa y placas de SBA inoculadas con *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 como especie de interés y representativa entre los hongos. Al igual que en el ensayo de difusión por discos, se dejó reposar unos 15 minutos. A continuación, se invirtió la placa y en la parte de la tapa se colocó un disco estéril, impregnado con 15µl del extracto en estudio, sin diluir.

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se mantuvieron placas control del crecimiento. Las placas se incuban a 37°C por espacio de 24 ± 2 horas en el caso de las bacterias y 28°C por 48 horas para el caso de hongos, todas las placas fueron selladas con cinta Parafilm, una vez acabado el tiempo de incubación se determinó la posible inhibición del crecimiento bacteriano comparándola con una placa control.

Los productos ensayados en la prueba de aromagrama han sido:

3 (Extracto de Rutáceas)	4 (Aceite de canela)
26, 27, 28, 35 y 36 (Extractos no Rutáceos)	37 (1,8 Cineol)
39 (Geraniol)	40 (Citronelal)
42 (Citronelol)	44 (Citral)

### 3.1.2.3.3 **Método de estudio de la capacidad de inhibición microbiana por dilución en microplacas**

Esta metodología la aplicamos para el estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los productos a evaluar tanto para bacterias como para hongos.

#### 3.1.2.3.3.1 Ensayo con bacterias

La técnica aplicada es una variación de la utilizada por Eloff en el año 1998 (39). El ensayo se desarrolló sobre microplacas de 96 pocillos con fondo en 'U' (RUBILABOR S.L.). En los análisis con aceites esenciales que son insolubles en medio líquido se utilizó como emulsificante una mezcla de TSB y agar al 0.15%.

En la primera serie de pocillos se deposita el producto a evaluar previamente diluido en TSB o TSB + agar 0,15%, según sea el caso, a 32000ppm, (100µL) y en los otros pocillos de la placa 50µL de TSB. Se preparan diluciones seriadas a partir de la primera serie de pocillos y a continuación se adicionan 50µL de una concentración del microorganismo ( $1-1,5 \times 10^6$  UFC/mL), así se reduce el inóculo del microorganismo a un inóculo final de entre  $5-7 \times 10^5$  UFC/mL, y también se reduce la primera dilución de los productos a 16000ppm (Volumen final para todos los pocillos de 100µL), la fila 12 se deja para controles positivos y negativos.

Antes de incubar, para controlar que el inóculo final sea el correcto, se toman 10µL de uno de los pocillos de los controles positivos y se diluye en 10mL de solución de Ringer y de

aquí se toman 100µL y se siembran en 3 placas de TSA a 37°C por 24 horas para comprobar el crecimiento, éste debe estar comprendido entre 50-70 UFC por placa.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado. Se consideró que el resultado del ensayo era válido si entre cada réplica no había una variación en  $\pm$  una dilución y si los controles positivos estaban entre los valores indicados (caso contrario se descartaba y se repetía la prueba).

Las microplacas, se incubaron a 37°C en aerobiosis, por espacio de 18-24 horas. Finalizada la incubación, se adicionan 40µL de una solución de sales de violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT) (Sigma®) a esta, a una concentración de 0,2 mg/mL de INT. Se mantiene a 37°C entre 30 a 60 minutos y se procede a la lectura de resultados. La solución de sales es un indicador de actividad biológica dado que sus componentes actúan como aceptores de electrones y son reducidos, desencadenando color cuando hay actividad de los microorganismos y quedando incoloro en caso contrario.

#### 3.1.2.3.3.2 Ensayo con hongos miceliares

Esta basado en el método descrito en el apartado anterior, el medio de cultivo utilizado para la dilución es Agar Sabouraud (SDB), salvo para los aceites esenciales que fueron insolubles en él, para los cuales se utilizó SDB + 0,15% de agar. El inocular final para hongos fue del orden de  $5-7 \times 10^4$  UFC/mL.

El tiempo de incubación fue de 48 horas a 28°C y para la lectura de resultados no es preciso añadir ningún colorante vital. Las lecturas se hicieron visualmente y se consideró la concentración mínima inhibitoria como la menor concentración en la cual no se observó crecimiento.

#### 3.1.2.3.4 **Inhibición bacteriana y fúngica por aceites esenciales, ácidos orgánicos y mezclas de ambos, sobre pienso acabado y cebada en grano.**

El objetivo de este apartado, ha sido evaluar la capacidad inhibidora de diversos aditivos: Ácido propiónico, ácido fórmico, aceites esenciales y mezcla de ambos productos adicionados a cebada en grano y pienso en polvo a fin de controlar la presencia de *Escherichia coli* FVB467 y *Aspergillus flavus* FVB51.

Se dispusieron 100g de cada alimento en matraces y se autoclavaron a 121°C por 20 minutos, la cantidad de matraces preparados fue la necesaria para hacer lectura de 24 horas (blancos) y de 7 y 14 días.

La mitad de los matraces se inocularon con 1,5mL de una suspensión de *Escherichia coli* FVB 467 ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) y la otra con 1,5mL de una suspensión  $1 \times 10^7$  UFC/mL de *Aspergillus flavus* FVB51. A la par se adicionaron los aditivos a los diversos matraces, los productos fueron a adicionados a las siguientes proporciones, ácido propiónico, fórmico y los productos mezcla de aceites esenciales y ácidos a 2000ppm y los aceites esenciales solos a 1000ppm, tras la adición se homogenizaron bien con el contenido.

Los matraces cerrados e inoculados y los controles blancos, se incubaron a temperatura ambiente (20-25°C) por 14 días, para mantener la humedad se adicionó 1,5mL de agua desionizada estéril en el día 3 y 8 de iniciado el ensayo.

Para realizar las lecturas a los días indicados se procedió a pesar un gramo de cada matraz y proceder a realizar diluciones decimales en solución de Ringer para establecer los recuentos de UFC/mL en base a estas diluciones.

Las siembras de las diluciones se sembraron en TSA a 37°C por 24 horas en condiciones de aerobiosis, en el caso de los ensayos con bacterias y en SDA a 28°C por 72 horas, en el caso de los hongos.

En la Tabla número 9 se muestran los productos y las dosis usadas en las pruebas de inhibición fúngica y bacteriana sobre pienso y grano.

Tabla núm. 9 Productos y dosis utilizadas como inhibidores en la prueba.

<b><u>PRODUCTO</u></b>	<b><u>DOSIS</u></b>
<b>Ácido Fórmico</b>	<b>2000ppm</b>
<b>Ácido Propiónico</b>	<b>2000ppm</b>
<b>Propionato Sódico</b>	<b>2000ppm</b>
<b>Producto 13 (ER)</b>	<b>1000ppm</b>
<b>Producto 14 (EN)</b>	<b>1000ppm</b>
<b>Producto 15 (ER/AO)</b>	<b>2000ppm</b>
<b>Producto 19 (ER/AO)</b>	<b>2000ppm</b>
<b><u>Producto 21 (ER/AO)</u></b>	<b><u>2000ppm</u></b>

ER: Extracto de Rutáceas      ER/AO: Extracto de Rutáceas adicionado de ácidos orgánicos

EN: Extracto no Rutáceo

### 3.1.2.3.5 **Degradación *in vitro* de micotoxinas por una mezcla de aceites esenciales de Rutáceas y ácidos orgánicos.**

Para realizar este experimento se puso en contacto una solución de cada micotoxina a evaluar en una concentración conocida y se les aplicó el producto a evaluar a una concentración de 2000ppm, en medio líquido. Para la cuantificación de las micotoxinas se trabajó con un sistema ELISA competitivo directo, que provee concentraciones exactas en partes por billón (ppb) de aflatoxina y de ocratoxina A libre, y en partes por millón (ppm) para deoxinivalenol y zearalenona. En cada ensayo específico, la micotoxina a evaluar compete con una enzima marcadora de la toxina (conjugado) por los anticuerpos que tapizan los pocillos, después de un paso de lavado, el sustrato reacciona con la enzima ligada al conjugado y produce un color azul, se utiliza un lector de microplacas para medir las densidades ópticas.

Las densidades ópticas de los controles, permiten construir una curva patrón y las densidades ópticas de las muestras son enfrentadas a la curva para calcular la concentración exacta de micotoxina.

#### 3.1.2.3.5.1 Metodología de ELISA aplicada a micotoxinas

La metodología utilizada es muy parecida para las diferentes micotoxinas de interés, con algunas modificaciones de una a otra tal como se indica a continuación.

##### 3.1.2.3.5.1.1 Aflatoxinas

Existen algunos pasos que se deben seguir para realizar correctamente la prueba:

##### 3.1.2.3.5.1.1.1 *Preparación de la muestra y extracción*

Las muestras deben de estar conservadas entre 2 y 8°C hasta el momento de su análisis. La metodología a seguir fue la siguiente:



- ✓ Preparar una solución Metanol: Agua destilada en proporción 70:30.
- ✓ Homogenizar la muestra a analizar tanto como sea posible.
- ✓ Mezclar 5g de muestra con 25mL de la solución de metanol 70:30 y agitar vigorosamente durante 3 minutos.
- ✓ Filtrar el extracto: este extracto es la muestra de partida (el pH tendría que oscilar entre 6 y 8, en caso contrario se debe de corregir).

### 3.1.2.3.5.1.1.2 Procedimiento

Los reactivos se tienen que dejar atemperar a temperatura ambiente antes de su uso. La secuencia de pasos a seguir es la siguiente:

- Preparar tantos pocillos rojos como muestras a analizar hayan, y agregar cuatro mas para los controles. Se colocan en el soporte de pocillos.
- Preparar la misma cantidad de pocillos calculados en este caso transparentes (tapizados con anticuerpos).
- Mezclar cada uno de los reactivos antes de su uso.
- Poner en una cubeta ELISA un volumen de conjugado (botella con etiqueta azul). Con la pipeta multicanal añadir 100 $\mu$ L a cada pozo, y mezclar sobre una superficie plana durante 10-20 segundos.
- Inocular 100 $\mu$ L de los controles y de las muestras a sus pozos rojos correspondientes, siguiendo la pauta:        0   5   15   50   M1   M2   M3   M4   M5   M6   M7   M8
- Mezclar el contenido de los pozos con la pipeta multicanal, haciendo movimiento de aspirar y dejar tres veces, y transferir el contenido de los pozos a sus homólogos transparentes. Mezclar durante 20 segundos sobre una superficie plana e incubar 2 minutos a temperatura ambiente. Eliminar los pozos rojos.
- Vaciar los pozos y limpiarlos con agua destilada cinco veces, eliminando completamente el agua que queda.
- Poner en una cubeta ELISA un volumen de sustrato (botella con etiqueta verde). Con la pipeta multicanal agregar 100 $\mu$ L a cada pozo, y mezclar sobre una superficie plana durante 10-20 segundos. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.

- Poner en una cubeta ELISA un volumen de solución Stop (botella con etiqueta roja). con la pipeta multicanal añadir 100 $\mu$ L a cada pozo, y mezclar sobre una superficie plana durante 10-20 segundos.
- Secar la parte inferior de los pozos suavemente y colocar los pozos en el lector.
- Elegir el Programa 2 del lector y proceder a la lectura de los pozos.

#### 3.1.2.3.5.1.2 Ocratoxina A

Al igual que para aflatoxina debemos seguir los siguientes pasos:

##### 3.1.2.3.5.1.2.1 *Preparación de la muestra y extracción*

La extracción de la Ocratoxina A con metanol al 50% con agua desionizada (metanol grado ACS) la proporción materia prima/metanol 50%, es de 1 parte de materia prima por 4 partes de metanol, se agita por unos 5 minutos, se filtra a través de papel Whatman # 1, se guarda una alícuota de unos 5-10mL y se conserva en temperatura de refrigeración hasta que se proceda a su análisis.

##### 3.1.2.3.5.1.2.2 *Procedimiento*

Se procede de la misma forma que para análisis de Aflatoxinas, con las diferencias especificadas por el fabricante. Los controles usados son de 0, 2, 5, 10 y 25ppb de OTA.

##### 3.1.2.3.5.1.3 Deoxinivalenol (DON)

Se procede de la misma forma que para análisis de Aflatoxinas, con las diferencias especificadas por el fabricante, Neogen<sup>®</sup>. Los controles usados son de 0, 0,25, 0,5, 1 y 3ppm de DON.

##### 3.1.2.3.5.1.4 Zearalenona

Se procede de la misma forma que para análisis de Aflatoxinas, con las diferencias especificadas por el fabricante, Neogen<sup>®</sup>. Los controles usados son de 0, 50, 150, 300 y 600ppm de Zearalenona.

### 3.1.2.3.6 **Método para evaluar la capacidad de inhibición de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 y de la producción de Ocratoxina A sobre dos sustratos vegetales por aceites esenciales y una mezcla de estos con ácidos orgánicos.**

Se evaluó la capacidad de inhibición de un grupo de aceites esenciales y de una mezcla de éstos con ácidos orgánicos sobre el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 y su capacidad de elaborar y acumular Ocratoxina A (OTA) sobre dos sustratos diferentes.

#### 3.1.2.3.6.1 Productos

Los productos ensayados han sido una mezcla de aceites esenciales de Rutáceas, producto 3 (ER) y una mezcla de ácidos orgánicos y extracto de Rutáceas, producto 5.

#### 3.1.2.3.6.2 Microorganismo

El microorganismo utilizado fue una cepa de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 productora de OTA. Se cultivó la cepa a 28°C en agar patata dextrosa (PDA) hasta que tenga un buen grado de esporulación 5-8 días. La concentración de la suspensión se ajustó a 10<sup>6</sup> UFC/mL.

#### 3.1.2.3.6.3 Sustratos de cultivo

El primer sustrato utilizado fue maíz, se dispusieron 25g de maíz y 5mL de agua desionizada por cada matraz.

Como segundo sustrato se utilizó arroz, se pesaron 10g y se adicionaron 5mL de agua desionizada a cada matraz. Los matraces conteniendo arroz y maíz fueron autoclavados a 120°C por 20 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de su inoculación.

#### 3.1.2.3.6.4 Procedimiento y determinación de crecimiento fúngico.

Los matraces con maíz y arroz se ajustaron con las concentraciones de los productos inhibidores, estas fueron del orden de 500, 1000 y 2000ppm para el producto 3 (P3); y de 1000 y 2000ppm para el producto 5 (P5).

Los matraces con maíz se inocularon con 1mL de la suspensión fúngica del orden de  $10^6$  UFC/mL y los matraces con arroz se inocularon con 0,75mL de la suspensión fúngica. Se uso un matraz conteniendo solo la suspensión fúngica y el sustrato correspondiente, los cuales sirvieron como controles de crecimiento.

Todos los matraces se incubaron a 28°C y se hicieron lecturas a los 7 días, incluidos los controles de crecimiento.

Para determinar el crecimiento fúngico se obtuvieron alícuotas de 1g del contenido previamente homogenizado de cada matraz y realizaron diluciones decimales, sembrando 0,1mL de cada dilución por duplicado en agar Sabouraud a 28°C, haciendo la lectura a las 72 horas.

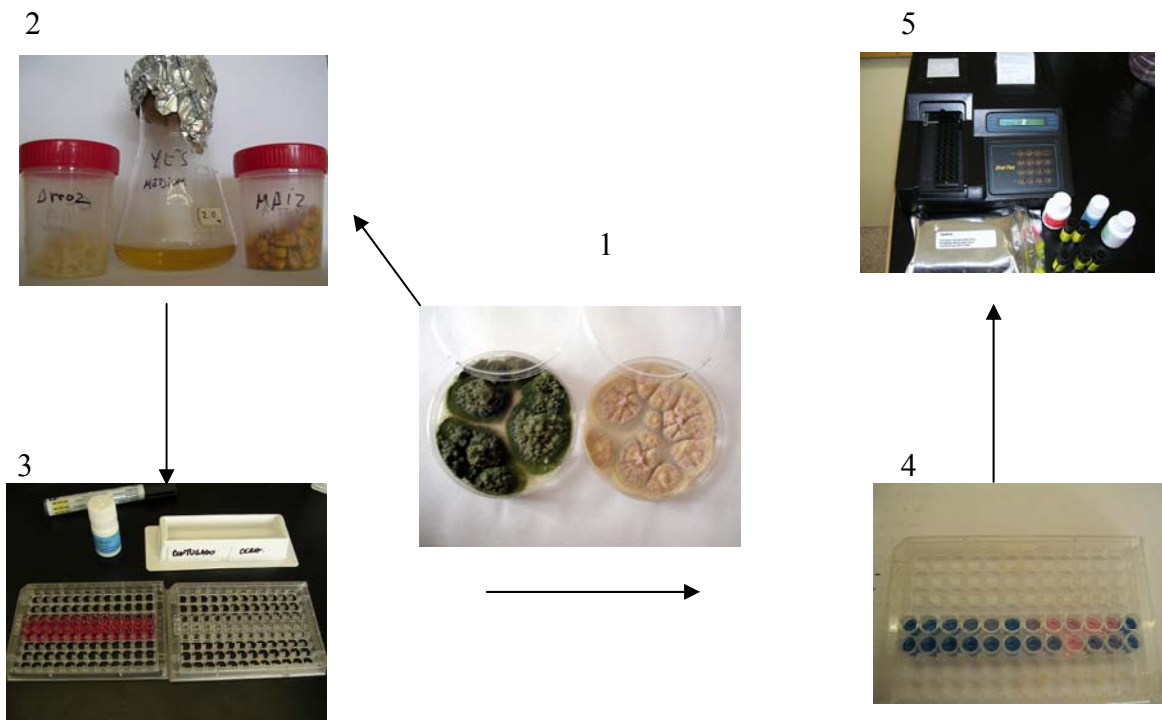
#### 3.1.2.3.6.5 Análisis de micotoxinas

Finalizado cada periodo de incubación se retiraron 5g del contenido, previa homogenización de cada matraz y se procedió a la extracción de las micotoxinas con metanol al 50% con agua desionizada (metanol grado ACS), teniendo en cuenta que la proporción: materia prima: metanol 50%, es de 1 parte de materia prima por 4 partes de metanol. Se agita por unos 5 minutos, se filtra a través de papel Whatman # 1, y se obtuvieron alícuotas de 5-10mL que se conservaron en temperatura de refrigeración hasta que se proceda a su análisis.

El análisis se llevó a cabo mediante la técnica ELISA (kit NEOGEN® Corporation) y se hizo la lectura con un lector de densidad óptica automatizado (STAT FAX modelo 321 Plus. Awareness Technology Inc.) de acuerdo con las especificaciones de la casa proveedora.

En la Fotografía número 1, podemos apreciar un esquema sobre la realización del experimento.

Fotografía núm. 1.- ESQUEMA DE REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.



- 1.- Cepas de *Aspergillus*, a la derecha de la foto *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948.
- 2.- Inoculación de la cepa de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948, en maíz y arroz como sustratos, y adición de productos para evaluar actividad antifúngica, incubación posterior a 28°C.
3. Materiales utilizados en la prueba de ELISA para detección de Ocratoxina A.
- 4.- Desarrollo de la prueba de ELISA.
- 5.- Lectura de las microplacas donde se realizó la prueba, (Lector de ELISA Neogen®)

### 3.1.2.3.7 **Método para detectar la actividad enzimática de extractos de Rutáceas y evaluar la alteración *in vitro* de la actividad enzimática extracelular de *Escherichia coli* FVB467 y *Salmonella typhimurium* FVB576 por acción de éstos.**

Para la realización de este experimento se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

#### 3.1.2.3.7.1 Preparación del inóculo bacteriano

Se procedió a preparar un inóculo bacteriano de  $2 \times 10^8$  UFC/mL, a partir de cultivos de cepas de *Salmonella typhimurium* FVB576 y *Escherichia coli* FVB467 de 18-24 horas a 37°C en placas con Agar Mac Conkey. A continuación se seleccionaron de tres ó cuatro colonias en que se incubaron en tubos de ensayo con 10mL con TSB. Los inóculos, se incubaron a 37°C por espacio de 3 a 4 horas hasta que alcanzaron la densidad óptica deseada. Posteriormente fueron retirados e inoculados con el extracto de Rutáceas a las concentraciones indicadas. Los tubos se incubaron por duplicado para cada bacteria y tratamiento durante 30 minutos a 37°C. los tratamientos fueron de 1000ppm del extracto de Rutáceas, (producto 3) para cada bacteria.

Transcurridos los 30 min de incubación, se procedió a retirar los tubos y a realizar 2 lavados, mediante centrifugación a 6500rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado o *pellet* resultante se lavó con solución de Ringer. Finalmente se reconstituyó el *pellet* y se estandarizó a una densidad óptica (D.O.) de 0,25 a 550 nm .

Para evaluar cualitativa y semicuantitativamente, la actividad enzimática extracelular *in vitro* de *Escherichia coli* FVB467 y *Salmonella typhimurium* FVB576 y la del extracto de Rutáceas sin diluir, se utilizó el sistema API ZYM<sup>®</sup> (BioMérieux, France ).

La metodología aplicada ha sido la siguiente:

### 3.1.2.3.7.2 Preparación de las muestras

Se siguieron los siguientes pasos:

- Se preparó la cámara de incubación (fondo y tapa) repartiendo 5mL aproximadamente de agua destilada o desmineralizada o toda agua sin aditivos susceptibles de liberar gas (Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc) en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
- Se retiraron las galerías de sus envases individuales y se colocaron en sus respectivas cámaras de incubación.
- Se procedió a repartir con una pipeta la muestra preparada a razón de 65µL por cúpula.
- Se colocaron las tapas en sus respectivas placas y se incubaron las galerías por 4 horas a 37°C.

### 3.1.2.3.7.3 Lectura e interpretación

Después de la incubación:

- Añadir 1 gota de reactivo ZYM A y 1 gota de reactivo ZYM B en cada cúpula.  
El hecho de poner un agente tensioactivo (reactivo ZYM A) permite facilitar la solubilización del reactivo ZYM B en el medio.
- Se desarrolla el color durante 5 minutos como mínimo. Posteriormente se expuso las galerías a la luz solar durante 1 hora. Esta operación tiene por objeto eliminar el fondo amarillo debido al exceso de *Fast Blue BB* que no ha reaccionado y que da reacciones negativas incoloras.
- Se efectúa las lecturas y se anota en las hojas de resultados, el valor 0 corresponde a una reacción negativa, el valor 5, a una reacción de intensidad máxima de color, las reacciones intermedias se anotan como 1, 2, 3 ó 4 de acuerdo a su intensidad.

En la Tabla 10 se muestra las enzimas estudiadas, el sustrato, pH y color en la reacción de la prueba de API ZYM<sup>®</sup>

Tabla núm 10.- Tabla de lectura de la galería de API ZYM<sup>®</sup>

	ENZIMA ESTUDIADA	SUSTRATO	pH	REACCIÓN	
				POSITIVA	NEGATIVA
1	<b>CONTROL</b>	-		INCOLORA O COLOR DE LA MUESTRA	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	Incolora o amarillo muy pálido
3	Esterasa (C4)	2-naftil butirato	6,5	"	
4	Esterasa Lipasa (C8)	2-naftil caprilato	7,5	"	
5	Lipasa(C14)	2-naftil miristato	"	"	
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamina	"	Naranja	
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	"	"	
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	"	"	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	"	
10	$\alpha$ -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5	"	
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	"	Azul	
13	$\alpha$ -galactosidasa	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-galactopiranosido	"	Violeta	
14	$\beta$ -galactosidasa	2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosido	"	Violeta	
15	$\beta$ -glucuronidasa	Naftol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronido	"	Azul	
16	$\alpha$ -glucosidasa	2-naftil- $\alpha$ D-glucopiranosido	"	Violeta	
17	$\beta$ -glucosidasa	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-mannopiranosido	"	Violeta	
18	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	1-naftil-N- $\alpha$ D-mannopiranosido	"	Marrón	
19	$\alpha$ -manosidasa	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-mannopiranosido	"	Violeta	
20	$\alpha$ -fucosidasa	2-naftil- $\alpha$ L-fucopiranosido	"	Violeta	

1: 5 nanomoles de sustrato hidrolizado; 2: 10 nanomoles de sustrato hidrolizado; 3: 20 nanomoles de sustrato hidrolizado



### 3.1.2.3.8 **Observación mediante microscopía electrónica de la actividad de los extractos de Rutáceas sobre bacterias.**

Con el fin de observar los posibles efectos de los productos ensayados sobre bacterias y hongos se procedió a la preparación de los cultivos y a su posterior observación bajo microscopio electrónico de barrido (MEB), siguiendo la metodología que se describe a continuación:

#### 3.1.2.3.8.1 Preparación de reactivos químicos

Se procedió a la preparación de los reactivos químicos a ser usados para el procesamiento de la muestra a ser observada bajo el microscopio electrónico.

**Tampón de cacodilato 0,1M (pH 7-7,1):** Se prepara en agua desionizada, en las siguientes proporciones:  $\text{AsO}_2(\text{CH}_3)_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  21,4 g/L, HCl 1M 3,455 mL/L. Medir el pH y comprobar que su valor esté comprendido entre 7-7,1. En caso que la medida se encuentre fuera de márgenes ajustar con NaOH 1 N o HCl 1 N.

Conservar el tampón en nevera a 4° C.

**Solución de glutaraldehído al 6% p/v:** Se prepara el  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  en tampón de Cacodilato.

Conservar en nevera a 4° C.

**Solución de tetróxido de osmio al 1% p/v:** Se prepara el  $\text{OsO}_4$  en tampón de Cacodilato.

Conservar en nevera a 4°C. y preservado de las luz.

**Alcohol etílico 96°:** EtOH de pureza analítica.

**Acetato de amilo:**  $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2$  del 99% de riqueza.

**Alcohol terc-butílico:**  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  del 99,5% de riqueza.

### 3.1.2.3.8.2 Obtención del cultivo

Se inoculan tres o cuatro colonias del microorganismo sobre el que se desea evaluar la actividad de los productos en tubos de ensayo conteniendo TSB, Los tubos se incubaron por espacio de 3-4 horas en estufa de 37°C.

A continuación, se ajusta la concentración de los cultivos al orden 0,5 de la escala de Mac Farland, equivalente a  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente, se procedió a preparar tubos con las siguientes concentraciones de producto.

*Bacillus subtilis* FVB19 + ER 1000ppm. y un control positivo.

*Salmonella typhimurium* FVB576 + ER 1000ppm. Y un control positivo.

ER= Extracto de Rutáceas.

### 3.1.2.3.8.3 Condiciones de incubación

Posteriormente se incubaron en estufa de aerobiosis a 37°C, tomándose una muestra tratada y un control por cada microorganismo a las 2 horas y a las 24 horas, para su evaluación bajo el microscopio electrónico.

Con las alícuotas recuperadas a las 2 y 24 horas de incubación se procedió de la siguiente forma:

Con una micropipeta se tomaron 10µL de cada tubo (tratamiento y bacteria), y se filtraron a través de membrana de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore® type GS). Posteriormente, el filtro se procedió a tratar como muestra para los siguientes pasos de preparación y su posterior visualización bajo microscopio electrónico de barrido (MEB).

### 3.1.2.3.8.4 Fijación

Una vez filtrada la muestra, a visualizar en el MEB, un fragmento del filtro se recorta y se transfiere a un vial estéril, al que se añade 1mL. de una mezcla de glutaraldehído 6% y

tetróxido de osmio 1% en solución tampón de cacodilato sódico 0,1M (pH 7,1- 7,4) en proporción 1:1 (solución fijadora).

La muestra debe mantenerse en la solución fijadora y preservada de la luz durante 2 horas a 4°C.

#### 3.1.2.3.8.5 Postfijación

Con una pipeta Pasteur, se retiró del tubo de ensayo la solución fijadora. A continuación se lavó la muestra con solución tampón, sin sacarla del tubo y finalmente se añadió 1mL de solución de tetróxido de osmio 1%. La muestra se debe mantener en el líquido postfijador durante 2 horas a 4°C.

Con una pipeta Pasteur se retira el líquido fijador del tubo de ensayo y se lavan las muestras primero con solución tampón y seguidamente con agua desionizada.

En caso de ser necesario, se puede detener el proceso en este punto, manteniendo la muestra tapada y guardada en la nevera a 4°C.

#### 3.1.2.3.8.6 Deshidratación

Para llevar a cabo el proceso de deshidratación, se añade 1mL de cada una de las mezclas descritas a continuación, dejando que el disolvente cubra la muestra durante 15 minutos y retirándolo, en cada caso, una vez transcurrido el tiempo.

3 agua desionizada: 1 alcohol etílico / 15 minutos

1 agua desionizada: 1 alcohol etílico / 15 minutos

1 agua desionizada: 3 alcohol etílico / 15 minutos.

Finalmente se mantuvo la muestra en etanol durante 2 horas

En caso de ser necesario, se puede detener el proceso en este punto, manteniendo la muestra en etanol.

Posteriormente se extrajo el etanol y de la misma forma (retirando el disolvente) se mantuvo la muestra durante 45 minutos en las siguientes graduaciones de etanol / alcohol terc-butílico

3 alcohol etílico: alcohol terc-butílico / 25 minutos.

1 alcohol etílico: alcohol terc-butílico / 25 minutos

1 alcohol etílico: alcohol terc-butílico / 25 minutos.

Para terminar la serie, se debe mantener la muestra en alcohol terc-butílico durante 60 minutos.

En caso de ser necesario, se puede detener el proceso en este punto, manteniendo la muestra tapada y guardada en la nevera a 4°C.

#### 3.1.2.3.8.7 Deseccación

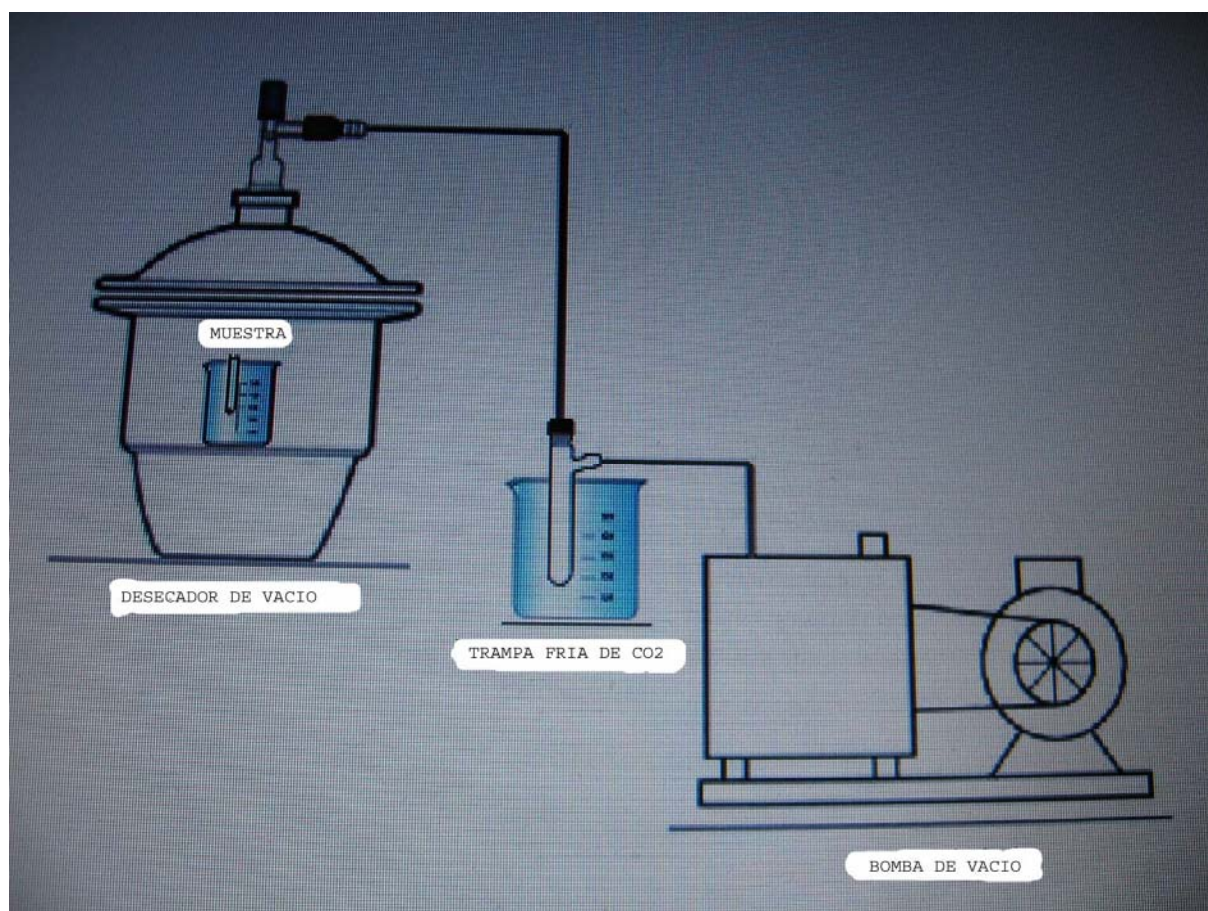
Se retiró el alcohol terc-butílico de la muestra mediante una pipeta Pasteur . Las muestras fueron desecadas utilizando un sistema de vacío, (ver Esquema núm. 1) durante un tiempo aproximado de 1 hora.

#### 3.1.2.3.8.7 Metalización

Se procedió a la metalización de las muestras durante 105 segundos, siguiendo el procedimiento descrito en las instrucciones de uso del metalizador Ion Sputtering IQS-ELQUM-USO-I-0003.

En el Esquema núm. 1 de la página siguiente, se muestra el sistema de vacío utilizado para la desecación de la muestra.

Esquema núm. 1 Esquema del sistema de desecación al vacío.



### 3.2 MATERIAL Y MÉTODOS PARA LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN *IN VIVO*

La evaluación *in vivo* de algunos de los productos ensayados a lo largo de esta Tesis doctoral se llevó a cabo por medio de dos experimentos de campo en granjas porcinas.

El protocolo utilizado recibió el visto bueno y la aprobación del Comité de revisión de protocolos de experimentación con animales de la Universidad Autónoma de Barcelona. El tratamiento, crianza y sacrificio de los animales se llevó a cabo de forma rigurosa y siguiendo las directrices de la Unión Europea.

#### 3.2.1 EFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXTRACTO DE RUTÁCEAS SOBRE LA MICROBIOTA ENTÉRICA DE CERDOS DESTETADOS.

Esta parte del estudio se llevó a cabo con 40 cerditos (Landrace x Large White ) destetados a los 21 días de edad, que fueron seleccionados al azar y distribuidos en 4 corrales, (densidad 2 animales x m<sup>2</sup>) conteniendo 10 cerditos cada uno. Estos corrales fueron proveídos con suelos completos de *slats*, poseían un sistema automático de iluminación y un sistema de control de ambiente.

##### 3.2.1.1 **Tratamientos**

Los tratamientos fueron añadidos a dos alimentos de formulación comercial, (Tablas núms. 11 y 12) y fueron distribuidos según un diseño factorial tal como determina el análisis estadístico. Se plantearon cuatro tratamientos en base a la inclusión o no de antibióticos (120ppm de colistina y 300ppm de amoxicilina) ,a la inclusión o no del producto 2 (P2) (Mezcla de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos. (2 Kg/TM) y la mezcla de antibióticos y el Producto 2 . El alimento y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

### 3.2.1.2 **Duración de la prueba y sacrificio**

La duración de la prueba fue de 18 días y después de ese tiempo, 2 cerdos por tratamiento fueron sacrificados por inyección intracardiaca de un eutanásico, el T-61 (Intervet Internacional B.V.).

### 3.2.1.3 **Análisis de Laboratorio**

De cada animal sacrificado se obtuvo el duodeno, el yeyuno, el ileon y el colon. Las muestras fueron inmediatamente transportadas en refrigeración al laboratorio de Microbiología (Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona). A su recepción en el laboratorio, fueron separadas las distintas muestras y se procedió a preparar un banco de diluciones decimales solución de Ringer  $\frac{1}{4}$  estéril y a separar el material necesario para la detección de *Salmonella* spp.

De acuerdo con Pascual y Calderón (105), se seleccionaron los medios adecuados de crecimiento y las técnicas de aislamiento y detección.

Los grupos de microorganismos estudiados han sido:

- Recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales.
- Recuento de bacterias anaerobias totales.
- Recuento de Enterobacterias totales.
- Recuento total de hongos filamentosos y levaduras.
- Detección de *Salmonella* spp.

En las Tablas núms. 11 y 12 se muestra la composición del pienso utilizado en el experimento.

Tabla núm. 11.- Composición basal del alimento y nutrientes estimados contenidos en el alimento empleado en el ensayo para evaluar la población microbiana presente en diversas zonas del aparato digestivo de los cerdos analizados.

<b>Ingredientes (%)</b>	
Cereales	47.342
Harina de Pescado	8.000
Plasma animal	5.000
Suero de leche	24.000
Sacarosa	5.000
Grasa animal	3.500
Proteína concentrada de harina de soja	5.000
Cloruro de sodio	0.300
Fosfato dicalcico	0.600
Carbonato de Calcio	0.780
Lisina	0.150
Metionina	0.128
Premix	0.200
<b>Composición Química</b>	
Energía neta (Mj/kg)	10.57
Proteína Cruda (%)	18.00
Extracto etereo (%)	5.80
Cenizas (%)	6.70
Fibra Cruda (%)	1.80
Lisina	1.40
Metionina + Cisteina (%)	0.80
Treonina (%)	0.80
Triptofano (%)	0.25



Tabla núm. 12.- Composición basal del alimento y nutrientes estimados contenidos en el alimento empleado en el ensayo para evaluar la población microbiana presente en diversas zonas del aparato digestivo de los cerdos analizados.

Ingredientes (%)	Pre starter	Starter
Maiz	24.270	12.721
Trigo + cebada	34.990	52.100
Harina de pescado	5.030	3.260
concentrado de harina de sangre	5.710	0.000
Suero de leche	21.980	10.000
Harina de soja 48	2.000	8.690
Grasa de soja super extrusada	0.000	6.000
Proteina concentrada de harina de soja	0.890	0.000
Proteina concentrada de patata	0.000	2.000
Aceite de soja	3.000	3.200
Cloruro de sodio	0.300	0.300
Fosfato dicalcico	0.700	0.649
Carbonato de calcio	0.540	0.521
Lisina	0.250	0.239
Metionina	0.140	0.120
Premix	0.200	0.200
Composición Química		
Energía neta (Mj/kg)	10.47	10.46
Proteina Cruda (%)	17.76	18.84
Extracto etereo (%)	5.02	6.49
Cenizas (%)	5.05	4.07
Fibra Cruda (%)	1.87	2.71
Lisina	1.43	1.30
Metionina + Cisteina (%)	0.80	0.76

Premix Pre Starter (por Kg de pienso): 10000 IU vitamina A, 2.000 IU vitamina D3, 20mg vitamina E, 1 mg vitamina K, 1mg tiamina, 4 mg Riboflavina, 10 mg de ácido D-pantotenico, 0,5 mg de ácido fólico, 12 mg de piridoxina, 15 mg de niacina, 0,03 mg de cobalamina, 600 mg de cloruro de colina, 0.1mg de biotina, 0.2 mg de Cobalto, 0.3 mg Se, 0,5 mg I, 100 mg Fierro, 10 mg Cu, 40 mg de Mn y 100 mg Zn.

Premix Started (por kg de pienso): 8000 IU vitamina A, 1.000 IU vitamina D3, 10mg vitamina E, 0.5 mg vitamina K, 1mg tiamina, 3 mg Riboflavina, 8 mg de ácido D-pantotenico, 0,5 mg de ácido fólico, 10 mg de piridoxina, 10 mg de niacina, 0,03 mg de cobalamina, 500 mg de cloruro de colina, 0.05 mg de biotina, 0.1 mg de Cobalto, 0.1 mg Se, 0,2 mg I, 80 mg Fierro, 10 mg Cu, 40 mg de Mn y 100 mg Zn

### 3.2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE ENGORDE.

El estudio se realizó con 120 cerdos híbridos comerciales (Landrace, Large White, Pietrain) repartidos en 20 corrales de 4 animales (2 machos y 2 hembras) cada uno. El peso vivo medio de los cerdos al inicio de los cerdos fue de  $26,28 \pm 1,31$  Kg. El reparto de corrales entre tratamientos se realizó cumpliendo la premisa de 2 machos y 2 hembras por corral y de manera que el peso medio entre tratamientos fuese igual.

#### 3.2.2.1 Piensos

Se utilizó un pienso basal único desde el inicio hasta el fin del estudio.

#### 3.2.2.2 Tratamientos

El estudio incluía de 3 tratamientos con 10 replicas por tratamiento, habiendo, por tanto, un total de 30 réplicas (cada corral fue considerando como una réplica: 30 réplicas y 120 cerdos).

TRATAMIENTOS	T-1	T-2	T-3
<b>Salinomicina Sódica (ppm)</b>	30	-	-
<b>Producto 2 (ppm)</b>	-	1000	-
<b>Producto 5 (ppm)</b>	-	-	1000

Producto 2 y producto 5, son mezclas de Extractos de Rutáceas y Ácidos orgánicos.

### 3.2.2.3 **Controles**

El estudio tuvo una duración de 84 días. Se realizaron controles al inicio del estudio y seis controles más, con un intervalo de 14 días entre cada control, registrando el peso medio y consumo de pienso por réplica y calculando el índice de conversión.

Al comenzar la prueba, se marcó un animal por réplica, con un total de cinco machos y cinco hembras, identificados por tratamiento. Al realizar cada control de peso, se tomaron muestras de heces de cada animal para su análisis microbiológico posterior.

### 3.2.2.4 **Pruebas en laboratorio**

Al principio del estudio se marcó un animal en cada corral con el fin de poder tomar siempre muestra de los mismos animales, marcándose un total de 30 cerdos. Por cada tratamiento habían 10 cerdos: 5 machos y 5 hembras.

En los tiempos decididos en el protocolo, y coincidiendo con los tiempos de muestreo para los restantes ensayos (registros de peso y de consumo de pienso), se tomaron muestras rectales mediante hisopos estériles, realizándose en total 6 muestreos de cada animal.

La toma de muestras se realizó mediante hisopos estériles.

Las muestras recogidas fueron remitidas en condiciones de refrigeración al laboratorio para su procesado.

A partir de los hisopos se procedió a la siembra de la muestra en los medios de cultivo y condiciones tal como se indica en la Tabla núm. 13

Tabla núm. 13.- Medios de cultivo, condiciones de incubación y finalidad de cada ensayo.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Condiciones de incubación</b>	<b>Finalidad</b>
Agar Triptona soja: TSA	37°C, 24-48h aerobiosis	Recuento total de bacterias aerobias mesófilas
Agar Mac Conkey: MK	37°C, 24-48h aerobiosis	Recuento total de <i>Enterobacteriaceae</i>
Agar selectivo para anaerobios: ASA	37°C, 24-48h anaerobiosis	Recuento total de bacterias anaerobias mesófilas
Agar Man Rogosa Sharpe: MRS	37°C, 24-72h microaerofilia	Recuento total de <i>Lactobacillus</i> spp. y géneros relacionados.
Agar Glucosado de Sabouraud Adicionado de 30 ppm de Clorhidrato de tetraciclina: S	28°C, 5-7 días	Recuento total de hongos filamentosos y levaduras.

h= horas

### 3.2.2.5 **Interpretación de los resultados.**

Para la interpretación de los resultados debe tenerse en cuenta la siguiente equivalencia.

- 1: 1 a 50 UFC/ placa.
- 2: 51 a 150 UFC/ placa.
- 3: 151 a 300 UFC/ placa.
- 4: >300 UFC/ placa.
- 5: Crecimiento confluyente de colonias por placa.

## 4 **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos a lo largo de la realización de la Tesis Doctoral se separan en dos apartados, en función de que los ensayos se realicen *in vitro* o *in vivo*.

### 4.1 **RESULTADOS DE LOS MÉTODOS *IN VITRO* PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.**

#### 4.1.1 RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

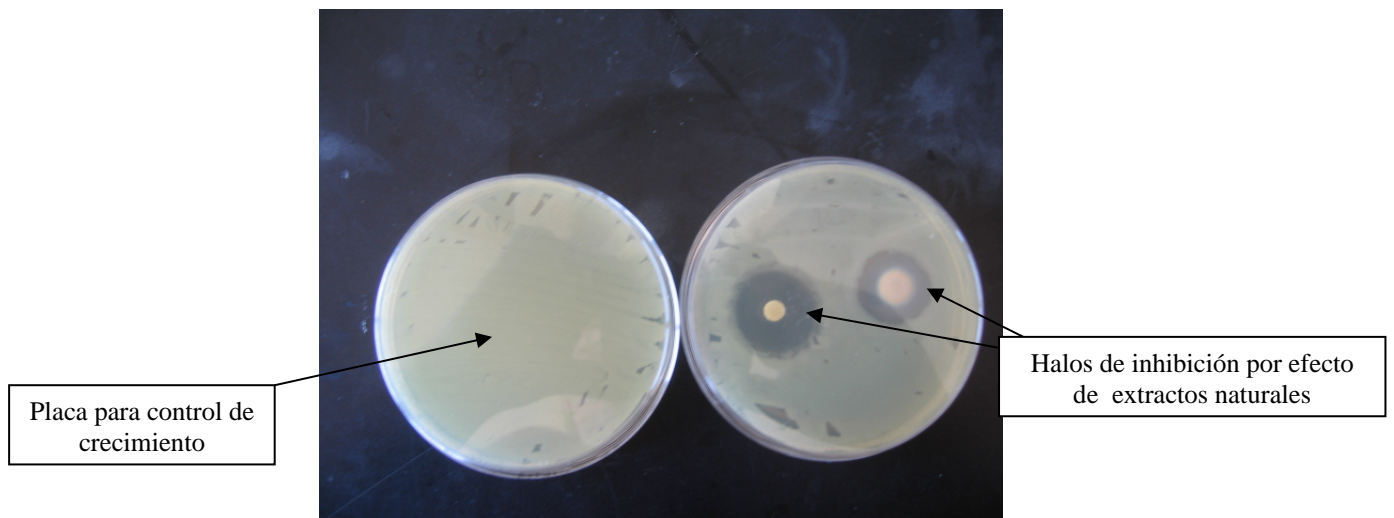
Los resultados de las pruebas de inhibición realizadas por la técnica de difusión en agar, se resumen en las Tablas y Diagramas siguientes.

Para una mejor interpretación de los resultados se han agrupado los productos evaluados, siguiendo la distribución aportada en el apartado de Material y Métodos.

Los valores que se expresan en las Tablas corresponden a los valores de inhibición (VI) obtenidos según la fórmula:

$$\text{VI} = \frac{\text{Diámetro total de inhibición (mm)} - \text{Diámetro del disco (6 mm)}}{2}$$

En la Fotografía núm. 2 , se aporta un ejemplo de los resultados obtenidos, en el estudio de la capacidad antimicrobiana, por el método de difusión en agar.



#### 4.1.1.1 Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo A.

Los resultados de los ensayos con los productos del grupo A se muestran en las Tablas núms. 14 y 15 y los Diagramas núms. 1 y 2.

Tabla núm. 14.- Valores de inhibición observados en las bacterias ensayadas frente a los productos del grupo A

Producto	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
1	8,00±0,00	5,33±0,76	11,17±0,76	11,17±0,29	8,25±0,58	4,50±0,00	7,00±0,58
2	6,17±0,29	7,33±0,58	9,00±0,50	9,00±0,29	8,17±0,58	2,50±0,50	6,28±0,29
3	8,17±0,29	6,33±0,58	14,33±0,29	14,33±0,00	10,33±0,58	5,33±0,50	8,67±0,58
4	6,50±0,50	6,33±0,58	10,50±0,00	10,50±0,00	8,42±0,87	9,17±0,58	8,67±0,76
5	4,83±0,58	4,67±0,29	9,67±0,29	11,50±0,87	3,00±0,00	4,67±0,29	5,17±0,29

1: Mezcla de ER y AO    2: Mezcla de ER y AO    3: Extracto de Rutáceas    4: Aceite esencial de canela  
5: Mezcla de ER y AO    ER: Extracto de Rutáceas    AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 1.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo A.

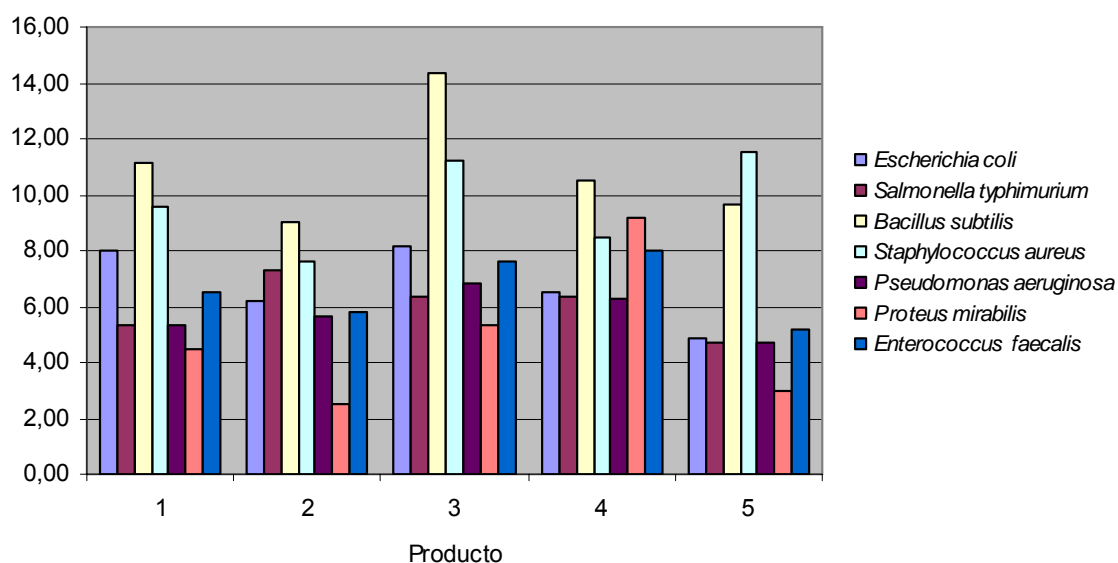
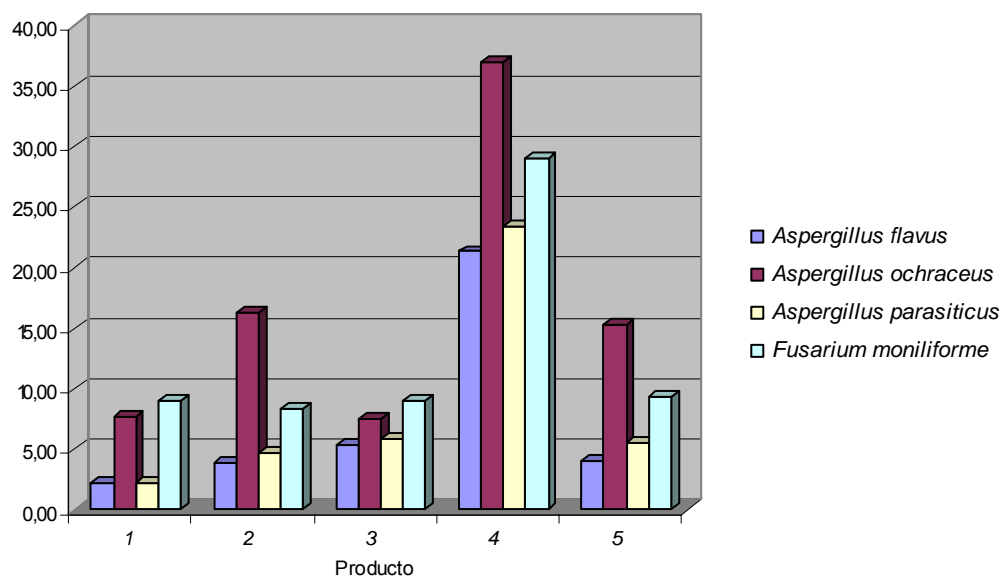


Tabla 15.-Valores de inhibición observados en los hongos ensayados frente a los productos del grupo A.

Producto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
1	2,17±0,29	7,67±0,29	2,17±0,29	9,00±0,87
2	3,83±0,29	16,33±0,58	4,67±0,29	8,33±1,04
3	5,33±0,76	7,50±0,87	5,83±0,29	9,00±0,87
4	21,33±0,58	37,00±0,00	23,33±1,26	29,00±0,87
5	4,00±0,50	15,33±0,29	5,50±0,00	9,33±0,58

1: Mezcla de ER y AO    2: Mezcla de ER y AO    3: Extracto de Rutáceas    4: Aceite esencial de canela  
 5: Mezcla de ER y AO    ER: Extracto de Rutáceas    AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 2.- Valores de de inhibición fúngica expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo A.





4.1.1.2 **Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo B**

Los resultados de los ensayos con los productos del grupo B se muestran en las Tablas núms. 16 al 19 y los Diagramas núms. 3 al 6.

Tabla 16.- Valores de inhibición observados en las cepas bacterianas ensayadas frente a los productos del grupo B.

Producto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
6	29,83±0,58	24,50±0,87	31,00±1,00	32,50±0,87	23,50±0,87	23,67±0,76
7	14,00±0,87	15,33±0,76	17,00±1,00	15,33±0,29	16,50±0,50	15,67±0,29
8	9,83±0,58	10,50±0,50	13,33±0,58	12,33±0,29	13,17±0,58	8,83±1,15
9	11,33±0,58	10,50±0,50	9,67±0,58	10,33±0,29	7,83±0,58	11,50±0,50
10	10,67±0,58	8,17±0,76	12,00±0,50	11,67±0,29	10,67±1,04	8,17±0,58
11	13,33±0,58	11,67±0,76	13,83±0,76	14,83±0,58	13,17±0,58	9,00±0,87
12	4,17±0,29	4,67±0,29	7,83±0,76	9,17±0,58	9,17±0,76	2,50±0,50
13	4,67±0,29	5,67±0,29	10,67±0,29	14,17±0,29	3,00±0,00	6,67±0,76
14	1,67±0,29	1,50±0,50	2,33±0,58	13,67±0,76	3,50±0,50	3,33±0,29
15	4,67±0,29	6,33±0,29	9,50±0,00	12,67±0,76	4,17±0,29	6,67±0,29

6: Formol 7:Acido fórmico 8:Acido propiónico 9: Acido láctico 10:Ác. láctico + Ác. acético  
 11: Acido acético 12: Propionato sódico 13: ER 14: EN 15: ER + AO  
 ER: Extracto de Rutáceas EN: Extracto natural AO: Ácido orgánico

Diagrama 3.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo B.

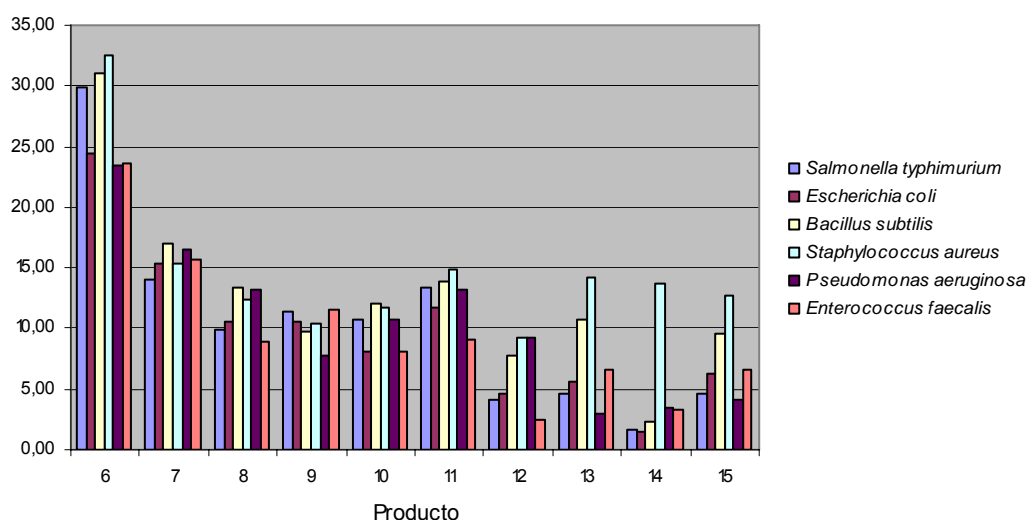


Tabla núm. 17.- Valores de inhibición observados en las bacterias ensayadas frente a los productos del grupo B (continuación).

Producto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
16	3,00±0,00	2,50±0,50	11,67±0,58	8,50±0,50	1,50±0,50	2,50±0,00
17	5,00±0,50	6,17±0,76	10,67±0,29	12,83±0,76	4,50±0,00	5,33±0,29
18	4,67±0,58	3,17±0,76	3,67±0,29	7,00±0,87	4,33±0,58	4,33±0,29
19	11,17±0,58	10,00±0,50	10,17±0,76	13,00±0,50	12,50±0,87	13,17±1,04
20	3,83±0,58	5,17±0,76	6,67±0,58	5,67±0,29	8,33±0,76	2,17±0,29
21	1,33±0,29	1,50±0,50	2,50±0,50	0,00±0,00	1,50±0,00	0,00±0,00
22	8,83±0,29	7,17±0,29	11,67±0,58	7,67±0,58	10,00±0,50	6,00±0,00
23	14,00±0,50	10,50±0,50	11,67±0,58	10,00±0,50	11,50±0,50	9,33±0,76
24	13,50±0,50	13,67±0,76	13,33±0,76	14,17±0,29	14,33±0,29	14,67±0,29
25	9,67±0,29	9,33±0,58	9,17±0,29	10,17±0,58	9,33±0,29	8,00±0,50

Productos del 16 al 25 son s mezclas en diferentes proporciones de Extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos.

Diagrama núm. 4.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo B (continuación).

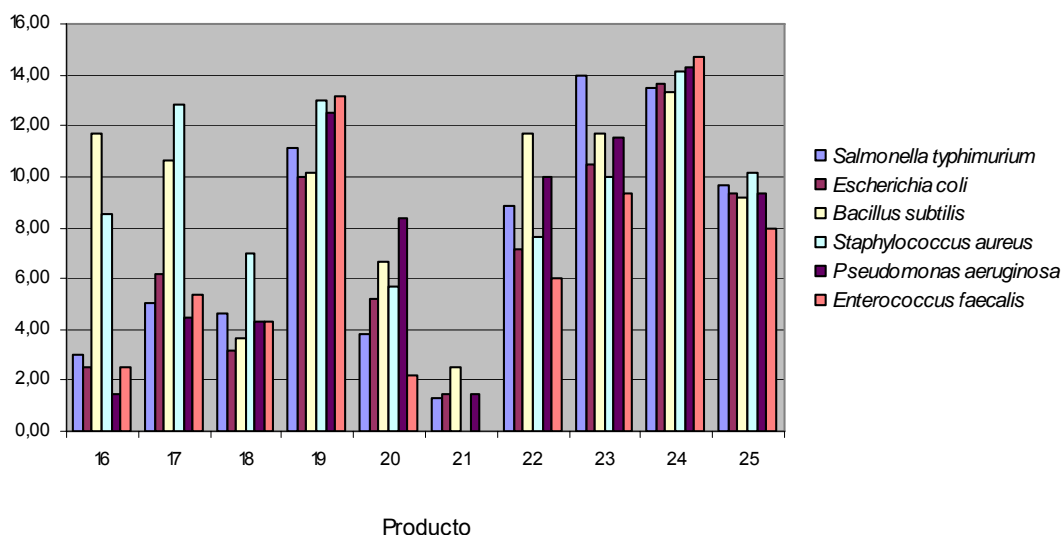


Tabla núm 18.- Valores de inhibición observados en las cepas fúngicas ensayadas frente a los productos del grupo B.

Producto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
6	26,17±1,44	15,33±1,53	15,00±0,87	25,83±1,26
7	9,17±0,29	7,33±0,58	1,33±0,29	18,50±0,87
8	20,50±0,87	9,00±0,50	5,17±0,58	22,83±0,29,
9	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	11,83±0,76	1,83±0,29	1,00±0,00	3,17±0,58
11	21,67±0,58	2,50±0,50	0,67±0,29	6,50±0,87
12	11,67±0,58	4,17±0,59	1,33±0,29	12,00±0,00
13	7,67±0,76	4,17±0,58	1,33±0,29	3,67±0,29
14	1,17±0,29	14,17±2,02	7,50±0,50	1,50±0,00
15	4,67±0,76	4,67±1,15	1,83±0,29	12,00±0,00

6: Formol 7:Acido fórmico 8:Acido propiónico 9: Acido láctico 10:Ác. láctico + Ác. acético  
 11: Acido acético 12: Propionato sódico 13: ER 14: EN 15: ER + AO  
 ER: Extracto de Rutáceas EN: Extracto natural AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 5.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo B.

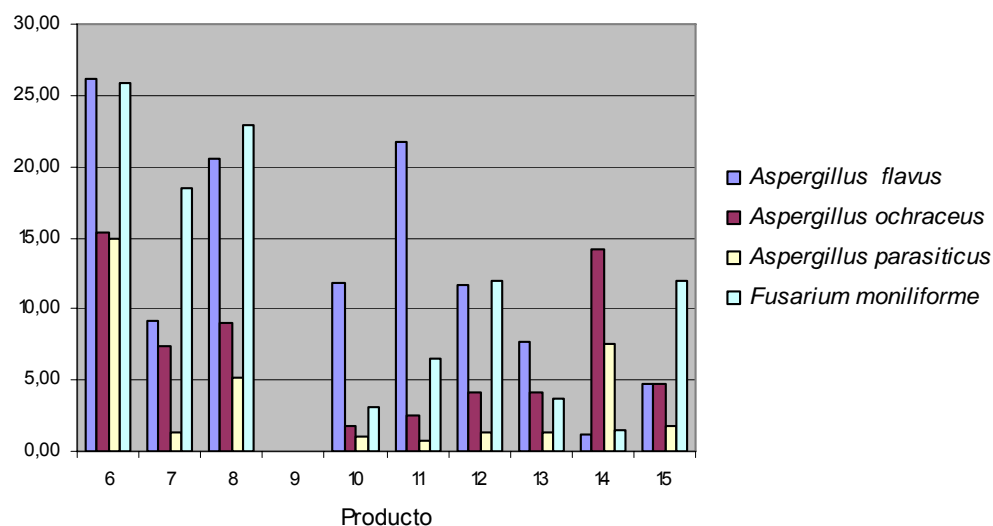
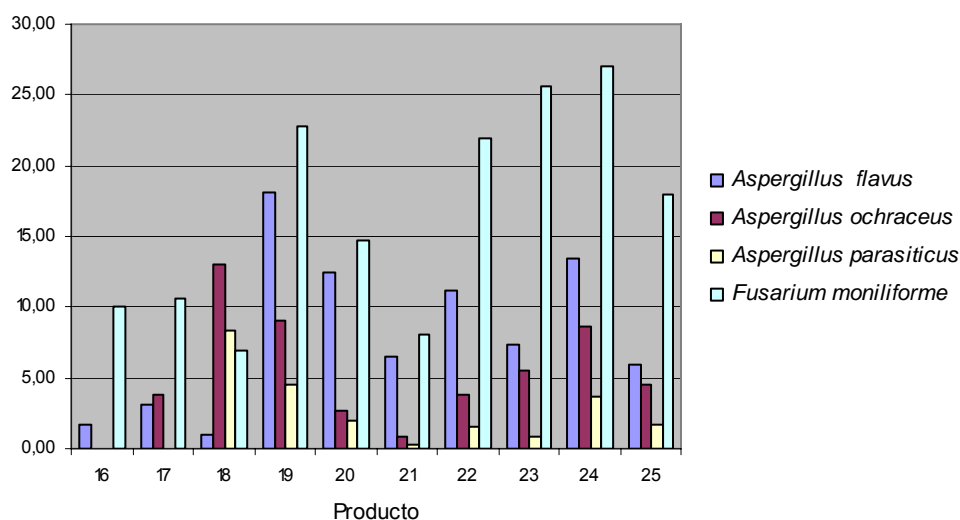


Tabla núm. 19.- Valores de inhibición observados en las cepas fúngicas ensayadas frente a los productos del grupo B (continuación).

Producto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
16	1,67±0,29	0,00±0,00	0,00±0,00	10,00±0,87
17	3,17±0,29	3,83±0,58	0,00±0,00	10,67±0,76
18	1,00±0,00	13,00±1,32	8,33±1,26	7,00±0,00
19	18,17±1,04	9,00±1,73	4,50±0,87	22,83±1,44
20	12,50±0,50	2,67±0,29	2,00±0,50	14,67±0,29
21	6,50±0,50	0,83±0,58	0,33±0,29	8,00±0,87
22	11,17±0,76	3,83±0,58	1,50±0,50	22,00±0,50
23	7,33±2,02	5,50±1,00	0,83±0,58	25,67±0,58
24	13,50±0,50	8,67±0,76	3,67±0,58	27,00±0,87
25	6,00±1,00	4,50±1,32	1,67±0,58	18,00±0,00

Productos del 16 al 25 son mezclas en diferentes proporciones de Extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos.

Diagrama núm. 6.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo B (continuación).



4.1.1.3 **Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo C**

Los resultados de los ensayos con los productos del grupo C se muestran en las Tablas núms. 20 y 21 y los Diagramas núm. 7 y 8.

Tabla núm. 20.- Valores de inhibición observados en las bacterias ensayadas frente a los productos del grupo C.

Producto	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
26	8,83±0,76	8,33±0,29	30,33±1,44	4,83±0,58	5,67±0,29	4,83±0,58	14,33±0,29
27	10,17±0,29	8,17±0,29	10,00±0,50	13,50±1,32	5,33±0,76	7,67±0,29	10,17±0,29
28	5,17±0,29	4,33±0,29	12,33±0,29	11,17±0,58	3,33±0,29	14,17±0,29	4,67±0,58
29	0,50±0,00	1,00±0,00	2,17±0,29	3,33±0,29	1,50±0,00	2,17±0,29	1,83±0,29
30	5,00±0,50	3,83±0,76	5,67±0,29	11,33±0,58	6,17±0,76	14,33±0,29	7,33±0,76
31	4,17±0,29	3,67±0,29	5,67±0,58	10,83±0,29	2,17±0,58	11,00±0,50	8,50±0,50
32	10,17±0,76	11,00±0,50	8,33±0,29	10,67±0,29	8,00±0,50	7,00±0,87	4,83±1,04
33	9,83±0,29	9,67±0,58	12,50±0,50	12,33±0,58	8,67±0,76	7,83±0,58	0,00±0,00
34	10,67±0,29	4,67±0,29	10,00±0,00	8,17±0,58	4,00±0,50	13,50±0,87	5,00±0,50
35	8,17±0,58	7,17±0,58	8,67±0,29	3,50±0,50	2,83±0,58	6,83±0,76	4,67±0,29
36	7,83±0,58	7,67±0,58	10,67±0,76	2,17±0,29	2,83±0,29	7,33±0,29	2,67±0,29

26: EN 27: EN 28: EN 29: EN+AO 30: EN+AO 31: EN+AO 32: EN+AO 33: EN+AO  
34: EN+AO 35: EN 36: EN EN: Extracto natural AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 7.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo C.

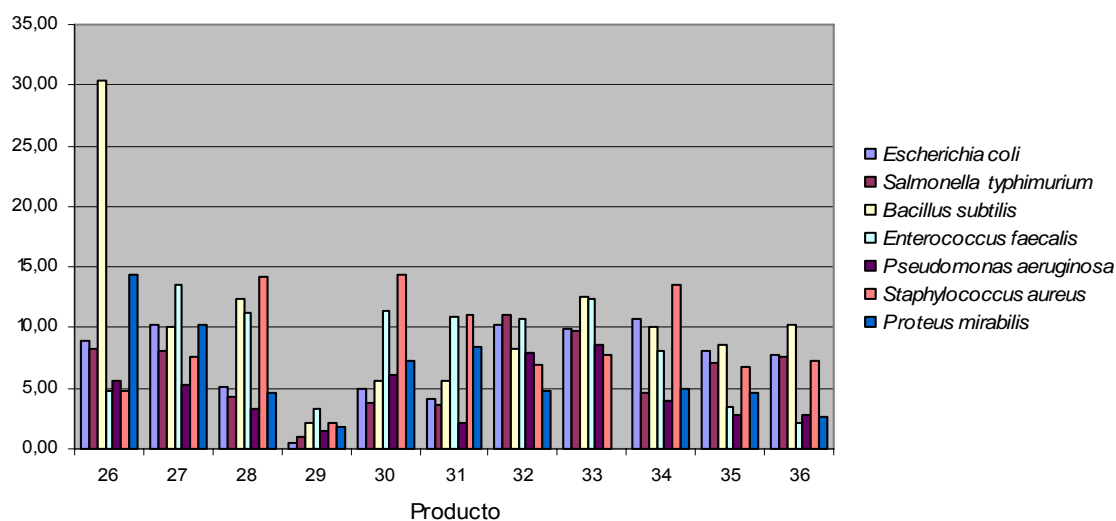
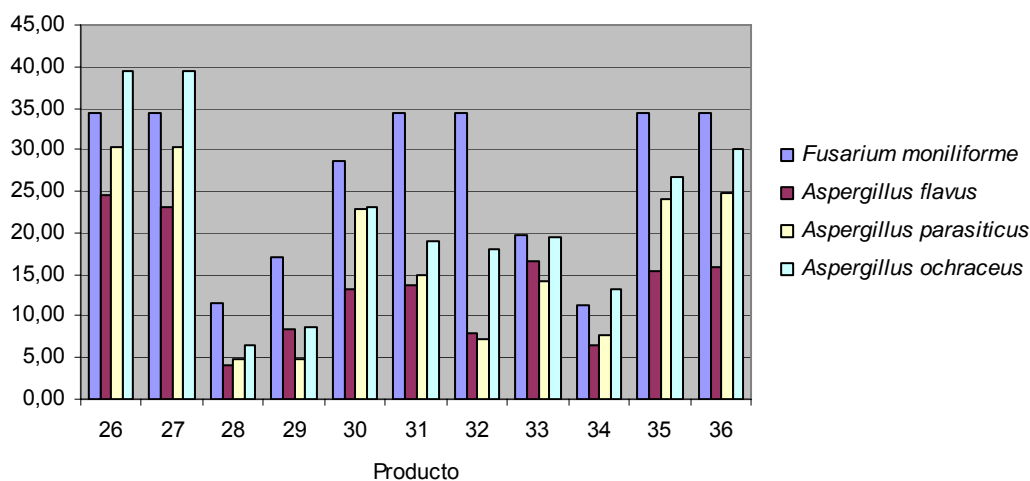


Tabla núm. 21.- Valores de inhibición observados en las cepas fúngicas ensayadas frente a los productos del grupo C.

Producto	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
26	34,50±0,00	24,50±1,00	30,33±1,44	39,50±0,00
27	34,50±0,00	23,00±0,50	30,33±1,44	39,5±0,00
28	11,67±0,58	4,17±0,29	4,83±0,29	6,50±0,87
29	17,17±0,29	8,33±0,76	4,83±0,29	8,67±0,76
30	28,67±1,44	13,33±1,15	22,83±1,44	23,17±0,58
31	34,50±0,00	13,83±1,15	14,83±0,58	19,00±0,50
32	34,50±0,00	8,00±0,87	7,33±0,58	18,00±0,50
33	19,67±0,29	16,67±0,58	14,17±1,04	19,50±0,00
34	11,33±0,58	6,50±0,50	7,67±0,29	13,33±0,29
35	34,50±0,00	15,33±0,76	24,00±0,87	26,67±0,58
36	34,50±0,00	15,83±1,26	24,83±0,29	30,00±0,87

26: EN    27: EN    28: EN    29: EN+AO    30: EN+AO    31: EN+AO    32: EN+AO  
 33: EN+AO    34: EN+AO    35: EN    36: EN    EN: Extracto natural    AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 8.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo C.



#### 4.1.1.4 Resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo D

Los resultados de los ensayos con los productos del grupo D se muestran en las Tablas núms. 22 y 23 y los Diagramas núms. 9 y 10.

Tabla núm. 22.- Valores de inhibición observados en las bacterias ensayadas frente a los productos del grupo D

Producto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
37	0,00±0,00	0,50±0,00	1,33±0,29	0,00±0,00	1,83±0,58	1,00±0,50	0,00±0,00
38	1,83±0,29	2,67±0,58	3,17±0,29	2,83±0,76	3,00±0,50	0,83±0,58	0,83±0,29
39	1,67±0,58	2,00±0,00	4,67±0,29	5,00±0,29	3,50±0,00	7,00±0,50	1,67±0,29
40	0,00±0,00	0,00±0,00	39,50±0,00	39,50±0,00	1,00±0,00	3,83±0,29	0,00±0,00
41	2,50±0,00	3,00±0,00	2,50±0,50	2,67±0,29	3,00±0,50	1,33±0,29	4,17±0,58
42	0,50±0,00	2,50±0,50	4,83±0,58	4,33±0,29	2,00±0,00	2,50±0,50	0,00±0,00
43	1,83±0,58	1,33±0,29	1,17±0,29	1,50±0,50	2,33±0,58	1,50±0,00	1,00±0,00
44	1,83±0,29	1,50±0,00	21,67±0,58	8,83±0,58	6,67±0,58	2,83±0,29	1,00±0,00

37: 1,8 Cineol      38: Acetato Bencilo      39: Geraniol      40: Citronelal  
41: Formiato Bencilo      42: Citronelol      43: Salicilato de metilo      44: Citral

Diagrama núm. 9.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo D.

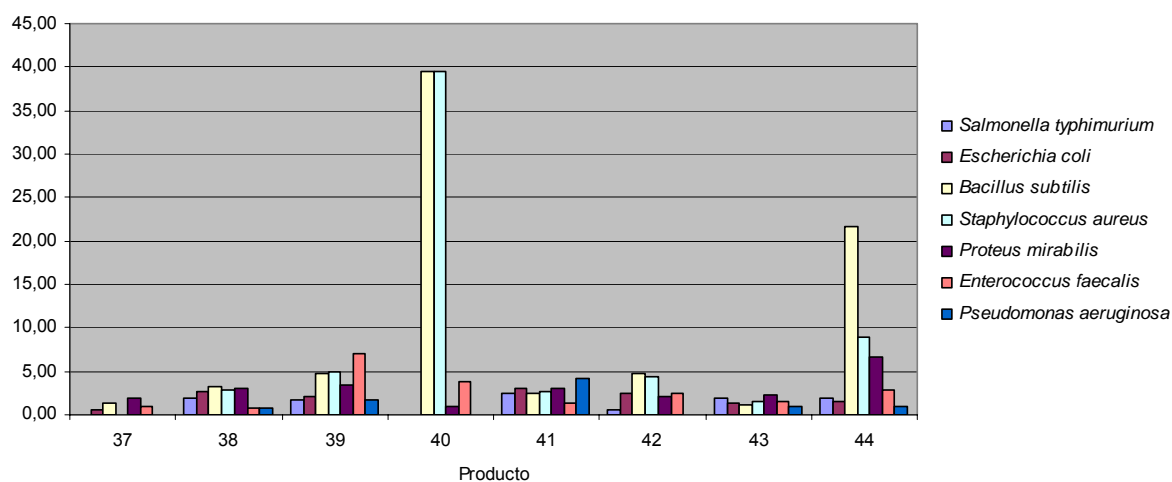
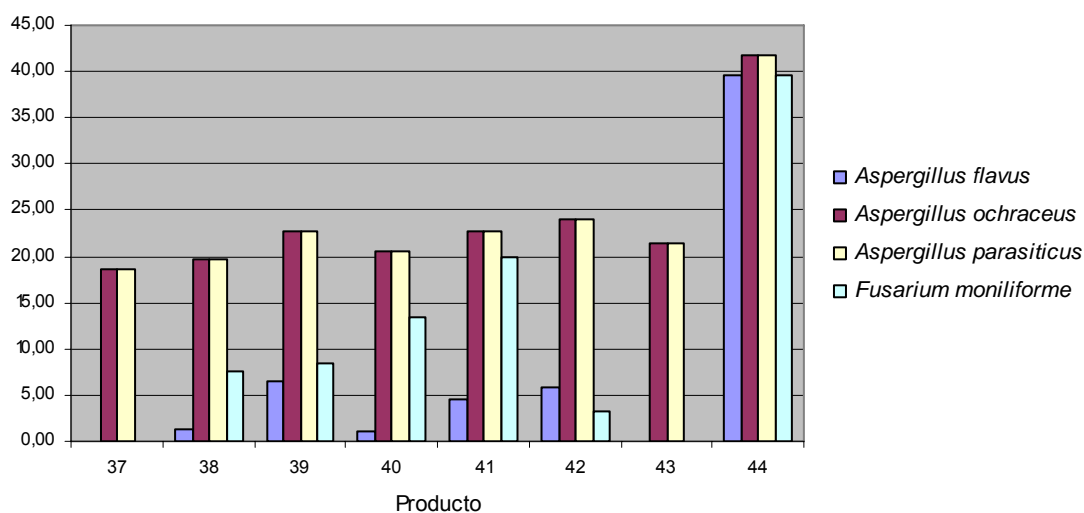


Tabla núm. 23.- Valores de inhibición observados en las cepas fúngicas ensayadas frente a los productos del grupo D.

Producto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
37	0,00±0,00	0,67±0,29	0,00±0,00	0,00±0,00
38	1,33±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00	7,50±0,87
39	6,50±0,50	22,50±1,32	8,17±0,58	8,50±0,87
40	1,00±0,50	0,67±0,29	0,00±0,00	13,33±1,26
41	4,50±0,50	6,83±0,76	0,00±0,00	20,00±0,87
42	5,83±0,29	8,00±1,00	3,83±0,76	3,17±0,29
43	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
44	39,50±0,00	39,50±0,00	39,50±0,00	39,50±0,00

37: 1,8 Cineol    38: Acetato Bencilo    39: Geraniol    40: Citronelal  
41: Formiato Bencilo    42: Citronelol    43: Salicilato de metilo    44: Citral

Diagrama núm. 10.- Valores de de inhibición expresados de forma comparativa, obtenidos con los productos del grupo D.





#### 4.1.2 RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR VOLATILIZACIÓN DE COMPONENTES DEL EXTRACTO (TÉCNICA DEL AROMATOGRAMA).

Los resultados obtenidos al aplicar la técnica del aromagrama, con el fin de determinar la posible actividad por volatilización de los componentes activos de los aceites esenciales ensayados, se resumen en las Tablas núms. 24 y 25.

Tabla núm. 24.- Resultados correspondientes al ensayo por la técnica del aromagrama frente a *Escherichia coli*. FVB467.

<b>PRODUCTO</b>	<b>VALOR DE INHIBICIÓN</b>
<b>Extracto de Rutáceas</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Aceite de canela</b>	<b>16,30mm</b>
<b>Producto 26</b>	<b>11,67mm</b>
<b>Producto 27</b>	<b>16,30mm</b>
<b>Producto 28</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Producto 35</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Producto 36</b>	<b>No inhibición</b>
<b>1,8 Cineol</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Geraniol</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Citronelal</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Citronelol</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Citral</b>	<b>Reducción del 50%*</b>

\* Se refiere a reducción del crecimiento sin halo de inhibición visible, comparándolo con la placa control de crecimiento.

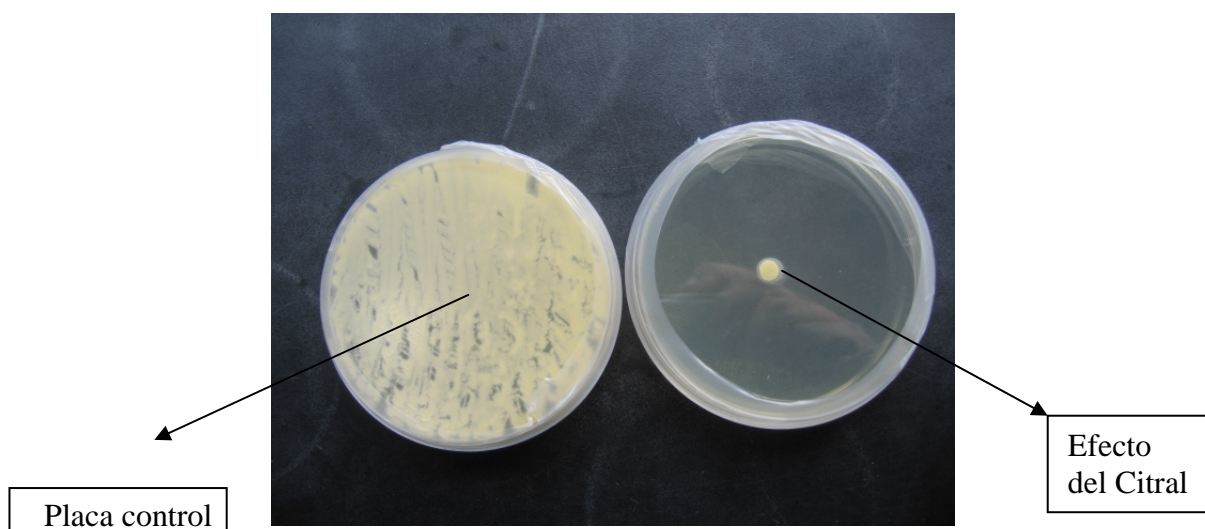
Tabla núm. 25 Resultados correspondientes al ensayo por la técnica del aromagrama frente a *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948.

PRODUCTO	VALOR DE INHIBICIÓN
<b>Extracto de Rutáceas</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Aceite de canela</b>	<b>69,00mm</b>
<b>Producto 26</b>	<b>70,67mm</b>
<b>Producto 27</b>	<b>74,33mm</b>
<b>Producto 28</b>	<b>No inhibición</b>
<b>Producto 35</b>	<b>45,67mm</b>
<b>Producto 36</b>	<b>45,67mm</b>
<b>1,8 Cineol</b>	<b>10,00mm</b>
<b>Geraniol</b>	<b>40,00mm</b>
<b>Citronelal</b>	<b>90,00mm*</b>
<b>Citronelol</b>	<b>22,00mm</b>
<b>Citral</b>	<b>90,00mm*</b>

\*Total inhibición del desarrollo en la placa de 90 mm de diámetro.

En la Fotografía núm. 3, se muestra un aromagrama realizado sobre *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 utilizando como producto a evaluar el citral.

Fotografía núm. 3.- En la fotografía se aprecia la placa con la cepa control de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 (placa izquierda) y a la derecha el efecto de los vapores del citral sobre el hongo, nótese una inhibición total del mismo (90,00mm, tras 3 días de incubación a 28°C).

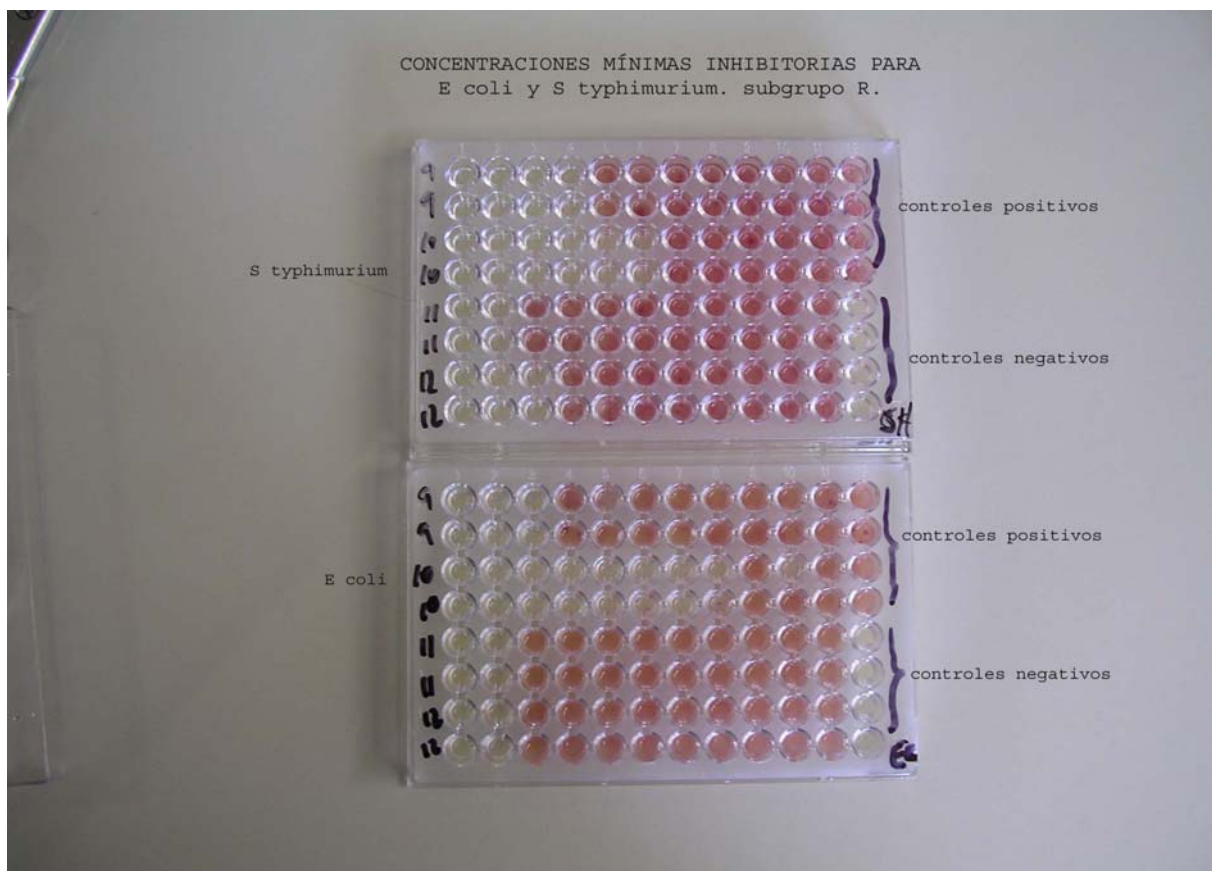


#### 4.1.3 RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL MÉTODO DE DILUCIÓN EN MICROPLACAS. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI)

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), se aportan en las Tablas y Diagramas siguientes, agrupados en base a la distribución de productos ensayados y señalada en el apartado de Material y Métodos.

La Fotografía núm. 4 permite observar la realización e interpretación de los ensayos para determinar la concentración mínima inhibitoria de los productos ensayados.

Fotografía núm. 4.- Ejemplo de placa con la realización del ensayo para establecer las Concentraciones mínimas inhibitorias de cada producto frente a los microorganismos ensayados.



#### 4.1.3.1 Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo A

Las Tablas núms. 26 y 27 y los diagramas 10 y 11 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias sobre hongos y bacterias para los productos del grupo A.

Tabla núm. 26.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo A sobre bacterias (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
1	1000	500	500	125	500	2000	62,5
2	4000	2000	1000	125	1000	4000	250
3	250	125	15,6	15,6	1000	1000	31,25
4	500	500	125	250	250	2000	500
5	2000	1000	125	125	4000	8000	250

1: Mezcla de ER y AO 2: Mezcla de ER y AO 3: Extracto de Rutáceas 4: Aceite esencial de canela 5: Mezcla de ER y AO ER: Extracto de Rutáceas AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 10.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo A frente a las bacterias ensayadas.

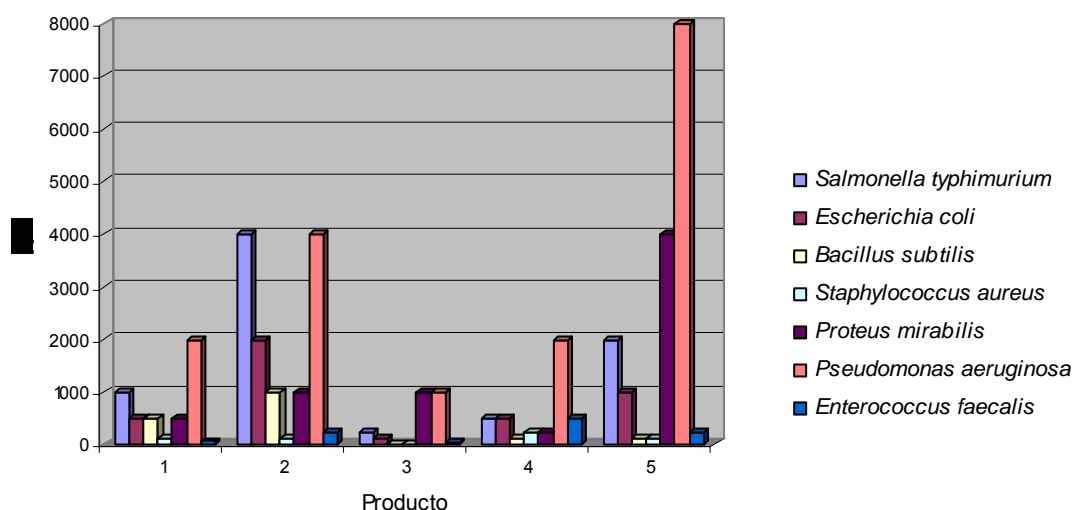
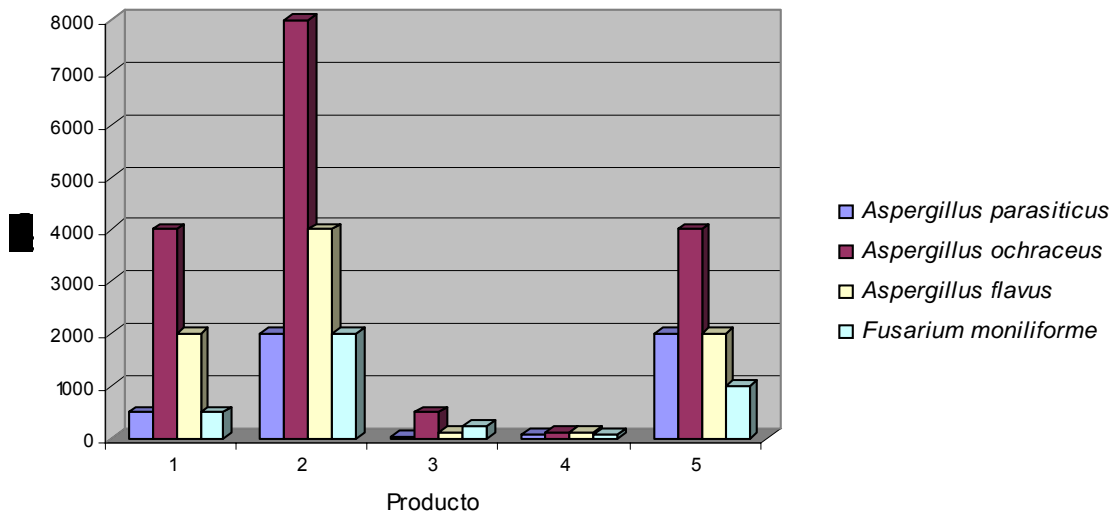


Tabla núm. 27.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo A sobre hongos (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
1	500	4000	2000	500
2	2000	8000	4000	2000
3	31,25	500	125	250
4	62,5	125	125	62,5
5	2000	4000	2000	1000

1: Mezcla de ER y AO    2: Mezcla de ER y AO    3: Extracto de Rutáceas    4: Aceite esencial de canela  
 5: Mezcla de ER y AO    ER: Extracto de Rutáceas    AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 11.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo A frente a los hongos ensayados.



#### 4.1.3.2 Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo B

Las Tablas núms. 28 al 31 y los diagramas 12 al 15 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias sobre hongos y bacterias para los productos del grupo B.

Tabla núm. 28.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo B sobre bacterias (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	125	125	250	250	250	125	250
7	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
8	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
9	4000	2000	4000	4000	4000	4000	4000
10	2000	2000	2000	4000	2000	2000	2000
11	2000	2000	2000	4000	2000	2000	2000
12	4000	4000	4000	8000	4000	4000	4000
13	125	250	1000	31,25	15,6	15,6	1000
14	2000	4000	2000	4000	2000	2000	16000
15	500	500	2000	62,5	31,25	31,25	2000

6: Formol 7: Acido fórmico 8: Acido propiónico 9: Acido láctico 10: Ácido láctico + Ácido Acético 11: Acido Acético  
12: Propionato sódico 13: ER 14: EN 15: ER + AO ER: Extracto Rutáceas EN: Extracto Natural AO: Acido orgánico

Diagrama núm. 12.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo B frente a las bacterias ensayadas.

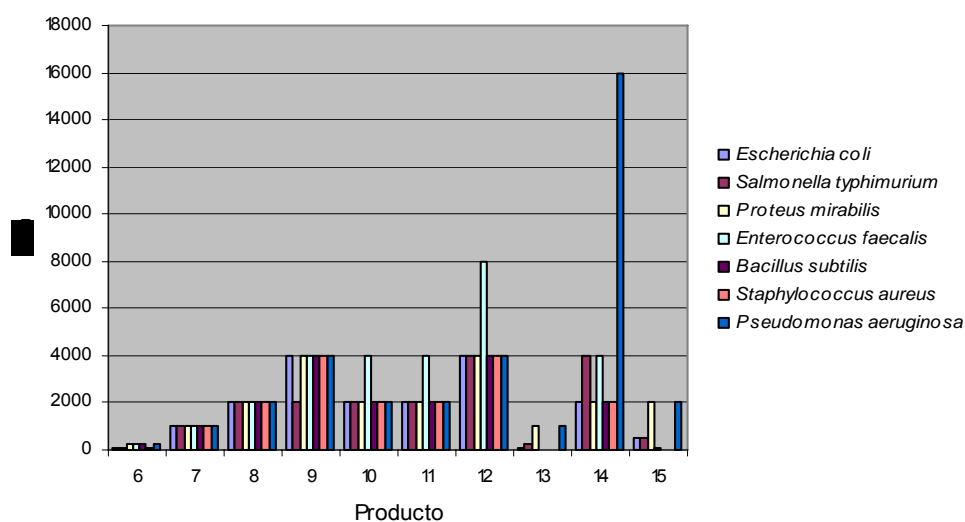


Tabla núm. 29.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo B sobre bacterias (Expresada en partes por millón, ppm). (Continuación).

Producto	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	16000	16000	16000	16000	2000	1000	16000
17	500	500	2000	62,5	31.25	15,6	2000
18	4000	8000	4000	4000	4000	4000	8000
19	2000	2000	2000	4000	2000	2000	2000
20	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
21	16000	8000	8000	16000	16000	16000	8000
22	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
23	2000	2000	4000	2000	2000	2000	4000
24	1000	1000	4000	2000	1000	2000	2000
25	2000	2000	4000	4000	4000	4000	4000

Productos del 16 al 25 son s mezclas en diferentes proporciones de Extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos.

Diagrama núm. 13.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo B frente a las bacterias ensayadas (continuación).

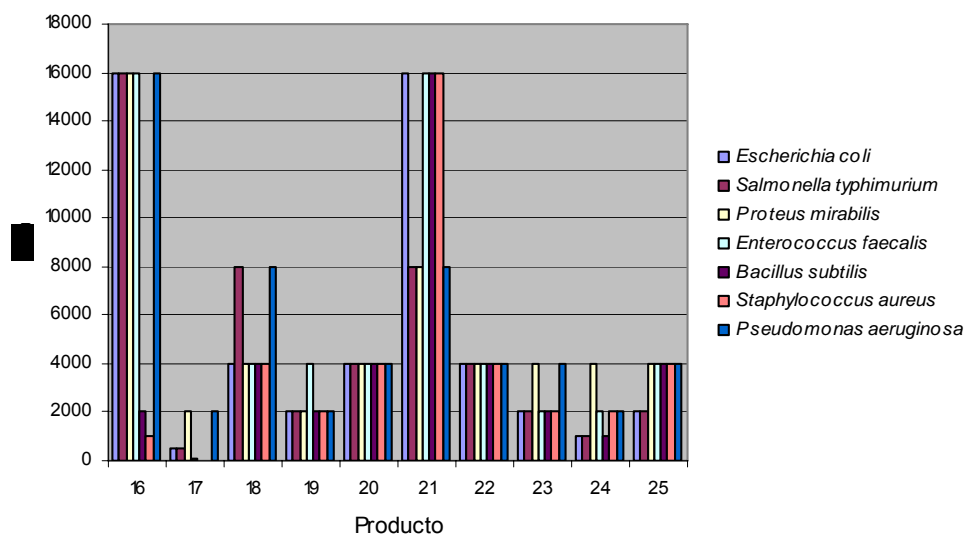


Tabla núm. 30.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo B sobre hongos (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
6	250	250	500	500
7	2000	1000	2000	1000
8	1000	1000	1000	1000
9	4000	2000	16000	8000
10	4000	2000	4000	2000
11	2000	2000	2000	1000
12	2000	2000	4000	2000
13	1000	125	2000	500
14	31,25	62,5	250	250
15	2000	500	2000	1000

6: Formol 7: Acido fórmico 8: Acido propiónico 9: Acido láctico 10: Ácido láctico + Ácido Acético 11: Acido Acético  
12: Propionato sódico 13: ER 14: EN 15: ER + AO ER: Extracto Rutáceas EN: Extracto Natural AO: Ác.orgánico

Diagrama núm. 14.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo B frente a los hongos ensayados.

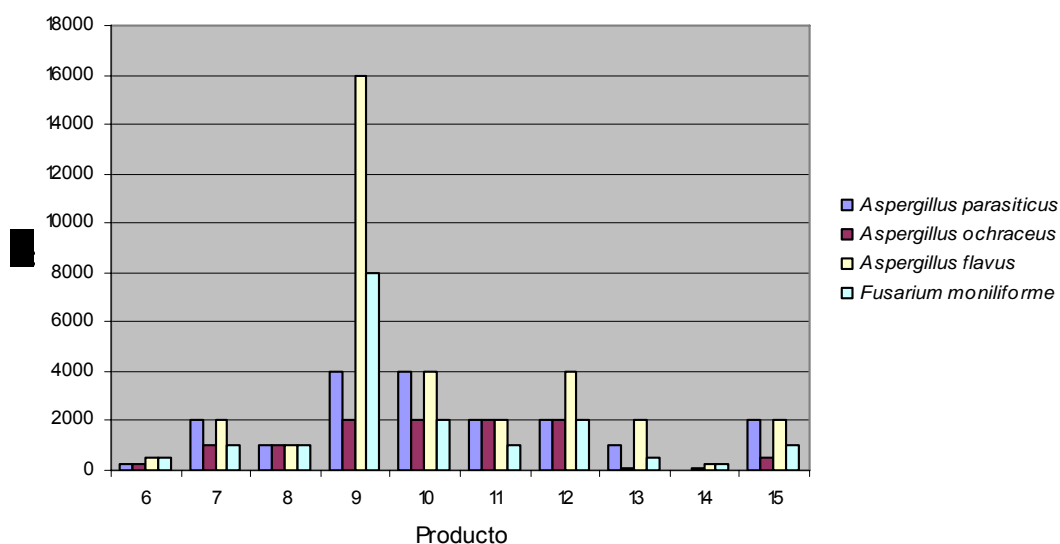


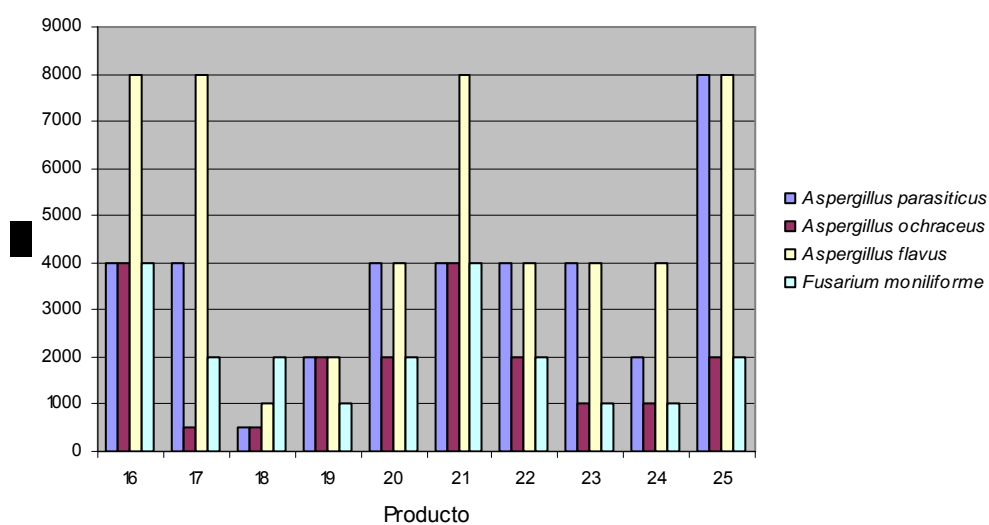


Tabla núm. 31.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo B sobre hongos, (Expresada en partes por millón, ppm). (Continuación).

Producto	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
16	4000	4000	8000	4000
17	4000	500	8000	2000
18	500	500	1000	2000
19	2000	2000	2000	1000
20	4000	2000	4000	2000
21	4000	4000	8000	4000
22	4000	2000	4000	2000
23	4000	1000	4000	1000
24	2000	1000	4000	1000
25	8000	2000	8000	2000

Productos del 16 al 25 son mezclas en diferentes proporciones de Extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos.

Diagrama núm. 15.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo B frente a los hongos ensayados (Continuación).



#### 4.1.3.3 Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo C

Las Tablas núms. 32 y 33, y los diagramas 16 y 17 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias sobre hongos y bacterias para los productos del grupo C.

Tabla núm. 32 Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo C sobre las bacterias ensayadas (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
26	125	250	250	125	125	1000	500
27	125	250	125	62,5	62,5	500	1000
28	500	125	16,6	31,25	500	1000	31,25
29	4000	4000	500	250	4000	16000	1000
30	4000	4000	125	250	2000	8000	1000
31	2000	2000	125	1000	1000	4000	1000
32	2000	2000	1000	1000	2000	8000	1000
33	2000	4000	4000	4000	2000	4000	4000
34	500	250	16,6	250	2000	4000	15,6
35	8000	8000	8000	2000	8000	16000	16000
36	4000	8000	8000	2000	8000	16000	16000

26: EN    27: EN 28: EN 29: EN+AO    30: EN+AO    31: EN+AO    32: EN+AO  
 33: EN+AO    34: EN+AO    35: EN    36: EN    EN: Extracto natural    AO: Ácido orgánico

Diagrama núm. 16.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo C frente a las bacterias ensayadas.

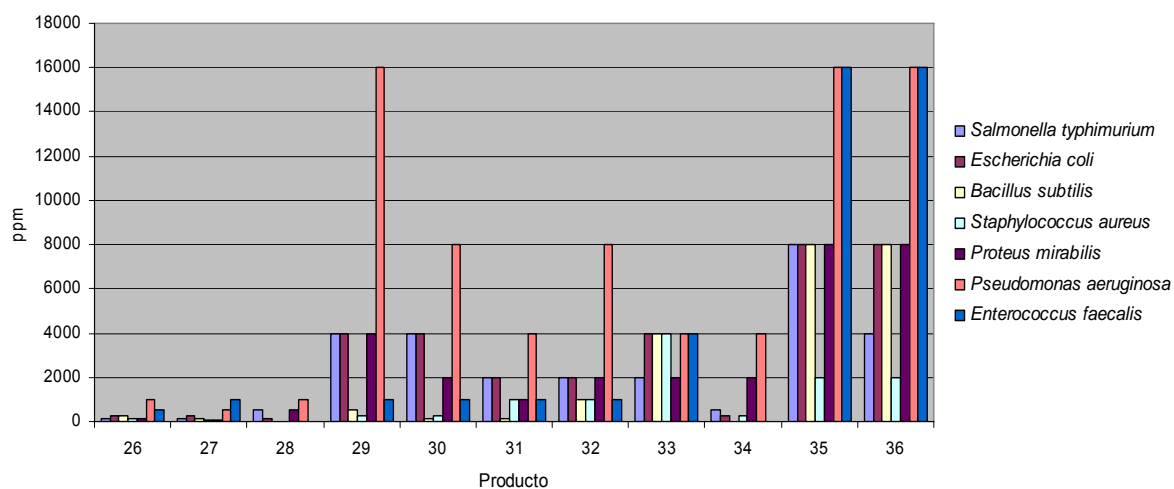
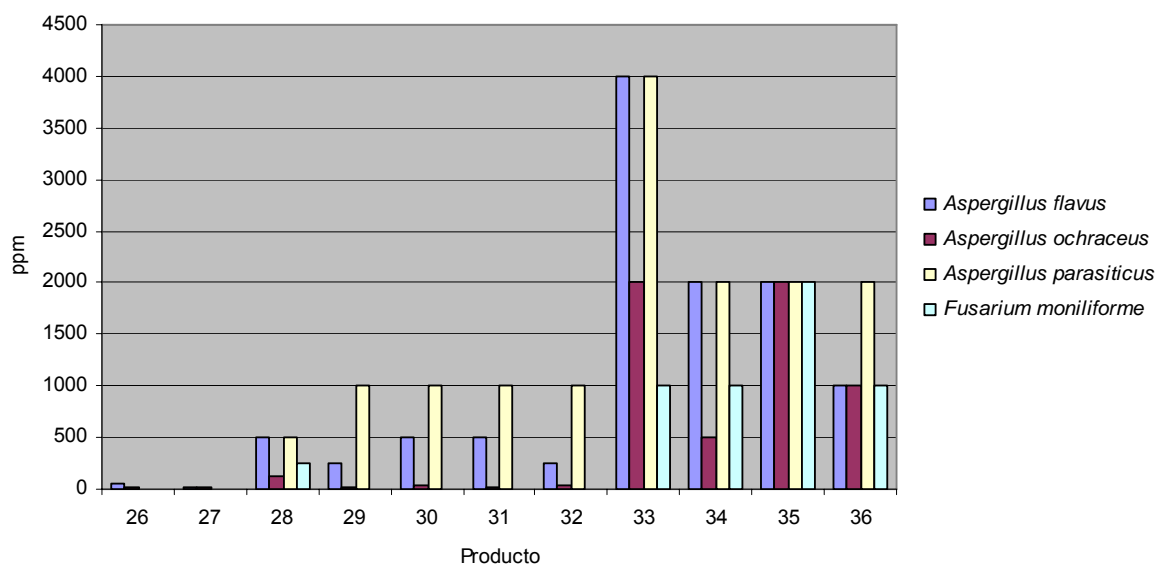


Tabla núm. 33.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo C sobre hongos, (expresado en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
26	62,5	15,6	62,5	62,5
27	15,6	15,6	62,5	62,5
28	500	125	500	250
29	250	15,6	1000	16,6
30	500	31,25	1000	31,25
31	500	15,6	1000	16,6
32	250	31,25	1000	16,6
33	4000	2000	4000	1000
34	2000	500	2000	1000
35	2000	2000	2000	2000
36	1000	1000	2000	1000

26: EN	27: EN	28: EN	29: EN+AO	30: EN+AO	31: EN+AO	32: EN+AO
33: EN+AO	34: EN+AO	35: EN	36: EN	EN: Extracto natural	AO: Ácido orgánico	

Diagrama núm. 17.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo C frente a los hongos ensayados.



#### 4.1.3.4 Resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo D

Las Tablas núms. 34 y 35, y los diagramas 18 y 19 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias sobre hongos y bacterias para los productos del grupo D.

Tabla núm. 34.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo D sobre las bacterias ensayadas, (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
37	>16000	>16000	>16000	>16000	>16000	>16000	>16000
38	8000	16000	>16000	>16000	16000	16000	16000
39	4000	2000	250	250	2000	2000	>16000
40	>16000	>16000	500	500	>16000	>16000	16000
41	8000	8000	4000	4000	16000	16000	8000
42	>16000	>16000	250	250	>16000	1000	>16000
43	4000	8000	1000	>16000	8000	>16000	16000
44	2000	2000	125	125	2000	1000	16000

37: 1,8 Cineol	38: Acetato Bencilo	39: Geraniol	40: Citronellal
41: Formiato Bencilo	42: Citronellol	43: Salicilato de metilo	44: Citral

Diagrama núm. 18.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo D frente a las bacterias ensayadas.

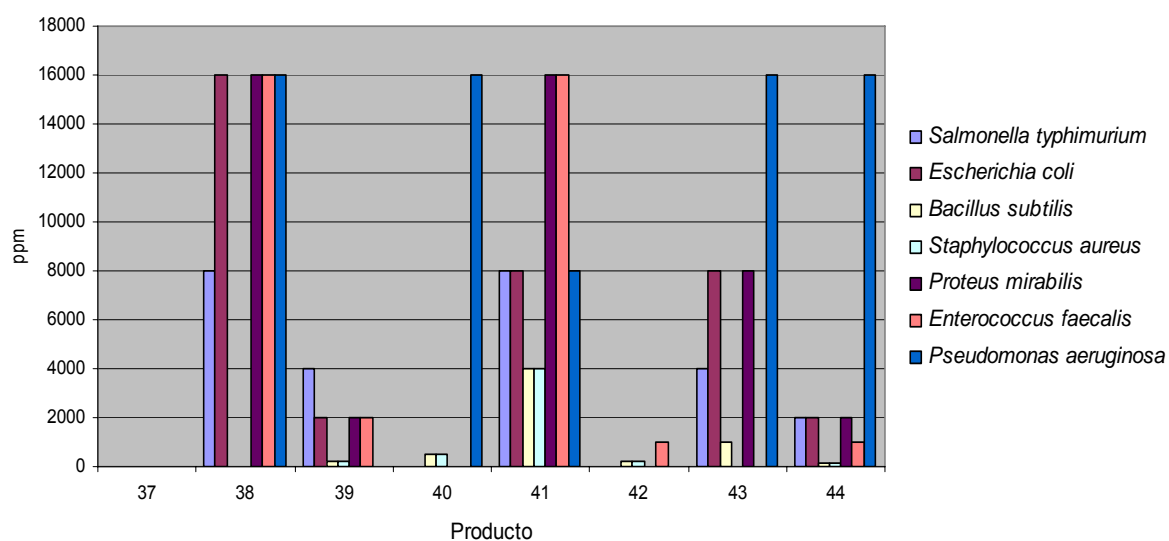
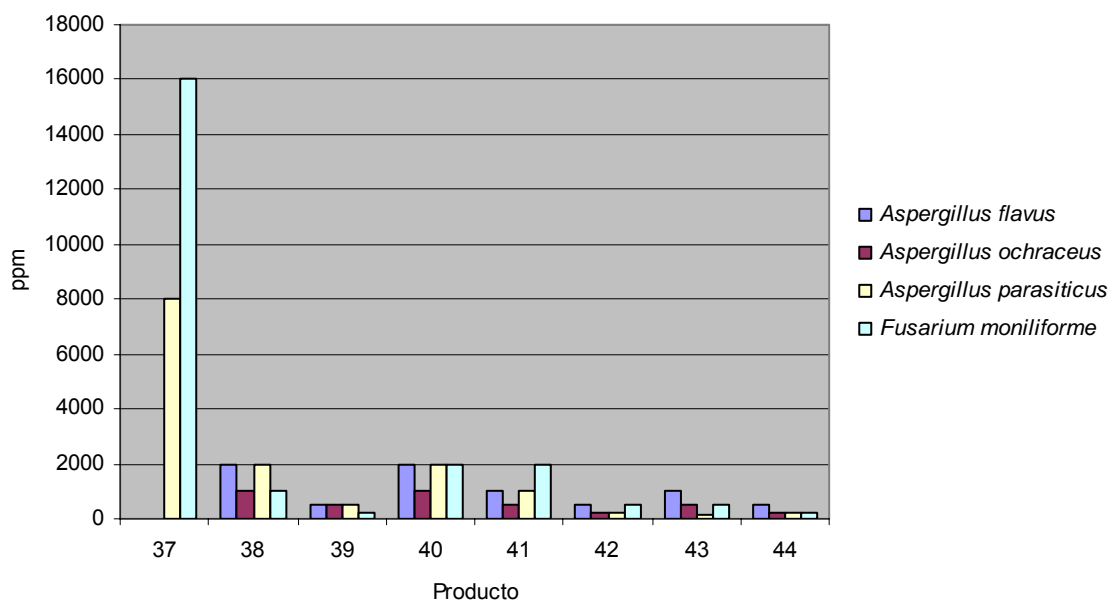


Tabla núm. 35.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos el grupo D sobre hongos, (Expresada en partes por millón, ppm).

Producto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
37	>16000	>16000	8000	16000
38	2000	1000	2000	1000
39	500	500	500	250
40	2000	1000	2000	2000
41	1000	500	1000	2000
42	500	250	250	500
43	1000	500	125	500
44	500	250	250	250

37: 1,8 Cineol	38: Acetato Bencilo	39: Geraniol	40: Citronellal
41: Formiato Bencilo	42: Citronellol	43: Salicilato de metilo	44: Citral

Diagrama núm. 19.- Concentraciones mínimas inhibitorias para productos del grupo D frente a los hongos ensayados.



#### 4.1.4 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA Y FÚNGICA POR ACEITES ESENCIALES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y MEZCLAS DE AMBOS, EN CEBADA EN GRANO Y EN PIENSO.

##### 4.1.4.1 Resultados del ensayo sobre cebada en grano

Los resultados obtenidos al adicionar los productos indicados en cada caso a cebada en grano esterilizada, analizando la evolución del desarrollo de *Escherichia coli* FVB467 y *Aspergillus flavus* FVB51 a lo largo de 14 días, se resumen en las Tablas núms. 36 y 37, y en las Gráficas núms. 1 y 2.

Tabla núm. 36.- Porcentaje de inhibición de *Escherichia coli* FVB467 en cebada en grano.

Producto	día 0	día 1	día 7	día 14
control	0	25	0	0
7	0	99	100	100
8	0	92,5	99,5	95
12	0	95	92,5	90
13	0	85	85	87,5
14	0	65	85	80
15	0	0	95	92,5
19	0	0	99	100
21	0	0	75	77,5

7: Acido fórmico    8: Acido propiónico    12: Propionato sódico    13:ER    14: EN    15: ER + AO  
 19: ER + AO    21: ER + AO    ER: Extracto de Rutaceas    EN: Extracto natural    AO: Ácido orgánico

Gráfica núm.1.- Porcentaje de inhibición de *Escherichia coli* FVB467 en cebada en grano.

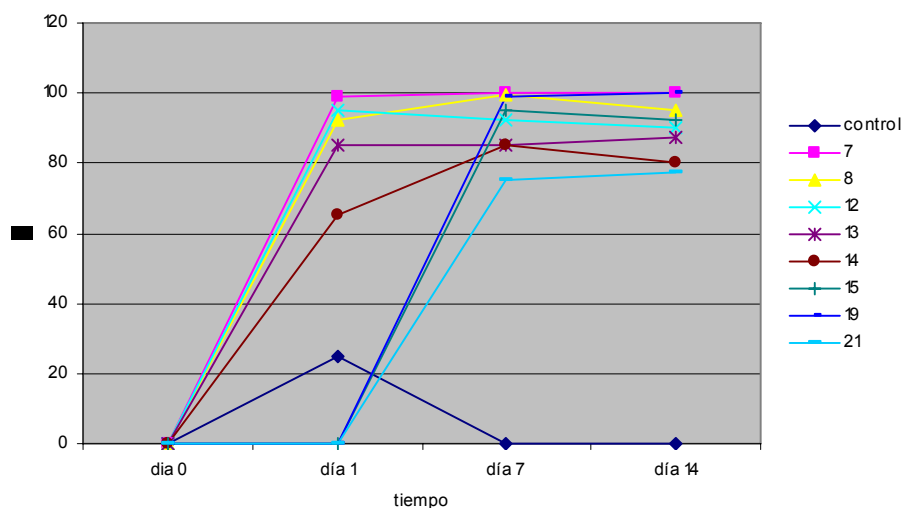
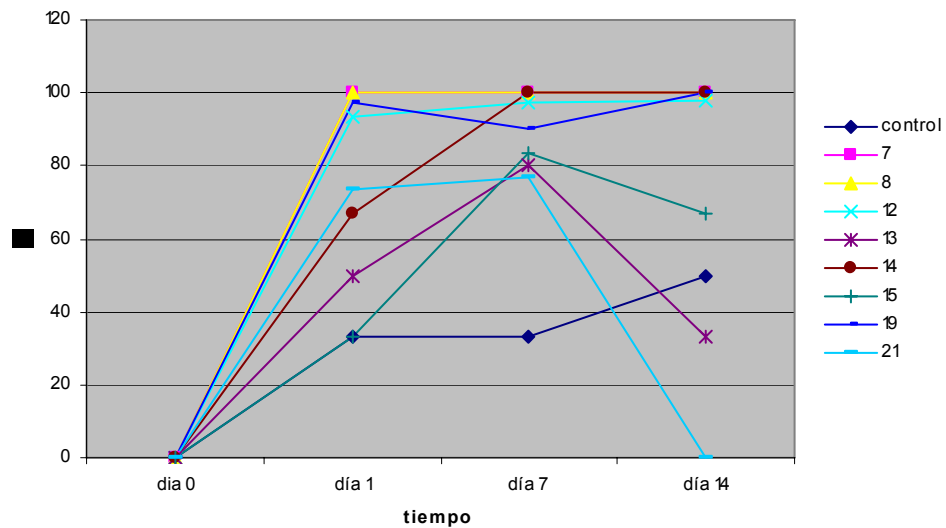


Tabla núm. 37.- Porcentaje de inhibición de *Aspergillus flavus* FVB51 en cebada en grano.

Producto	día 0	día 1	día 7	día 14
control	0	33,33	33,33	50
7	0	100	100	100
8	0	100	100	100
12	0	93,3	97,33	97,67
13	0	50	80	33,33
14	0	66,67	100	100
15	0	33,33	83,33	66,67
19	0	97,33	90	100
21	0	73,33	76,67	0

7: Acido fórmico 8: Acido propiónico 12: Propionato sódico 13:ER 14: EN 15: ER + AO  
 19: ER + AO 21: ER + AO ER: Extracto de Rutaceas EN: Extracto natural AO: Ácido orgánico

Gráfica núm. 2.- Porcentaje de inhibición de *Aspergillus flavus* FVB51 en cebada en grano



#### 4.1.4.2 Resultados del ensayo sobre pienso de finalización para gallinas

Los resultados obtenidos al adicionar los productos indicados en cada caso a pienso de finalización para gallinas esterilizado, analizando la evolución del desarrollo de *Escherichia coli* FVB467 y *Aspergillus flavus* FVB51 a lo largo de 14 días, se resumen en las Tablas núms. 38 y 39 y en las Gráficas núms. 3 y 4.

Tabla núm. 38.- Porcentaje de inhibición de *Escherichia coli* FVB467 en pienso para gallinas.

Producto	día 0	día 7	día 14
control	0	0	0
7	0	85	75
8	0	83	83
12	0	0	75
13	0	0	90
14	0	58	85
15	0	0	88
19	0	75	83
21	0	0	90

7: Ácido fórmico    8: Ácido propiónico    12: Propionato sódico    13:ER    14: EN    15: ER + AO  
 19: ER + AO    21: ER + AO    ER: Extracto de Rutáceas    EN: Extracto natural    AO: Ácido orgánico

Gráfica num. 3.- Inhibición de *Escherichia coli* FVB467 en pienso para gallinas.

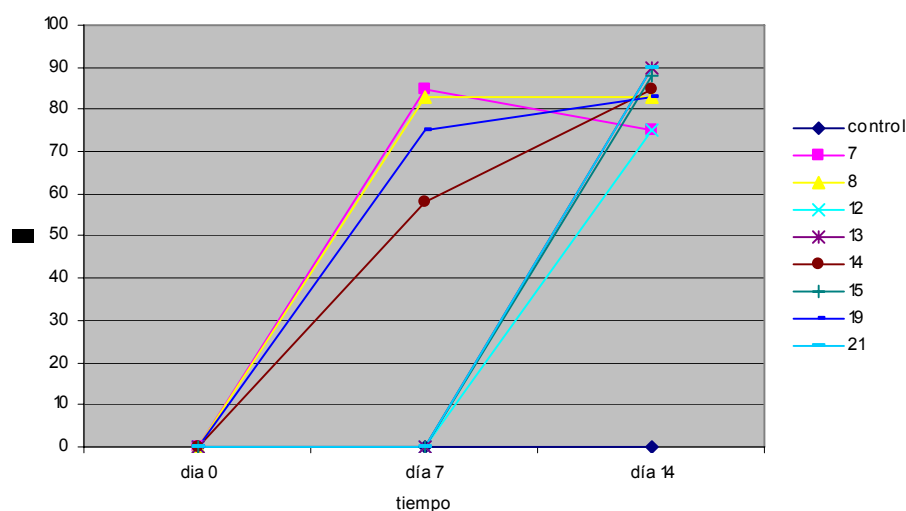


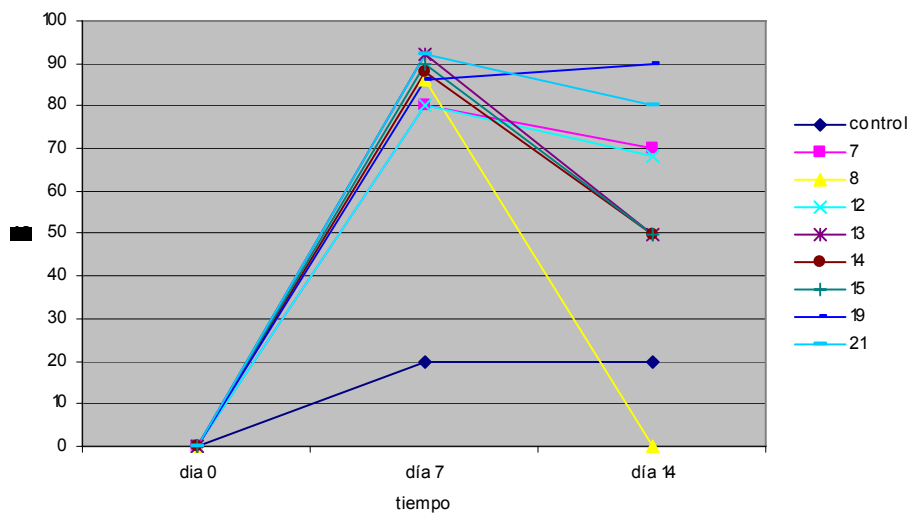


Tabla núm. 39.- Porcentaje de inhibición de *Aspergillus flavus* FVB51 en pienso para gallinas

Producto	día 0	día 7	día 14
control	0	20	20
7	0	80	70
8	0	86	0
12	0	80	68
13	0	92	50
14	0	88	50
15	0	90	50
19	0	86	90
21	0	92	80

7: Ácido fórmico    8: Ácido propiónico    12: Propionato sódico    13:ER    14: EN    15: ER + AO  
 19: ER + AO    21: ER + AO    ER: Extracto de Rutáceas    EN: Extracto natural    AO: Ácido orgánico

Gráfica núm. 4.- Inhibición de *Aspergillus flavus* FVB51 en pienso para gallinas.



#### 4.1.5 RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE LA DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE MICOTOXINAS POR UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES DE RUTACEAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.

En la Tabla núm. 40 se indican las micotoxinas ensayadas, y los resultados obtenidos al ponerlas en contacto con 2000 ppm del Extracto de Rutáceas por espacio de diez minutos, con el fin de que pudiera tener lugar, la posible reacción entre las micotoxinas y el extracto ensayado. Así mismo en la Tabla núm. 40, se indica la concentración de cada micotoxina antes (inicial) y después (final) del contacto con el extracto de Rutáceas. La detección de las micotoxinas se llevó a cabo por el método Vitaltech, descrito en el apartado de Material y Métodos.

Tabla núm. 40.- Degradación *in vitro* de micotoxinas por actividad de 2000ppm del extracto de Rutáceas.

MICOTOXINA	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL
AFLATOXINA B <sub>1</sub>	15ppb	8ppb
OCHRATOXINA A	20ppb	4ppb
DEOXINIVALENOL	3ppm	1,7ppm
ZEARALENONA	20ppm	20ppm

#### 4.1.6 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ATCC 2948 Y DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A, EN DOS SUSTRATOS VEGETALES POR ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES CON ÁCIDOS ORGÁNICOS

En las tablas núm. 41 y 42 podemos apreciar el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 y la producción de ocratoxina A (OTA) a los siete días de incubación a 28°C con los diversos productos y combinaciones (indicadas en el apartado 3.1.2.3.6.4 de la sección de Materiales y Métodos), adicionadas a arroz como matriz.

Tabla núm. 41.- Cuantificación de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 (UFC/g) y de la producción de Ocratoxina A (ppm) a los siete días de incubación con los diversos productos, sobre arroz como matriz.

Sustrato	Producto (ppm)	OTA (ppb)	UFC/g
ARROZ	C+	269	3,5x10 <sup>7</sup>
ARROZ	C-	0	0
ARROZ	P3 500ppm	342,4	10 <sup>7</sup>
ARROZ	P3 1000ppm	14,8	7x10 <sup>3</sup>
ARROZ	P3 2000ppm	19,9	10 <sup>5</sup>
ARROZ	P5 1000ppm	426,3	3x10 <sup>7</sup>
ARROZ	P5 2000ppm	3,1	1,5x10 <sup>4</sup>

C+: Control positivo C-: Control negativo P3: ER P5: ER + AO ER: Extracto de Rutáceas  
OA: Ácidos orgánicos OTA: Ocratoxina A

Tabla 42.- Porcentaje de inhibición de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 y de Ocratoxina A, respecto al control, a los siete días de incubación.

Sustrato	Producto (ppm)	Reduccion de OTA (%)	Inhibición de crecimiento
ARROZ	C+	-	-
ARROZ	C-	-	-
ARROZ	P3 500ppm	0	71,43
ARROZ	P3 1000ppm	94,5	99,98
ARROZ	P3 2000ppm	92,6	99,71
ARROZ	P5 1000ppm	0	14,29
ARROZ	P5 2000ppm	98,85	99,96

En las Tablas núms. 43 y 44 podemos apreciar el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 y la producción de ocratoxina A (OTA) a los siete días de incubación a 28°C con los diversos productos y combinaciones (indicadas en el apartado 3.1.2.3.6.4 de la sección de Materiales y Métodos), adicionadas a maíz como matriz.

Tabla núm. 43.- Cuantificación de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 (UFC/g) y de la producción de Ocratoxina A (ppm) a los siete días de incubación con los diversos productos, sobre maíz como matriz.

Sustrato	Producto (ppm)	OTA (ppb)	UFC/g
MAIZ	C+	244,6	$3 \times 10^7$
MAIZ	C-	0	0
MAIZ	P3 500ppm	2,5	$10^3$
MAIZ	P3 1000ppm	6,4	$2 \times 10^3$
MAIZ	P3 2000ppm	13,5	$2 \times 10^3$
MAIZ	P5 1000ppm	430,4	$2 \times 10^7$
MAIZ	P5 2000ppm	4,5	$6 \times 10^3$

C+: Control positivo C-: Control negativo P3: ER P5: ER + AO ER: Extracto de Rutáceas  
OA: Ácidos orgánicos OTA: Ocratoxina A

Tabla núm. 44.- Porcentaje de inhibición de *Aspergillus ochraceus* ATCC 2948 y de Ocratoxina A, respecto al control, a los siete días de incubación.

Sustrato	Producto (ppm)	Reduccion de OTA (%)	Inhibición de crecimiento
MAIZ	C+	-	-
MAIZ	C-	-	-
MAIZ	P3 500ppm	98,98	100
MAIZ	P3 1000ppm	97,38	99,99
MAIZ	P3 2000ppm	94,48	99,99
MAIZ	P5 1000ppm	0	33,33
MAIZ	P5 2000ppm	98,16	99,98

#### 4.1.7 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE EXTRACTOS DE RUTACEAS Y DE LA ALTERACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE *Escherichia coli* FVB467 Y *Salmonella typhimurium* FVB 567 POR ACCIÓN DE ÉSTOS.

Los resultados se muestran a continuación.

##### 4.1.7.1 **Resultados del estudio de la actividad enzimática del extracto de Rutáceas:**

En la Tabla núm. 45 se muestran los resultados obtenidos al evaluar el extracto de Rutáceas sin diluir mediante API ZYM<sup>®</sup>

Tabla núm. 45.-Relación de enzimas detectados, que influyen en la actividad del extracto de Rutáceas, sobre los microorganismos y nivel de actividad.

Sustrato	Enzima detectada	Nivel de actividad
Naftil-N-acetil- $\beta$ -glucosaminidina	N-acetil- $\beta$ - glucosaminidasa	2
Naftil-Fosfato	Fosfatasa	1
Naftil-Butirato	Esterasa	2
Naftil-Miristato	Lipasa	2
L-Leucil-naftilamida	Leucina arilamidasa	3
L-Cistil-naftiamida	Cistina arilamidasa	3

1: 5 nanomoles de sustrato hidrolizado; 2: 10 nanomoles de sustrato hidrolizado; 3: 20 nanomoles de sustrato hidrolizado

**4.1.7.2 Resultados de la evaluación de la alteración *in vitro* de la actividad enzimática extracelular de *Escherichia coli* FVB 467 y *Salmonella typhimurium* FVB 567 por extractos de Rutáceas.**

En las Tablas núm. 46 y 47 se resume la diversidad de la actividad enzimática detectada a partir de cultivos de microorganismos o en contacto con los extractos de Rutáceas, que corresponde con el Producto 3.

Tabla núm. 46.- Actividad enzimática del extracto de Rutáceas (1000ppm) sobre un cultivo de *Escherichia coli* FVB467 en medio líquido.

Nº	ENZIMA ESTUDIADA	Control crecimiento <i>E coli</i> (30min)	Control crecimiento <i>E coli</i> (30min)	<i>E coli</i> + P3 (30min)	<i>E coli</i> + P3 (30min)	PBS (30min)	PBS (30min)
1	CONTROL	0	0	0	0	0	0
2	<b>fosfatasa alcalina</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	0	0
3	<b>Esterasa (C4)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0
4	Esterasa Lipasa (c8)	0	0	0	0	0	0
5	Lipasa(C14)	0	0	0	0	0	0
6	<b>Leucina arilamidasa</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0
7	<b>Valina arilamidasa</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0	0
8	Cistina arilamidasa	0	0	0	0	0	0
9	Tripsina	0	0	0	0	0	0
10	$\alpha$ -quimotripsina	0	0	0	0	0	0
11	<b>fosfatasa ácida</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	0	0
12	<b>Naftol-AS-BI-phosfosfohidrolasa</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	0	0
13	$\alpha$ -galactosidasa	0	0	0	0	0	0
14	<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	0	0
15	<b><math>\beta</math>-glucoronidasa</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0
16	<b><math>\alpha</math>-glucosidasa</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	0	0
17	$\beta$ -glucosidasa	0	0	0	0	0	0
18	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasas	0	0	0	0	0	0
19	$\alpha$ -mannosidasa	0	0	0	0	0	0
20	$\alpha$ -fucosidasa	0	0	0	0	0	0

P3: Extracto de Rutáceas.

FOTOGRAFIA núm 5.- La galería número uno, corresponde a una incubación de *Escherichia coli* FVB467 durante treinta minutos a 37°C, y la número dos corresponde a una incubación de *Escherichia coli* FVB467 en presencia de 1000ppm de extracto de Rutáceas.



Tabla núm. 47.-Actividad enzimática de extractos de Rutáceas (1000ppm) sobre un cultivo de *Salmonella typhimurium* FVB567 en medio líquido.

Nº	ENZIMA ESTUDIADA	Control crecimiento <i>Salmonella</i> (30min)	Control crecimiento <i>Salmonella</i> (30min)	<i>Salmonella</i> + P3 (30min)	<i>Salmonella</i> + P3 (30min)	PBS (30min)	PBS (30min)
1	CONTROL	0	0	0	0	0	0
2	fosfatasa alcalina	5	5	3	3	0	0
3	Esterasa (C4)	2	2	0	0	0	0
4	Esterasa Lipasa (c8)	2	2	1	1	0	0
5	Lipasea(C14)	0	0	0	0	0	0
6	Leucina arilamidasa	4	4	0	0	0	0
7	Valina arilamidasa	1	1	0	0	0	0
8	Cistina arilamidasa	0	0	0	0	0	0
9	Tripsina	0	0	0	0	0	0
10	$\alpha$ -quimotripsina	0	0	0	0	0	0
11	fosfatasa ácida	5	5	4	4	0	0
12	Naftol-AS-BI-phosfosfohidrolasa	2	2	1	1	0	0
13	$\alpha$ -galactosidasa	0	0	0	0	0	0
14	$\beta$ -galactosidasa	0	0	0	0	0	0
15	$\beta$ -glucoronidasa	0	0	0	0	0	0
16	$\alpha$ -glucosidasa	1	1	1	1	0	0
17	$\beta$ -glucosidasa	0	0	0	0	0	0
18	N-acétil- $\beta$ -glucosaminidasas	0	0	0	0	0	0
19	$\alpha$ -mannosidasa	0	0	0	0	0	0
20	$\alpha$ -fucosidasa	0	0	0	0	0	0

P3: Extracto de Rutáceas 2000ppm



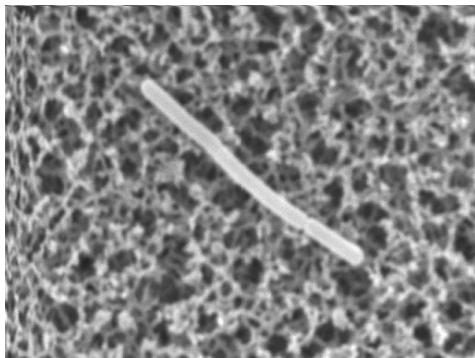
Fotografía núm. 6.- La galería de la parte superior de la foto, corresponde a una incubación de *Salmonella typhimurium* FVB567 durante treinta minutos a 37°C, y la de la parte inferior corresponde a una incubación de *Salmonella typhimurium* FVB567 en presencia de 1000ppm de extracto de Rutáceas.



#### 4.1.8 RESULTADOS DE LA OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE RUTÁCEAS SOBRE BACTERIAS

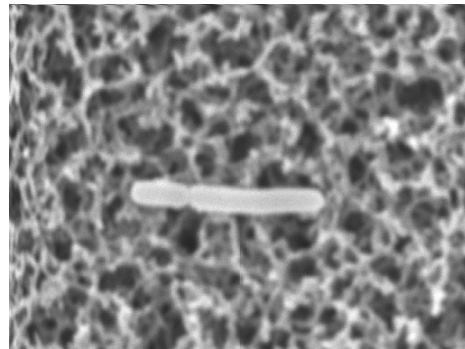
En las Fotografías núms. 7 a la 21, podemos apreciar los resultados de la observación bajo microscopía electrónica de barrido de la acción del extracto de Rutáceas sobre *Bacillus subtilis* FVB19 y *Salmonella typhimurium* FVB576 .

Fotografía núm. 7.- *Bacillus subtilis*  
(Control positivo 2 horas de incubación)



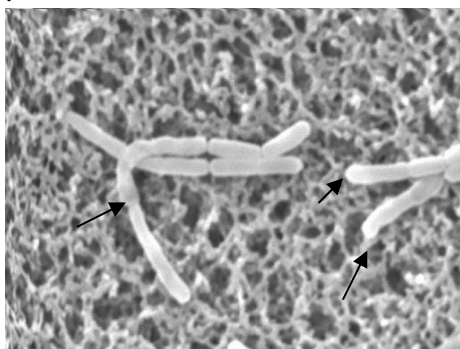
(x 7500)

Fotografía núm. 8.- *Bacillus subtilis*  
(Control positivo 2 horas de incubación).



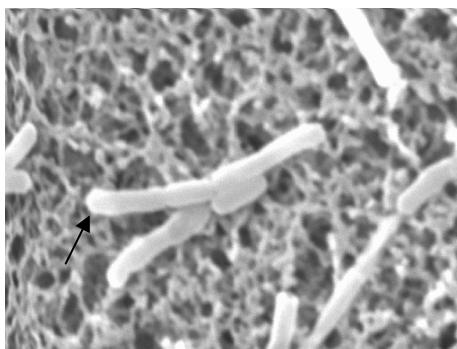
(x 10000)

Fotografía núm. 9.-  
*B. subtilis* + ER a 1500 ppm (2 horas de incubación). Las flechas señalan el probable inicio de la esporulación.



(x 7500)

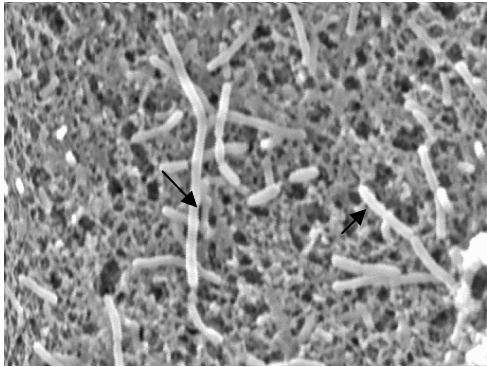
Fotografía núm. 10  
*B. subtilis* + ER a 1500 ppm (2 horas de incubación). La flecha señala el probable inicio de la esporulación.



(x 10000)

Fotografía núm. 11

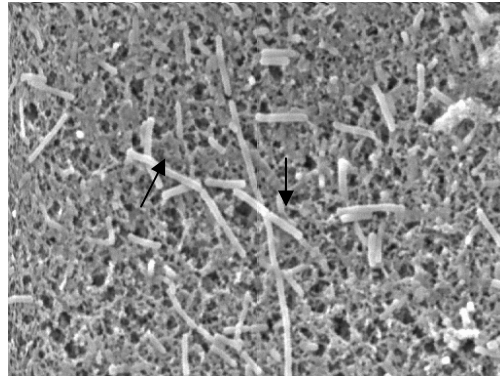
*B. subtilis* (Control positivo 24 horas)  
Las flechas señalan la presencia de la bacteria control.



(x 5000)

Fotografía núm. 12

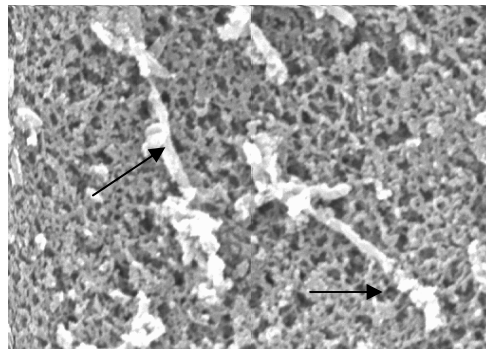
*B. subtilis* (Control positivo 24 horas)  
Las flechas señalan la presencia de la bacteria control.



(x 3500)

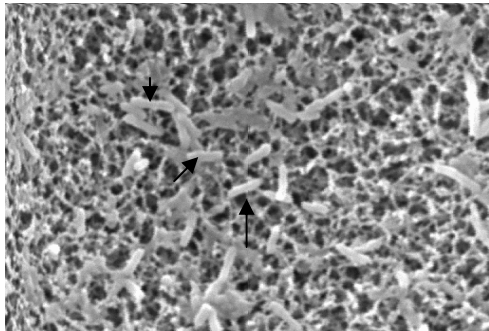
Fotografía núm. 13

*B. subtilis* + ER a 1500 ppm (24 horas)  
Ausencia total de *B. subtilis*.



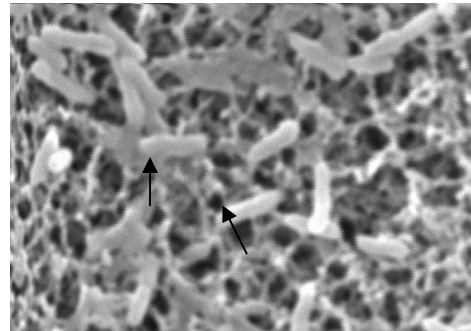
(x 10000)

Fotografía núm. 14  
*Salmonella typhimurium*  
 (control positivo 2 horas)  
 Las flechas señalan la bacteria control.



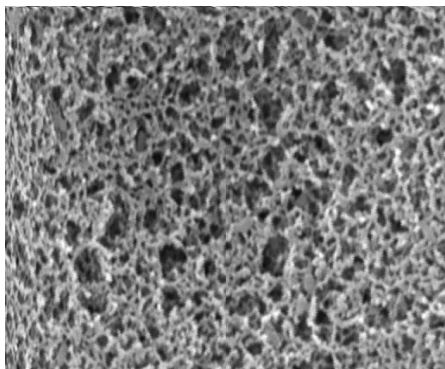
(x 5000)

Fotografía núm. 15  
*Salmonella typhimurium*  
 (control positivo 2 horas)  
 Las flechas señalan la bacteria control.



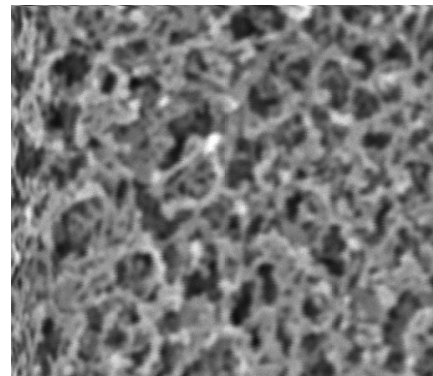
(x 10000)

Fotografía núm. 16  
*S. typhimurium* + ER a 1000ppm  
 (2 horas incubación).  
 Ausencia de *S. typhimurium*.



(x 5000)

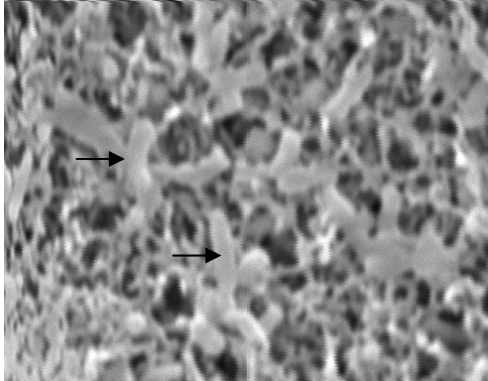
Fotografía núm. 17  
*S. typhimurium* + ER a 1000ppm  
 (2 horas incubación).  
 Ausencia de *S. typhimurium*.



(x 10000)

Fotografía núm. 18

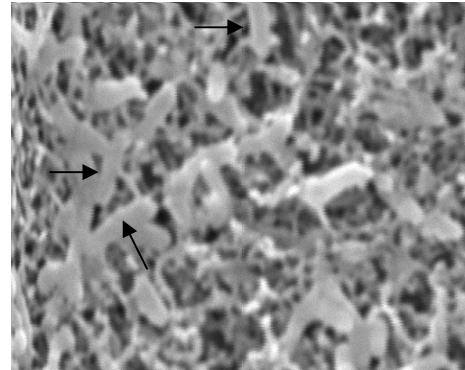
*S. typhimurium* (Control positivo  
24 horas de incubación).  
Las flechas señalan la bacteria control.



(X10000)

Fotografía núm. 19

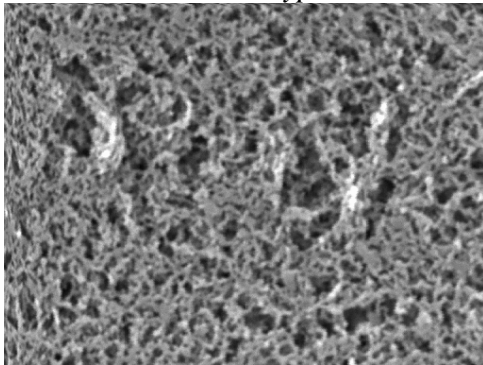
*S. typhimurium* (Control positivo  
24 horas incubación).  
Las flechas señalan la bacteria control.



(x 10000)

Fotografía núm. 20

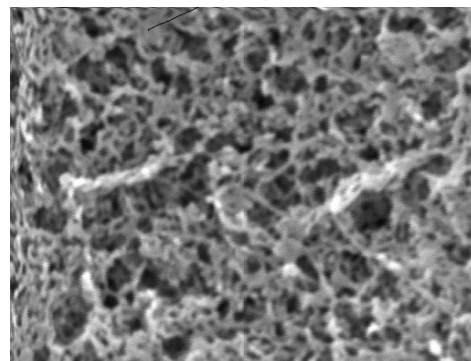
*S. typhimurium* + ER a 1000ppm  
(24 horas de incubación).  
Ausencia total de *S. typhimurium*.



(x 5000)

Fotografía núm. 21

*S. typhimurium* + ER a 1000ppm  
(24 horas de incubación).  
Ausencia total de *S. typhimurium*.



(x 10000)

## 4.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN *IN VIVO*.

Los resultados de las pruebas de evaluación *in vivo* se exponen a continuación de acuerdo al ensayo realizado.

### 4.2.1 RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXTRACTO DE RUTÁCEAS SOBRE LA MICROBIOTA ENTÉRICA DE CERDOS DESTETADOS.

En la tabla núm. 48 de la página siguiente, se aportan los resultados de las analíticas microbiológicas llevadas a cabo: Recuento total de bacterias aerobias mesófilas, recuento total de bacterias anaerobias, recuento de *Enterobacteriaceae* totales, y recuento total de hongos, para cada parte del intestino (duodeno, yeyuno, ileon y colon) de los animales en estudio.

Tabla núm. 48.- Población microbiana (recuentos totales: log CFU/g; significado  $\pm$ SEM) del contenido intestinal de los cerdos (2 cerdos/tratamiento), de acuerdo al tratamiento administrado.

(Antibióticos = 120ppm colistina + 300ppm amoxicilina. P2= producto 2)

Item	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Colon
<b>Bacterias aerobias mesófilas</b>				
Control negativo	5.0 $\pm$ 0.00	4.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	5.0 $\pm$ 0.00
Antibióticos	4.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	5.0 $\pm$ 0.00	6.0 $\pm$ 0.00
P2	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00
P2 + Antibióticos	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00
p<F	-	-	-	-
<b>Bacterias anaerobias</b>				
Control negativo	2.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.00	2.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.00
Antibióticos	6.0 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 0.00	6.0 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 0.00
P2	1.8 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.0 $\pm$ 0.00	1.3 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	4.0 $\pm$ 0.00
P2 + Antibióticos	1.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	2.0 $\pm$ 0.00	2.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.00
p<F	***	-	***	-
<b>Enterobacterias</b>				
Control negativo	3.0 $\pm$ 0.00	4.0 $\pm$ 0.00	5.0 $\pm$ 0.00	5.0 $\pm$ 0.00
Antibióticos	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	5.0 $\pm$ 0.00	5.0 $\pm$ 0.00
P2	2.0 $\pm$ 0.00	2.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00
P2 + Antibióticos	2.0 $\pm$ 0.00	2.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00	3.0 $\pm$ 0.00
p<F	-	-	-	-
<b>Hongos y levaduras</b>				
Control negativo	2.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.00	2.0 $\pm$ 0.00	4.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
Antibióticos	2.5 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.00	4.3 $\pm$ 0.00	4.3 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
P2	2.3 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.00	2.5 $\pm$ 0.00	3.3 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
P2 + Antibióticos	2.6 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 0.00	4.3 $\pm$ 0.00	3.7 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
p<F	***	-	-	***

a,b,c,d valores dentro de las columnas sin superscript comunes son significativamente diferentes  
El signo - significa que no se puede realizar estadística. \*\*\* p <0.001

P2: Mezcla de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos.

a,b,c,d valores dentro de las columnas sin *superscript* comunes, son significativamente diferentes, - Significa que son diferentes pero como SEM=0, no puede realizarse estadística.

\*\*\* p <0.001

#### 4.2.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS DE RUTACEAS Y ACIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE ENGORDE.

##### 4.2.2.1 Resultados sobre los parámetros productivos de los cerdos.

En las Tablas 49 al 54 y la gráfica núm. 5 se muestran los parámetros productivos de los animales objeto del estudio y su evolución a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Tener en cuenta las siguientes equivalencias:

GMD: Ganancia de peso diaria      CMD: Consumo de pienso diario

IC: Índice de conversión

Tabla núm. 49.- Resultados del engorde de 0 a 14 días.

##### RESULTADOS DE ENGORDE DE 0 A 14 DIAS.

PARÁMETRO	T-1	T-2	T-3	STD ERROR
NUMERO CORRALES	10	9	10	
PESO MEDIO INICIAL (KG)	26,3	26,22	26,32	0,24
PESO MEDIO FINAL (KG)	34,62	33,72	35,42	0,34
GMD (g/DIA)	594,60 <sup>ab</sup>	535,78 <sup>b</sup>	649,90 <sup>a</sup>	14,33
CMD (g/DIA)	1,181,20 <sup>a</sup>	1.070,22 <sup>b</sup>	1.204,50 <sup>a</sup>	19,92
IC	1,99 <sup>ab</sup>	2,02 <sup>a</sup>	1,85 <sup>b</sup>	0,03

Tabla núm. 50.- Resultados del engorde de 0 a 28 días

##### RESULTADOS DE ENGORDE DE 0 A 28 DIAS.

PARÁMETRO	T-1	T-2	T-3	STD ERROR
NUMERO CORRALES	10	9	10	
PESO MEDIO INICIAL (KG)	26,3	26,22	26,32	0,24
PESO MEDIO FINAL (KG)	46,54	44,81	47,65	0,52
GMD (g/DIA)	722,80 <sup>ab</sup>	663,78 <sup>b</sup>	761,60 <sup>a</sup>	14,1
CMD (g/DIA)	1.491,70 <sup>a</sup>	1.349,89 <sup>b</sup>	1.492,40 <sup>a</sup>	24,03
IC	2,07 <sup>a</sup>	2,04 <sup>a</sup>	1,96 <sup>b</sup>	0,02



Tabla núm. 51.- Resultados del engorde de 0 a 42 días

## RESULTADOS DE ENGORDE DE 0 A 42 DIAS.

PARÁMETRO	T-1	T-2	T-3	STD ERROR
NUMERO CORRALES	10	9	10	
PESO MEDIO INICIAL (KG)	26,3	26,22	26,32	0,24
PESO MEDIO FINAL (KG)	58,65	56,72	60,12	0,62
GMD (g/DIA)	779,40 <sup>ab</sup>	726,22 <sup>b</sup>	804,70 <sup>a</sup>	12,1
CMD (g/DIA)	1.734,60 <sup>a</sup>	1564,11 <sup>b</sup>	1.698,50 <sup>a</sup>	24,34
IC	2,25 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	2,11 <sup>b</sup>	0,02

Tabla núm. 52.- Resultados del engorde de 0 a 56 días

## RESULTADOS DE ENGORDE DE 0 A 56 DIAS.

PARÁMETRO	T-1	T-2	T-3	STD ERROR
NUMERO CORRALES	10	9	10	
PESO MEDIO INICIAL (KG)	26,30	26,22	26,32	0,24
PESO MEDIO FINAL (KG)	71,12	69,03	73,27	0,80
GMD (g/DIA)	800,50 <sup>ab</sup>	764,44 <sup>b</sup>	838,30 <sup>a</sup>	12,23
CMD (g/DIA)	1.859,20 <sup>a</sup>	1.710,00 <sup>b</sup>	1.852,60 <sup>a</sup>	25,29
IC	2,32 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	2,21 <sup>b</sup>	0,01

Tabla núm. 53.- Resultados del engorde de 0 a 70 días

## RESULTADOS DE ENGORDE DE 0 A 70 DIAS.

PARÁMETRO	T-1	T-2	T-3	STD ERROR
NUMERO CORRALES	10	9	10	
PESO MEDIO INICIAL (KG)	26,30	26,22	26,32	0,24
PESO MEDIO FINAL (KG)	83,72	82,36	85,62	0,86
GMD (g/DIA)	820,30	802,22	847,00	10,65
CMD (g/DIA)	1.950,60 <sup>a</sup>	1.813,67 <sup>b</sup>	1.930,90 <sup>a</sup>	24,64
IC	2,38 <sup>a</sup>	2,26 <sup>b</sup>	2,28 <sup>b</sup>	0,01

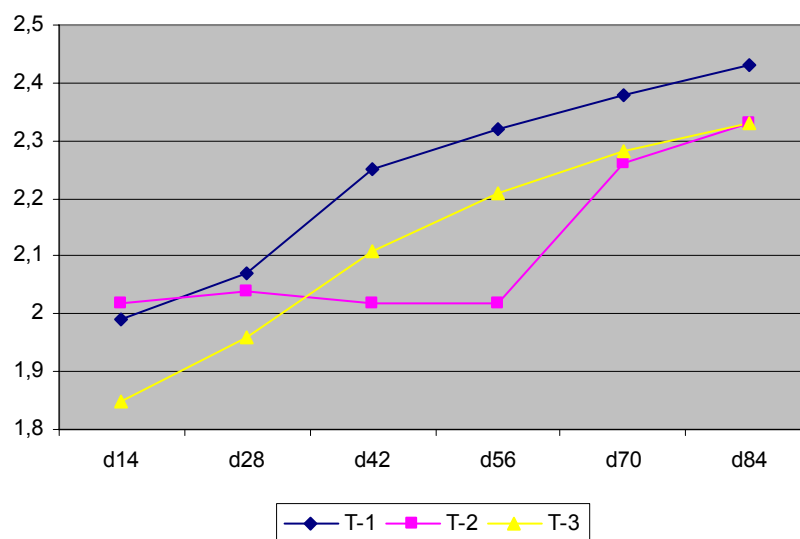
Tabla núm. 54.- Resultados del engorde de 0 a 84 días

## RESULTADOS DE ENGORDE DE 0 A 84 DIAS.

PARÁMETRO	T-1	T-2	T-3	STD ERROR
NUMERO CORRALES	10	9	10	
PESO MEDIO INICIAL (KG)	26,30	26,22	26,32	0,24
PESO MEDIO FINAL (KG)	98,41	97,81	100,70	0,96
GMD (g/DIA)	858,60	852,11	885,40	9,89
CMD (g/DIA)	2086,80	1985,11	2060,70	22,89
IC	2,43 <sup>a</sup>	2,33 <sup>b</sup>	2,33 <sup>b</sup>	0,02

En la Gráfica núm. 5, se destaca el índice de conversión acumulada a lo largo del tiempo.

Gráfica núm. 5.- Índice de conversión acumulada en el tiempo.



d: día

#### 4.2.2.2 **Resultados sobre recuentos microbianos realizados mediante hisopados rectales obtenidos en animales vivos.**

Los resultados de los recuentos bacterianos y fúngicos para cada grupo de tratamiento, se muestran en las tablas del 55 al 69.

Para la interpretación de los resultados debe tenerse en cuenta la siguiente equivalencia.

- 1: 1 a 50 UFC/ placa
- 2: 51 a 150 UFC/ placa
- 3: 151 a 300 UFC/ placa
- 4: >300 UFC/ placa
- 5: Crecimiento confluyente de colonias por placa

En las Tablas núms. 55 a la 69 se puede observar la evolución de los recuentos, comparando con el control a lo largo de siete muestreos durante la duración del estudio.

Los resultados se expresan, teniendo en cuenta el Tratamiento recibido por parte de los animales, el medio de cultivo y por consiguiente el grupo de bacterias u hongos, que pueden estar presentes en estas muestras

Las muestras fueron obtenidas mediante hisopos rectales.

Tabla núm. 55.- Tratamiento 1. Recuento de Bacterias aerobias mesófilas.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,8	3,6	2,8	2,6	4,0	2,4	2,0
<b>HEMBRAS</b>	4,2	4,4	3,2	2,6	3,2	2,8	3,4
<b>MEDIA</b>	4,5	4,0	3,0	2,6	3,6	2,6	2,7

M: muestreo

Tabla núm. 56.- Tratamiento 1. Recuento de *Enterobacteriaceae*.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	2,6	2,0	1,6	1,4	4,2	1,6	0,0
<b>HEMBRAS</b>	3,6	3,8	2,6	1,8	2,0	2,4	0,8
<b>MEDIA</b>	3,1	2,9	2,1	1,6	3,1	2,0	0,4

M: muestreo

Tabla núm. 57.- Tratamiento 1. Recuento de Bacterias anaerobias.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	2,8	2,0	3,8	2,8	4,0	3,4	2,8
<b>HEMBRAS</b>	2,8	3,0	3,8	2,4	3,4	3,6	2,8
<b>MEDIA</b>	2,8	2,5	3,8	2,6	3,7	3,5	2,8

M: muestreo

Tabla núm. 58.- Tratamiento 1. Recuento de *Lactobacillus spp.*

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	1,4	2,6	3,2	4,2	3,6	3,6	2,4
<b>HEMBRAS</b>	1,2	3,0	3,8	4,0	4,6	3,3	3,2
<b>MEDIA</b>	1,3	2,8	3,5	4,1	4,1	3,4	2,8

M: muestreo

Tabla núm. 59.- Tratamiento 1. Recuento de Hongos filamentosos y levaduras.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,7	4,6	1,4	1,8	2,6	1,2	2,4
<b>HEMBRAS</b>	4,8	4,8	2,4	1,6	2,2	2,0	2,6
<b>MEDIA</b>	4,7	4,7	1,9	1,7	2,4	1,6	2,5

M: muestreo

Tabla núm. 60.- Tratamiento 2. Recuento de Bacterias aerobias mesófilas.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,4	3,8	3,0	3,4	3,8	2,4	2,8
<b>HEMBRAS</b>	4,4	4,0	2,6	3,0	2,4	2,6	2,2
<b>MEDIA</b>	4,4	3,9	2,8	3,2	3,1	2,5	2,5

M: muestreo

Tabla núm. 61.- Tratamiento 2. Recuento de *Enterobacteriaceae*.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,4	3,0	1,8	2,6	3,2	0,8	1,4
<b>HEMBRAS</b>	3,2	3,0	2,2	1,8	2,2	1,8	0,0
<b>MEDIA</b>	3,8	3,0	2,0	2,2	2,7	1,3	0,7

M: muestreo

Tabla núm. 62.- Tratamiento 2. Recuento de Bacterias anaerobias.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,0	2,2	4,2	3,4	3,6	2,8	3,6
<b>HEMBRAS</b>	3,6	3,0	4,2	3,0	3,2	3,6	3,0
<b>MEDIA</b>	3,8	2,6	4,2	3,2	3,4	3,2	3,3

M: muestreo

Tabla núm. 63.- Tratamiento 2. Recuento de *Lactobacillus spp.*

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	2,4	2,0	2,8	3,6	3,6	2,6	3,2
<b>HEMBRAS</b>	1,4	2,2	3,6	3,8	4,0	3,6	3,0
<b>MEDIA</b>	1,9	2,1	3,2	3,7	3,8	3,1	3,1

M: muestreo

Tabla núm. 64.- Tratamiento 2. Recuento de Hongos filamentosos y levaduras.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,7	4,7	1,8	3,0	2,8	0,6	1,8
<b>HEMBRAS</b>	4,8	4,8	1,4	1,8	2,2	1,0	1,0
<b>MEDIA</b>	4,7	4,7	1,6	2,4	2,5	0,8	1,4

M: muestreo

Tabla núm. 65.- Tratamiento 3. Recuento de Bacterias aerobias mesófilas.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	3,6	3,0	2,6	3,4	3,4	2,2	2,6
<b>HEMBRAS</b>	3,6	4,0	3,2	2,6	3,8	2,4	2,4
<b>MEDIA</b>	3,6	3,5	2,9	3,0	3,6	2,3	2,5

M: muestreo

Tabla núm. 66.- Tratamiento 3. Recuento de *Enterobacteriaceae*.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	2,2	2,4	1,4	3,2	1,6	1,2	0,4
<b>HEMBRAS</b>	2,0	2,8	1,2	2,6	2,2	1,6	0,6
<b>MEDIA</b>	2,1	2,6	2,6	2,9	1,9	1,4	0,5

M: muestreo

Tabla núm. 67.- Tratamiento 3. Recuento de Bacterias anaerobias.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	2,6	2,6	2,6	2,0	2,8	2,4	3,2
<b>HEMBRAS</b>	1,6	2,4	3,2	1,4	3,6	2,2	3,4
<b>MEDIA</b>	2,1	2,5	2,9	1,7	3,2	2,3	3,3

M: muestreo

Tabla núm. 68.- Tratamiento 3. Recuento de *Lactobacillus spp.*

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	1,4	2,2	4,6	4,6	4,0	3,6	3,6
<b>HEMBRAS</b>	1,0	2,6	4,6	4,2	4,2	3,0	3,2
<b>MEDIA</b>	1,2	2,4	4,6	4,4	4,1	3,3	3,4

M: muestreo

Tabla núm. 69.- Tratamiento 3. Recuento de Hongos filamentosos y levaduras.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
<b>MACHOS</b>	4,6	4,4	1,2	2,8	3,2	1,6	1,2
<b>HEMBRAS</b>	4,6	4,4	1,6	2,6	2,6	1,2	1,0
<b>MEDIA</b>	4,6	4,4	1,4	2,7	2,9	1,4	1,1

M: muestreo

## 5 **DISCUSIÓN**

### 5.1 **DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS AL EVALUAR *IN VITRO* LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.**

#### 5.1.1 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

Al analizar globalmente, los resultados obtenidos por el método de difusión en agar podemos indicar que consideramos que esta metodología es adecuada para evaluar de manera cualitativa y rápida la posible actividad antimicrobiana de diversos extractos naturales, de ácidos orgánicos y de las mezclas de ambos, tal como señalaron Fisher y Phillips en el año 2006 (44). Al evaluar los resultados obtenidos podemos indicar que los parámetros que deben de tenerse en cuenta para que los resultados aportados sean comparables con los indicados por otros autores deben ser: concentración de inóculo inicial del microorganismo, medio de cultivo, condiciones de incubación y concentración del producto ensayado. En la actualidad no existe una armonización de estas pruebas que permita la evaluación comparativa de la actividad antimicrobiana de los diversos extractos de plantas conocidos en el presente.

Asimismo debemos considerar que un factor limitante es la solubilidad de los aceites a evaluar ya que la no presencia de halos de inhibición o halos de pequeño diámetro pueden deberse a la insolubilidad de algunos de sus compuestos (58).



#### 5.1.1.1 **Discusión de los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo A.**

En lo referente a los resultados de la actividad inhibitoria de los productos del grupo A mediante el método de difusión en agar sobre bacterias, podemos señalar que el extracto de Rutáceas, el aceite esencial de canela y la mezcla de los compuestos citados con ácidos orgánicos, presentaron los mayores valores de inhibición frente a bacterias Gram positivas, concretamente frente a *Bacillus subtilis* y a *Staphylococcus aureus*, mientras que los valores más bajos de inhibición se obtuvieron al ensayar el extracto de Rutáceas sólo o mezclado con aceite esencial de canela, frente a *Proteus mirabilis* (bacilo Gram negativo). Estos resultados concuerdan con los aportados por Fisher y Phillips en 2006 (44), Moleyar y Narasimham en el año 1992 (94), y Burt en el año 2004 (13), ya que en sus estudios mencionan una mayor actividad inhibitoria de los aceites esenciales de canela y de cítricos así como de sus componentes sobre bacterias Gram positivas que sobre bacterias Gram negativas.

Respecto a los resultados sobre la inhibición del desarrollo de los hongos podemos afirmar que entre todos los productos ensayados, el aceite esencial de canela es el que posee mayor actividad de inhibición. Este efecto inhibitorio se debe al aldehído cinámico, principal componente de los aceites volátiles del aceite esencial de canela, que posee una actividad antifúngica demostrada (85, 141). Entre los restantes productos ensayados podemos también destacar que el extracto de Rutáceas y los productos mezcla de extractos con aceites esenciales, poseen una marcada actividad antifúngica como podemos observar en los resultados indicados en la Tabla núm. 15 del apartado de Resultados.

La actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de Rutáceas ensayados, se debe a los componentes activos que poseen y entre los que destacan: el limoneno, el linanol, el citral, entre otros (44).

#### 5.1.1.2 **Discusión de los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo B.**

Al evaluar los resultados obtenidos en los ensayos con los productos del grupo que hemos diferenciado como grupo B, se observó que el producto 6 (formol) fue el que produjo mayor inhibición bacteriana, seguido en orden decreciente de actividad por el ácido fórmico, el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido láctico y una mezcla de ácido láctico y ácido

acético. El propionato sódico presentó asimismo actividad inhibitoria sobre las bacterias ensayadas, aunque ésta fue de menor diámetro que la relativa a los ácidos mencionados.

En cuanto a los extractos de plantas podemos indicar que ambos presentaron capacidad inhibitoria sobre las bacterias ensayadas, y los halos de inhibición observados fueron mayores en el caso de los ensayos realizados con extracto de Rutáceas que con extractos no Rutáceos (Producto 14).

En lo referente a los productos núms. 15 al 25, que corresponden a diversas mezclas de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos, todos tuvieron actividad inhibitoria sobre las bacterias ensayadas. Los productos 19, 23 y 24 fueron los que mostraron mayor actividad. En contraposición, el producto 21 mostró actividad inhibitoria baja, y no fue capaz de inhibir el desarrollo de las cepas de *Staphylococcus aureus* ni de *Enterococcus faecalis* ensayadas.

Si revisamos la actividad antifúngica de los productos del grupo B, podemos deducir que la mayor actividad inhibitoria la manifestó el formol, seguido del ácido propiónico que también determinó una elevada actividad inhibitoria sobre los hongos ensayados. El ácido láctico no tuvo actividad inhibitoria sobre los hongos ensayados. El producto 16 no presentó actividad sobre *Aspergillus ochraceus* ni sobre *Aspergillus parasiticus* y el producto 17 no tuvo actividad sobre *Aspergillus parasiticus*. Los productos 16 y 17 corresponden a mezclas de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos.

El ácido fórmico, el ácido acético y la mezcla de ácido acético y ácido láctico, manifestaron actividad inhibitoria sobre todas las cepas fúngicas ensayadas.

En general, los valores más bajos de inhibición se obtuvieron sobre *Aspergillus parasiticus* y sobre *Aspergillus ochraceus*, mientras que los valores de mayor actividad inhibitoria se observaron sobre *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, entre los hongos ensayados en nuestro estudio

### 5.1.1.3 **Discusión de los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo C**

En general, todos los extractos naturales incluidos en el grupo C de nuestro estudio, tuvieron actividad inhibitoria sobre bacterias, la menor actividad correspondió al producto 29. Si consideramos los productos mezcla de extractos no Rutáceos y ácidos orgánicos, éstos fueron activos sobre todas las bacterias ensayadas.

La actividad de los productos del grupo C sobre hongos, puso de manifiesto que los mayores valores de inhibición correspondieron a los productos 26, 27, 35 y 36, todos ellos extractos naturales no Rutáceos. Aunque todos los productos incluidos en el grupo C presentaron actividad inhibitoria sobre los hongos ensayados, tal como queda reflejado en la Tabla núm. 21 del apartado de Resultados.

### 5.1.1.4 **Discusión de los resultados obtenidos al ensayar los productos del grupo D**

Entre los productos del grupo D, de nuestro estudio, las actividades inhibitorias más notables sobre bacterias más notables correspondieron al citral y al geraniol. En contraposición, el 1,8 cineol no tuvo actividad inhibitoria sobre *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ni sobre *Pseudomonas aeruginosa*. El citronelal manifestó una alta actividad sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, pero carece de efecto inhibitorio sobre *Salmonella typhimurium* y sobre *Escherichia coli*.

Entre las bacterias ensayadas, la menos sensible a los productos del grupo D fue *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la que mostró mayor sensibilidad fue *Bacillus subtilis*.

Nuestros resultados con geraniol coinciden con los aportados por Dorman y Deans, que en el año 2000 (38), en un estudio realizado para evaluar mediante la técnica de difusión en agar de este producto sobre cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Cuando la cepa ensayada fue *Staphylococcus aureus* obtuvo valores de inhibición menores que los observados en nuestra investigación.

En cuanto a la actividad inhibitoria sobre hongos, 1,8 cineol tuvo muy baja actividad sobre *Aspergillus ochraceus*, y fue nula sobre los demás hongos. El acetato de bencilo solo mostró actividad sobre *Aspergillus flavus*, y el salicilato de metilo no mostró actividad inhibitoria sobre ninguna de las cepas fúngicas ensayadas.

La actividad inhibitoria más alta de este grupo fue para el citral, seguida por el geraniol, como ya hemos citado. Citral y geraniol, son componentes activos de los extractos de Rutáceas evaluados.

#### 5.1.2 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR VOLATILIZACIÓN DE COMPONENTES DEL EXTRACTO (TÉCNICA DEL AROMATOGRAMA).

En los resultados obtenidos por la técnica del aromatoograma frente a *Escherichia coli*, podemos observar que los aceites esenciales 26 y 27, y el aceite esencial de canela presentaron altos valores de inhibición. Inouye *et al.* en el año 2001, encontraron actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* y sobre *Staphylococcus aureus*, al tratarlos con vapores del aceite esencial de canela, citral y geraniol. En nuestro estudio, el citral no determinó la formación de un halo de inhibición, sin embargo se observa una reducción de crecimiento que corresponde aproximadamente al 50% con respecto al desarrollo detectado en la placa control de crecimiento bacteriano a las 24 horas de incubación a 37°C. Los demás productos no mostraron inhibición de las bacterias al ser comparados con el control. Fisher y Phillips en el año 2006 (44), no encontraron valores de inhibición de *Escherichia coli* O157 para los vapores del citral, ni para los vapores de los aceites esenciales de limón, naranja y bergamota, pero si cuando se ensayaban directamente los aceites. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio ya que el extracto de Rutáceas utilizado es una mezcla de aceites esenciales de naranja amarga, limón, bergamota y buchu, y como hemos indicado no produjo inhibición por medio de sus vapores pero si cuando se ensayaba el aceite por el método de difusión en agar.

En el caso del *Aspergillus ochraceus*, los vapores del citronelal y del citral inhibieron completamente su crecimiento en placa. Los vapores del aceite esencial de canela, al igual que los de los extractos naturales 26 y 27, manifestaron un halo de inhibición muy alto, del orden de 69mm. Los demás productos mostraron halos de inhibición de 10mm a 45mm. Los vapores procedentes del extracto de Rutáceas y del producto 28, no mostraron inhibición sobre *Aspergillus ochraceus*. Comparando con otros autores podemos indicar que Inouye *et al.*, en el año 2000 (68), encontraron actividad fungistática y fungicida a partir de los vapores de citral y del aceite de canela contra *Aspergillus fumigatus*, aunque la especie investigada no es la misma que en nuestro estudio, los resultados coinciden con la actividad manifestada frente a determinadas cepas del género *Aspergillus*.

### 5.1.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL MÉTODO DE DILUCIÓN EN MICROPLACAS. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI)

#### 5.1.3.1 **Discusión de los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo A**

A partir de los resultados obtenidos podemos indicar que el producto con mayor actividad inhibitoria sobre bacterias fue el extracto de Rutáceas, (Producto 3) seguido del aceite esencial de canela. Entre las bacterias ensayadas, las más sensibles a los productos, objeto de evaluación, fueron *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, Dabbah *et al.*, en el año 1970 (32), encontraron inhibición del 100% de *Staphylococcus aureus* al ser expuesto a 1000ppm de aceites esenciales de naranja, limón y mandarina, estos resultados coinciden con los detectados en nuestro estudio, mediante el método de difusión aplicado, a excepción de *Pseudomonas aeruginosa*, que mostró un valor de inhibición alto en el método de difusión ( $10,33 \pm 0,58$ ), pero menos sensibilidad en el método por dilución (4000ppm).

Los productos 1, 2 y 5, mezclas de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos, tuvieron efecto inhibitor sobre los diversos microorganismos a los que se enfrentaron.

Para el caso de los hongos, el aceite de canela y el extracto de Rutáceas tuvieron las mayores actividades inhibitorias, *Aspergillus ochraceus* mostró mayor resistencia a los productos ensayados.

Los resultados de Friedman *et al.* (46) para las CMI's de un aceite esencial de canela coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, cifrándose en el caso de *Escherichia coli* en valores de 400ppm a 1100ppm, y para *Salmonella enterica* de entre 400ppm a 600ppm. También coincidimos con los resultados de Smith-Palmer *et al.* (131), quienes cifraron las CMI's para el aceite esencial de canela en 500ppm contra *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

#### 5.1.3.2 **Discusión de los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo B**

El extracto de Rutáceas ensayado en este grupo de productos, tuvo una actividad muy marcada sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. El formol presentó valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) entre 250ppm y 125ppm para las bacterias ensayadas.

Entre los ácidos orgánicos el que mas bajas CMI's mostró fue el ácido fórmico, con CMI's de 1000ppm para todas las bacterias ensayadas. Los productos del núm. 15 al 25, que son preparaciones a base de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos manifestaron valores de CMI's entre 2000ppm y 4000ppm, a excepción del producto 16 en el que la CMI fue del orden de 16000ppm salvo frente a *Staphylococcus aureus* para el que fue de 1000ppm. El producto 21 también mostró altos valores de CMI's. Los productos 15 y 17 fueron los que dieron CMI's más bajas si consideramos todas las CMI's establecidas en el grupo de los productos mezclas de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos.

En el caso de hongos, el producto 14 (extracto natural no Rutáceo) presentó las CMI's más bajas, seguido del formol. Entre los ácidos orgánico, ensayados el ácido propiónico fue el que tuvo más bajas CMI's, (1000ppm para todos los hongos).

### 5.1.3.3 **Discusión de los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo C**

Los productos 26, 27 y 28, que corresponden a extractos naturales no Rutáceos, fueron los que mostraron las CMI's más bajas contra las bacterias ensayadas mientras que los extractos 35 y 36 que también son extractos naturales no Rutáceos, mostraron las CMI's más altas. Debe indicarse que estos dos últimos productos poseen mayor viscosidad que los restantes extractos ensayados, factor que dificulta su difusión y por consiguiente el contacto con los microorganismos frente a los que se evalúa.

Las bacterias frente a las que se obtuvieron los valores de CMI's más bajos fueron: *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa* fue la que mostró valores de CMI's más altos coincidiendo plenamente con el hecho de que se observen valores bajos de inhibición en la prueba de difusión.

En cuanto a los hongos, los productos 26, 27, 31 y 32 fueron los que presentaron los valores de más bajas en este grupo (estos productos son extractos naturales no Rutáceos) y el producto 33 el que mostró los valores de CMI's más altos, aunque nunca superaron las 4000ppm. Los productos con los que se detectaron los valores de inhibición más elevados en el caso de los hongos fueron: 26, 27, 35 y 36. En el caso de los dos últimos se obtuvieron CMI's de entre 2000 y 1000ppm. Este alto valor de inhibición puede deberse a sus compuestos volátiles que presentaron una marcada capacidad inhibitoria en la prueba del aromatógrama.

De los hongos evaluados, el *Aspergillus ochraceus* presentó los valores de CMI's inferiores para los productos del grupo C, en contraposición de *Aspergillus parasiticus* frente a quien se detectaron las CMI's más altas.

#### 5.1.3.4 **Discusión sobre los resultados relativos a las concentraciones mínimas inhibitorias, establecidas para cada uno de los productos del grupo D**

Tanto 1,8 cineol, como el acetato de bencilo, fueron los productos que mostraron las CMI's más altas. Al evaluar la actividad del citronelol y del formiato de bencilo se puede aportar que presentaron valores de CMI's altas. *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* fueron las bacterias con mayor grado de sensibilidad frente a estos productos.

Las CMI's más bajas fueron para el citral y el geraniol, *Pseudomonas aeruginosa* fue la bacteria que presentó las CMI's más altas mientras que *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* las que mostraron las CMI's más bajas. Moleyar y Narasimham en el año 1992 (94), evidenciaron en sus estudios la actividad inhibidora del citral, del citronelal y del geraniol para *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* a bajas concentraciones, estos mismos autores señalaron una mayor actividad inhibidora de estos productos sobre bacterias Gram positivas. CMI's similares a las nuestras fueron encontradas por Friedman *et al.*, en el año 2002 (46) para *Salmonella enterica* y para *Escherichia coli*. En el caso de geraniol evidenciaron CMI's más bajas.

En lo referente a hongos, el 1,8 cineol manifestó las CMI's más altas; mientras que el citral, el citronelol y el geraniol fueron los productos con CMI's más bajas de este grupo. Los valores de CMI's fueron muy parecidos entre los hongos evaluados. Mahmoud, en el año 1994 (85), encontró valores de CMI's de citronelol y de geraniol de 500ppm para *Aspergillus flavus*, resultados que coinciden con los obtenidos a lo largo de nuestra investigación.



#### 5.1.4 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA Y FÚNGICA POR ACEITES ESENCIALES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y MEZCLAS DE AMBOS ADICIONADOS A CEBADA EN GRANO O A PIENSO.

Los estudios *in vitro* muestran que los aceites esenciales tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas, en muchos casos a concentraciones *in vitro* entre 0,2 y 10 $\mu$ L/mL (44), pero que se precisan concentraciones mucho mayores para producir un efecto similar en alimentos (13). En este orden de ideas, se realizaron una serie de experimentos, con el fin de comprobar la actividad inhibitoria de ciertos ácidos orgánicos, extracto de Rutáceas, y mezcla de ambos sobre *Escherichia coli* y *Aspergillus flavus* inoculados en pienso para consumo animal y cebada en grano como sustrato.

##### 5.1.4.1 **Discusión sobre los resultados del ensayo sobre cebada en grano.**

La utilización de ácidos permite higienizar el pienso, ya que origina un medio hostil al crecimiento de bacterias y algunos hongos. De hecho, su presencia provoca un efecto bacteriostático y antifúngico en el pienso y lo protege de posibles contaminaciones por bacterias y hongos. Se ha demostrado que algunos acidificantes como el ácido propiónico y sus sales (dipropionatos) y, en menor medida, el ácido fórmico y el ácido acético tienen una acción fungistática sobre el pienso (107).

En este sentido y en relación con nuestros resultados, podemos indicar que la actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* en granos de cebada fue del orden del 100%, del 95% y del 90% para el ácido fórmico, ácido propiónico y para propionato sódico respectivamente, a los 14 días de su aplicación y de cerca del 100% para los mismos productos sobre *Aspergillus flavus*. El ácido propiónico viene siendo utilizado hace décadas como inhibidor de hongos sobre piensos (37) y el ácido fórmico y las mezclas de éste con ácido propiónico se recomiendan como inhibidores bacterianos, especialmente frente a Enterobacterias (117).

En este mismo orden de ideas, podemos indicar que en nuestro estudio, los aceites esenciales de Rutáceas tuvieron una actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* superior al

80% a los 14 días de actuación cuando la dosis de aplicación fue del orden de 1000ppm sobre cebada en grano. Asimismo, Paranagama *et al.*, en el año 2003 (103), detectaron una marcada inhibición del crecimiento de una cepa aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* aislada de arroz a 2,8 mg./mL por acción de un extracto de *Cymbopogon citrato*.

En nuestra investigación, el producto 13 (Extracto de Rutáceas), manifestó una actividad del orden del 80% al día 7 frente a *Aspergillus flavus*, que posteriormente bajo al 33% a los 14 días de su aplicación.

Las mezclas 15 y 19 fueron muy activas contra *Escherichia coli* (alcanzando inhibiciones superiores al 90%) a los 14 días de su aplicación, En el caso del producto 19 (mezcla de Extracto de rutáceas y ácidos orgánicos) frente a *Aspergillus flavus*, se obtuvo un 100% de inhibición a los 14 días de aplicación.

#### 5.1.4.2 **Discusión sobre los resultados del Ensayo sobre pienso de finalización para gallinas**

A lo largo del estudio y tras la aplicación de de diversos productos a piensos de finalización para gallinas, se observó que la inhibición de *Escherichia coli* fue menos marcada, para el ácido fórmico y el propionato sódico, alcanzando valores de inhibición del orden del 75% a los 14 días aplicación, que para ácido propiónico con el que se obtuvo una inhibición del orden del 83%. En el caso de los productos 13 (Extracto de Rutáceas) y 14 (Extracto no Rutáceo) durante el mismo periodo de contacto, la capacidad inhibitoria detectada fue del orden del 90 y 85% respectivamente. Cuando se ensayaron mezclas de estos productos se obtuvieron porcentajes de inhibición del orden del 80 y 90% frente a *Escherichia coli*, a los catorce días de aplicación del producto .

Así mismo la inhibición de *Aspergillus flavus* en muestras de pienso, por acción del ácido fórmico y del propionato sódico fue del orden del 80% a los 14 días de iniciado el ensayo. El ácido propiónico a 2000ppm, presento una mayor actividad inhibitoria, obteniéndose el 86% de inhibición a los 7 días, pero debemos señalar que la muestra se recontaminó y tras los 14 días de contacto con el ácido propiónico ya no presentó a inhibición con respecto al control.

Paster, en el año 1979 (106), detectó un porcentaje de inhibición de *Aspergillus flavus* de 100% para ácido propiónico sobre pienso, a 3000ppm a los 30 días de contaminación, aunque a los 60 días se detectó una recontaminación, y la inhibición con respecto al control fue solo del orden del 50%.

La mezcla 19 (Mezcla de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos) fue la más activa ya que con ella se logró un 90% de inhibición fúngica a los 14 días de iniciado el ensayo.

La variabilidad de los resultados dependiendo del sustrato se debe a que la dispersión de los aditivos líquidos es mejor en producto en grano como corresponde a la cebada que en el pienso en polvo, que puede absorber con mayor facilidad el líquido, y por tanto no permitir una buena dispersión del producto, asimismo Dixon y Hamilton, en el año 1981 (37), reportaron efectos de los ingredientes de los piensos en la actividad del ácido propiónico, por la capacidad tampón que pueden ejercer.

#### 5.1.5 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO SOBRE LA DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE MICOTOXINAS POR DOS MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE RUTACEAS Y ACIDOS ORGÁNICOS.

Aunque se han descrito diversos factores que pueden afectar la inhibición sobre la producción de micotoxinas en sustratos vegetales por diversos aditivos (5, 10), la inhibición *in vitro* de micotoxinas nos permite establecer la capacidad de degradación de un producto sobre éstas.

Algunas especies fúngicas pueden tener una marcada capacidad que les permite degradar o metabolizar determinadas micotoxinas, así por ejemplo, Varga, *et al.*, en el año 2000 (139) lograron en un experimento, transformar Ocratoxina A, en Ocratoxina  $\alpha$ , que es atóxica, mediante una cepa de *Aspergillus niger* no tóxica, en medio de cultivo.

Mohanlall y Odhav, en el año 2006 (93), encontraron actividad antimicotoxigénica de una fitoalexina aislada de *Citrus sinensis* infectado con *Penicillium digitatum*, contra *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium. verticillioides*, que produjo reducción en la producción de

Fumonisina B<sub>1</sub> y Aflatoxinas G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, y B<sub>2</sub>, esta fitoalexina posee una estructura química análoga a la 6,7-dimetoxi cumarina.

La actividad de degradación de micotoxinas por acción de ciertas plantas ha sido citada por diversos autores, entre los que destacan, Ruhland *et al.* (121, 122), quienes demostraron que en cultivos celulares de trigo, tomate, maíz y otras plantas se conseguía transformar completamente Ocratoxina A en otros derivados no tóxicos.

Berthiller *et al.*, en el año 2006 (10), al evaluar un modelo de biodegradación de Zearalenona por *Arabidopsis thaliana* detectaron siete diferentes metabolitos, la mayoría de ellos glucósidos. Como productos finales de la transformación se detectaron: malonilglucósidos, di-hexosa- y hexosa-pentosa, disacáridos de Zearalenona y  $\alpha$  y  $\beta$ -Zearalenona.

En nuestro estudio se han alcanzado niveles de degradación del orden de un 50% en el caso de Aflatoxina B<sub>1</sub> y del Deoxinivalenol y de un 25% para la Ocratoxina A, pero no hubo degradación de la Zearalenona, por parte de los extractos de Rutáceas investigados.

Velluti *et al.*, en el año 2004 (141), detectaron diferencias significativas al estudiar la inhibición de Zearalenona y Deoxynavenol en un ensayo al adicionar *lemongrass* y aceite esencial de canela a 500ppm y 1000ppm, utilizando maíz como sustrato con una actividad de agua de 0,995. Sin embargo, este mismo autor, no encontró diferencias significativas en la reducción de Zearalenona y Deoxynavenol por ambos productos a las mismas concentraciones de estudio pero cuando la actividad de agua era del orden de 0,95. Estos resultados indican que la actividad de agua es un factor a tener en cuenta en la producción de micotoxinas y para la degradación de las mismas. Montani *et al.*, en el año 1988 (95), ya habían detectado una relación entre una mayor acumulación de Zearalenona en maíz a mayor actividad de agua.

#### 5.1.6 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ATCC 2948 Y DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A, EN DOS SUSTRATOS VEGETALES POR ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES CON ÁCIDOS ORGÁNICOS.

Es un hecho conocido que determinados extractos naturales y aceites esenciales de plantas, tienen efecto inhibitor sobre hongos productores de micotoxinas tal como demostraron Basilico *et al.*, en el año 1999 (5).

A lo largo de nuestro estudio hemos podido evidenciar que los extractos de Rutáceas y sus mezclas con ácidos orgánicos mostraron un efecto directo en el porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico y en la inhibición de la producción de Ocratoxina A en arroz y maíz.

En el caso de inhibición de Ocratoxina A en arroz, se alcanzó prácticamente un 100% de inhibición con el producto P3 (extracto de Rutáceas) a concentraciones de 1000ppm y 2000ppm, pero no a 500ppm y para el producto P5 (Mezcla de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos) a 2000ppm, pero no a 1000ppm. Sobre maíz esta inhibición se alcanzó a 500, 1000 y 2000ppm para el producto P3, y a 2000ppm para el producto P5.

Al igual que en nuestros estudios, otros autores encontraron una relación entre la dosis de aceites esenciales y la inhibición de los hongos, y entre la inhibición de éstos y la inhibición de su producción de micotoxinas (133).

Aunque no hemos encontrado trabajos sobre inhibición de producción de Ocratoxina A por parte de aceites esenciales de Rutáceas, se han publicado diversas investigaciones realizadas con otros aceites esenciales y compuestos derivados de éstos, algunos de ellos utilizando *Ocimum basilicum*, canela y timol, entre otros (5, 133).

Soliman y Badaea, en el año 2002 (133), demostraron que 500ppm de aceite esencial de timol y canela inhibieron totalmente el desarrollo de cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*. En este mismo estudio, usando como sustrato trigo, detectó una considerable disminución en la producción de Ocratoxina A a

las dos semanas con ambos productos, las investigaciones realizadas por estos mismos autores con aceite esencial de canela a 1000ppm, determinaron una disminución de la producción hasta 1,91 ng/gr a comparación del control que fue de 21,46 ng/gr, de Ocratoxina A. En el caso de los aceites esenciales de anís y timol a 1000ppm no se detectó a las dos semanas la producción de Ocratoxina A.

Basilico *et al.*, en el año 1999 (5), en un ensayo para inhibición de crecimiento de *Aspergillus ochraceus* y su producción de Ocratoxina A en caldo YES, encontraron una inhibición completa de *Aspergillus ochraceus* y de su producción de OTA, por parte del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (hierbabuena) a los siete días. Estos mismos autores encontraron en otro experimento que el aceite esencial de orégano y menta fueron efectivos al 100% en la inhibición del crecimiento y producción de Ocratoxina A, a los 21 días a una concentración del orden de 1000ppm.

Hitokoto *et al.*, en el año 1980 (65), demostraron en su estudio, una inhibición que oscila del 10 al 90% para tres cepas del género *Aspergillus* y una inhibición de sus toxinas del orden del 86 al 100%.

Venturini *et al.*, en el año 2002 (142), evidenciaron la actividad de inhibición del citral sobre *Penicilium expansum*. Debe tenerse en cuenta que el citral es uno de los principales componentes de los aceites esenciales de Rutáceas evaluados en nuestro trabajo.

Rasooli y Owlia, en el año 2005 (115), demostraron la concentración mínima inhibitoria de 250ppm sobre *Aspergillus parasiticus*, e igual concentración para inhibir su producción de Aflatoxina, con extractos de *Thymus eriocalyx* y *Thymus X-porlock*, en medio líquido.

Fandohan *et al.*, en el año 2004 (43), investigaron la posible inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* por acción del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, aportando que la CMI de este producto puede cifrarse en 4,8 µL/g en maíz, concentración que asimismo determina una marcada inhibición de la producción y acumulación de Fumonisinias en el maíz en condiciones de almacenamiento cerrado.

Krishnamurthy y Shashikala en el año 2006 (78), encontraron que aceites esenciales de *Citrus sinensis* y *Citrus medica* tienen actividad de controlar la producción de Aflatoxina B<sub>1</sub> en granos de soja.

Luo *et al.*, en el año 2004 (83), observaron que el citral tiene una fuerte actividad inhibidora contra *Aspergillus flavus*, el mecanismo de acción se basa en la producir daño irreversible en la pared de los conidios de *Aspergillus flavus*, por lo que el producto puede entrar en la célula influyendo en su expresión genética, sino que altera la morfología de las mitocondrias y provoca como consecuencia que las organelas y macromoléculas pierdan sus estructuras normales y sus funciones, lo que eventualmente lleva a una pérdida de la capacidad de germinación de las esporas de *Aspergillus flavus*.

#### 5.1.7 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE EXTRACTOS DE RUTACEAS Y DE LA ALTERACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE *Escherichia coli* FVB467 Y *Salmonella typhimurium* FVB 567 POR ACCIÓN DE ÉSTOS.

##### 5.1.7.1 Discusión sobre los resultados del estudio de la actividad enzimática del extracto de Rutáceas

En nuestro estudio hemos detectado la presencia de las enzimas Leucina arilamidasa y Cistina arilamidasa, en los extractos de Rutáceas ensayados., por el método API ZYM<sup>®</sup>. Estos enzimas pueden alterar la síntesis proteica del sustrato en el que se encuentren.

A lo largo de la investigación con extractos de Rutáceas, también hemos detectado actividad esterasa y lipasa. Las enzimas estererasas y lipasas permiten actuar sobre lípidos, facilitando la actividad de los extractos sobre bacterias Gram negativas así como sobre las esporas de bacterias Gram positivas, en las que los lípidos son un constituyente fundamental (47).

Otras actividades enzimáticas evidenciadas en el extracto de Rutáceas fueron: fosfatasas, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa. Esta última actividad determina, sin duda la capacidad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas.

Este mismo sistema (API ZYM<sup>®</sup>) ha sido utilizado por Chudnicka y Matysik, en el año 2005 (24), para evaluar actividades enzimáticas de extractos de plantas. Estos autores detectaron: N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa, fosfatasas, esterasa, Leucina arilamidasa y Cistina arilamidasa, pero no actividad lipasa en extractos acuosos de *Chamomilla recutita*, *L. anthodium*, *Lamium album*, *Calendula officinalis* y *Euphrasiae rostkoviana*.

Asimismo podemos indicar que algunos aceites esenciales pueden tener actividad inhibidora de la acción de las enzimas, así por ejemplo Matsuura *et al.*, en el año 2006 (89), mencionan actividad anti-tirosinasa de ciertos extractos naturales, o por ejemplo actividad inhibitoria de algunos extractos naturales de la enzima  $\beta$ -Lactamasa (49).

#### 5.1.7.2 **Discusión sobre los resultados de la evaluación de la alteración *in vitro* de la actividad enzimática extracelular de *Escherichia coli* FVB 467 y *Salmonella typhimurium* FVB 567 por extractos de Rutáceas.**

Tanto en el caso de *Escherichia coli*, como para *Salmonella typhimurium*, el contacto de los cultivos con extracto de Rutáceas provocó una alteración en el sistema enzimático de la bacteria. El cambio en su actividad enzimática tuvo como consecuencia la alteración de la síntesis proteica derivada de la disminución en la actividad enzimática de leucina arilamidasa así como de la valina arilamidasa, en ambas bacterias, si la comparamos con las que presentaban las cepas no tratadas y consideradas como control.

En el caso de la enzima esterasa, ésta disminuyó tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium* a los 30 minutos de contacto con el extracto de Rutáceas. La actividad esterasa lipasa se detectó sólo en *Salmonella typhimurium*, y esta actividad también disminuyó al contacto con el extracto, objeto de estudio.



Para *Escherichia coli*, los enzimas fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida, mantuvieron su actividad tras treinta minutos en contacto con el extracto de Rutáceas, pero estas mismas enzimas disminuyeron drásticamente su actividad en el caso de *Salmonella typhimurium*.

El enzima Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa en *Escherichia coli* se detectó a mayor concentración a los treinta minutos de contacto con el extracto; en el caso de *Salmonella typhimurium*, esta enzima disminuyó su actividad al mismo tiempo.

#### 5.1.8 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LA OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE RUTÁCEAS Y SUS MEZCLAS CON ACIDOS ORGÁNICOS, SOBRE BACTERIAS

En las microfotografías núm. 7 y 8, podemos observar la cepa de *Bacillus subtilis* control, a las dos horas de incubación en TSB a 37°C, mientras que en las microfotografías núms. 9 y 10 observamos el mismo cultivo tras ser sometido a la acción del extracto de Rutáceas, en la que podemos observar un ensanchamiento en los extremos, como probable consecuencia de la formación de esporas. Este proceso es un mecanismo de defensa ante el medio hostil. Al proceder a la observación de las mismas cepas a las 24 horas, se evidenció un crecimiento normal de las cepas de *Bacillus subtilis* en el ensayo control (microfotografías núms. 11 y 12) mientras que en los ensayos realizados con extractos de Rutáceas, no se observó la presencia de la bacteria, microfotografía núm. 13, en las flechas se destacan los residuos que corresponden a material celular probablemente lisado y/o coagulado.

En el caso de *Salmonella typhimurium*, las microfotografías núms. 14 y 15, muestran las bacterias control, con una morfología normal a las dos horas de incubación a 37°C en TSB. Las microfotografías núms. 16 y 17 muestran las mismas bacterias tratadas con 1000ppm del extracto de Rutáceas. En este caso no se llegó a visualizar ninguna célula bacteriana tras el tratamiento con los extractos de Rutáceas, probablemente debido a la lisis de los componentes celulares, Kim y Fung, en el año 2004 (77), reportaron la pérdida de integridad de la membrana celular de *Escherichia coli* O157H7 en contacto con un extracto de té, en medio líquido, fenómenos que observó por microscopía electrónica.

El experimento se repitió con los mismos resultados, y a las veinticuatro horas las bacterias control siguieron creciendo (microfotografías núms. 18 y 19) mientras que las que recibieron el tratamiento con extracto de Rutáceas no mostraron crecimiento alguno.

Guftafson, *et al.*, en el año 1998 (54), describieron en un experimento la desnaturalización de la membrana y de las proteínas de *Escherichia coli*, por acción del aceite de *Melaleuca alternifolia*, tras una hora de contacto en medio líquido.

Oussalah *et al.*, en el año 2006 (102), comprobaron que los comportamientos de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* fueron diferentes en presencia de extractos de orégano y clavo, observaron daños como deformaciones de la célula en *Bacillus subtilis* y formación de poros a nivel de la membrana celular en *Escherichia coli*, semejantes a los hallados en nuestro estudio.

## 5.2 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE EVALUACIÓN *IN VIVO*.

### 5.2.1 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXTRACTO DE RUTACEAS SOBRE LA MICROBIOTA ENTÉRICA DE CERDOS DESTETADOS.

En los últimos años se ha observado un progresivo incremento en el número de trabajos realizados *in vivo* con animales en condiciones normales de crianza suplementados con extractos naturales o aceites esenciales en sus dietas, la mayoría de ellos realizados en aves, especialmente en *broilers* y algunos en cerdos (21, 72, 130). Aunque la mayoría de estos trabajos se centra en los parámetros productivos y pocos en la alteración de la microbiota entérica.

Jamroz *et al.*, en el año 2005 (72), fueron capaces de demostrar una mejora en la conversión alimenticia de *broilers* alimentados con maíz que se puede cifrar en un 4% y en un 2% aquellos alimentados con trigo y cebada, al ser suplementadas ambas dietas con 100mg/Kg de un extracto de plantas en cuya composición podemos citar: carvacrol, cinamaldehído y capsicina. Si bien no logró un incremento en el peso final de las aves, mejoró el índice de conversión alimenticia, así como la digestibilidad de los nutrientes a nivel del íleon. Los recuentos de *Escherichia coli*, disminuyeron notablemente, especialmente en aves adultas, produciéndose en contrapartida un incremento en el recuento de *Lactobacillus* spp.

Si *et al.*, en el año 2006 (130), en un estudio *in vitro* recreando las condiciones del tracto intestinal de cerdos, con material digerido del ciego de cerdos de 6 semanas de edad, a los que se añadió geraniol, carvacrol, eugenol y aceite esencial de canela, encontraron inhibición en los recuentos de coliformes totales y *E. coli*; mientras que para *Lactobacillus* spp y anaerobios totales, los recuentos no variaron significativamente frente al control.

Castillo *et al.*, en el año 2006 (21), demostraron en un experimento con cerdos destetados que no había un efecto de reducción de los recuentos totales de bacterias en el tracto intestinal de los cerdos suplementados con una mezcla de cinamaldehído, carvacrol y capsicum,

mediante un recuento por una técnica de PCR. En este mismo estudio encontró que la población de *Lactobacillus* spp del yeyuno aumentaba estadísticamente en los animales suplementados con esta mezcla natural.

Los resultados aportados por los autores citados, son semejantes a los detectados a lo largo de nuestro estudio, al ensayar los productos mezcla de ácidos orgánicos y extractos de Rutáceas sobre cerdos destetados. En nuestro caso, pudimos evidenciar bajos recuentos bacterianos a diferentes niveles del tracto intestinal, al comparar con el grupo de animales control.

Si consideramos a los hongos, se obtuvieron altos recuentos tras la evaluación de todos los tratamientos aplicados y a lo largo de todo el tracto intestinal al ser comparados con el control. Sin embargo los valores más elevados y estadísticamente significativos fueron obtenidos a partir de las muestras del duodeno ( $p < 0.001$ ). Al analizar los resultados podemos constatar que el incremento es debido a la mayor presencia de colonias de levaduras, que ven indirectamente favorecido su desarrollo por los niveles de pH ácido alcanzados, como una consecuencia directa de los aditivos suplementados a la dieta.

El colon fue una excepción, porque los animales suplementados con el producto 2 (o aún las mismas combinaciones con antibióticos), tuvieron recuentos significativamente mas bajos que los cerdos alimentados con dietas conteniendo solo antibióticos o el control negativo.

## 5.2.2 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS DE RUTACEAS Y ACIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE ENGORDE

Al evaluar los parámetros productivos, podemos observar que el índice de conversión acumulado en el tiempo, fue significativamente diferente para el tratamiento 2 (producto 2- Extracto de Rutáceas con ácidos orgánicos) y el tratamiento 3 (producto 5- Extracto de Rutáceas con ácidos orgánicos), (índice de conversión menor 2,33) que para el tratamiento con 30ppm de salinomicina (T1), así mismo, el consumo medio diario fue mayor para el T1 (2086,80g), que para T2 y T3. T3 tuvo la mayor ganancia diaria de peso (885,60g.) y mejor peso final (100,70Kg).

Maass *et al.*, en el año 2005 (84), reportaron una mejora en 4% de la conversión alimenticia comparando con el grupo control, al suministrar 1,8% de un extracto de *Echinacea purpurea* a una dieta para cerdos.

Hernández *et al.*, en el año 2004 (63), observaron que al adicionar a la dieta una mezcla de aceites esenciales de canela, orégano y pimienta o bien otra de aceites esenciales de timo y romero, se presentaba un notable incremento en los niveles de digestibilidad del alimento para broilers, efecto que a su vez repercutía en mejorar la productividad, aunque el efecto no fue estadísticamente significativo.

Bampidis *et al.*, en el año 2005 (2), pudieron evidenciar un efecto de mejora en la eficiencia de la conversión alimenticia de hembras de pavo, entre los días 43 y 84, tras la inclusión de 1,25g de orégano en polvo por Kg, de peso vivo.

En cuanto al recuento de bacterias aerobias mesófilas, los tres tratamientos presentaron recuentos semejantes tanto al inicio como al final del estudio. En lo referente a las Enterobacteriaceae, los recuentos son más bajos al final del experimento que al inicio de éste para los tres tratamientos evaluados.

Si consideramos los valores de recuentos para bacterias anaerobias, podemos observar que se mantienen constantes a lo largo del tiempo para los tratamientos 1 y 2, presentando un ligero incremento en el caso de los animales del lote 3.

Los recuentos relativos a las bacterias lácticas presentan un incremento hasta la cuarta semana del ensayo, para descender ligeramente hasta la última semana en la que los recuentos son mayores que al inicio del estudio. Jamroz *et al.*, en el año 2005 (72), pusieron en evidencia que en el caso de broilers alimentados con maíz o con trigo y cebada, al suplementar ambas dietas con 100 mg/Kg de un extracto de plantas que contenía carvacrol, cinamaldehído y capsicina, presentaban un aumento en los recuentos totales de *Lactobacillus* spp a los 21 y 41 días de iniciado el estudio.

Con respecto a los recuentos de hongos filamentosos y levaduras, podemos indicar que éstos disminuyen desde los primeros muestreos y mantienen esta tendencia a lo largo de todo el estudio.

Debemos señalar que en ninguna de las bajas que se dieron en el transcurso de la investigación, se observaron lesiones que dieran a sospechar de enfermedad entérica, consecuencia de la alimentación o de los promotores adicionados a la alimentación de los animales objeto de estudio.

## 6 CONCLUSIONES

### 6.1 CONCLUSIONES SOBRE LOS ENSAYOS *IN VITRO*.

- El método de difusión en agar es un buen sistema de *screening* para evaluar de forma cualitativa, rápida y económica la actividad antimicrobiana de extractos naturales.
- El método del Aromatograma que pone de manifiesto la actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles de los extractos naturales en combinación con el de difusión en agar, permiten evaluar de forma completa la actividad antimicrobiana de los extractos.
- El método de dilución en microplacas permite definir las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de plantas sobre bacterias y hongos, estableciendo la potencia comparativa entre productos.
- Las concentraciones de los extractos naturales que deben adicionarse a sustratos destinados a alimentación (piensos compuestos, materias primas, entre otros) varían en función de las características de la matriz, como consecuencia de la capacidad de difusión, de la presencia de inhibidores, entre otros factores.
- Los extractos de Rutáceas empleados en nuestros experimentos poseen actividad inhibitoria tanto para bacterias como para hongos, observándose una mayor capacidad inhibitoria frente a las bacterias Gram positivas que sobre las bacterias Gram negativas ensayadas.
- Al mezclar extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos se observa un claro efecto sinérgico que se manifiesta en un notable incremento de la actividad inhibitoria contra bacterias y hongos.
- El extracto de Rutáceas adicionado a sustratos como arroz y maíz contaminados con *Aspergillus ochraceus* productor de ocratoxina A, es capaz de inhibir el crecimiento

fúngico y la producción de ocratoxina A, por lo que puede ser utilizado como sistema de control implicado en Seguridad Alimentaria.

- El extracto de Rutáceas ensayado posee actividad enzimática, y al adicionarlo a un cultivo en medio líquido de *Escherichia coli* o de *Salmonella typhimurium*, es capaz de modificar el metabolismo de los citados microorganismos.

## 6.2 CONCLUSIONES SOBRE LOS ENSAYOS *IN VIVO*.

- La adición de mezclas de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos a la dieta de cerdos, tanto destetados, como adultos, no disminuye la ingesta diaria de pienso, por el contrario la incrementan y aumenta la ganancia diaria de peso, determinando un mejor índice de conversión de los 21 a los 63 días, comparando con cerdos destetados a los que se les suministraron antibióticos como promotores de crecimiento durante el mismo periodo de tiempo.
- El recuento total de bacterias aerobias mesófilas a lo largo del tracto digestivo de cerdos del grupo tratado con la mezcla de extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos con o sin antibióticos, es menor que el obtenido en el grupo de animales al que sólo se le suministró antibióticos, evidenciándose un mejor control de la microbiota intestinal.
- Los grupos de cerdos a los que se les suministró extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos en la dieta, presentaron recuentos de *Lactobacillus* spp más elevados que el grupo al que se le suministró sólo antibiótico como promotor de crecimiento, por lo que podemos indicar que el extracto de Rutáceas adicionado a la dieta determina un incremento en bacterias lácticas y favorece el equilibrio de la microbiota intestinal.
- Suministrar a la dieta de cerdos tanto en destete como en engorde la mezcla de extractos de Rutáceas constituye una medida correcta, que mejora sus parámetros productivos, tiene efectos positivos sobre la microbiota intestinal y no determina efectos nocivos sobre el animal.



## 7 **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Allan, P. y Bilkei, G. 2005. Oregano Improves Reproductive Performance of Sows. *Theriogenology* 63: 716-21.
- 2 Bampidis, V.A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Chatzopoulou, P.S., Tsiligianni, T. y Spais, A.B. 2005. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *Br. Poult. Sci.* 46(5): 595-601.
- 3 Basf. 1996. Sobre el tema de los aditivos para la alimentación animal. Información Técnica. Edición 97/98.
- 4 Basf. 2001. Ácidos orgánicos en la producción animal. Mesa redonda. Diciembre. Lérída. 71 pp.
- 5 Basílico, M.Z. y Basílico, J.C. 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett. Appl. Microbiol.* 29(4): 238-41.
- 6 Bates, J., Jordens, J.Z. y Griffiths, D.T. 1994. Farms animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infection in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 34: 507-16.
- 7 Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-96.
- 8 van Beers-Schreurs, H.M., Nabuurs, M.J., Vellenga, L., Kalsbeek-van der Valk, H.J., Wensing, T. y Breukink, H.J. 1998. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J. Nutr.* 128(6): 947-53.

- 9 Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D.A.A., Burt, S.A. y Snijders, J.M.A. 1998. Impact on human health of *Salmonella spp.* on pork in the Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int. J. Microbiol.* 44: 219-29.
- 10 Berthiller, F., Werner, U., Sulyok, M., Krska, R., Hauser, M.T. y Schuhmacher, R. 2006. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit. Contam.* 23(11): 1194-01.
- 11 Beuchat, L.R. y Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Techn.* 1: 134-42.
- 12 Blank, R., Mosenthin, R., Sauer, W.C. y Huang, S. 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77(11): 2974-84.
- 13 Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 1;94(3): 223-53.
- 14 Calvo, M.A. y Asensio, J.J. 1999a. Métodos para el análisis y control de la actividad antimicrobiana de productos útiles en alimentación animal. *Anaporc* 191: 97-02.
- 15 Calvo, M.A. y Asensio, J.J. 1999b. Evaluación de la eficacia de productos antimicrobianos en la alimentación animal. *Anaporc* 192: 142-46.
- 16 Calvo, M.A. 2003. Reflexiones sobre resistencia bacteriana a los antibióticos. Discurso de ingreso como Académica numeraria en la Real Academia de Doctores de Cataluña. 85 pp.
- 17 Calvo, M.A., Angulo, E., Costa-Batllori, P., Shiva, C., Adelantado, C. y Vicente A. 2006. Natural Plant Extracts and Organic Acids: Synergism and Implication on Piglet's Intestinal Microbiota. *Biotechnology* 5(2): 137-142.

- 18 Canibe, N., Steien, S.H., Overland, M. y Jensen, B.B. 2001. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *J. Anim. Sci.* 79(8): 2123-33.
- 19 Capasso, L.A. 1998. 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *Lancet* 352(5): 1864.
- 20 Carro, M.D. y Ranilla, M.J. 2002. Aditivos antibioticos promotores de crecimiento de los animales: Situación actual y posibles alternativas. *Exopol. circular* 90, 7 pp.
- 21 Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Roca, M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Perez, J.F. y Gasa, J. 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84(10): 2725-34.
- 22 Chateau, N., Castellanos, I. y Deschamps, A.M. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.* 74(1): 36-40.
- 23 Cherrington, C.A., Hinton, M., Pearson G.R. y Chopra, I. 1991. Inhibition of *Escherichia coli* . *J. Appl. Bacteriol.* 70: 156-60.
- 24 Chudnicka, A. y Matysik, G. 2005. Research of enzymatic activities of fresh juice and water infusions from dry herbs. *J. Ethnopharmacol.* 99: 281-86.
- 25 Collins, J.D. y Wall, P.G. 2004. Food safety and animal production system: controlling zoonoses at farm level. *Rev. Sci. Tech.* 23(2): 685-00.
- 26 Corcoran, B.M, Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* 96(5): 1024-39.
- 27 Coulombe, R.A. 1993. Symposium: Biological action of Mycotoxins. *J. Dairy Sci.* 76: 880-91.

- 28 Cowan, M.M. 1999. Plants Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-82.
- 29 Creppy, E.E., Chiarappa, P., Baudrimont, I., Borracci, P., Moukha, S. y Carratu, M.R. 2004. Synergistic effects of fumonisin B<sub>1</sub> and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. *Toxicology* 201(1-3): 115-23.
- 30 Crump, J.A., Griffin, P.M. y Angulo, J. 2002. Bacterial Contamination of Animal Feed and Its Relationship to Human Foodborne Illness. *Clin. Infect. Dis.* 35: 859-65.
- 31 Cutter, C.N., 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J. Food Prot.* 63 (5): 601-07.
- 32 Dabbah, R., Edwards, V.M. y Moats, W.A. 1970. Antimicrobial action of some *Citrus* Fruit Oils on selected Food-Borne Bacteria. *Appl. Microbiol.* 19 (1): 27-31.
- 33 Davies, R. H. y Wray, C. 1997. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feedmills. *Vet. Microbiol.* 51: 159-69.
- 34 Debnam, A.L, Jackson, C.R, Avellaneda, G.E., Barrett, J.B. y Hofacre, C.L. 2005. Effect of growth promotant usage on *enterococci* species on a poultry farm. *Av. Dis.* 49(3): 361-65.
- 35 Dibner, J.J. y Richards, J.D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84(4): 634-43.
- 36 Dirheimer, G. 1996. Mechanism approaches to ochratoxin toxicity. *Food Addit. Contam.* 13 (Supl.): 45-48.
- 37 Dixon, R.C. y Hamilton, P.B. 1981. Effect of feed ingredients on the antifungal activity of propionic acid. *Poult. Sci.* 60: 2407-11.

- 38 Dorman, H.J. y Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-16.
- 39 Eloff, J.N. 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Med.* 64: 711-13.
- 40 Eun, J.S. y Beauchemin K.A. 2005. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 88(6): 2140-53.
- 41 Fairbrother, J.M. y Nadeau, E. 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech.* 25(2): 555-69.
- 42 Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. y Pedro, L.G. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36(1): 35-40.
- 43 Fandohan, P., Gbenou, J.D., Gnonlonfin, B.; Hell, K., Marasas, W.F.O. y Wingfield, M.J. 2004. Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin Contamination in Corn. *Agric. Food Chem.* 52(22): 6824-29.
- 44 Fisher, K. y Phillips, C.A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *J. Appl. Microbiol.* 101(6): 1232-40.
- 45 Franco, L.D., Fondevila M., Lobera, M.B., y Castrillo, C. 2005. Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 89(3-6): 88-93.
- 46 Friedman, M., Henika, P.R. y Mandrell, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65(10): 1545-60.

- 47 Gacesa, P. y Hubble, J. 1990. Tecnología de las Enzimas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 206 pp.
- 48 Gálfi, P. y Bokori, J. 1991. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. Acta Vet. Hung. 38: 3-17.
- 49 Gangoue-Pieboji, J., Baurin, S., Frere, J.M., Ngassam, P., Ngameni, B., Azebaze, A., Pegnyemb, D.E., Watchueng, J., Goffin, C. y Galleni, M. 2007. Screening of some medicinal plants from cameroon for beta-Lactamase inhibitory activity. Phytother. Res. 21(3): 284-87.
- 50 Gillespie, R.J., Humphreys, D.A., Baird, N.C. y Robinson, E.A. 1990. Química. Editorial Reverte. Barcelona. 1140 pp.
- 51 Goldman, P. 2001. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. Ann. Intern. Med. 16;135(8): 594-00.
- 52 Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. J. Food Prot. (Supl): 82-86.
- 53 Guo, F.C., Kwakkel, R.P., Soede, J., Williams, B.A. y Verstegen, M.W.A. 2004. Effect of a Chinese herb medicine formulation, as an alternative for antibiotics, on performance of broilers. Br. Poult. Sci. 45(6): 793-97.
- 54 Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J., Bell, H.C., Wyllie, S.G. y Warmington, J.R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 26(3): 194-98.
- 55 Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M. y Zelder, O. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68(5): 588-97.
- 56 Halberstein, R.A. 2005. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns Ann. Epidemiol. 15(9): 686-99.

- 57 Hammer, K.A., Carson, C. F. y Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86(6): 985-90.
- 58 Hammer, K.A., Carson, C. F. y Riley, T.V. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* 95(4): 853-60.
- 59 Hampson, D.J. 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res. Vet. Sci.* 40: 32-40.
- 60 Harvey, A.L. 1993. *Drugs from natural products: pharmaceuticals and agrochemicals.* Editorial Ellis Harwood Limit. Inglaterra. 171 pp.
- 61 Henry, R.W., Pickard, D.W. y Hughes, P.E. 1985. Citric acid and fumaric acid as food additives for early-weaned piglets. *Anim. Prod.* 40: 505-09.
- 62 Hernandez, F., Garcia, V., Madrid, J., Orengo, J., Catala, P. y Megias, M.D. 2006. Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 47(1): 50-56.
- 63 Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J. y Megías, M.D. 2004. Influence of Two Plants Extracts on Broilers Performance, Digestibility and Digestive Organ Size. *Poult. Sci.* 83: 169-74.
- 64 Hinton, M. y Linton A.H. 1988. Control of *Salmonella* infections in broilers chickens by the acid treatment of their feed. *Vet. Rec.* 123: 416-21.
- 65 Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. y Kurata, H. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(4): 818-22.
- 66 Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey R.B. y Doerr, J.A. 1988. Mycotoxin Interactions in Poultry and Swine. *J. Anim. Sci.* 66: 2351-55.

- 67 Hussein, H.S. y Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. (167): 101-34.
- 68 Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y. y Yamaguchi, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses* 43(1-2):17-23.
- 69 Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47(5): 565-73.
- 70 INPPAZ- Instituto Panamericano de Proteccion de los Alimentos y Zoonosis. 2000. Taller Internacional sobre Vigilancia de *Salmonella* y de la Resistencia Antimicrobiana en Patógenos Transmitidos por los Alimentos. Buenos Aires-Argentina.
- 71 Izat, A.L., Tidwell, R.A., Thomas, R.A., Reiber, M.A., Adams, M.H., Colberg, M. y Waldroup, P.W. 1990. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. *Poult. Sci.* 69: 818-26.
- 72 Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Wertelecki, T., Orda, J. y Skorupinska, J. 2005. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *Br. Poult. Sci.* 46(4): 485-93.
- 73 Jones, F.T. and Richardson, K.E. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult. Sci.* 83(3): 384-91.
- 74 Kamel, C. 2002. Re-defining botanicals. *Feed Int.* 3: 24-27.
- 75 Kim, H.J., Lee, D.S. y Paik, H.D. 2004. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from raw soybean sprouts. *J. Food Prot.* 67(5): 1031-35.
- 76 Kim, J., Marshall, M.R. y Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five food-borne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2839-45.



- 77 Kim, S. y Fung, D.Y. 2004. Antibacterial effect of crude water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on food-borne pathogens in liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 39(4): 319-25.
- 78 Krishnamurthy, Y.L. y Shashikala, J. 2006. Inhibition of aflatoxin B production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(5): 469-74.
- 79 LeMieux, F.M., Southern, L.L. y Bidner, T.D. 2003. Effect of mannan oligosaccharides on growth performance of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 81(10): 2482-87.
- 80 Lis-Balchin, M., Buchbauer, G., Hirlenleher, T., y Resh, M. 1998. Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 207-09.
- 81 Liu, H.L., Yu, F.Y., Chan, M.H. y Yang, Y.L. 2002. The effects of Mycotoxins, Fumonisin B<sub>1</sub>, and Aflatoxin B<sub>1</sub>, on Primary Swine Alveolar Macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180: 197-204.
- 82 Luby, S., Jones, J., Dowda, H., Kramer, J. y Horan, J. 1993. A large outbreak of gastroenteritis caused by diarrheal toxin-producing *Bacillus cereus*. *J. Infect. Dis.* 167(6): 1452-55.
- 83 Luo, M., Jiang, L.K., Huang, Y.X., Xiao, M., Li, B. y Zou, G.L. 2004. Effects of Citral on *Aspergillus flavus* Spores by Quasi-elastic Light Scattering and Multiplex Microanalysis Techniques. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36(4): 277-83.
- 84 Maass, N., Bauer, J., Paulicks, B.R., Bohmer, B.M. y Roth-Maier, D.A. 2005. Efficiency of *Echinacea purpurea* on performance and immune status in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 89(7-8): 244-52.
- 85 Mahmoud, A.L. 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* 19(2): 110-13.

- 86 Mann, C.M. y Markham, J.L. 1998. A new Method for determining the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. *J. Appl. Bacteriol.* 84: 538-44.
- 87 Manzanilla, E.G., Perez, J.F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F. y Gasa, J. 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 82: 3210-18.
- 88 Marasas, W.F. 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Health Perspect. (Supl 2)*: 239-43.
- 89 Matsuura, R., Ukeda, H. y Sawamura, M. 2006. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 22;54(6): 2309-13.
- 90 Mau, J.L., Chen, C.P. y Hsieh, P.C., 2001. Antimicrobial of extracts from *Chinese chive*, *Cinnamon* and *Corni fructus*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 183-88.
- 91 Miller, G.Y., Liu, X., McNamara, P.E. y Barber, D.A. 2005. Influence of *Salmonella* in Pigs Preharvest and during Pork Processing on Human Health Costs and Risks from Pork. *J. Food Prot.* 68(9): 1788-98.
- 92 Moellering, R. 1995. Past, Present and Future of Antimicrobial of medicine. *Am. J. Med.* 99 (6A) supl. 1: 11-18.
- 93 Mohanlall, V. y Odhav, B. 2006. Biocontrol of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and fumonisin B<sub>1</sub> with 6,7-dimethoxycoumarin, a phytoalexin from *Citrus sinensis*. *J. Food Prot.* 69(9): 2224-29.
- 94 Moleyar, V. y Narasimham, P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* 16(4): 337-42.
- 95 Montani, M.L., Vaamonde, G., Resnik, S.L. y Buera, P. 1988. Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearalenone in corn. *Int. J. Food Microbiol.* 6(1): 1-8.

- 96 Mosaad, A.; Wahhab, A. y Soher, E.A. 2003. Antioxidants and Radical Scavenging Properties of Vegetable Extracts in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet. *J. Agric. Food Chem.* (51): 2409-14.
- 97 Moss, M.O. 1996. Mode of formation of Ochratoxin A . *Food Addit. Contam.* 13 (Supl): 5-9.
- 98 Mountzouris, K.C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G. y Fegeros, K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult. Sci.* 86(2): 309-17.
- 99 Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K. y Rodwell, V.W. 1992. *Bioquímica de Harper* 2ª Edición. Mexico D.F. 740 pp.
- 100 Omogbenigun, F.O., Nyachoti, C.M. y Slominski, B.A. 2004. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 82(4): 1053-61.
- 101 Östling, C.E. y Lindgren, S.E. 1993. Inhibition of *Enterobacteria* and *Listeria* growth by Lactic, Acetic and Formic Acids. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 18-24.
- 102 Oussalah, M. Caillet, S. y Lacroix, M. 2006. Mechanism of Action of *Spanish Oregano*, *Chinese Cinnamon*, and *Savory* Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69(5): 1046-55.
- 103 Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H., Abeywickrama, K. y Nugaliyadde, L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (*lemongrass*) against *Aspergillus flavus*. isolated from stored rice. *Lett. Appl. Microbiol.* 37(1): 86-90.
- 104 Partanen, K.H. y Mroz, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Res. Rev.* 12: 117-45.

- 105 Pascual, M.R. y Calderón, V. 2000. *Microbiología Alimentaria* 2nd. Edit. Diaz de Santos, cop. 360 pp.
- 106 Paster, N., 1979. The efficacy of Luproclil NC as a feed Preservative. *Poult. Sci.* 35(4): 244-48.
- 107 Paster, N., Bartov, I. y Perelman, A. 1985. Studies of the fungistatic activity of antifungal compounds in mash and pelleted feeds. *Poult. Sci.* 64(9): 1673-77.
- 108 Peris, S. y Asensio, J.J. 2002. Organic acids plus botanicals. *Feed Int.* March: 17-19.
- 109 Plestina, R. 1996. Nephrotoxicity of Ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13(Supl): 49-50.
- 110 Poppenga, R.H. 2001. Risk associated with the use of herbs and other dietary supplements veterinary. *Clin. North Am. Equine Practic.* 17(3): 455-77.
- 111 Radecki, S.V., Juhl, M.R. y Miller, E.R. 1988. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. *J. Anim. Sci.* 66(10): 2598-605.
- 112 Ralphs, M.H., Provenza, F.D., Wiedmeier, R.D. y Bunderson, F.B. 1995. Effects of energy source and food flavour on conditioned preferences in sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1651-57.
- 113 Ramoutsaki, I., Ramoutsakis, Y.A., Hankotakis, S. y Tsatsakis, A.M. 2000. Remedies used in Hellenic history. *Vet. Hum. Toxicol.* 42(4) : 238-41.
- 114 Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I. y Fridlender, B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 20(12):522-31.

- 115 Rasooli, I. y Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*. 66(24): 2851-56.
- 116 Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K. y Remmal, A. 2003. The Mechanism of Bactericidal Action of Oregano and Clove Essential Oils and of Their Phenolic Major Components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil Res.* 15: 356-62.
- 117 Ricke, S.C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* 82(4): 632-9.
- 118 Roncada, P., Carta, F., Zannotti, M. Malagutti, L., Sciaraffia, F. y Greppi, G.F. 2004. Swine ochratoxicosis: proteomic investigation of hepatic bioindicators. *Vet. Res. Commun.* 28(Supl 1): 371-75.
- 119 Ross, Z.M., Gara, E.A.O., Hill, D.J., Sleightholme, H.V. y Maslin, D.J. 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulphides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 475-80.
- 120 Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. y Wilson, T.M. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10): 3225-26.
- 121 Ruhland, M., Engelhardt, G., Schäfer, W. y Wallnöfer, P.R. 1996a. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. *Nat. Toxins* 4: 254-60.
- 122 Ruhland, M., Engelhardt, G. y Wallnöfer, P.R. 1996b. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. *Mycopathologia* 134(2): 97-102.

- 123 Rutqvist, L., Björklund, N.E., Hult, K., Hökby, E. y Carlson, B. 1978. Ochratoxin A as the Cause of Spontaneous Nephropathy in Fattening Pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(6): 920-25.
- 124 Salmond, C.V. Kroll, R.G. y Booth, I.R. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130(11): 2845-50.
- 125 San Martín, R. 1977. *Tratado de Farmacognosia*. Ed. Científico Médica. Barcelona. 1121 pp.
- 126 Scholten, R.H., van der Peet-Schwering, C.M., den Hartog, L.A., Balk, M., Schrama, J.W. y Verstegen, M.W. 2002. Fermented wheat in liquid diets: effects on gastrointestinal characteristics in weanling piglets. *J. Anim. Sci.* 80(5): 1179-86.
- 127 Scudamore, K.A. 1996. Ochratoxin A in animal feed-effects of processing. *Food Addit. Contam.* 13 (supl): 39-42.
- 128 Sharma, R.P. 1993. Immunotoxicity of Mycotoxins. *J. Dairy Sci.* 76: 892-97.
- 129 Shiva, C.M. y Calvo, M.A. 2003. Aspectos sobre la capacidad Antibacteriana de extractos naturales y ácidos orgánicos. *Anales de la Real Academia de Doctores de España* 7: 121-129.
- 130 Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R. y Du, Z. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 100(2): 296-305.
- 131 Smith-Palmer, A., Stewart, J. y Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26(2): 118-22.
- 132 Smith-Schalkwijk, M.J. 1999. Veterinary Phytotherapy: an overview. *Can. Vet. J.* 40: 891-92.

- 133 Soliman, K.M. y Badeaa, R.I. 2002. Effect of Oil Extracted from some Medicinal Plants on different Mycotoxigenic Fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40 : 1669-75.
- 134 Stobberingh, E.E. y van den Bogaard, A.E. 2000. Spread of antibiotic resistance from food animals to man. *Acta Vet. Scand.* 93: 47:52.
- 135 Toit, E.A. y Rautenbach, M. 2000. A Sensitive Standardised Micro-gel well Diffusion Assay for the Determination of Antimicrobial Activity. *J. Microbiol. Methods.* 42: 159-65.
- 136 Urdaci, M.C., Bressollier, P. y Pinchuk, I. 2004. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J. Clin. Gastroenterol.* 38(6 Supl): 86-90.
- 137 Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E. y Tepe, B. 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fish. Et Mey. Var. *Pectinatus (Lamiaceae)*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 63-67.
- 138 Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. y Kozakiewicz, Z. 1996. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(12): 4461-64.
- 139 Varga, J., Rigo, K. y Teren, J. 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 25;59(1-2): 1-8.
- 140 Vargas, I., Sanz, I, Moya, P. y Primo-Yufera, E. 1999. Antimicrobial and antioxidant compounds in the non-volatile fraction of expressed orange essential oils. *J. Food Prot.* 62(8): 929-32.
- 141 Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Turon, C. y Marin, S. 2004. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *J. Appl. Microbiol.* 96(4): 716-24.
- 142 Venturini, M.E., Blanco, D. y Oria, R. 2002. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* 65(5): 834-39.

- 143 Witte, W. 2000. Antimicrobial therapy in a Historical perspective. *Acta Vet. Scand.* 93: 7-16.
- 144 Witte, W., Tschäpe, H., Klare, I. y Werner, G. 2000. Antibiotics in animal feed. *Acta Vet. Scand.* 93: 37-45.
- 145 Xu, Z.R., Hu C.H., Xia, M.S., Zhan, X.A. y Wang MQ. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* 82(6): 1030-36.
- 146 Young, K.M. y Foegeding, P.M. 1993. Acetic, Lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* and the effect on intracellular pH. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 515-20
- 147 Young, L.G., Ping, H. y King, G.J. 1990. Effects of feeding zearalenone to sows on rebreeding and pregnancy. *J. Anim. Sci.* 68(1): 15-20.
- 148 Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. y Manes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45(1): 1-18.