



**DECIMOCTAVO CONGRESO INTERNACIONAL  
AVEM 2026**

**Pachuca, Hidalgo, México  
10 al 12 de marzo de 2026**

**Víctor Manuel Petrone García**  
Editor en jefe

**Inkar Castellanos Huerta**  
Coeditor

**Aviespecialistas de México**

Decimoctavo Congreso Internacional AVEM 2026

Editor en jefe: Víctor Manuel Petrone García

Coeditor: Inkar Castellanos Huerta

Todos los derechos reservados. Esta publicación no puede ser reproducida ni parcial ni totalmente ni registrada en, o transmitida por, un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni formato, por ningún medio, sea mecánico, fotocopiado, electrónico, magnético, electroóptico o cualquier otro, sin el previo y por escrito de la editorial.

La información contenida en cada uno de los trabajos es responsabilidad de los autores



Derechos reservados Aviespecialistas de México AC © 2026, 1ª edición.  
Clavelinas 266, Nueva Santa María, 02800 Azcapotzalco, Ciudad de México

ISBN:

Impreso y hecho en México

AVEM  
Aviespecialistas de México



## MESA DIRECTIVA DE AVEM 2023-2025

### **PRESIDENTE**

Gustavo Medel Hernández

### **VICEPRESIDENTE**

Víctor Manuel Valdés Narváez

### **SECRETARIO**

Román Eduardo López Cortés

### **TESORERO**

Enrique Oscar García Vera

### **VOCALES RELACIONES NACIONALES**

Alberto García Meade

### **VOCALES RELACIONES COMERCIALES**

Román Eduardo López Cortés

### **VOCAL ESTATUTOS**

Ángel Felix Borbolla

### **COMITÉ DE MEMBRESÍAS**

Jorge Sanchez Zúñiga

### **COMISIÓN CIENTÍFICA**

Víctor Manuel Petrone García  
(Coordinador de la Comisión)

Jorge Aguirre Esponda

Enrique Oscar García Vera

### **Comisión Científica Internacional**

Inkar Castellanos Huerta

Guillermo Téllez Isafas

### **ORGANIZADOR DEL CONGRESO AVEM**

Víctor Manuel Petrone García  
(Coordinador de la General)

### **COORDINADORES DE DELEGACIONES REGIONALES**

Víctor Ortiz Herrera

## LISTA DE CONTENIDOS

<b>MESA DIRECTIVA de AVEM 2023-2025</b> .....	<b>3</b>
<b>PRESIDENTE</b> .....	3
<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN AVES SILVESTRES: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PATOGENICIDAD Y ANÁLISIS COMPARATIVO</b> .....	<b>6</b>
Alejandro Jacobo Aranda Jiménez .....	6
Víctor Manuel Petrone García, Gabriela Aguilar Tipacamú, Varinia López Ramírez, Inkar Castellanos Huerta.....	6
<b>REDUCCIÓN DEL USO DE ANTIBIÓTICOS CON ACCIÓN DIGESTIVA EN AVES DE COMBATE POR UNA ALTERNATIVA NUTRICIONAL</b> .....	<b>12</b>
Manuel Alfonso Negrete Morales, Arturo Piñón Quintana.....	12
<b>EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LAS MICROVESÍCULAS DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> ADMINISTRADAS POR VÍA ORAL A POLLOS COBB 500 DESAFIADOS CON AFLATOXINA B<sub>1</sub></b> .....	<b>14</b>
Moreno Lazaro Ericka, Juan Omar Hernández Ramírez, Cynthia González Ruiz .....	14
<b>EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CARNE EN POLLOS DE ENGORDA SUPLEMENTADOS CON PROBIÓTICO COMERCIAL Y GLUCOSA OXIDASA</b> .....	<b>31</b>
Ángel Daniel Colín González, Cinthia Itzel Aguilar Ayala, Juan Sebastián Barrientos Padilla, Omar Hernández Ramírez, Nora Rosalía Flores Huitron.....	31
<b>DISEÑO DE NANOCÁPSULAS CARGADAS CON GERANIOL PARA SU USO CONTRA SALMONELLA INFANTIS: EVALUACIÓN EN UN MODELO AVÍCOLA IN VITRO.</b> .....	<b>41</b>
K. S. Garcia Salazar, J. A. Maguey Gonzalez, J. D. Latorre, R. López Arellano, E. A. Morales Hipólito, R. Díaz Torres, A. Vázquez Durán, G. Tellez Isaias, A. Méndez Albores, B. Solis Cruz, D. Hernandez Patlan.....	41
<b>“BIOCARBONES DERIVADOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE COCO, NARANJA Y GUAYABA PARA LA ADSORCIÓN DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> EN UN MODELO AVIAR IN VITRO”</b> .....	<b>57</b>
K. S. García Salazar, A. Méndez Albores, E. A. Morales Hipólito, J. A. Maguey González, G. Téllez Isaias, A. Vázquez Durán, R. López Arellano, B. Solis-Cruz y D. Hernandez Patlan.....	57
<b>COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS PROBIÓTICOS COMERCIALES SOBRE HUEVO SUCIO, PRODUCTIVIDAD Y MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS LIBRES DE JAULA DE UNA GRANJA COMERCIAL EN MÉXICO POSTERIOR A UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO POR INFECCIÓN CON <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i></b> .....	<b>75</b>
López González Víctor Hugo, Ibarra Macari María Beatriz.....	75
<b>UNA VACUNA DE SEGUNDA GENERACIÓN FORMULADA CON ESPOROZOITOS COMPLETOS DE <i>Eimeria tenella</i> PROTEGE EFICAZMENTE CONTRA UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL SEVERA</b> .....	<b>81</b>
M.A. Juárez Estrada, A. Gayosso Vázquez, G. Tellez Isaias, R.A. Alonso Morales .....	81
<b>IMPACTO DE UN PROBIÓTICO MULTICEPA DE BACILLUS SPP. EN LA PIGMENTACIÓN CUTÁNEA Y EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO DE POLLOS DE ENGORDA SOMETIDOS A COCCIDIOSIS</b> .....	<b>86</b>
Ma Beatriz Ibarra Macari, María del Carmen Mojica Enriquez, Gloria Samantha Ortega Alvarado, Yared Arturo Moreno Arenas ..	86
<b>LA SUPLEMENTACIÓN CON COMPUESTOS DERIVADOS DE LA LEVADURA MODULA LA MICROBIOTA INTESTINAL, REDUCE LA MORTALIDAD Y MEJORA EL DESEMPEÑO DE LOS POLLOS DE ENGORDE EN CONDICIONES COMERCIALES</b> .....	<b>94</b>
Rosiane de Souza Camargos, Adriana Nogueira Figueiredo, Letícia Moreira dos Santos, Magdalena Couste, Mariana Nascimento	94
<b>LOS PROBIÓTICOS ADICIONADOS EN EL AGUA MEJORAN EL CRECIMIENTO DE POLLOS DE ENGORDA EN SISTEMA DE PRODUCCIÓN CONVENCIONAL</b> .....	<b>99</b>
Oscar Vazquez, Josué Arroyo, Víctor Naranjo, Maria Ortiz .....	99

<b>FARMACOCINÉTICA DE UN PREPARADO A BASE DE UN FITOBIÓTICO CON ENROFLOXACINA DIHIDRATO CLORHIDRATO PARA AVES DE PRODUCCIÓN EN TRASPATIO.....</b>	<b>105</b>
Gutiérrez OL, Sumano LH, Gracia MJ, Mendoza BJ .....	105
<b>RESPUESTAS EN PRODUCTIVIDAD, MICROBIOLOGÍA Y MICROBIOTA INTESTINAL EN POLLOS DE ENGORDA ADICIONADOS CON SUSTANCIAS HÚMICAS EN ALIMENTO O AGUA DE BEBIDA.....</b>	<b>112</b>
María de Lourdes Angeles, Sergio Gómez Rosales, José Martín Ruvalcaba Gómez .....	112
<b>EVALUACIÓN DE ALGUNAS VARIABLES EN EL CONTEO DE OOQUISTES DE EIMERIA SPP. POR LA TÉCNICA DE MCMASTER.....</b>	<b>119</b>
Santos Sánchez Vanessa, Fuente Martínez Benjamín, Velasco Hernández Xóchitl .....	119
<b>DETERMINACIÓN DE LA SERIE BLANCA EN EL HEMOGRAMA DEL “PATO REAL” CAIRINA MOSCHATA, LINNAEUS, 1758 (anseriformes: anatidae) .....</b>	<b>127</b>
José Henry Osorio, Yocner Quenan, Silvio Jaramillo .....	127
<b>EVALUATION AND CONTROL OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CHICKS IN THE INCUBATOR .....</b>	<b>131</b>
Lisa R. Bielke, Nivedita Pareek, Muhammad Wajeeh Ul Hassan .....	131
<b>ACTUALIZACIÓN EN LAS CURVAS DE CRECIMIENTO POR ESTIRPE DE POLLO Y SU RELACIÓN CON LOS NUEVOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LAS PRINCIPALES ESTIRPES DE POLLO DE ENGORDA.....</b>	<b>132</b>
Everton Luis Krabbe – Eng Agr, D.Sc., Nutrologo – Embrapa Suinos e Aves – Brazil.....	132
<b>GLOBAL CONTROL STRATEGIES FOR HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA .....</b>	<b>134</b>
David E Swayne .....	134
<b>CHANGES IN THE ECOLOGY AND EPIDEMIOLOGY OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA .....</b>	<b>135</b>
David E Swayne .....	135
<b>EPIDEMIOLOGIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE FADV(ADENOVIRUS AVIAR) EN COLOMBIA (2025) .....</b>	<b>136</b>
John Jairo Salazar .....	136
Pablo Saavedra, Jairo Araque, Aura María Torres, Andrés Faura, Andrea Castaño .....	136
<b>MEJORAS EN EL RENDIMIENTO DE LOS POLLOS DE ENGORDE Y LA SALUD INTESTINAL DEPENDIENTES DE LA DOSIS CON UNA SOLUCIÓN BIOACTIVA DOBLEMENTE ENCAPSULADA .....</b>	<b>144</b>
Muñoz CVM, Ladirat S, Lara HA .....	144
<b>RELACIÓN DE LAS INSTALACIONES TRADICIONALES Y EL AMBIENTE EN LA ALIMENTACIÓN DE GALLINAS DE POSTURA .....</b>	<b>146</b>
Everton Luis Krabbe – Eng Agr, D.Sc., Nutrologo – Embrapa Suinos e Aves – Brazil.....	146
<b>NUTRICIÓN DE PRECISIÓN PARA GALLINAS PONEDORAS.....</b>	<b>148</b>
Fernando Guilherme Perazzo Costa, Adiel Vieira de Lima, Apolônio Gomes Ribeiro .....	148
<b>ALIMENTACIÓN DIVIDIDA (SPLIT FEEDING) PARA GALLINAS PONEDORAS.....</b>	<b>149</b>
Fernando Guilherme Perazzo Costa, Adiel Vieira de Lima, Apolônio Gomes Ribeiro .....	149
<b>ACTUALIZACIÓN SOBRE EL IMPACTO DE LOS MACROMINERALES EN EL DESEMPEÑO DE LAS AVES.....</b>	<b>150</b>
Roberto Téllez .....	150

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN AVES SILVESTRES: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PATOGENICIDAD Y ANÁLISIS COMPARATIVO

Alejandro Jacobo Aranda Jiménez

Víctor Manuel Petrone García, Gabriela Aguilar Tipacamú, Varinia López Ramírez, Inkar Castellanos Huerta.

Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma de Querétaro, . Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Department of Poultry Science, University of Arkansas.  
aaranda04@alumnos.uaq.mx

### Resumen

El virus de influenza tipo A es catalogado como un agente de importancia debido al gran impacto socio-económico y eco-epidemiológico que tiene en diversos hospedantes, en México emergió con los serotipos de baja patogenicidad H5N2 en 1993 y de alta patogenicidad H7N3 en 2012, estableciendo que son las aves acuáticas las que favorecen su transmisión y persistencia en la industria avícola del país. Con lo anterior se estableció evaluar variaciones antigénicas y moleculares asociadas con la alta virulencia en cepas de aves domésticas en comparación con virus silvestres, determinar las relaciones evolutivas entre los virus silvestres y domésticos circulantes en México. Se evaluaron marcadores específicos para H5N2 y H7N3 en cepas con divergencia en su dinámica espacio-temporal, y las relaciones evolutivas fueron determinadas. La construcción de las relaciones evolutivas fue determinada aplicando un modelo de inferencia bayesiana filodinámica en BEAST. Se complementó el análisis con una difusión espacio-temporal empleando un software geoespacial. El análisis de las variaciones antigénicas indico que las cepas de campo presentan y conservan sustituciones de aminoácidos asociadas con la adaptación y el incremento de su patogenicidad en los hospedantes, y con la inferencia filogeográfica se muestra que el linaje mexicano linajes tuvo su origen de poblaciones silvestres, pero las aves domésticas han promovido la transmisión interespecie. Con base a los resultados, se establece que la producción avícola de México desempeña un rol eco-epidemiológico en la circulación del virus de influenza aviar, y que las aves silvestres cumplen su rol ecológico en su dispersión geográfica. Palabras clave: linaje mexicano, H5N2, H7N3, fauna aviar silvestre, redes de inferencia, difusión geográfica.

**Palabras Clave:** linaje mexicano, cepas silvestres, Anseriformes, Galliformes, redes de transmisión, difusión geográfica

### Abstract

Influenza A virus is classified as an agent of importance due to the great socio-economic and eco-epidemiological impact it has on various hosts, avian influenza virus emerged in Mexico with H5N2 subtype and subsequently H7N3 establishing that waterfowl their transmission and persistence in national poultry. Reason for seeking to evaluate antigenic and molecular variations associated with high virulence in strains of poultry compared to wild birds, and establish evolutionary relationships between viruses wild-type and domestic-type circulating in Mexico. Specific molecular markers for H5N2 and H7N3 were evaluated in strains that differed in their spatio-temporal dynamics, and evolutionary relationships were determined by phylogenetic inference analysis in BEAST. Phylogenetic trees were generated based on discrete trait variables using Markov chains to design inference networks. The analysis was complemented by a spatio-temporal diffusion using geospatial software. Analysis of antigenic variations indicates that the poultry strains have presented and retain amino-acid substitutions associated with adaptation and increased pathogenicity in the hosts, and with the phylogeographic inference it was established that Mexican lineages originated from wild populations, but poultry are the responsible for the evolution, persistence, and cross-species transmission. Based on the results, it is established that poultry production in Mexico plays an eco-epidemiological role in the circulation of avian influenza virus, and that wild birds play their ecological role in their geographical dispersion. Keywords: Mexican lineage, H5N2, H7N3, wild avian fauna, inference networks, geographic spread.

**Key Words:** abcd

### Introducción

El virus de influenza aviar (vIA) es considerado un agente patógeno con impacto considerable en el ámbito salubridad humana y animal (1,2) debido a su potencial zoonótico (3,4), y al ser un virus circulante en ambientes ecológicos debido a sus hospedantes naturales le ha permitido ser uno de los patógenos con mayor persistencia histórica (5,6), con base a su factibilidad de afectar diversas especies de aves y mamíferos (2). Aplicando la dinámica del vIA, se han catalogado sus infecciones a lo largo de la historia, con base a los conocimientos obtenidos en el ámbito ecológico, epidemiológico y filogenético (7,8).

En México, se tiene registro que circulan 3 serotipos en poblaciones aviares, el serotipo H5N2 ha circulado desde hace más de dos décadas, emergiendo como virus de influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) en 1993, denominado A/chicken/Mexico/31381-7/93 (9). Un año más tarde, se detectó el virus IABP H5N2, nombrado A/chicken/Mexico/31381-7/1994 relacionado evolutivamente con virus de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) H5N2 circulante en EE.UU. durante 1983 a 1984 (10); sin embargo, a finales de otoño de dicho año, el virus tuvo mutaciones que dieron origen al virus de IAAP H5N2 (A/chicken/Puebla/8623-607/1994) (9–11), y para 1995 emergieron las cepas A/chicken/Queretaro/14588\_19/1995, y A/chicken/Queretaro/7653\_20/1995 las cuales promovieron la afectación en Querétaro afectaron a 20 millones de pollos (9,10,12). Actualmente los virus IABP H5N2 descendientes de ese linaje, se han vuelto endémico en las poblaciones de aves domésticas del país (9,10). No fue hasta principios de marzo de 2024 en Huetamo, Michoacán y Atizapán de Zaragoza, Estado de México (28 de marzo de 2024) (13), que se notificaron brotes activos de IAAP del serotipo H5N2 en el país, después de 25 años de ausencia en poblaciones aviares de México (10).

En 2012, emergió el serotipo de IAAP H7N3 (A/chicken/Jalisco/12283/CPA1/2012), el cual mostró relación histopric-evolutiva con virus de IABP circulantes en patos de la especie *Anas carolinensis* (8,14,15). Actualmente continua generando la presencia de casos en aves domésticas, pero no en igual magnitud como el brote ocurrido en 2012, que ocasionó pérdidas de aproximadamente \$475 millones de dólares y la matanza de más de 22.4 millones aves en el país (16). Sin embargo, en diciembre de 2021 Canadá registró el primer brote por un virus de IAAP H5N1 de linaje Gs/Gd en América (17–19), y fue hasta el 13 de octubre de 2022 que en México notificó el primer caso de IAAP H5N1 linaje Gs/Gd clado 2.3.4.4b en un halcón gerifalte (*Falco rusticolus*) en el Estado de México (20). Pero el primer pico de la enfermedad en la industria avícola se detectó en Nuevo León y Sonora a finales de octubre de 2022 (21,22), y posteriormente en Jalisco y Yucatán a finales de noviembre de 2022, y el último pico se presentó en Yucatán donde se reportaron 6 brotes a principios de enero de 2023 (21). En un panorama general para el virus de IAAP H5N1 se registraron 56 brotes a lo largo del territorio nacional, de los cuales 16 brotes se presentaron en aves silvestres y 40 en aves domésticas registrados hasta el 21 de marzo de 2023 (21,23). Sin embargo, debido a la ausencia de brotes de H5N1 en el territorio nacional desde junio de 2023, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) publicó el 04 de octubre en el Diario Oficial de la Federación el **ACUERDO por el que se declara al territorio de los Estados Unidos Mexicanos, como zona libre de Influenza Aviar tipo A, subtipo H5N1** (24) pero el estatus zoonosanitario cambió el 05 de octubre de 2023 cuando en Jalisco se confirmó la presencia de un caso de H5N1 en una cerceta de ala verde (*Anas crecca*) comenzando los rebrotes en aves silvestres en los estados de Veracruz, Jalisco y Guanajuato; y en aves domésticas en Sonora el 25 de octubre de 2023 (23,25), y el día 28 en Celaya, Guanajuato se reportó un brote de IAAP H5Nx (25). Por lo que ante la presencia de rebrotes de la IAAP H5N1 en México se publicó a finales del 2023 el **ACUERDO mediante el cual se activa, integra y opera el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, para el control y, en su caso, erradicación de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad A, subtipo H5N1**, así como para prevenir su diseminación dentro del territorio nacional (26) con el objetivo de estipular las estrategias zoonosanitarias para controlar y erradicar la reemergencia de la enfermedad.

Anteriormente, se describieron los principales serotipos circulantes en la industria avícola, como es el caso del H5N2 endémico desde 1993 (9), el H7N3 circulante desde 2012 (8,27), y el virus IAAP H5N1 clado 2.3.4.4b, desde 2022 (23,25). Por otra parte, los virus de IABP se han identificado en diversas especies de aves silvestres endémicas y migratorias (28–30); estableciendo que la prevalencia del vIA en poblaciones de aves acuáticas y terrestres presentes en las áreas de superposición de rutas migratorias en el territorio nacional sea de un 39% (31).

## Materiales y Métodos

Para los ensayos bioinformáticos se emplearon las secuencias de H5N2 (n=15), H7N3 (n=13), y otros subtipos (n=3), las cuales se alinearon usando la herramienta Clustal Omega 1.2.2 (32). A partir del ensayo resultante se realizó un análisis de alineamiento múltiple de Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para poder efectuar la elaboración de los ensayos bioinformáticos. Al aplicar los criterios de exclusión se obtuvieron en total 660 secuencias para el virus H5N2, y 949 secuencias para el virus H7N3; disponibles públicamente en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) consultada el 11 de octubre de 2024.

Para identificar los marcadores moleculares de patogenicidad específicos de H5N2 y H7N3 se utilizó la base de datos disponible en GISAID (<https://gisaid.org/about-us/acknowledgements/epiflu/>) (33), y la evaluación *in silico* realizada por Dadonaite et al. (34). Al obtener el consenso de los marcadores, se obtuvo el gen codificante para cada una de las proteínas de superficie, internas y no estructurales, de las secuencias de H5N2 (n=15), H7N3 (n=13), y otros subtipos (n=3) usando la herramienta EasyGene (35) con la finalidad de retirar las regiones no codificantes de las secuencias.

Para la localización de los marcadores de los segmentos 1, 2, 3, 5, 7 y 8 se emplearon las secuencias de la cepa A/goose/Guangdong/1/96(H5N1) (36), disponibles públicamente en la base de datos GenBank. Para el segmento 4 primero se implementó la herramienta SignalP 4.1 (37,38) para identificar el péptido señal N-terminal de las secuencias, y con la herramienta ProP 1.0 (39) se determinó el sitio de escisión de HA0. En cambio, en el segmento 6 inicialmente se definieron sus regiones estructurales usando la herramienta DeepTMHMM (40), y después la secuencia de aminoácidos se enumeró con base al modelo establecido por Colman *et al* (41).

Las secuencias de H5N2 (n=660) y H7N3 (n=949) fueron alineadas con cada segmento genómico de la cepa de origen silvestre actual como control externo para evaluar su relación evolutiva con las secuencias de aves domésticas identificadas. Para iniciar con el ensayo filogenético se determinó el modelo evolutivo con base a la sustitución de nucleótidos (42,43). El modelo de sustitución obtenido se empleó para realizar un análisis bayesiano enfocado en evaluar la dinámica evolutiva del virus mediante la aplicación del modelo bayesiano de Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) en el programa BEAST v1.10.4 (44). El modelo de MCMC se ejecutó a 100 millones con un muestreo cada 1,000 generaciones, la convergencia de las cadenas del modelo MCMC y el tamaño muestral se evaluaron usando Tracer 1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk>), obteniendo valores de ESS  $\geq 150$  (45). Finalmente, el árbol de máxima credibilidad de clado (MCC, Maximum Clade Credibility) se obtuvo en el programa TreeAnnotator v.1.10.4 (46) y se visualizó en el programa FigTree v1.4.4.

La visualización gráfica del origen para los virus H5N2 y H7N3 se realizó mediante una reconstrucción especial a partir del modelo bayesiano del árbol obtenido mediante MCC usando spreadD3 v0.9.6 (47) en el cual se efectuó un análisis de difusión filogeográfica en espacio discreto (48), y para inferir la ruta de dispersión más significativa en la filodinámica se calculó el factor bayes (BF<sub>10</sub>) a partir del análisis de selección de variables de búsqueda estocástica bayesiana (49,50).

## Resultados y discusión

En relación a la proteína HA del serotipo H5N2 con base al alineamiento se determinó que la mayoría de las secuencias de H5N2 contaban una secuencia multibásica de aminoácidos (KRKR/GLF) que les confiere un patotipo de IAAP (12,51); sin embargo, en tres cepas se observó una secuencia (KKTR/GLF) reportada solamente en virus de mediana patogenicidad (52), los cuales se aíslan con frecuencia en patos y gansos domésticos causándoles infecciones respiratorias (53) y solamente dos cepas tuvieron un patotipo de IABP (12,51). Sin embargo, Lee *et al.* (2017) ha descrito que los virus IAAP H5 se caracterizan por presentar una secuencia consecutiva de 4 aminoácidos básicos en su sitio de escisión de HA0, y un aumento de los mismos no incrementará su patogenicidad en aves domésticas; por otro lado, Luczo y Spackman (2025) evaluaron que los virus IAAP H5 en asociación con subtipo N2 de linaje americano presentan mayoritariamente una inserción multibásica de mediana longitud (RKKR/G) que una inserción extensa (REKREKR/G). En relación a lo descrito anteriormente, se puede plantear que el subtipo IAAP H5N2 no ha sido erradicado a pesar de que su último reporte en 1995 (56), ya que con base a la evaluación del HACS de las secuencias se establece que en México se encuentran interactuando tres diferentes patotipos.

Durante la identificación de marcadores de patogenicidad se observó que la mayoría de las cepas H5N2 de pollo y la cepa A/Mexico/INER-INF645\_HA/2024(H5N2) presentaban una asparagina en la posición 158 (S158N) un marcador relacionado con favorecer la relacionada con la afinidad de unión al receptor SA $\alpha$ -2,6 Gal (57), con lo que se puede inferir que son las cepas de aves domésticas las que podrían favorecer la adaptación y el salto zoonótico hacia los mamíferos. Adicionalmente, en las cepas aisladas en Aguascalientes (2013), Estado de México (2023), Jalisco (2022), Puebla, y Querétaro (2021 - 2023) se observaron marcadores asociados a la patogenicidad de cepas H5N1 como D101N, V214I, S159N, T192I, y S137; en cambio, la cepa A/Mexico/INER-INF645\_HA/2024(H5N2) presentó sustituciones de aminoácidos con efectos zoonóticos potenciales en los sitios 101S, 216T, y 227R (33).

Para la proteína NA, las cepas H5N2 provenientes de aves domésticas en conjunto con la cepa A/Mexico/INER-INF645/2024(H5N2) contaban con una delección de 20 aminoácidos en la región del tallo, el cual es un patrón de delección presente en el subtipo N2 circulante en países como EE.UU., El Salvador, Guatemala, Japón, México y Taiwán (58), dicha delección se encuentra asociada con la adaptación de la NA circulante en aves silvestres hacia aves domésticas (36,51). Dentro del análisis de los marcadores, con excepción del cambio del ácido glutámico en la posición 368 (E368K) asociado con aumentar la actividad de la neuraminidasa durante la replicación en células de pollos (59) en las cepas de H5N2, no hubo algún otro cambio asociado con el incremento en la patogenicidad de las cepas.

A partir de dicha escala espacio-temporal se apreció que el subtipo H5 fue introducido a México desde la región oriental de Canadá (Ontario) y nororiental de EE.UU (Minnesota) fuertemente soportados por un factor de Bayes (BF<sub>10</sub>) >4.61, (60)

en conjunto con el análisis espacial se determinó que la transmisión del segmento HA involucro poblaciones de aves domésticas y silvestres en donde se observó un vínculo altamente significativo de una difusión hacia Galliformes domésticos a partir de Anseriformes silvestres ( $BF_{10}=4.16$ ) más que de una transmisión de aves domésticas hacia aves silvestres ( $BF_{10}=2.73$ ) estableciendo que la transmisión del segmento fue promovida por poblaciones silvestres, lo cual fue establecido por Hill *et al.* (2022) quienes determinaron que dichas poblaciones actúan como promotores de la expansión geográfica de los virus de influenza, pero el caso particular del clado mexicano se presentaron casos aislados de la donación del gen HA de aves domésticas hacia aves silvestres (2007 y 2017) y mamíferos (2014 y 2024), tal como lo descrito por Mateus-Anzola *et al.* (2021), quienes detallaron que las cepas aisladas de H5N2 en suinos tenían una relación evolutiva con cepas de aves silvestres y aves domésticas de México, más que con los aislados identificados en poblaciones de aves silvestres de 2002 a 2013 circulantes en Norteamérica, dicho argumento se sustentó con el valor probabilístico de  $BF_{10}=3.69$  (60). Para NA se observaron vínculos altamente significativos de una difusión de Anseriformes silvestres hacia Galliformes domésticos ( $BF_{10}=4.46$ ) como de Galliformes domésticos hacia Anseriformes silvestres ( $BF_{10}=3.76$ ) estableciendo que para el gen de NA se ha presentado una mezcla del subtipo N2 entre las poblaciones domésticas y silvestres.

En relación a la proteína HA del serotipo H7N3 se encontró que las cepas presentaban un patotipo de IAAP debido a que contaban con una inserción de 4 aminoácidos básicos (HRKTR/GLF) (63) patrón que mejora la replicación e infección en aves domésticas. Similar a como ocurre en virus H5, también pueden presentar una inserción de longitud corta, mediana o extendida (55); para las cepas de H7N3 de aves domésticas se observó una inserción de 13 aminoácidos de los cuales 7 eran básicos lo cual los clasifica como secuencia de HACS extendida (55) a diferencia de cepas silvestres las cuales cuentan con patotipo de IABP, al conservar la secuencia típica (NPKTR/GLF) (55). Evaluando los marcadores de patogenicidad solamente en la cepa de Aguascalientes (2023) y Jalisco (2022 y 2023) presentó la sustitución de alanina en la posición 157, asociado con incrementar la patogenicidad en aves domésticas (64). La proteína NA no presentó delección en el tallo lo cual coincide con lo descrito por Abdelwhab *et al.* (2013) quienes establecieron que en virus H7N3 de linaje mexicano no cuentan con delección en la región del tallo, en comparación con cepas aisladas en EE.UU., Italia, Pakistán, y Reino Unido donde si llegan a presentar delecciones en H7N3 (58) y ser asociadas en incrementar la patogenicidad en mamíferos (65).

Al realizar la evaluación filogeográfica se observa que el origen de la circulación del linaje H7N3 de México deriva de virus provenientes de Canadá (Columbia Británica) aislados durante 2004, lo cual está soportado con un valor  $BF_{10}=5.33$  (60) estableciendo que los virus H7N3 de Norteamérica emergieron en Canadá durante el 2004 por (51,66,67). En relación a la red de transmisión del segmento entre hospedantes, la difusión del segmento HA partió de especies de Anseriformes silvestres ( $BF_{10}=4.16$ ) las cuales promovieron la dispersión hacia poblaciones de Charadriiformes. Sin embargo, también se observó una evidencia substancial para inferir que las poblaciones de Galliformes domésticas son las que han promovido el salto hacia aves silvestres ( $BF_{10}=2.27$ ) como hacia mamíferos ( $BF_{10}=1.60$ ). El subtipo N3 del linaje mexicano (Figura 22) al igual que H7 tuvo su origen de virus canadienses (Alberta) circulantes durante 2003, aisladas soportado con un valor  $BF_{10}=4.25$  (60) (Anexo VIII). No obstante, para el segmento NA las especies de Anseriformes silvestres promovieron la donación del gen hacia aves domésticas ( $BF_{10}=4.007$ ), pero las poblaciones domésticas promovieron una donación hacia los mamíferos.

#### Referencias

1. Hautefeuille C, Dauphin G, Peyre M. Knowledge and remaining gaps on the role of animal and human movements in the poultry production and trade networks in the global spread of avian influenza viruses—A scoping review. *PLoS one*. 2020;15(3):0567–88.
2. Suarez DL. Influenza A virus. En: Swayne, DE, Animal influenza. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2017. p. 3–28.
3. Abdelwhab EM, Mettenleiter TC. Zoonotic Animal Influenza Virus and Potential Mixing Vessel Hosts. *Viruses*. 2023;15(4):980–1017.
4. Charostad J, Rukerd MRZ, Mahmoudvand S, Bashash D, Hashemi SMA, Nakhaie M, et al. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep. *Travel medicine and infectious disease*. 2023;55:1–16.
5. Prosser DJ, Hungerford LL, Erwin RM, Ottinger MA, Takekawa JY, Newman SH, et al. Spatial modeling of wild bird risk factors for highly pathogenic A (H5N1) avian influenza virus transmission. *Avian diseases*. 2016;60(1s):329–36.
6. van der Kolk JH. Role for migratory domestic poultry and/or wild birds in the global spread of avian influenza? *Veterinary Quarterly*. 2019;39(1):161–7.
7. Swayne DE. The global nature of avian influenza. En: Swayne, DE, Animal influenza. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2017. p. 177–201.
8. Swayne DE, Suarez DL, Sims LD. Influenza. En: Swayne, DE, Diseases of Poultry. 14 th. John Wiley & Sons; 2020. p. 210–56.
9. Xu W, Navarro-López R, Solís-Hernández M, Liljehult-Fuentes F, Molina-Montiel M, Lagunas-Ayala M, et al. Evolutionary Dynamics of Mexican Lineage H5N2 Avian Influenza Viruses. *Viruses*. 2022;14(5):958–75.
10. Perez DR, de Wit JJ (Sjaak). Low-pathogenicity avian influenza. En: Swayne, DE, Animal influenza. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2017. p. 271–301.
11. Montalvo-Corral M, Reyes-Leyva J, Hernandez J. Avian influenza: Eco-epidemiological aspects of the virus in its natural hosts, the migratory waterfowls. *Revista Chilena de Historia Natural*. 2010;83(4):543–56.
12. Lee DH, Criado MF, Swayne DE. Pathobiological origins and evolutionary history of highly pathogenic avian influenza viruses. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2021;11(2):a038679.

13. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Panorama nacional - Influenza Aviar de Alta Patogenicidad [Internet]. 2024 p. 1–12. Disponible en: [https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2024/septiembre/6ACTPANIAAPago24p%C3%BAblico\\_4e414cc8-6fe9-4f59-b97b-6a5c29453d05.pdf](https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2024/septiembre/6ACTPANIAAPago24p%C3%BAblico_4e414cc8-6fe9-4f59-b97b-6a5c29453d05.pdf)
14. Lu L, Lycett SJ, Leigh Brown AJ. Determining the Phylogenetic and Phylogeographic Origin of Highly Pathogenic Avian Influenza (H7N3) in Mexico. *Kramer F*, editor. *PLoS ONE*. el 16 de septiembre de 2014;9(9):e107330–43.
15. Youk S, Leyson CM, Parris DJ, Kariithi HM, Suarez DL, Pantin-Jackwood MJ. Phylogenetic analysis, molecular changes, and adaptation to chickens of Mexican lineage H5N2 low-pathogenic avian influenza viruses from 1994 to 2019. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2022;69(5):1445–59.
16. Afanador-Villamizar A, Gomez-Romero C, Diaz A, Ruiz-Saenz J. Avian influenza in Latin America: A systematic review of serological and molecular studies from 2000-2015. *PLoS One*. 2017;12(6):e9573–94.
17. Caliendo V, Lewis N, Pohlmann A, Baillie S, Banyard A, Beer M, et al. Transatlantic spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wild birds from Europe to North America in 2021. *Scientific reports*. 2022;12(1):11729.
18. Günther A, Krone O, Svansson V, Pohlmann A, King J, Hallgrímsson GT, et al. Iceland as Stepping Stone for Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus between Europe and North America. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(12):2383–8.
19. Harvey JA, Mullinax JM, Runge MC, Prosser DJ. The changing dynamics of highly pathogenic avian influenza H5N1: Next steps for management & science in North America. *Biological Conservation*. 2023;282:1–11.
20. Navarro-López R, Alcazar CJ, Guillen AM, Piña HJ, Flores EB, Hernández DL, et al. Avance IA - Influenza Aviar. Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales / Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. 2023;1(8):1–24.
21. Navarro-López R, Alcazar CJ, Guillen AM, Piña HJ, Flores EB, Hernández DL, et al. Avance IA - Influenza Aviar. Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales / Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. 2023;1(13):1–24.
22. Pan American Health Organization, World Health Organization. Epidemiological Update: Outbreaks of avian influenza caused by influenza A(H5N1) in the Region of the Americas 11 May 2023 [Internet]. Washington, D.C.: Pan American Health Organization - Regional Office for the Americas of the World Health Organization; 2023 [citado el 20 de mayo de 2023]. Disponible en: Consultado 20 de mayo de 2023 en, <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-outbreaks-avian-influenza-caused-influenza-ah5n1-region-americas>
23. WOA, WAHIS. WAHIS: World Animal Health Information System [Internet]. Avian Influenza A(H5N1) and the Continuing Outbreak; 2025 [citado el 7 de agosto de 2025]. Disponible en: <https://wahis.woah.org/#/home>
24. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. ACUERDO por el que se declara al territorio de los Estados Unidos Mexicanos, como zona libre de Influenza Aviar tipo A, subtipo H5N1. *Diario Oficial de la Federación*. 2023;Consultado el 06 de Marzo de 2024 en, [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5703833 & fecha=04/10/2023#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5703833 & fecha=04/10/2023#gsc.tab=0).
25. Alcazar CJ, Guillén AM, Del Rio VC. Avance IA - Influenza Aviar. Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales / Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. 2024;2(1):1–25.
26. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. ACUERDO mediante el cual se activa, integra y opera el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, para el control y, en su caso, erradicación de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad A, subtipo H5N1, así como para prevenir su diseminación dentro del territorio nacional. *Diario Oficial de la Federación*. 2023;Consultado 06 de Marzo de 2024 en, [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5712440 & fecha=26/12/2023#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5712440 & fecha=26/12/2023#gsc.tab=0).
27. Navarro-López R, Alcazar CJ, Guillen AM, Piña HJ, Flores EB, Hernández DL, et al. Avance IA - Influenza Aviar. Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales / Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. 2023;11:1–24.
28. BV-BRC. Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center. 2023 [citado el 4 de julio de 2023]. *Viruses*. Disponible en: Consultado el 04 de julio de 2023 en <https://www.bv-brc.org/>
29. NCBI. Influenza Virus Resource - Information, Search and Analysis. 2023 [citado el 4 de julio de 2023]. *Influenza virus database*. Disponible en: Consultado el 04 de julio de 2023 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>
30. SENASICA. SENASICA. 2023 [citado el 4 de julio de 2023]. *Influenza aviar AH7N3: Situación actual en México*. Disponible en: Consultado 04 de julio de 2023 en [https://dj.senasica.gob.mx/AtlasSanitario/storymaps/ia\\_focos.html#](https://dj.senasica.gob.mx/AtlasSanitario/storymaps/ia_focos.html#)
31. Cerda-Armijo C, de León MB, Ruvalcaba-Ortega I, Chablé-Santos J, Canales-del-Castillo R, Peñuelas-Urquides K, et al. High Prevalence of Avian Influenza Virus Among Wild Waterbirds and Land Birds of Mexico. *Avian Diseases*. 2020;64(2):135–42.
32. Tan J, Yin Z, Huang H, Zeng C. Characterization and phylogenetic analysis of *Acheilognathus chankaensis* mitochondrial genome. *Mitochondrial DNA Part B*. el 2 de enero de 2019;4(1):1148–9.
33. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAIID's innovative contribution to global health. *Global Challenges*. 2017;1(1):33–46.
34. Dadonaite B, Ahn JJ, Ort JT, Yu J, Furey C, Dosey A, et al. Deep mutational scanning of H5 hemagglutinin to inform influenza virus surveillance. *bioRxiv*. el 31 de julio de 2024;2024.05.23.595634.
35. Larsen TS, Krogh A. EasyGene—a prokaryotic gene finder that ranks ORFs by statistical significance. *BMC Bioinformatics*. el 3 de junio de 2003;4:21.
36. Suttie A, Deng YM, Greenhill AR, Dussart P, Horwood PF, Karlsson EA. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses. *Virus Genes*. 2019;55:739–68.
37. Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. En: Kihara D, editor. *Protein Function Prediction* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [citado el 11 de noviembre de 2024]. p. 59–73. (*Methods in Molecular Biology*; vol. 1611). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7015-5\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7015-5_6)
38. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. 2011;8(10):785–6.
39. Duckert P, Brunak S, Blom N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel*. enero de 2004;17(1):107–12.
40. Krogh A. Two methods for improving performance of an HMM and their application for gene finding. En: Gaasterland T, Karp P, Karplus K, Ouzounis C, Sander C, Valencia A, et al., editores. *Proc Fifth IntConf Intelligent Systems for Molecular Biology*. CA: AAAI Press; 1997. p. 179–86.
41. Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol*. junio de 1993;67(6):2972–80.
42. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nat Methods*. el 30 de julio de 2012;9(8):772.
43. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. octubre de 2003;52(5):696–704.
44. Hill V, Baele G. Bayesian Estimation of Past Population Dynamics in BEAST 1.10 Using the Skygrid Coalescent Model. *Molecular Biology and Evolution*. el 1 de noviembre de 2019;36(11):2620–8.
45. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. el 1 de septiembre de 2018;67(5):901–4.
46. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. el 8 de noviembre de 2007;7(1):214.
47. Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*. el 15 de octubre de 2011;27(20):2910–2.

48. Faria NR, Suchard MA, Rambaut A, Lemey P. Towards a quantitative understanding of viral phylogeography. *Curr Opin Virol.* noviembre de 2011;1(5):423–9.
49. de Carvalho LMF, Santos LBL, Faria NR, de Castro Silveira W. Phylogeography of foot-and-mouth disease virus serotype O in Ecuador. *Infection, Genetics and Evolution.* el 1 de enero de 2013;13:76–88.
50. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLOS Computational Biology.* el 25 de septiembre de 2009;5(9):e1000520.
51. Abdelwhab ESM, Veits J, Mettenleiter TC. Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. *Virulence.* 2013;4(6):441–52.
52. Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, et al. Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico. *Virology.* el 20 de octubre de 1995;213(1):223–30.
53. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics).* agosto de 2000;19(2):463–82.
54. Lee DH, Bertran K, Kwon JH, Swayne DE. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3. 4.4. *Journal of veterinary science.* 2017;18(S1):269–80.
55. Luczo JM, Spackman E. Molecular Evolution of the H5 and H7 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Haemagglutinin Cleavage Site Motif. *Reviews in Medical Virology.* 2025;35(1):e70012.
56. Villarreal C. Avian influenza in Mexico. *Rev Sci Tech.* abril de 2009;28(1):261–5.
57. Meseko C, Milani A, Inuwa B, Chinyere C, Shittu I, Ahmed J, et al. The Evolution of Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5) in Poultry in Nigeria, 2021–2022. *Viruses.* el 17 de junio de 2023;15(6):1387.
58. Li J, zu Dohna H, Cardona CJ, Miller J, Carpenter TE. Emergence and Genetic Variation of Neuraminidase Stalk Deletions in Avian Influenza Viruses. *PLoS One.* el 23 de febrero de 2011;6(2):e14722.
59. Youk SS, Leyson CM, Seibert BA, Jadhao S, Perez DR, Suarez DL, et al. Mutations in PB1, NP, HA, and NA Contribute to Increased Virus Fitness of H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Clade 2.3.4.4 in Chickens. *J Virol.* el 1 de marzo de 2021;95(5):e01675-20.
60. Dittrich D, Leenders RThAJ, Mulder J. Network Autocorrelation Modeling: Bayesian Techniques for Estimating and Testing Multiple Network Autocorrelations. *Sociological Methodology.* el 1 de agosto de 2020;50(1):168–214.
61. Hill NJ, Bishop MA, Trovão NS, Ineson KM, Schaefer AL, Puryear WB, et al. Ecological divergence of wild birds drives avian influenza spillover and global spread. *PLoS Pathogens.* 2022;18(5):1–25.
62. Mateus-Anzola J, Gaytan-Cruz L, Montoya-Carrillo C, Ivan Sánchez-Betancourt J, Zarza H, Segura-Velázquez R, et al. Molecular identification and phylogenetic characterization of influenza A virus at a wildlife-livestock interface in Mexico. *Transbound Emerg Dis.* noviembre de 2021;68(6):3563–73.
63. Navarro-Lopez R, Xu W, Gomez-Romero N, Velazquez-Salinas L, Berhane Y. Phylogenetic Inference of the 2022 Highly Pathogenic H7N3 Avian Influenza Outbreak in Northern Mexico. *Pathogens.* el 1 de noviembre de 2022;11(11):1284.
64. Laleye AT, Abolnik C. Emergence of highly pathogenic H5N2 and H7N1 influenza A viruses from low pathogenic precursors by serial passage in ovo. *PLOS ONE.* el 8 de octubre de 2020;15(10):e0240290.
65. Trinh TTT, Tiwari I, Durairaj K, Duong BT, Nguyen ATV, Tuong HT, et al. Genetic Characterization and Pathogenesis of Avian Influenza Virus H7N3 Isolated from Spot-Billed Ducks in South Korea, Early 2019. *Viruses.* el 7 de mayo de 2021;13(5):856.
66. Trovão NS, Talavera GA, Nelson MI, Perez de la Rosa JD. Evolution of highly pathogenic H7N3 avian influenza viruses in Mexico. *Zoonoses Public Health.* mayo de 2020;67(3):318–23.
67. Wainwright S, Trevenec C, Claes F, Vargas-Terán M, Martin V, Lubroth J. Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3). 2012;26.



# AVEM

## Aviespecialistas de México

## REDUCCIÓN DEL USO DE ANTIBIÓTICOS CON ACCIÓN DIGESTIVA EN AVES DE COMBATE POR UNA ALTERNATIVA NUTRICIONAL

Manuel Alfonso Negrete Morales, Arturo Piñón Quintana  
Al-Chemia GV  
arturop@al-chemia.com

### Resumen

Los aminoácidos azufrados son nutrientes esenciales para las aves. Sin embargo, una preocupación creciente es el exceso de fuentes de azufre (S) en la dieta, ya que los sulfatos podrían servir como sustrato para la producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) por bacterias reductoras de sulfato, con efectos negativos sobre la salud intestinal y, por consiguiente, el rendimiento productivo de las aves. Se sabe que la toxicidad del S en las aves de corral induce condiciones patológicas inespecíficas que, generalmente, se manifiestan por diarrea.

Se llevó a cabo una prueba de campo con pollitos de combate con la finalidad de evaluar si la restricción del uso de sustratos asufrados por las bacterias intestinales permite reducir la presentación de trastornos digestivos. Tres grupos de 10 pollitos cada uno recibieron una mezcla de ácido cítrico + mineral en el agua de bebida a razón de 0 (A), 150 (B) o 1500 (C) gramos disueltos en 1000 L de agua durante 28 días.

En sólo 3 días después del inicio de la suplementación, las excretas de las aves de los Grupos B y C cambiaron, tanto en color como en firmeza, con lo que la cama de estos dos grupos de aves se mantuvo más seca en comparación con el Grupo Testigo (A). Las aves del Grupo B tuvieron una ganancia de peso promedio de 20 g más por semana comparativamente a las aves del Grupo Testigo (+ 80 gramos al final de la evaluación). No se observó ningún signo de toxicidad, baja de consumo de alimento ni pérdida de peso en las aves del Grupo C. La suplementación permitió controlar la presentación de trastornos digestivos y mejorar la condición corporal de las aves sin alguno riesgo de toxicidad

**Palabras Clave:** ave de combate, intestino, microbiota, ácido sulfhídrico, inflamación, intestino

### Introducción

Una de las problemáticas cruciales de la gallicultura es la presentación de trastornos gastroentéricos que se llegan a manifestar durante la transición de criadoras (de piso o batería) a semi-libertad o libertad para los pollitos, al final de la temporada de pelecha, al ingreso en lotes de aves reproductoras o al inicio del periodo de preparación cuando el gallo pasa de una fase de mantenimiento a un entrenamiento vigoroso y de alta demanda nutricional [1].

Los nutrientes de la dieta y las secreciones intestinales que no se absorben en el intestino delgado alcanzan el intestino grueso donde, la intensa fermentación bacteriana resulta en una gran variedad de metabolitos con actividad biológica.

A diferencia del amplio conocimiento del metabolismo de aminoácidos azufrados, los efectos deletéreos asociados con el azufre (S) han recibido poca atención. Generalmente, las dietas a base de maíz y harina de soya pueden contener de 100 a 3,500 ppm de S pero, dependiendo de los ingredientes utilizados en una formulación (ej. DDGS y minerales traza en forma de sulfato), el contenido total de azufre de los alimentos balanceados puede oscilar entre menos de 500 y más de 10,000 ppm [2].

Bajo las condiciones anaeróbicas en el intestino grueso, bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Clostridium* son capaces utilizar S como donador - aceptor terminal de electrones para producción de energía. El producto final de esta vía metabólica es el ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) que es un gas altamente proinflamatorio para la mucosa intestinal.

Limitar la utilización de sustratos azufrados y la producción de H<sub>2</sub>S por el microbiota es una alternativa innovadora para modular la inflamación de la mucosa a lo largo del intestino y preservar la estructura y la función de la barrera epitelial intestinal. Para validar los beneficios de esta estrategia en aves de combate, se llevó a cabo una prueba de campo con el objetivo evaluar los efectos de la suplementación de un complejo mineral + ácido cítrico (Al-Chemia GV) en el agua de bebida de pollitos de combate sobre la incidencia de trastornos digestivos.

30 pollos de diferentes líneas de combate de entre 3 y 4 meses de edad divididos en 3 grupos experimentales de 10 individuos cada uno (A, B y C). Las aves se mantuvieron enjauladas para garantizar la dosificación del complejo y la correcta observación de la condición de las excretas y de la cama donde se encontraban los animales y su estado de salud.

Los pollos recibieron una alimentación comercial adecuada a su edad compuesta por una mezcla al 50 % de alimento Crecimiento con 16% de proteína y Desarrollo con 17% de proteína a libre acceso.

Las aves del Grupo A (Testigo) recibieron agua de bebida fresca a voluntad. Las del Grupo B recibieron el complejo, a razón de 150 g/ 1000 L de agua (dosis recomendada) y las del Grupo C, 1500 g por 1000 L de agua (dosificación de seguridad), a voluntad durante el periodo de observación (28 días). La dosificación de seguridad fue implementada para validar la inocuidad de la suplementación.

Todas las aves en la granja reciben la vacuna TRAI COVAC para la prevención de Newcastle, Cólera Aviar y Colibacilosis. Todas las aves se pesaron, de manera individual, al inicio de la prueba y los días 7, 14, 21 y 28 de la evaluación. Se observó cotidianamente el aspecto de la excreta de cada una de las aves. El criterio de eficacia fue la ausencia de trastornos digestivos manifestada por excretas bien formadas y una ganancia de peso mayor que el Grupo Testigo.

En sólo 3 días después del inicio de la suplementación, las excretas de las aves que recibieron el complejo (Grupos B y C) cambiaron contundentemente, tanto en color como en firmeza, con lo que la cama de estos dos grupos de aves se mantuvo más seca en comparación con el Grupo Testigo (A). Las aves del Grupo B tuvieron una ganancia de peso promedio de 20 g más por semana comparativamente a las aves del Grupo Testigo (+ 80 gramos al final de la evaluación). No se observó ningún signo de toxicidad, baja de consumo de alimento ni pérdida de peso en las aves del Grupo C.

A los pocos días de iniciada la evaluación el Grupo Testigo presentó síntomas de infección digestiva por lo que cada una de las aves de este grupo recibió 20 mg de Norfloxacin durante 5 días. No hubo necesidad de medicación alguna durante el periodo de prueba para las aves que recibieron el complejo (Grupos B y C). Después de 15 días de suplementación, se observó una diferencia marcada en el plumaje y la condición corporal de las aves que recibieron DIG GUT W en comparación con el Grupo Testigo (pollos con plumaje más pobre y opaco y menor peso).

### Conclusión

La suplementación con el complejo permitió controlar la presentación de trastornos digestivos y mejorar la condición corporal de las aves sin alguno riesgo de toxicidad, por lo que puede impactar positiva y económicamente la cría y el manejo de los gallos en sus diferentes etapas y reducir el uso indiscriminado de antibióticos que se ofrecen en las galleras.

### Referencias

- [1] Orozco Adame J.K., Piñón Quintana A. 2024 . Salud Intestinal en el Ave de Combate. Los Avicultores y su Entorno. BM Editores. 156, 143-145.
- [2] Piñón A., Maurin J. 2021. Looking at sulphur and sulphate levels in poultry diets. Poultry World. 2. 28-29.

Aviespecialistas de México

# EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LAS MICROVESÍCULAS DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* ADMINISTRADAS POR VÍA ORAL A POLLOS COBB 500 DESAFIADOS CON AFLATOXINA B<sub>1</sub>

Moreno Lazaro Ericka, Juan Omar Hernández Ramírez, Cynthia González Ruiz.  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM  
316112936@cuautitlan.unam.mx

## Resumen

Las micotoxinas constituyen un problema relevante en la producción avícola debido a que pueden contaminar los granos empleados en la alimentación de estas aves y su impacto negativo sobre el desempeño productivo, la salud hepática y la integridad intestinal. Entre ellas, la aflatoxina B<sub>1</sub> es una de las más frecuentes y hepatotóxicas, ampliamente distribuida en alimentos para animales y asociada con la disminución del crecimiento, alteraciones metabólicas y pérdidas económicas importantes. Ante la necesidad de estrategias que mejoren la producción de manera segura y eficaz, se ha propuesto el uso de probióticos acelulares (PbA), como las microvesículas (MVs), estructuras liberadas por microorganismos que pueden internalizarse en tejidos y transportar moléculas bioactivas con efectos protectores. Las MVs derivadas de *Lactobacillus acidophilus* (LA) han demostrado propiedades probióticas y podrían representar una alternativa para modular los efectos tóxicos de las micotoxinas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto protector de MVs de *Lactobacillus acidophilus*, aisladas del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus*, administradas por vía oral en pollos Cobb 500 desafiados con aflatoxina B<sub>1</sub>. Se utilizaron aves distribuidas en seis grupos experimentales con diferentes tratamientos: Control (CT), LA, MVs, AFB, LA+AFB y MVs+AFB. Durante el periodo experimental se registraron variables productivas, parámetros clínicos y alteraciones hepáticas. El grupo tratado únicamente con MVs presentó la mayor ganancia de peso (2777.71 g) y mejor conversión alimenticia, mientras que el grupo AFB mostro los valores productivos más bajos (2525 g) y mayor conversión. Asimismo, se observó menor severidad de lesiones hepáticas en los grupos tratados con LA y MVs frente a los grupos desafiados sin tratamiento. Estos resultados sugieren que las microvesículas de *Lactobacillus acidophilus* podrían atenuar los efectos adversos de la aflatoxina B<sub>1</sub>, favoreciendo el crecimiento, la integridad hepática y la respuesta fisiológica de los pollos de engorda, reducir la dependencia de antibióticos y favorecer el desarrollo sostenible de la industria avícola constituyendo una alternativa complementaria.

**Palabras Clave:** Micotoxicosis, salud intestinal, avicultura, desempeño productivo, probióticos, vesículas.

## Introducción

Uno de los sectores agrícolas con mayor crecimiento es el de la industria avícola, por ello es importante incrementar la eficiencia de los sistemas productivos no solo por la producción de carne, sino también por la competencia en el mercado, que ha llevado a la intensificación de los sistemas de producción, en el que se presentan diversos desafíos causados por factores como el estrés, los antibióticos y prácticas de crianza [1].

La producción de “carnes blancas” en México tiene una elevada demanda, por ello se mantiene en crecimiento. Algunos factores que mantienen exitosa esta producción es la tasa de crecimiento rápida y la eficiente conversión alimenticia. Otros factores claves son la prevención y control de enfermedades aviares, manejo, alimentación de calidad y uso de líneas mejoradas [2].

La producción de carne en canal de ave en México, tiene un aporte del 15.2% en la producción pecuaria y el consumo anual per cápita es de 35.3 kg. En los últimos diez años, fue la segunda con mayor aumento en el sector pecuario, registrando una tasa media anual de crecimiento de 3.1%. en la producción de aves comerciales [3].

Dentro de la industria avícola una de las principales preocupaciones es la exposición a las aflatoxinas, particularmente la de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ya que la intoxicación produce una disminución en la producción de carne o huevo, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, alteraciones en el tracto gastrointestinal y reproducción, inmunosupresión y mayor susceptibilidad a enfermedades [4].

Las aflatoxinas son producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que suelen contaminar granos como el cacahuate, algodón, maíz, blanco o amarillo, diversas nueces y el trigo. Entre las aflatoxinas que con mayor frecuencia se

encuentran en cereales son las variantes B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, siendo la aflatoxina B<sub>1</sub> la más tóxica de todas. Desde la perspectiva química, son compuestos policíclicos con un anillo de fluorano y exhiben fluorescencia verde o azul bajo luz ultravioleta de onda larga [5].

Para impedir que las micotoxinas ingresen a la cadena alimentaria, se establecieron límites de asesoramiento o de intervención. Por ello se realiza una vigilancia continua tanto en productos alimenticios como en piensos para animales. Un ejemplo de estas regulaciones es el límite de la unión europea para la aflatoxina B<sub>1</sub>, que establece un máximo de 2 ppb en alimentos destinados al consumo humano y de hasta 20 ppb en los destinados a alimentación animal [6].

#### *Aflatoxicosis en aves de corral.*

La aflatoxicosis es una afección tóxica con potencial cancerígeno, con alteraciones genéticas y potencial teratogénico que se desarrolla tras el consumo de alimentos contaminados con aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Tiene impacto en el desarrollo y la salud de las aves de corral. Esta condición es común en zonas tropicales y subtropicales donde el calor y la humedad favorecen la proliferación de hongos del género *Aspergillus*. En particular, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* pueden infectar cultivos y granos tanto en el campo como durante almacenamiento, generando AFB<sub>1</sub> como parte de su metabolismo secundario [7].

En pollos, provoca una reducción en la producción de huevo, una reducción en la tasa de crecimiento, un incremento en la mortalidad y en la susceptibilidad a enfermedades, apatía, hígado graso con mala pigmentación, pérdida de apetito y mala conversión alimenticia. La principal vía de transmisión es a través de consumo de alimentos y forrajes contaminados [8].

Otros signos incluyen anorexia, excreción de alimento no digerido, aumento en problemas en extremidades, escaso crecimiento en las alas, pigmentación deficiente en extremidades y pies, hematomas y cambios en el peso relativo de los órganos. Sobre los efectos en la inmunidad de las aves de producción también se pueden mencionar la involución de la bolsa de Fabricio, involución del timo, disminución de la producción de inmunoglobulinas, descenso de la inmunidad a nivel de mucosas, disminución de la producción del interferón y complemento, disminución de la fagocitosis de neutrófilos, monocitos, trombocitos y macrófagos, alteración de inmunidad humoral y celular, alteración de la mucosa gastrointestinal, cavidad oral y piel [5].

Los residuos de aflatoxina en productos avícolas representan una preocupación significativa para los consumidores finales, estas micotoxinas pueden ingresar a la cadena alimentaria humana mediante su acumulación en carne y huevo de las aves, lo que implica riesgos en la salud pública [9].

#### *Probióticos.*

Durante muchos años, para aumentar la eficiencia y rendimiento en la producción animal, se utilizaron antibióticos como promotores de crecimiento en aves de corral. Debido a sus efectos secundarios como la resistencia a los antibióticos, destrucción de bacterias beneficiosas del intestino y la disbiosis, es necesario para la industria pensar en alternativas [10].

Una opción que ayuda a mantener una microbiota intestinal beneficiosa es la alimentación con probióticos, mejora la resistencia del huésped a patógenos entéricos y da como resultado un a mejor función intestinal, conversión alimenticia, mayor ganancia de peso y rendimiento de las aves [11].

En los sistemas de producción animal intensiva, los probióticos se emplean actualmente como agentes promotores del crecimiento, estos aditivos zootécnicos están compuestos por microorganismos vivos que generan beneficios para el hospedero, lo que se traduce en una mejora en su desempeño productivo. Los microorganismos más utilizados en la formulación de estos productos son principalmente cultivos puros de bacterias ácido láctica y levaduras, así como cultivos mixtos. La mayoría de las cepas empleadas como probióticos se aíslan del contenido gastrointestinal y de las heces de diversas especies animales [12].

Los probióticos se definen como cultivos puros o mezclas de microorganismos vivos, ya sean bacterias o levaduras, que pueden desempeñar diversas funciones beneficiosas. Entre estas se incluye la inhibición o reducción de la colonización por patógenos, la disminución o eliminación de factores de virulencia, la estimulación del sistema inmunológico mediante la producción y liberación de compuestos inflamatorios, así como la generación de sustancias con propiedades antimicrobianas y antivirales en el tracto intestinal [13].

El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas puede provocar la acumulación de estos compuestos tóxicos en los tejidos animales, representando un riesgo para la salud humana. Se ha propuesto el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) en la dieta como una estrategia para reducir o neutralizar estas toxinas, aunque hay poca evidencia disponible sobre su efectividad específica en pollos de engorde [14].

El grupo BAL pertenece al phylum Firmicutes, uno de los grupos más diversos en la naturaleza teniendo aproximadamente de 20 géneros, Entre los más representativos están: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulun*, *Globicatella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Sin embargo, los generos más usados para la preservación alimentaria y prevención de enfermedades son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leucoccus*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium* [15].

El empleo de bacterias ácido lácticas en la reducción de micotoxinas no se limita únicamente a su capacidad para unir estos contaminantes; en algunos casos también se ha reportado que pueden inhibir el crecimiento de los hongos responsables de su producción. Esta capacidad para interactuar con los contaminantes alimentarios sugiere que pueden usarse para reducir la cantidad que llega al torrente sanguíneo, es decir, para disminuir su biodisponibilidad [16].

Además de sus efectos sobre la biodisponibilidad, también ejercen una defensa física frente a patógenos intestinales. Este mecanismo, conocido como impedimento estérico, consiste en que las bacterias benéficas se adhieren a las células del epitelio intestinal, bloqueando los sitios de unión que los microorganismos patógenos necesitan para adherirse y colonizar al hospedero [15].

#### *Microvesículas de membrana externa (MVs).*

Las microvesículas de membrana (MV) bacteriana se reconocen actualmente como uno de los mecanismos más relevantes de los sistemas de secreción y de la comunicación intercelular. Estas estructuras esféricas de tamaño nanométrico, corresponden a vesículas derivadas de la membrana externa en bacterias Gram negativas y de la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivas, las cuales son liberadas de manera activa a lo largo de todas las fases del crecimiento bacteriano al medio extracelular [17].

Se ha descrito que las funciones de las MVs dependen de la célula de origen, en el caso de MVs provenientes de eucariotas han sido ampliamente estudiadas por su relevancia funcional de sus progenitoras. Por ejemplo, células del sistema inmune son capaces de secretar MVs, como lo son polimorfonucleares y células NK secretan MVs que pueden contener interleucinas, granzinas y perforinas, además de inducir la activación de otras células de defensa a través de receptores específicos. En el caso de MVs de bacterias cumplen funciones biológicas entre ellas la liberación de toxinas, modulación del sistema inmune, la transferencia de señales entre bacterias y formación de biofilms [18].

El estudio de las vesículas extracelulares en bacterias Gram positivas ha sido limitado, en parte porque la presencia de una pared celular gruesa hacía pensar que su liberación era poco probable. No fue sino hasta 2009 cuando se obtuvo evidencia directa de su existencia, gracias a observaciones con microscopia electrónica de transmisión y análisis proteómicos en *Staphylococcus aureus*. A partir de entonces, se ha confirmado que diversas bacterias Gram positivas pueden producir MVs, entre ellas *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Clostridium perfringens*. Mas recientemente, también se ha identificado la producción de MVs en distintas especies de *Lactobacillus* [19].

Se ha descrito que las microvesículas de Gram negativas son liberadas por la célula a través de un proceso de evaginación de la membrana. Este mecanismo involucra una reorganización tanto del citoesqueleto como de los fosfolípidos, los cuales normalmente se encuentran en la parte interna de la membrana, quedando en la parte externa. Posteriormente, la

membrana sufre una curvatura que culmina con la liberación de la microvesículas [15]. En estas bacterias negativas, las microvesículas se generan mediante el plegamiento de la membrana externa, incorporando componentes del periplasma. En las Gram positivas, debido a la presencia de una pared celular gruesa, aun se estudia como ocurre exactamente este proceso; se ha planteado que enzimas capaces de degradar parcialmente el peptidoglicano podrían facilitar la liberación de las vesículas. Estas estructuras presentan tamaños que varían entre 50 y 250 nm, dependiendo de la cepa [18].

Los efectos inmunomoduladores de las microvesículas (MVs) se encuentran estrechamente vinculados a su capacidad de interactuar tanto con células inmunitarias como no inmunitarias mediante receptores de reconocimiento de patrones, entre ellos, los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo NOD (NLR), así como diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Diversos estudios han demostrado que las MVs inducen la producción de citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, en el caso de las MVs originadas de especies del género *Lactobacillus*, se ha reportado que *L. casei* induce la producción de IL-6 en células epiteliales intestinales humanas y *L. reuteri* DSM-17938 estimula la motilidad intestinal en modelos murinos [17].

## Materiales y Métodos

### Obtención de microvesículas.

Las microvesículas utilizadas se obtuvieron a partir de cepas de *Lactobacillus acidophilus* aisladas del íleon de *Rattus norvegicus* identificadas en trabajos previos por PCR del gen 16S y por el sistema API50CHL. La obtención, purificación y cuantificación fue realizada en colaboración con el Laboratorio 9 de la UIM de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, donde la cepa se cultivó en caldo MRS (37°C, 24h, CO<sub>2</sub>) con ampicilina y el sobrenadante libre de biomasa se obtuvo mediante centrifugación y filtración (0.45 y 0.22µm). Posteriormente las MVs fueron concentradas por ultracentrifugación, resuspendidas en tampón HEPES (10mM, pH 7) con inhibidores de proteasas y almacenadas a -70°C. La concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford para estandarizar la dosis. Finalmente, las MVs fueron adsorbidas a quitosán para mejorar su estabilidad y liberación intestinal. Las formulaciones finales fueron suministradas para su uso *in vivo* en pollos de engorda.

### Obtención del hongo y preparación de AFB1

El hongo se obtuvo a partir de una cepa identificada de *Aspergillus flavus* (1325), cultivada en maíz esterilizado para simular su entorno natural y favorecer la producción de micotoxinas. Tras ajustar la humedad del grano y distribuirlo en viales estériles, se inoculó con una suspensión de esporas previamente cuantificadas mediante cámara de Neubauer. Los viales se incubaron a 30°C durante 30 días y posteriormente se esterilizaron, secaron y molieron para obtener el material contaminado con aflatoxinas. La concentración de AFB1 se determinó mediante el ensayo de AflaTest (columnas de inmunoafinidad y fluorimetría). Las muestras se extrajeron con metanol, se filtraron y se aplicaron a la columna, tras los lavados correspondientes la micotoxina se extrajo y cuantificó por fluorimetría, permitiendo estandarizar las concentraciones empleadas en los ensayos.

### Diseño experimental

Se realizó un estudio controlado para evaluar el efecto *in vivo* de microvesículas (MVs) derivadas de *Lactobacillus acidophilus* sobre el desempeño productivo de pollos Cobb 500 expuestos a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB1). El experimento se llevó a cabo en la caseta avícola de la FESC-UNAM Campo Cuatro, bajo condiciones controladas de bioseguridad, ventilación, temperatura y manejo, con alojamiento en corrales con cama de viruta y acceso libre a agua y alimento. Las aves provenientes de una empresa comercial, pasaron una semana de adaptación y fueron vacunadas contra Newcastle antes de iniciar los tratamientos. Posteriormente, se distribuyeron en seis grupos experimentales: Control (CT), *L. acidophilus* (BAL), microvesículas (MVs), aflatoxina (AFB1), LA+AFB1 y MVs+AFB1.

Identificación	Tratamiento
CT	Alimento sin tratamiento /control (-)
BAL	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 500 µl
MVs	Microvesículas 500 µl/
AFB	Aflatoxina B <sub>1</sub> 500 ng/g de alimento
BAL+AFB	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + Aflatoxina B <sub>1</sub>
MVs + AFB	Microvesículas + Aflatoxina B <sub>1</sub>

El ensayo tuvo una duración de siete semanas. Los tratamientos con LA y MVs se administraron por vía oral en el agua de bebida dos veces por semana, restringiendo previamente el acceso al agua por 30 minutos. La AFB<sub>1</sub> se incorporó diariamente al alimento en la concentración establecida, asegurando la homogeneidad de la mezcla.

#### *Leucograma*

Se obtuvieron muestras sanguíneas de vena braquial, metatarsiana o por vía intracardiaca en tubos con anticoagulante. Se elaboraron y tiñeron frotis para el conteo diferencial y la evaluación morfológica de leucocitos (heterófilos, linfocitos, eosinófilos y monocitos).

#### *Bioquímica sanguínea*

A partir del suero sanguíneo se realizaron pruebas para evaluar función hepática: proteínas totales (PT), glucosa, albumina, ALT, AST y GGT.

#### *Necropsia*

Las aves se sacrificaron conforme a la NOM-033-SAG/ZOO-2014. En la necropsia se recolectaron bazo, intestino delgado, tonsilas, riñón y bolsa cloacal, que se fijaron en formol para su estudio histológico.

#### *ELISA*

Los sueros se analizaron mediante ELISA para cuantificar anticuerpos específicos contra el virus de Newcastle.

#### *Histopatología*

Las muestras se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se procesaron por inclusión en parafina y se tiñeron con HE, las lesiones se clasificaron según su severidad.

#### *Análisis estadístico*

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de medias utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) y para los datos no paramétricos, se empleó el análisis de Kruskal-Wallis. En ambas, se aplicó un modelo de ANOVA de una vía.

### **Resultados**

#### *Parámetros productivos*

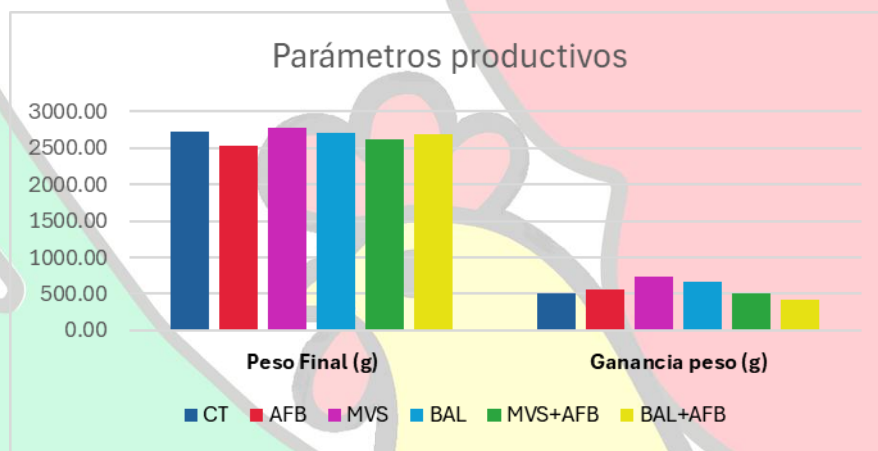
Los parámetros productivos mostraron diferencias significativas entre los grupos. El grupo tratado con microvesículas obtuvo el mayor peso final (2777.71 g) con el índice de conversión alimenticia (ICA) más bajo (1.13), lo cual indica un mejor aprovechamiento del alimento y este hallazgo sugiere un efecto beneficioso acumulativo, posiblemente relacionado con la modulación inmunológica progresiva, la mejora de nutrientes y la integridad de la mucosa intestinal. El grupo de BAL también mostró un buen desempeño, con una ganancia de peso de 658 g y un ICA de 1.17, lo cual sugiere un efecto positivo a pesar de no alcanzar el peso final de MVs. Lo que demuestra que las microvesículas y las células completas mejoraron el desempeño productivo cuando se administraron solas.

En contraste el grupo tratado solo con aflatoxina B1 presento un menor peso final (2525 g), aunque con aparentemente ICA favorable (1.26). Los grupos que combinaron aflatoxina con tratamientos, BAL+AFB y MVS+AFB mostraron una recuperación parcial, sin alcanzar los valores del grupo control ni de los tratamientos sin toxina, aunque con menor ganancia de peso y peores valores de ICA. véase tabla 1.

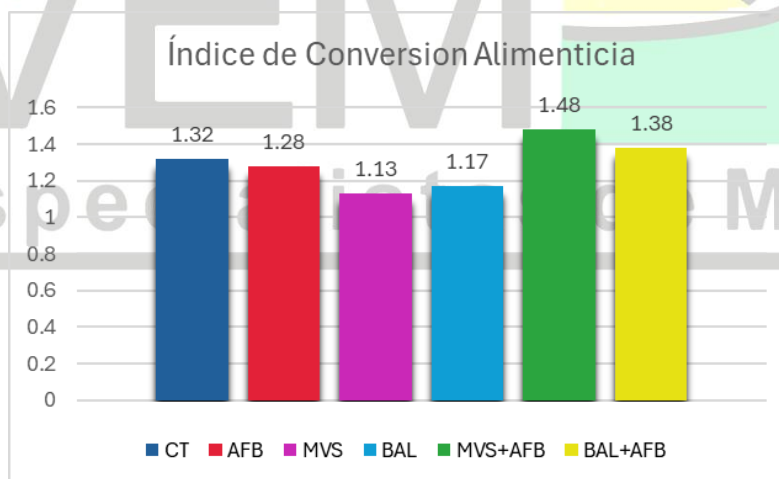
Tabla 1. Registro del peso final, ganancia de peso e índice de conversión alimenticia de las aves.

Registros	CT	AFB	MVS	BAL	MVS+AFB	BAL+AFB
Peso Final (g)	2721.43	2525	2777.71	2710	2622.14	2683.33
Ganancia peso (g)	514.59	555.88	735.41	658.07	509.64	417.61
ICA	1.32	1.28	1.13	1.17	1.48	1.38

Grafica 1. Registro del peso final y ganancia de peso de las aves.



Grafica 2. Índice de Conversión alimenticia.



### Pesos finales por semana

En la semana 0, todos los grupos iniciaron con pesos similares, sin diferencias estadísticas significativas. A partir de la semana cuatro, el grupo con aflatoxina (AFB) mostro una marcada reducción en la ganancia de peso, alcanzando en la semana seis el valor más bajo (2525 g), por debajo del control. Los grupos LA+AFB y MVs+AFB presentaron pesos intermedios (2683.93 g y 2622.14 g), evidenciando una atenuación parcial del efecto negativo de la aflatoxina. El grupo tratado solo con microvesículas mostro el mejor desempeño, alcanzando 2777.71 g en la semana seis, incluso por encima del control (2721.43 g) (véase tabla 2).

En conjunto, los resultados indican que las MVs reducen el impacto de la aflatoxina y administradas solas, pueden mejorar el crecimiento de los pollos de engorda.

Tabla 2. Registro del peso final, ganancia de peso e índice de conversión alimenticia de las aves.

Semana	CT	AFB	MVS	BAL	MVs+AFB	BAL+AFB
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
0	104.87 ± 2.19 <sup>a</sup>	98.67 ± 2.53 <sup>a</sup>	90.87 ± 2.19 <sup>b</sup>	105.12 ± 2.19 <sup>a</sup>	101.33 ± 3.59 <sup>a</sup>	106.67 ± 3.58 <sup>a</sup>
1	207.76 ± 26.3 <sup>ab</sup>	193.79 ± 30.11 <sup>ab</sup>	186.28 ± 25.97 <sup>b</sup>	233.33 ± 41.87 <sup>ab</sup>	216.67 ± 46.81 <sup>ab</sup>	233.33 ± 41.87 <sup>ab</sup>
2	411.31 ± 18.35 <sup>a</sup>	397.67 ± 20.89 <sup>a</sup>	370.34 ± 17.61 <sup>a</sup>	404.19 ± 19.5 <sup>a</sup>	407.42 ± 31.34 <sup>a</sup>	434.09 ± 32.73 <sup>a</sup>
3	761.82 ± 38.22 <sup>a</sup>	723.04 ± 37.38 <sup>ab</sup>	638.2 ± 35.85 <sup>b</sup>	714.6 ± 35.85 <sup>ab</sup>	78 ± 56.68 <sup>a</sup>	816.5 ± 56.68 <sup>a</sup>
4	1449.32 ± 65.51 <sup>a</sup>	1246.67 ± 67.05 <sup>bc</sup>	1172.27 ± 65.51 <sup>c</sup>	1281.82 ± 65.51 <sup>abc</sup>	1364.5 ± 97.16 <sup>abc</sup>	1437 ± 97.16 <sup>bc</sup>
5	2159.5 ± 384.803 <sup>a</sup>	2782.89 ± 394.8 <sup>a</sup>	1878.06 ± 405.62 <sup>a</sup>	1923.33 ± 35.53 <sup>a</sup>	1970 ± 54.19 <sup>a</sup>	2113 ± 544.19 <sup>a</sup>
6	2721.43 ± 87.72 <sup>ab</sup>	2525 ± 73.39 <sup>b</sup>	2777.71 ± 62.03 <sup>a</sup>	2710.29 ± 56.29 <sup>ab</sup>	2622.14 ± 87.72 <sup>ab</sup>	2683.93 ± 134 <sup>ab</sup>

### Histopatología

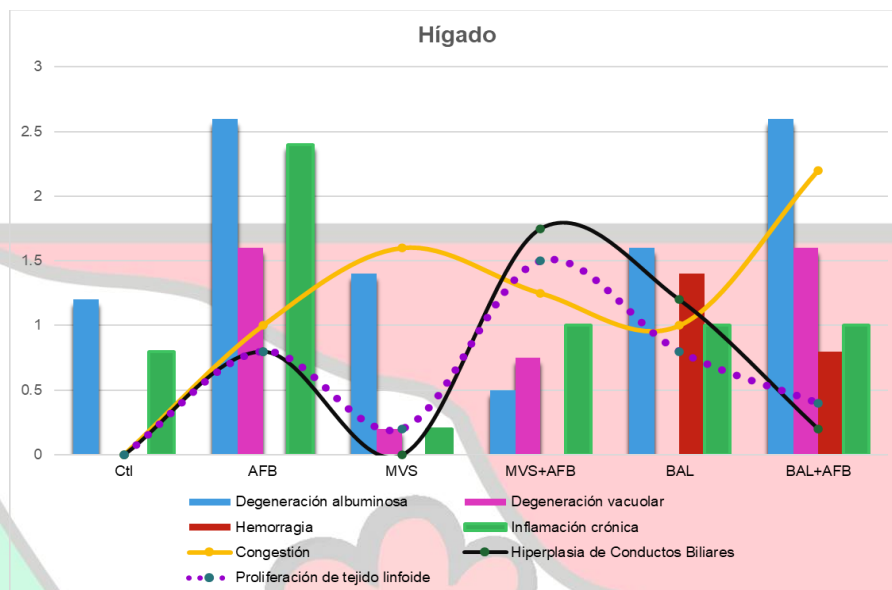
Se valoraron lesiones histopatológicas en hígado, bazo, riñón, intestino, tonsilas cecales y bolsa cloacal, clasificándolas según su distribución y severidad en una escala de 0-3 (0: sin lesión, 1:leve, 2: moderada, 3: grave). Los parámetros analizados incluyeron degeneración albuminosa y vacuolar, congestión, hemorragia, inflamación aguda y crónica, fibrosis, hiperplasia de conductos biliares, presencia de pigmentos y proliferación linfoide. Los resultados se presentan en tablas y figuras con los promedios por grupo.

### Hígado

Las lesiones predominantes fueron de tipo inflamatorio crónico linfocitario, siendo el grupo AFB el más afectado: mostro los mayores valores de degeneración albuminosa y vacuolar, mayor inflamación crónica y evidencia de fibrosis. En contraste, el grupo MVs presento puntajes bajos de inflamación y vacuolización, congestión moderada y prácticamente ausencia de fibrosis.

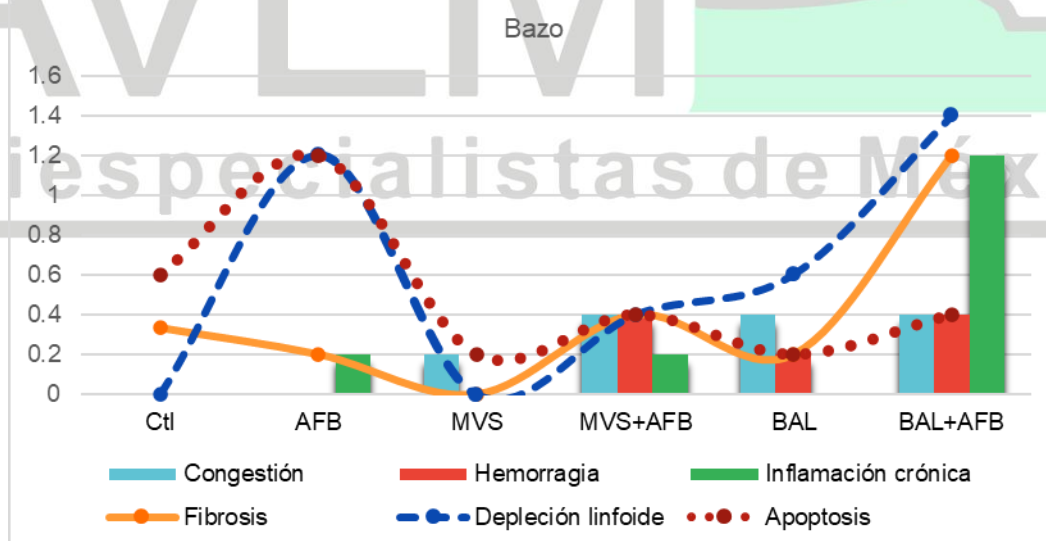
En MVs+AFB se observó una atenuación clara de las lesiones inducida por aflatoxina, con reducción de la degeneración y menor inflamación respecto a AFB solo. El grupo LA mostro baja vacuolización, pero hemorragia e inflamación moderadas, mientras que LA+AFB mantuvo degeneración elevada y mayor congestión que MVs+AFB. En conjunto estos hallazgos indican que MVs fue más consistente que LA para prevenir la degeneración vacuolar y limitar la inflamación, fibrosis y que MVs+AFB brindo mejor protección que LA+AFB frente al daño hepático asociado a aflatoxina.

Grafica 3. Perfil de lesiones histopatológicas en hígado por tratamiento. Se muestran puntajes promedio (0-3) para cada lesión evaluada



**Bazo**  
En el análisis histopatológico de bazo (Imagen 4), predominaron lesiones asociadas con depleción linfóide y apoptosis. El grupo AFB fue el más afectado, con valores moderados para ambas variables, mientras que los grupos CT, MVs y LA mostraron los niveles más bajos de congestión y hemorragia. El grupo MVs+AFB evidenció una mejor recuperación frente al daño inducido por aflatoxina, con puntajes bajos de congestión, hemorragia e inflamación crónica. En los grupos LA Y LA+AFB se observaron fibrosis e inflamación crónica, aunque en menor grado que en AFB. En conjunto, los hallazgos sugieren que las MVs confieren un efecto protector parcial frente al daño esplénico por aflatoxina, contribuyendo a preservar la arquitectura del bazo en mayor medida que LA.

Grafica 4. Perfil de lesiones histopatológicas en bazo por tratamiento. Se muestran puntajes promedio (0-3) para cada lesión evaluada

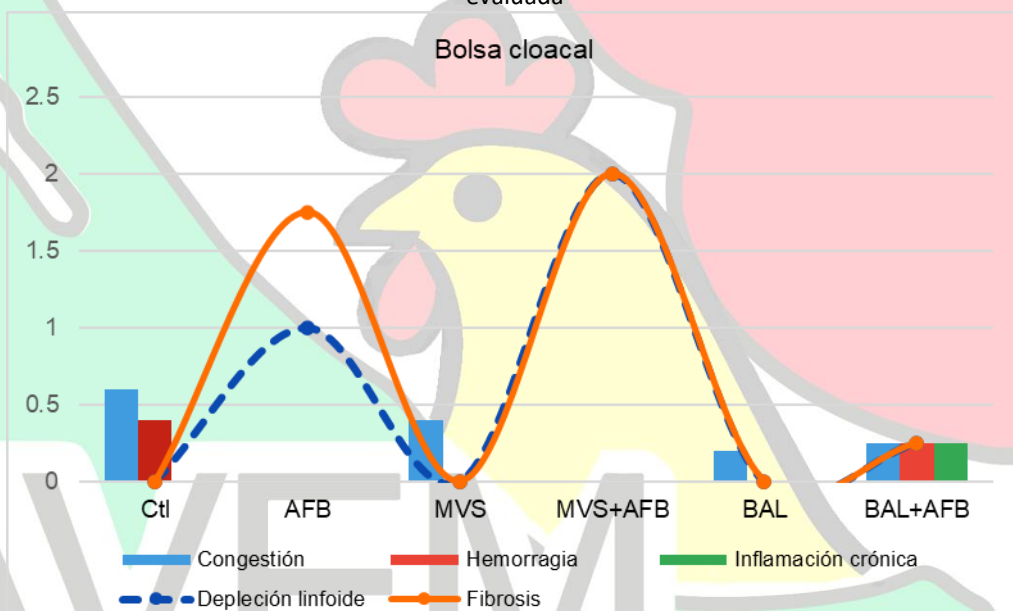


### Bolsa cloacal

En la bolsa cloacal se observaron principalmente lesiones de fibrosis y depleción linfóide (véase grafica 5). El grupo AFB presentó fibrosis moderada y una leve depleción linfóide en comparación con los demás tratamientos. Los grupos CT, MVs y BAL mostraron escasas lesiones, con valores cercanos a cero en la mayoría de los parámetros. Por su parte los grupos MVs+AFB y BAL+AFB evidenciaron un patrón intermedio, con presencia de fibrosis moderada, aunque con menor depleción linfóide que el grupo AFB.

Estos resultados sugieren que la administración de aflatoxina genera alteraciones estructurales en la bolsa cloacal, particularmente fibrosis, mientras que la suplementación con MVs o BAL, aun en presencia de AFB, podría atenuar parcialmente este efecto.

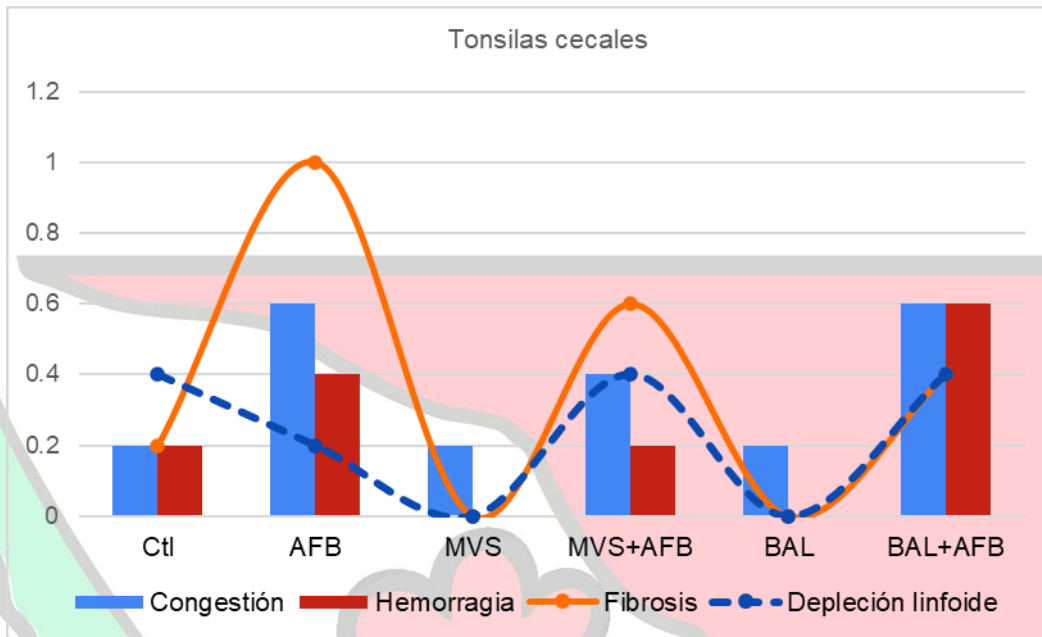
Grafica 5. Perfil de lesiones histopatológicas en bazo por tratamiento. Se muestran puntajes promedio (0-3) para cada lesión evaluada



### Tonsilas cecales

En las tonsilas cecales se observaron principalmente lesiones de congestión, hemorragia, fibrosis y depleción linfóide (véase grafica 6 ). Los grupos AFB y BAL+AFB presentaron los valores más altos de congestión (0.6), en cuanto a hemorragia, el grupo BAL+AFB presentó el valor más elevado (0.6), respecto a fibrosis el grupo más afectado (1.) fue AFB. En conjunto estos hallazgos indican que la administración de aflatoxina induce principalmente fibrosis y congestión en las Tonsilas cecales, mientras que la combinación con BAL potencia la aparición de hemorragias. Por otro lado, la suplementación con MVs parece atenuar parcialmente estas lesiones.

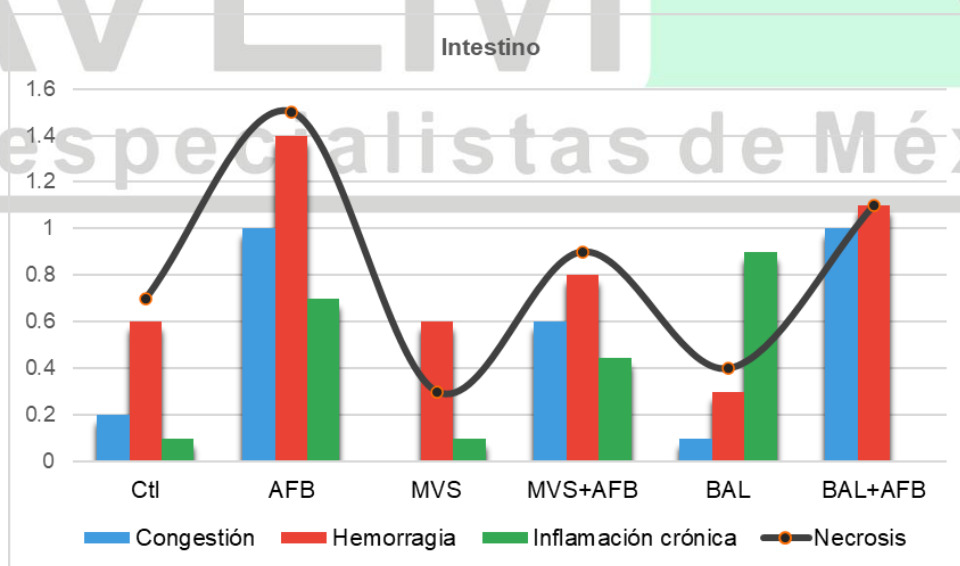
Grafica 6. Perfil de lesiones histopatológicas en tonsilas cecales por tratamiento. Se muestran puntajes promedio (0-3) para cada lesión evaluada.



#### Intestino

El grupo AFB presentó las lesiones más severas, con incrementos en congestión (1), hemorragia (1.4) y necrosis (1.5), en comparación con los demás grupos (véase grafica 7). En contraste el grupo MVs+AFB mostró valores menores de congestión (0.6) y hemorragia (0.8) respecto al grupo LA+AFB (1 y 1.1 respectivamente), además de una reducción de necrosis (0.9) frente a 1.1). El grupo MVs evidenció valores bajos de congestión (0) y necrosis (0.3), lo que sugiere un efecto protector más marcado que el observado en el grupo LA, el cual presentó congestión de 0.1 y necrosis de 0.9. En cuanto a inflamación crónica, se registró un aumento leve en el grupo MVs+AFB (0.44) en relación con los demás grupos. En conjunto, estos resultados indican que las MVs confieren un mayor efecto protector frente a las lesiones intestinales inducidas por AFB que LA, tanto cuando se administraron de forma individual como combinada.

Grafica 7. Perfil de lesiones histopatológicas en intestino por tratamiento. Se muestran puntajes promedio (0-3) para cada lesión evaluada.



## Bioquímica sanguínea

Se evaluaron proteínas totales (PT), albumina (ALB), globulinas (Glob), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyl transferasa (GGT) y glucosa (GLU) en todos los grupos experimentales. Los resultados se expresan como *Media ± EE* y las comparaciones se basan en diferencias estadísticas (valor de P <0.05).

### Proteínas totales.

El grupo AFB presentó los valores más elevados de PT, seguido de MVs+ AFB, mientras que LA y CT mostraron las concentraciones más bajas. El incremento observado en AFB sugiere un cuadro de hiperproteinemia asociado a respuesta inflamatoria. En contraste, los grupos MVs y BAL mantuvieron valores similares al grupo CT.

### Albumina

El grupo AFB registró la menor concentración de albumina, lo que refleja un deterioro funcional hepático asociado a la exposición a aflatoxina. Los grupos MVs y CT mostraron valores más altos, mientras que LA y MVs+AFB presentaron valores intermedios, indicando que los probióticos atenuaron el efecto tóxico, aunque no lo eliminaron totalmente. En este parámetro, MVs evidenció una mejor protección hepática de LA, al conservar concentraciones más cercanas al CT.

### Globulinas

Las concentraciones más altas de globulinas se observaron en MVs+AFB, mientras que los valores más bajos correspondieron al grupo MVs. El incremento en AFB y MVs+AFB se relaciona con activación del sistema inmune. El grupo MVs presentó valores reducidos, lo que sugiere que, aunque la aflatoxina induce aumento de globulinas, la administración de MVs favorece una respuesta inmune más controlada, posiblemente vinculada a su efecto probiótico.

### ALT

La ALT mostró variaciones mínimas entre los grupos, con los valores más altos en CT, LA y LA+AFB y el más bajo en AFB.

### AST

El grupo AFB presentó un incremento significativo respecto al resto. Aunque LA también mostró elevación, esta fue menor. En contraste MVs y MVs+AFB mantuvieron niveles cercanos al CT, evidenciando un efecto hepatoprotector asociado a MVs frente a la aflatoxina.

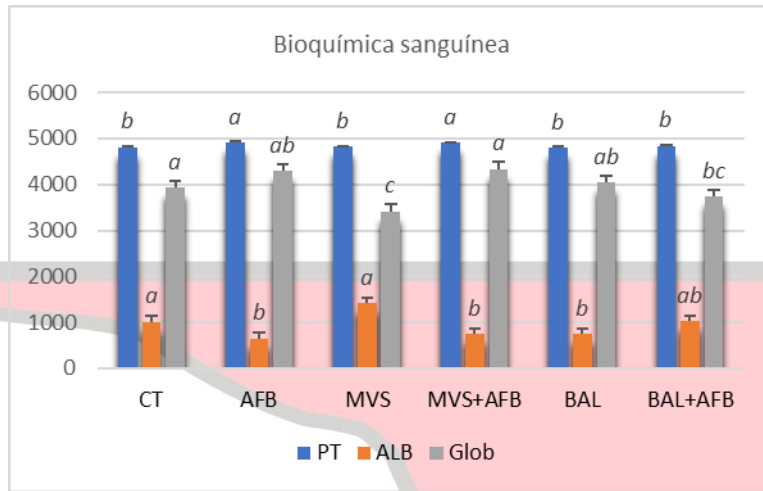
### GGT

El valor más alto se registró en el grupo AFB, mientras que los demás grupos se mantuvieron bajos y comparables al CT, lo que sugiere que tanto LA como MVs contribuyeron a prevenir el daño hepático inducido por AFB.

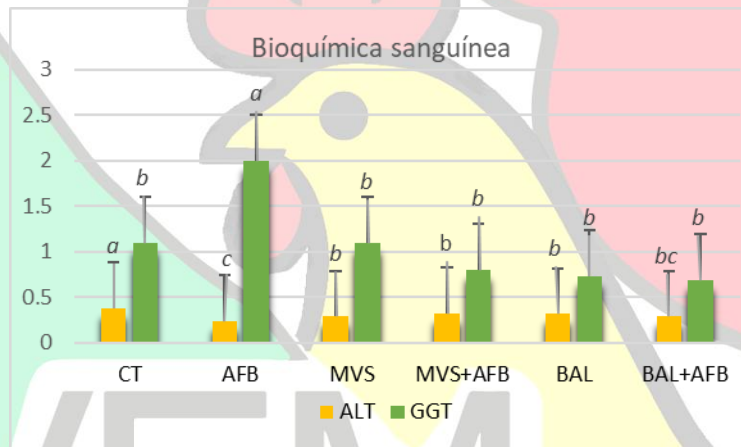
Tabla 3. Parámetros bioquímicos séricos en pollos de los diferentes grupos experimentales. Los datos se expresan como Media y error estándar (EE). Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

TX	CT	BAL	MVS	AFB	BAL+AFB	MVS+AFB	Valor P
	<i>Media ± EE</i>	<i>Media ± EE</i>	<i>Media ± EE</i>	<i>Media ± EE</i>	<i>Media ± EE</i>	<i>Media ± EE</i>	
<b>PT</b>	4810 ± 24.84 <sup>b</sup>	4800 ± 17.6 <sup>b</sup>	4820 ± 19.59 <sup>b</sup>	4912.5 ± 17.02 <sup>c</sup>	4842.5 ± 8.54 <sup>b</sup>	4905 ± 12.59 <sup>c</sup>	<b>0</b>
<b>ALB</b>	1014 ± 199.84 <sup>b</sup>	753.6 ± 78.32 <sup>b</sup>	1429 ± 520.05 <sup>a</sup>	654.2 ± 79.24 <sup>b</sup>	1032 ± 94.72 <sup>ab</sup>	755.33 ± 169.12 <sup>b</sup>	<b>0</b>
<b>GLOB</b>	3796 ± 158.46 <sup>abc</sup>	4046.4 ± 65.39 <sup>ab</sup>	3391 ± 511.79 <sup>a</sup>	4258.3 ± 70.32 <sup>ab</sup>	3810.5 ± 82.28 <sup>bc</sup>	4149.67 ± 211.2 <sup>a</sup>	<b>0</b>
<b>ALT</b>	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.005 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>b</sup>	<b>0</b>
<b>AST</b>	11.41 ± 0.86 <sup>c</sup>	28.87 ± 6.80 <sup>b</sup>	10.99 ± 2.32 <sup>c</sup>	40.65 ± 0.85 <sup>a</sup>	15.50 ± 1.98 <sup>c</sup>	14.69 ± 2.61 <sup>c</sup>	<b>0</b>
<b>GGT</b>	1.07 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.19 <sup>b</sup>	<b>0</b>
<b>GLU</b>	118.16 ± 1.19 <sup>ab</sup>	118.77 ± 2.48 <sup>ab</sup>	114.63 ± 5.45 <sup>b</sup>	123.38 ± 1.09 <sup>a</sup>	118.73 ± 3.06 <sup>ab</sup>	118.95 ± 0.19 <sup>ab</sup>	<b>0.4</b>

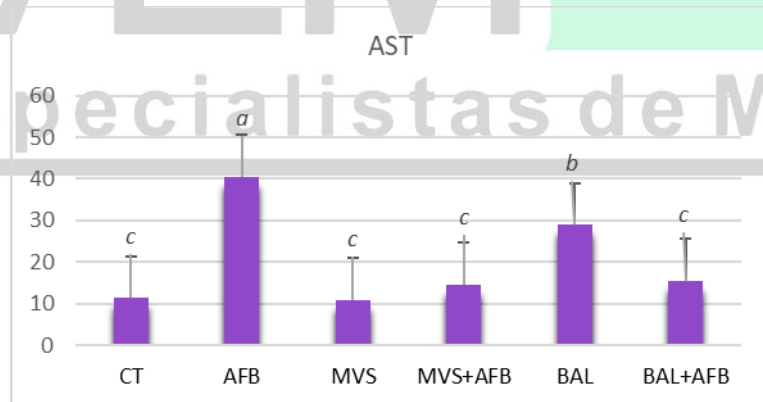
Grafica 8. Niveles séricos de proteínas totales (PT), albumina (ALB) y globulinas (GLOB) en pollos de los diferentes grupos experimentales.



Grafica 9. Niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y gamma-glutamil transferasa (GGT) en pollos de los diferentes grupos experimentales.



Grafica 10. Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) en pollos de los diferentes grupos experimentales.



## Leucograma

Para el leucograma se evaluaron los principales tipos celulares circulantes en sangre: heterófilos (HQ), linfocitos (LQ), monocitos (MQ), eosinófilos (Q) y basófilos (BQ) a los diferentes grupos experimentales. Este recuento constituye un indicador fundamental del estado inmunitario e inflamatorio de en aves, pues refleja componentes tanto de la inmunidad innata como adaptativa.

En el caso de los heterófilos, el grupo MVs presento mayor proporción, seguido de CT y MVs+AFB, mientras que los grupos AFB y LA+AFB registraron los valores más bajos. Estos hallazgos indican que la exposición a aflatoxina se asoció con una reducción significativa de heterófilos, sugiriendo un posible compromiso de la respuesta inflamatoria innata. Respecto a los monocitos, el grupo LA mostro el incremento más marcado, en contraste con el grupo AFB, que presento el valor más bajo. Los grupos LA+AFB y MVs+AFB exhibieron niveles intermedios, lo que sugiere que ambos tratamientos atenuaron parcialmente el efecto depresor de la aflatoxina. Para los basófilos, el grupo CT presento los valores más altos, seguido de MVs+AFB y MVs, mientras que AFB y LA+AFB mostraron los recuentos más bajos. Este patrón sugiere que la aflatoxina también afecta poblaciones celulares relacionadas con procesos inflamatorios y alérgicos. Finalmente en eosinófilos no se observaron diferencias relevantes entre los grupos, indicando que bajo condiciones experimentales este tipo celular no fue significativamente modulado por los tratamientos.

Tabla 5. Valores promedio del leucograma en pollos de engorda pertenecientes a los diferentes grupos experimentales

TX	CT	BAL	MVS	AFB	BAL+AFB	MVS+AFB	VALOR P
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	
HQ	2.33 ± 1.2 <sup>ab</sup>	3.33 ± 0.89 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.74 <sup>a</sup>	0 ± 0	1 ± 0.41 <sup>ac</sup>	2.25 ± 0.63 <sup>ab</sup>	0
MQ	4.8 ± 2.09 <sup>b</sup>	11 ± 1.53 <sup>c</sup>	4.4 ± 1.50 <sup>b</sup>	1.8 ± 1.11 <sup>b</sup>	4 ± 0.95 <sup>b</sup>	4.5 ± 0.29 <sup>b</sup>	0
LQ	92.25 ± 2.43 <sup>b</sup>	80.25 ± 2.29 <sup>b</sup>	88.5 ± 1.71 <sup>b</sup>	13.8 ± 9.33 <sup>a</sup>	93.6 ± 1.17 <sup>b</sup>	85 ± 3.60 <sup>b</sup>	0
BQ	3 ± 0.33 <sup>ac</sup>	0.67 ± 0.33 <sup>abc</sup>	1 ± 0.58 <sup>ab</sup>	0 ± 0	0 ± 0	1.5 ± 0.29 <sup>a</sup>	0
EQ	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.2 ± 0	0 ± 0	0.6

## Peso de órganos

Se determino el peso relativo de hígado, bazo, proventrículo, molleja, intestino y bolsa cloacal con el propósito de evaluar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo orgánico de las aves. Cada órgano se pesó individualmente y su peso relativo se calculó en función al peso corporal final mediante la formula:

$$\frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso corporal}} \times 100 = \text{Peso relativo del órgano (mg/100g)}$$

Este procedimiento nos permitió estandarizar las comparaciones entre grupos, minimizando la variabilidad individual. Cambios en el peso relativo pueden reflejar efectos tóxicos, adaptativos o inmunológicos y además tener implicaciones productivas, ya que incrementos orgánicos excesivos pueden comprometer la ganancia de peso designada a canal. En hígado, el grupo AFB presento el mayor peso relativo, mientras que CT y LA mostraron los valores mas bajos, MVs, LA+AFB y MVs+AFB se situaron en rangos intermedios, sin diferencias significativas entre sí. El incremento observado en AFB sugiere hepatomegalia asociada a la exposición a la aflatoxina. En el bazo, el mayor peso relativo correspondió a LA, seguido de MVs y CT, mientras que los valores más bajos se registraron en los grupos expuestos a aflatoxinas (AFB, LA+AFB y MVs+AFB), lo que indica un posible efecto inmunosupresor reflejado en la reducción esplénica. Respecto a la molleja, los valores más altos se observaron en MVs y LA+AFB, en tanto que AFB y MVs+AFB mostraron los pesos más bajos. Estos resultados sugieren que la aflatoxina afecto negativamente el desarrollo de este órgano, mientras que MVs pudo favorecer un mejor procesamiento del alimento.

Finalmente en intestino se detectaron diferencias significativas entre tratamientos: BAL presento el mayor peso relativo, seguido de MVs, mientras que AFB y MVs+AFB registraron los valores más bajos. CT y LA+AFB permanecieron en niveles

intermedios. En conjunto, los datos indican que la exposición a aflatoxina redujo el desarrollo intestinal, mientras que los probióticos (LA y MVs) favorecieron su crecimiento, posiblemente por una mejora en el aprovechamiento de nutrientes y estimulación de la mucosa.

Tabla 6. Peso relativo de órganos (hígado, bazo, proventrículo, molleja, intestino y bolsa cloacal) en pollos de engorda pertenecientes a los diferentes grupos experimentales.

TX	CT		BAL		MVS		AFB		BAL+AFB		MVS+AFB		VALOR P
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE		
Hig	2034.64 ± 114.27 <sup>b</sup>	2306.74 ± 104.70 <sup>a</sup>	2382.78 ± 114.93 <sup>a</sup>	2429.64 ± 23.82 <sup>a</sup>	2149.19 ± 39.50 <sup>ab</sup>	2321.24 ± 43.47 <sup>ab</sup>	0						0
Bazo	200.91 ± 31.53 <sup>a</sup>	137.92 ± 19.50 <sup>b</sup>	123.60 ± 14.61 <sup>b</sup>	109.47 ± 10.51 <sup>b</sup>	115.46 ± 24.87 <sup>b</sup>	105.96 ± 12.1 <sup>b</sup>	0						0
Mol	2189.09 ± 115.42 <sup>a</sup>	1789.14 ± 98.39 <sup>a</sup>	2563.29 ± 2108.55 <sup>a</sup>	1603.82 ± 118.57 <sup>b</sup>	2218.43 ± 202.53 <sup>a</sup>	1780.71 ± 147.22 <sup>b</sup>	0						0
Int	4428.39 ± 270.83 <sup>a</sup>	5265.1 ± 267.19 <sup>a</sup>	5111.81 ± 277.73 <sup>a</sup>	3614.64 ± 294.71 <sup>b</sup>	3871.27 ± 338.86 <sup>a</sup>	3491.8 ± 127.16 <sup>a</sup>	0						0
BC	144.18 ± 229.20 <sup>a</sup>	188.34 ± 211.84 <sup>a</sup>	209.14 ± 22.11 <sup>b</sup>	305.52 ± 231.89 <sup>a</sup>	163.164 ± 26.67 <sup>a</sup>	168.90 ± 26.92 <sup>b</sup>	0						0
ProV	352.93 ± 32.04 <sup>ab</sup>	324 ± 18.35 <sup>b</sup>	432.01 ± 69.30 <sup>ab</sup>	470.82 ± 16.35 <sup>a</sup>	386.99 ± 57.35 <sup>ab</sup>	381.42 ± 24.50 <sup>ab</sup>	0.2						0.2

## Discusión

En los últimos años, los probióticos se han consolidado como herramientas relevantes en la producción animal debido a su capacidad para mejorar la salud intestinal, optimizar la absorción de nutrientes y contribuir a la reducción del uso de antimicrobianos. Su principal mecanismo de acción se relaciona con la modulación del sistema inmunológico, favoreciendo la prevención y el control de infecciones y en consecuencia el desempeño productivo. Entre ellos, las bacterias ácido lácticas (BAL) destacan por sus efectos benéficos ampliamente documentados en diferentes especies, donde se ha observado mejora en la respuesta inmune, el crecimiento y la resistencia a enfermedades. Recientemente, se ha reconocido que las BAL liberan microvesículas (MVs) con funciones biológicas similar las funciones de la célula completa, lo que le da un papel importante en la modulación de los procesos fisiológicos del hospedador [18].

En el presente estudio se evaluaron los efectos protectores de *Lactobacillus acidophilus*, así como de sus microvesículas frente a la intoxicación con aflatoxina B1 en pollos Cobb 500, la administración mostro mejorías significativas en los parámetros considerados, que incluyeron los parámetros productivos (peso final, ganancia de peso e Índice de Conversión Alimenticia), histopatología, bioquímica sanguínea, leucograma y pesos relativo de órganos. La suplementación en particular de microvesículas derivadas de *Lactobacillus acidophilus* en este estudio, mejoro el desempeño productivo en comparación con el grupo Control y BAL, mientras que AFB disminuyo significativamente estos parámetros. De forma similar, de acuerdo con Hu, las vesículas extracelulares (EVs) de *Lactobacillus reuteri* atenúan respuestas inflamatorias intestinales inducidas por LPS y mantienen la homeostasis inmune, lo que explicaría una mejor conversión alimenticia y ganancia de peso observadas con las MVs [19].

De acuerdo con De Cesare [21], la suplementación con cepas de *L. acidophilus* puede mejorar parámetros productivos en broilers (ganancia de peso y conversión) además de modular la morfología intestinal y favorecer una mayor absorción, por ejemplo mayor altura en las vellosidades intestinales. La administración con AFB no restaura totalmente el rendimiento, pero atenuó los daños, este resultado es coherente con la bibliografía, las MVs parecen mejorar barrera y modular inflamación (reduciendo la absorción o el impacto), pero no están descritas como agentes que neutralicen químicamente las micotoxinas. Las MVs pueden mitigar los efectos inflamatorios secundario a AFB, mejorando indicadores bioquímicos e histológicos, pero la presencia continua de toxina puede seguir afectando el metabolismo hepático y la conversión. La capacidad de las MVs para influir más eficientemente que las células completas puede estar relacionada con su facilidad de interacción con células del hospedador, facilitando la entrega de componentes bioactivos directamente a células epiteliales o inmunitarias, sin depender de la colonización bacteriana, lo que puede explicar la mejoría en la ICA y ganancia de peso observada con las MVs en este trabajo [22].

El análisis histopatológico confirmo que la aflatoxina B<sub>1</sub> provoca lesiones multisistémicas, principalmente en hígado, bazo, bolsa cloacal e intestino. Las MVs y en menor grado LA, redujeron la severidad de fibrosis, degeneración vacuolar e

infiltración inflamatoria, sugiriendo un efecto protector superior de las MVs. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Fouad [22] y Gimeno [5], quienes señalan que el hígado es el principal órgano afectado en la aflatoxicosis, presentando vacuolización, necrosis e infiltración leucocitaria. De otra forma similar, Ali [23] y Fonchesato [1], reportaron que la suplementación con probióticos como *Lactobacillus plantarum* o mezclas con *Saccharomyces* pueden reducir significativamente la degeneración vacuolar y la fibrosis, lo que coincide con la protección observada en este trabajo, especialmente con MVs.

En la bioquímica sanguínea, la AFB<sub>1</sub> alteró proteínas séricas y enzimas hepáticas, mientras que los grupos suplementados con MVs mantuvieron niveles más cercanos al CT, especialmente en albumina y AST, evidenciando un efecto hepatoprotector. De forma paralela, el leucograma mostro un patrón compatible con inmunosupresión inducida por aflatoxina B<sub>1</sub>, que fue parcialmente revertido por ambos tratamientos, destacando nuevamente la eficacia de las MVs.

El peso relativo de los órganos es un indicador sensible de los efectos tóxicos y fisiológicos en las aves, ya que refleja tanto alteraciones metabólicas como cambios morfofuncionales asociados a diferentes tratamientos. En el contexto de la aflatoxicosis, las micotoxinas pueden obstaculizar el desarrollo de los órganos inmunes, causar agrandamiento del bazo y atrofia de la bursa de Fabricio y el timo, y aumentar los pesos relativos del timo y el bazo [24]. Por ellos el análisis comparativo de estos parámetros resulta fundamental para comprender el impacto de las micotoxinas y la posible acción moduladora de probióticos o sus derivados.

Los resultados del presente estudio mostraron que el peso relativo del hígado, fueron de los del grupo AFB, que coincide con Ali [23] donde menciona que las aflatoxinas se acumulan en el hígado y causan diferentes efectos patológicos en el parénquima hepático, y uno de estos efectos es el peso absoluto del hígado. También menciona que cuando se administró *Lactobacillus plantarum* a los pollos de engorde intoxicados con aflatoxinas, el peso absoluto del hígado volvió a la normalidad y se observó un patrón similar en el peso absoluto del riñón como en el hígado. Al igual que los resultados de BAL y Ct que fueron los más bajos, y los grupos MVs, BAL+AFB y MVs+AFB que fueron los intermedios.

En el intestino, el grupo tratado con BAL presento los valores más elevados de peso intestinal, seguido por el grupo MVs, mientras que los intestinos más ligeros correspondieron al grupo AFB, lo que sugiere un posible efecto de agrandamiento o hipertrofia local inducido por la aflatoxina. De acuerdo con Wu [25] el uso de *Lactobacillus acidophilus* se asocia con diversos beneficios sobre la integridad intestinal, entre ellos la secreción de sustancias antimicrobianas, el fortalecimiento de la barrera intestinal, la adherencia competitiva a la mucosa y la modulación de la respuesta inmunitaria. Además, la suplementación con *L. acidophilus* en pollos de engorde favorece la morfología intestinal, incrementando la altura de las vellosidades del íleon, lo cual mejora la absorción de nutrientes y la salud intestinal. Y De acuerdo con Zhu [26], las micotoxinas pueden obstaculizar el desarrollo de los órganos inmunes, causar agrandamiento del bazo y atrofia de la bursa de Fabricio y el timo, y aumentar los pesos relativos del timo y el bazo.

En el presente estudio, la exposición a aflatoxina B<sub>1</sub>, se reflejó en alteraciones de proteínas séricas y enzimas hepáticas. El grupo AFB presentó la proteína total más elevada, lo que sugiere un proceso inflamatorio asociado a la intoxicación, mientras que la albumina mostro la concentración más baja, confirmando un deterioro en la función hepática. Este patrón coincide con lo descrito por Ali, quienes reportaron que los pollos intoxicados con AFB<sub>1</sub> presentaron una disminución significativa en proteínas totales y albumina sérica, acompañada de un incremento en biomarcadores hepáticos como AST, ALT y GGT. En su estudio, la suplementación con *Lactobacillus plantarum* restituyó estos valores hacia la normalidad, particularmente a dosis bajas de aflatoxina, lo que concuerda con la mejoría observada en nuestro grupo MVs+AFB.

De manera similar, Fonchesato [1] señaló que la suplementación con un aditivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus rhamnosus* en pollos expuestos a AFB<sub>1</sub>, permitió mantener estables la mayoría de los parámetros bioquímicos, sin evidenciar alteraciones significativas en enzimas hepáticas. En concordancia, en nuestro experimental los grupos suplementados con BAL y MVs mostraron niveles de ALT, AST y GGT cercanos al control, lo que sugiere un efecto protector frente a la toxicidad de la aflatoxina. En particular, los grupos con MVs conservaron valores de albumina más altos y AST más bajos que los observados en BAL, lo que indica una mejor preservación de la integridad hepática.

Respecto a las globulinas, el incremento observado en AFB y MVs+AFB refleja la activación del sistema inmune en respuesta a la toxina, mientras que en el grupo MVs mostro valores más bajos, sugiriendo una modulación inmune más controlada, posiblemente atribuible a los efectos de las microvesículas probióticas. Este hallazgo complementa lo descrito

por Ali [23], donde los probióticos redujeron la severidad de las alteraciones bioquímicas en inmunológicas inducidas por AFB1.

En conjunto, los resultados confirman que la aflatoxicosis afecta directamente parámetros hepáticos e inmunológicos en la sangre, mientras que la suplementación probiótica atenúa dichos efectos. En este contexto, las MVs de *Lactobacillus* mostraron una eficacia superior frente a BAL, al conservar niveles de albumina cercanos al control y reducir significativamente la elevación de AST, sugiriendo un efecto hepatoprotector más robusto. La ausencia de variaciones relevantes en la glucosa entre grupos respalda que el impacto principal de la aflatoxina y de los probióticos se centra en el metabolismo hepático y la respuesta inmune, más que en la homeostasis energética.

## Conclusión

La suplementación con MVs derivadas de *Lactobacillus acidophilus* demostró un efecto protector significativo frente a la intoxicación por aflatoxina B<sub>1</sub> en pollos de engorda Cobb 500. Las MVs mejoraron el desempeño productivo, atenuaron las alteraciones bioquímicas hepáticas, redujeron la severidad de las lesiones histopatológicas y contribuyeron a mantener un perfil leucocitario más cercano al de las aves sanas. En la mayoría de los parámetros evaluados, su efecto fue superior al observado con la administración de bacterias completas (LA).

Esto sugiere que las MVs podrían actuar como postbióticos naturales, capaces de modular procesos inflamatorios y proteger tejidos sin requerir la viabilidad de la bacteria completa.

La aflatoxina B<sub>1</sub> confirmó su daño negativo sobre el crecimiento, el hígado, intestino y órganos inmunes, reforzando su relevancia en la industria avícola. Sin embargo, la suplementación con MVs mitigó gran parte de estos efectos, posicionándolas como una estrategia biotecnológica prometedora, abriendo nuevas posibilidades en el desarrollo de postbióticos de origen bacteriano, capaces de hacer la producción animal más segura, eficiente y sostenible.

## Referencias

- [1] A. Fochesato, M. P. Martínez, D. Cuello, V. L. Poloni, M. J. Luna, A. P. Magnoli, C. Fernández y L. R. Cavaglieri, «Effects of a mixed additive based on *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* on broilers exposed to aflatoxin B<sub>1</sub> by contaminated feed,» *Revista Argentina de microbiología*, 2024.
- [2] J. A. Quirarte, «Alimentación de pollo de engorda,» UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO, México, 2022.
- [3] SENASICA, «Riesgos en la avicultura nacional e impactos económicos en los costos de producción avícola por los brotes de IAH5N1 en México,» 2022.
- [4] M. J. Mughal, X. Peng, A. A. Kamboh, Y. Zhou y J. Fang, «Aflatoxin B<sub>1</sub> Induced Systemic Toxicity in Poultry and Rescue Effects of Selenium and Zinc,» *Springer Science*, 2017.
- [5] I. Gimeno, R. D. Pascual, O. Fletcher, N. M. Masferrer, E. Montiel, O. Osuna, A. R. Pandiri, K. Schat, J. A. Smyth y G. Zavala, *Enfermedades inmunosupresoras en avicultura*, Zaragoza: Servet, 2013.
- [6] S. P. McCormick, «Microbial Detoxification of Mycotoxins,» *Springer Science*, 2013.
- [7] D. Paneru, M. K. Sharma, H. Shi, J. Wang y K. Kim, «Aflatoxin B<sub>1</sub> Impairs Bone Mineralization in Broiler Chickens,» *MDPI*, 2024.
- [8] M. A. Hamouda, A. H. Saad, A. A. Saadany, T. M. El Sharawey, W. Abdo, E. M. EL-diasty, S. E. Fadl y E. Y. Abdelhiee, «Trials for reducing the dangerous effect on poultry fed on aflatoxin contaminated ration using nano curcumin,» *BMC Veterinary Research*, 2025.
- [9] M. S. Kashif, K. Ashraf, S. T. Gul, M. N. Naseem, M. S. Sajid, M. Mohsin, C. He, M. Zubair y A. Khan, «Corrigendum to Toxicopathological effects of feeding aflatoxins B<sub>1</sub> in broilers and its amelioration with indigenous mycotoxin binder,» *ELSEVIER*, 2020.
- [10] M. Alagawany, M. ABD El-Hack, M. R. Farag, S. Sachan, K. Karthik y K. Dhama, «The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition,» *Environmental Science and Pollution Research*, 2018.
- [11] H. Aliakbarpour, N. Chamani, G. Rihimi, A. Sadeghi y D. Qujeq, «The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers,» *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012.
- [12] O. Molina, «Aislamiento e identificación mediante el uso de pruebas bioquímicas de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de ratas (*Rattus norvegicus*),» UNAM, México, 2017.
- [13] D. I. Leon-de la O, B. Calderón, A. Martínez, E. M. Sánchez, A. C. Zulatto, I. Camacho, A. L. Arredondo y R. Salgado, «Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque,» UNAM, México, 2013.
- [14] K. Slizewska, B. Cukrowska, S. Smulikowska y J. Cielecka-Kuszyk, «The Effect of Probiotic Supplementation on Performance and the Histopathological Changes in Liver and Kidneys in Broiler Chickens Fed Diets with Aflatoxin B<sub>1</sub>,» *MDPI*, 2019.
- [15] V. Gutiérrez, «Identificación de Bacteriocinas en Microvesículas (Mvs) producidas por Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), aisladas del tracto gastro intestinal (TGI) de *Rattus norvegicus*,» UNAM, México, 2020.
- [16] G. M. Chiochetti, C. Jádán-Piedra, V. Monedero, M. Zúñiga, D. Vélez y V. Devesa, «Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 59, 2019.

- [17] P. Pérez, V. Gutiérrez, C. Ávalos, M. De la Garza, A. Vargas, R. Higuera, E. Marín, C. Longgi, F. González, H. Ramírez y C. González, «Evaluation of the Immunostimulant Effect of Microvesicles of Lactobacillus acidophilus Isolated from Wild Rats,» *Microorganisms*, vol. 13, nº 6, 2025.
- [18] V. Gutiérrez y C. González, «Evaluación in vitro del efecto inmunoestimulante de Microvesículas de Bacterias Ácido Lácticas de Rattus Norvegicus de vida libre, sobre la línea celular RAW 264.7 gamma NO (-) ATCC CRL-2278,» UNAM, México, 2023.
- [19] R. Hu, H. Lin, M. Wang, Y. Zhao, H. Liu, Y. Min, X. Yang, Y. Gao y M. Yang, «Lactobacillus reuteri-derived extracellular vesicles maintain intestinal immune homeostasis against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in broilers,» *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 12, nº 1, 2021.
- [20] I. O. Autor, S. P. Autor y T. R. Autor, «Título publicación».
- [21] A. De Cesare, F. Sirri, G. Manfreda, P. Moniaci, A. Giardini, M. Zampiaga y A. Meluzzi, «Effect of dietary supplementation with Lactobacillus acidophilus D2/CSL (CECT 4529) on caecum microbioma and productive performance in broiler chickens,» *PLoS ONE*, vol. 12, nº 5, 2017.
- [22] A. Fouad, D. Ruan, H. El-Senousey, W. Chen, S. Jiang y C. Zheng, «Harmful Effects and Control Strategies of Aflatoxin B1 Produced by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus Strains on Poultry: Review,» *MDPI*, vol. 11, nº 3, 2019.
- [23] A. Ali, A. Khatoon, H. Almohaimeed, F. Al-Sarraj, R. Albiheyri, I. Alotibi y Z. Abidin, «Mitigative Potential of Novel Lactobacillus plantarum TISTR 2076 against the Aflatoxins-Associated Oxidative Stress and Histopathological Alterations in Liver and Kidney of Broiler Chicks during the Entire Growth Period,» *Toxins*, vol. 14, nº 10, 2022.
- [24] Y. Zou, S.-B. Liu, Q. ZHANG y H.-Z. Tan, «Effects of Aflatoxin B1 on growth performance, carcass traits, organ index, blood biochemistry and oxidative status in Chinese yellow chickens,» *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 85, nº 9, 2023.
- [25] Z. Wu, K. Yang, A. Zhang, W. Chang, A. Zheng, Z. Chen, H. Cai y G. Liu, «Effects of Lactobacillus acidophilus on the growth performance, immune response, and intestinal barrier function of broiler chickens challenged with Escherichia coli O157,» *Poultry Science*, vol. 100, nº 9, 2021.
- [26] P. Zhu, Z. Zuo, Z. Zheng, F. Wang, X. Peng, J. Fang, H. Cui, C. Gao, H. Song, Y. Zhou y X. Liu, «Aflatoxin B 1 affects apoptosis and expression of death receptor and endoplasmic reticulum molecules in chicken spleen,» *Oncotarget*, vol. 8, 2017.



## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CARNE EN POLLOS DE ENGORDA SUPLEMENTADOS CON PROBIÓTICO COMERCIAL Y GLUCOSA OXIDASA

Ángel Daniel Colín González, Cinthia Itzel Aguilar Ayala, Juan Sebastián Barrientos Padilla, Omar Hernández Ramírez, Nora Rosalía Flores Huitron

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México  
mvzaguilarayala@gmail.com

### Resumen

El crecimiento a nivel nacional e internacional de la producción de carne de pollo es evidente, así como la tendencia de los consumidores por el interés en el bienestar animal, calidad y beneficios a la salud ofrecidos por esta industria. Los aditivos naturales como probióticos y enzimas surgieron como una opción viable y con eficacia demostrada para mejorar diversos aspectos, entre ellos la calidad de la carne. En este estudio se evaluó en pollos Ross 308 de 49 días, la suplementación de productos comerciales conteniendo probióticos a base de cepas de *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* y la enzima glucosa oxidasa de tal forma que se formaron 4 grupos: 1) control (CT), 2) probióticos (NO), 3) enzima glucosa oxidasa (GLU) y 4) probióticos y enzima glucosa oxidasa (NO+GLU), se procedió a evaluar aspectos de la calidad de la carne como el pH, colorimetría bajo el sistema CIELab, la pérdida por goteo, pérdida por cocción y dureza de la carne en muestras de pechuga de los pollos. Los resultados mostraron que el pH a las 0 horas se mantuvo superior con significancia para CT mientras que a las 24 horas NO presentó los valores más bajos. El grupo GLU mostró una disminución de la coordenada L\* y sin cambios significativos para a\* y b\*. NO+GLU mostró un mejor desempeño reduciendo significativamente...

### Palabras clave

Pechuga de pollo, pérdida por goteo, pérdida por cocción, dureza, pH muscular, colorimetría.

### Introducción

En México, la carne de pollo se ha consolidado como la más producida y consumida. La industria doméstica cubre el 81% de la demanda nacional mientras que el déficit es cubierto por importaciones de Estados Unidos, Chile y Brasil, haciendo al país el tercer mayor importador de carne de pollo del mundo. (1) Así mismo, México ocupa el tercer lugar en América en producción de carne y el séptimo en el mundo con una representación del 3.1 global y con una producción de 3,888, 208 toneladas en 2023.

Por otro lado, el consumo anual per cápita se estima en 37.9 kg (2) y representa una importante fuente de proteína de alta calidad debido a que contiene todos los aminoácidos esenciales en la dieta humana, también se posiciona como uno de los cárnicos más consumidos por la población de menores ingresos (3) por lo que se considera este sector como estratégico en la seguridad alimentaria mexicana. De acuerdo con las proyecciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para 2033, se espera que el consumo de carne de pollo para México incremente hasta 43.8 kg per cápita, así como se espera el incremento de importaciones y de la producción doméstica ligado a las políticas actuales que facilitan a México la importación de granos y alimento que le permita aumentar su producción derivado del Tratado entre México, Estados Unidos y Canadá (T-MEC) (4)

La avicultura es el agronegocio que presenta la tasa de crecimiento mayor dentro de las actividades agrícolas, pecuarias y pesqueras y es fundamental en la producción de alimentos, así como un elemento importante en la dieta de la población mexicana, así mismo el objetivo de la avicultura comercial es proveer a la población de alimento con proteína de calidad y a un precio competitivo (5)

En años recientes, los consumidores cada vez están más interesados en aspectos sostenibles, de salud y nutricionales de los productos avícolas y están dispuestos a pagar un mayor precio por carne que perciben entre otras cosas como de alto estándar de bienestar animal. (6) Estudios revelaron que los consumidores mexicanos parecen estar más interesados en el bienestar de los animales de granja, así como en sus implicaciones éticas, sociológicas y económicas, entre otras cosas como exigir más regulaciones al respecto, los consumidores expresaron estar dispuestos a pagar más por productos amigables con el bienestar certificados y principalmente basándose en beneficios para la salud humana y términos de la calidad del producto. (7)

La calidad de un producto, en especial agroalimentario se refiere a un juicio ordinal emitido por el consumidor, basado en las variables que éste considera de calidad. (8) Respecto a la calidad de la carne, es un conjunto de propiedades que identifican lo que se aprecia de la misma, tradicionalmente aquellas asociadas a la percepción sensorial como la apariencia, color, sabor, textura (en especial la terneza), jugosidad, retención de agua y olor. Se trata de una medida de rasgos que

son buscados y valorados por el consumidor y es la suma de todos los factores en términos de propiedades sensoriales que incluyen las ya señaladas mientras que las nutritivas incluyen el contenido de grasa, proteína y tejido conectivo y los factores tecnológicos incluyen parámetros como el pH, distribución del agua y capacidad de retención de esta. (9,10) Se han descrito ya algunas propiedades fisicoquímicas y organolépticas que incluye el término de calidad, sin embargo, otras propiedades relevantes son la salubridad o la ausencia de acción tóxica que define la calidad microbiológica o higiénica; propiedades funcionales, la estabilidad, el coste de elaboración y factores psicológicos como la facilidad de empleo, la novedad u hábitos sociológicos. (8)

La carne es la parte muscular comestible de los animales de abasto, sacrificados y faenados en condiciones higiénicas. Se incluyen también las porciones de grasa, hueso, cartílago, piel, tendones, aponeurosis, nervios y vasos linfáticos y sanguíneos que acompañan al tejido muscular y que no se separa de éste durante la manipulación y transformación de la carne. (8) Específicamente la carne de ave es la porción comestible de las aves domesticadas como el pollo, pato, pavo, gansos, etcétera y tienen un rol importante en proveer proteína de alta calidad y seguridad alimentaria. (11)

Hay muchas dimensiones de la calidad, los consumidores se interesan en aspectos como la apariencia, el aroma, sabor, textura y el sonido, que son características percibidas a través de los sentidos. (12) Dado que la calidad es percibida y experimentada por los consumidores la hace altamente subjetiva y variable de acuerdo con la cultura y experiencia, aunque para jugar los aspectos organolépticos o sensoriales se evalúa por medio de equipos o paneles de personas entrenadas para dar descripciones de los productos o por medio de métodos afectivos como las respuestas de los consumidores. (12,13)

Por otro lado, el control o medición de calidad fisicoquímico y microbiológico precisan de instrumentos de medida para evaluar estos componentes del producto. (8) Algunos rasgos se pueden medir con instrumentos en línea o poco después del sacrificio (dentro de las primeras 24 a 48 horas postmortem para predecir la calidad final. Este tiempo cae en que la carne se encuentra dentro de la planta de procesado de carne y las mediciones giran en torno al pH, la temperatura y en ocasiones el uso de sondas portátiles para la medición de parámetros como la conductividad o impedancia. La mayoría de los métodos de laboratorio que son objetivos para la caracterización de la calidad de la carne tienen limitaciones como su poca rapidez y adaptabilidad a la línea de procesamiento, además implican un gasto de personal, tiempo, recursos y el uso de equipo sofisticado, por lo que son principalmente usados en la investigación. (10,13)

Uno de los atributos más importantes de calidad en un alimento es el aspecto, de esto, el factor que más contribuye al aspecto es el color, pues es un factor visual que afecta a la selección de un alimento, si el color es inaceptable, el producto no se comercializa. El color se puede definir como “el aspecto de las cosas causado por distintas cualidades de luz”. (14) El color de la carne puede describirse puramente por medio de instrumentos o visualmente con ayuda de referencias de color. Para la medición instrumental existen evaluaciones, casi todas basadas en tres colores primarios, rojo, azul y verde, mientras que la luminosidad (negro a blanco) se combina con estos tres componentes para obtener valores triestímulos del color. (13)

El sistema de color CIE (Comisión Internacional de l' Eclairage) junto con Hunter Lab son dos de los más usados para la medición del color de la carne fresca, debido a la distribución de tres tipos de células conos con distintos picos de sensibilidad en el ojo, los valores tricromáticos dependen del campo visual del observador. El espacio de color Lab es un espacio de color oponente con la dimensión L para la luminosidad y a y b para las dimensiones opuestas de color rojo-verde y azul-amarillo respectivamente. Esta escala original bidimensional de Hunter Lab fue revisada por la CIE en 1976 para convertirla en un espacio tridimensional (CIE L\*a\*b\* o CIELab) La diferencia en ambos es que CIE se basa en la transformación de la raíz cúbica de los datos del color mientras que el sistema Hunter se basa en la transformación de la raíz cuadrada. El sistema CIELab es preferido para la medición de la carne fresca por su énfasis en el color rojo. Para estandarizar los métodos y describir las especificaciones en los resultados, se utilizan colorímetros o espectrofotómetros para medir instrumentalmente el color. Los primeros son más simples de usar para medir las coordenadas Lab y fueron de las primeras máquinas portátiles de laboratorio producidas por Minolta, para una medición fácil de la superficie de la carne en campo, cámaras de refrigeración, etc. y son populares para medir espectrofotometría y valores del espacio del color. (13,15)

Saber el valor del pH es un elemento esencial en la medición de la calidad, este mide la acidez del músculo o la carne, como tal no constituye una característica de calidad, pero influye en el color, la capacidad de retención de agua, sabor, textura y vida de anaquel.

Una vez finalizada la circulación posterior al sacrificio del animal, el tejido muscular cambia a un metabolismo anaeróbico, lo que genera una acumulación de productos, en especial el ácido láctico, provocando un descenso en el pH que a medida que disminuye, las proteinasas endógenas se activan, estas enzimas ablandan las proteínas de la carne, por lo que

monitorear el pH en el proceso nos da una medida efectiva de la calidad final. (16) Las mediciones se toman a diferentes tiempos postmortem como justo después del sacrificio y durante el proceso de rigor mortis, el pH último es el valor del pH una vez terminado el rigor. Este valor suele estar en un rango de 5.3 a 7.0. El valor para la carne de pollo suele encontrarse en 6.0 o más a las 2 a 4 horas postmortem bajo condiciones comerciales de refrigeración. Para evaluarlo se utilizan medidores de pH, recomendablemente a temperaturas de 20 a 25°C y calibrado con buffers usualmente de pH 4 y 7 previo a su uso para una mayor precisión. Una forma común de hacerlo es perforando la carne a una profundidad de al menos 1cm y después introducir el electrodo en el corte. (13,16)

La capacidad de retención de agua es la aptitud de la carne para retener total o parcialmente el agua propia y eventualmente agua adicionada durante su tratamiento cuando se aplica fuerza (calor, presión). Esta tiene una gran repercusión en el desarrollo y apreciación de las características sensoriales, valor nutritivo y comercial de la carne. (8) La mayoría de esta propiedad reside en el agua localizada en los espacios intermoleculares entre las proteínas solubles en sal (actina y miosina) del músculo y que se mantiene en su lugar gracias a la fuerza de capilaridad. Este espacio puede variar por factores como el pH, fuerzas iónicas, presencia de cationes divalentes, presión osmótica o la longitud del sarcómero. (15) Esta propiedad se puede medir por métodos como con el uso de papel filtro, papel filtro y presión, pérdida por goteo y centrifugación. Los primeros tres son de importancia ya que se relacionan con la jugosidad de la carne. El goteo se refiere a la liberación de fluido acuoso y causa una merma en el peso. Esto ocurre en las superficies musculares de la canal durante su almacenamiento o su procesado. (8,16)

La pérdida por goteo o método gravimétrico no requiere de una fuerza externa y se refiere a la medición del peso perdido por goteo libre, en bolsa o en cubo donde se suele dejar la carne bajo condiciones ambientales diferentes, generalmente con peso y tamaño estándar de las muestras, suspendidas en una bolsa inflada y que no esté en contacto con la muestra por 1 o 2 días a temperatura estándar como a 1-4°C. La muestra se debe pesar al inicio de la prueba y se pesa después del tiempo transcurrido, por último, se calcula la pérdida de agua expresada en porcentaje respecto al peso inicial. (15) Otra manera de evaluar la pérdida por goteo de forma indirecta es por el rendimiento de cocción o la pérdida por cocción; esta ocurre conforme las proteínas se desnaturalizan y se encogen, exprimiendo el tejido. De igual forma se expresa en porcentaje comparando el peso inicial de la carne cruda y después de cocinar. En esta, una muestra de carne de peso estandarizado se coloca en una bolsa plástica con termopares y se sumerge en agua hirviendo y se cocina hasta que alcance una temperatura interna de 75°C, después se deja enfriar la bolsa, la muestra se extrae y se seca con toallas para volver a pesarla. (16)

La textura se considera como la característica más importante en la carne de pollo y es el más afectado por la edad del ave y los procesos. Algunas de sus características como la terneza, jugosidad, masticabilidad y fibrosidad están asociados a la calidad del producto. De estas destaca que desde 1950 ha habido un gran interés en procesos instrumentales para estimar la terneza, para obtener repetibilidad y valores numéricos. (12,16)

La terneza de la carne es una medida del esfuerzo requerido al morder, sin embargo, a pesar del desarrollo de dispositivos mecánicos, existen inconsistencias entre estas evaluaciones y las evaluaciones sensoriales de la terneza, debido en parte a que la percepción sensorial de la terneza está influenciada más allá de la fuerza requerida para morder. Cuando se mide mecánicamente la terneza se suele expresar en medidas de resistencia como fuerza de corte en kilogramos (kgF) o newtons (N), de tal forma que valores bajos indican carne más tierna. (15) Uno de los métodos más utilizados es el sistema de fuerza de corte Warner-Bratzler que consiste en una cuchilla rectangular con una abertura triangular en el centro; la cuchilla está unida a una báscula circular en abanico y la muestra de carne se coloca en la muesca triangular y se bajan dos barras por un motor hidráulico y se empuja la muestra a través del vértice de la muesca y a medida que se bajan las barras, la fuerza máxima de corte a través de las fibras se registra en alguna unidad. Esto ofrece confiabilidad, robustez y facilidad de uso ideal para el trabajo in situ de control de calidad. (12)

Uno de los principales desafíos que enfrenta la industria avícola es la eliminación de los antibióticos profilácticos o subterapéuticos, en el mundo se ha logrado a través de la legislación, la presión de los consumidores o por iniciativa propia de la industria. (17) Los antibióticos históricamente han jugado un papel crucial como promotores del crecimiento y previniendo enfermedades en la avicultura, sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos y la posible transmisión de características resistentes a patógenos humanos ha generado preocupación sobre la salud pública. En respuesta a este desafío los probióticos, particularmente aquellos compuestos de múltiples cepas de microorganismos benéficos ofrecen un acercamiento holístico para mejorar el desempeño productivo. (18) De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidad adecuada confieren algún beneficio en la salud del hospedador, consisten en varios tipos de microorganismos que mejoran la microbiota intestinal y secretan enzimas

benéficas que mejoran local y sistémicamente el sistema inmune y son alternativa de gran interés sobre los antibióticos en la industria avícola. (19) Adicionalmente la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece criterios para los probióticos como: no producir toxinas, no tener resistencia a los antibióticos y no ser patógenos. (20)

*Bacillus subtilis* es un probiótico mesófilo, aeróbico, gram positivo formador de endosporas (21) que mejora la salud intestinal al modular la microbiota intestinal, mejora la digestibilidad de los nutrientes y fortalecer la respuesta inmunitaria, se sabe que aumenta las poblaciones de *Lactobacillus spp.* Mientras suprime patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* (se sabe que ejerce su función bacteriostática a través de sus metabolitos), mejorando la integridad de la barrera intestinal, como probiótico contribuye a la secreción de enzimas, al metabolismo de sales biliares y a la exclusión competitiva de patógenos. (22,23) Por otro lado *Bacillus amyloliquefaciens* es una especie probiótica ampliamente utilizada en la industria alimentaria animal, un componente de su modo de acción es la secreción de múltiples enzimas extracelulares y sustancias antibacterianas como la fitasa, adicionalmente se sabe que mejora efectivamente el rendimiento de postura y calidad de huevo al fortalecer el sistema inmunológico y la regulación de hormonas reproductivas en gallinas ponedoras, en pollos de engorda promueve el crecimiento modulando el sistema inmune al aumentar la capacidad antioxidante y la actividad enzimática digestiva y mitigando el daño intestinal (24,25)

La glucosa oxidasa es una enzima deshidrogenasa aeróbica que específicamente cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico y produce peróxido de hidrógeno. Esta enzima ha sido ampliamente utilizada en la industria alimentaria por sus efectos verificados bacteriostáticos, promotores del crecimiento, inmunidad, y su digestión, además de no ser tóxico y de bajos residuos, así como difícil de generar resistencia. (26) Esta enzima elimina o inhibe de forma no farmacológica los microorganismos patógenos al crear un ambiente anaeróbico, y con los productos que cataliza se le considera un potencial sustituto de los antibióticos, además de que se ha estudiado la desintoxicación de micotoxinas a partir del peróxido de hidrógeno, en particular de la aflatoxina B1. (21)

La incorporación de probióticos dietarios, prebióticos y otras sustancias benéficas pueden mejorar la composición de la microbiota intestinal, aumentar el rendimiento de la carne y elevar la calidad de esta, reducen significativamente el uso de antibióticos, que además va de acuerdo con la demanda de los consumidores de carnes libres de antibióticos, y alimentos funcionales con beneficios adicionales. (27)

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la suplementación con probióticos y glucosa oxidasa por 7 semanas en la calidad de la carne de los pollos en engorda, a través de las pruebas y registro de valores de colorimetría, pH, pérdida por goteo, pérdida por cocción, terneza y la evaluación del área de fibra muscular. Particularmente se evaluó en las diversas pruebas de calidad de la carne con muestras de la pechuga izquierda por medio del sistema CIELAB para la colorimetría, la curva de pH durante el proceso de rigor mortis, la capacidad de retención de agua a partir de la medición de pérdidas de peso en anaquel y por cocción, la evaluación de la terneza y la evaluación morfométrica de las fibras musculares al observarse en un corte histológico transversal.

### Materiales y métodos

Dentro del módulo de aves perteneciente al Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo IV, Universidad Nacional Autónoma de México, con ubicación en el km. 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan, colonia San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli en el Estado de México se llevó a cabo el proceso de engorda a partir de la recepción de pollitos Ross 308 y que duró en total el proceso 49 días hasta el sacrificio. Para los propósitos de este trabajo se formaron 4 tratamientos (grupos) con 10 pollitos cada uno, es decir, un total de 40 individuos analizados. Tales grupos formados se presentan a continuación en el cuadro 1.

#### División de los 4 tratamientos

Grupo experimental	Tratamiento	Abreviación
Grupo 1 (control)	Dieta comercial	CT
Grupo 2	Dieta comercial + Gutfitzyme® 300 EXCELLING	GLU
Grupo 3	Dieta comercial + NORUM Interagro®	NO
Grupo 4	Dieta comercial + NORUM Interagro® + Gutfitzyme® 300 EXCELLING	NO+GLU

De acuerdo con los diferentes grupos asignados, a los individuos se les suplementó en la dieta con los probióticos y/o la enzima de tal forma que Gutfitzyme®300, EXCELLING (enzima glucosa oxidasa) se administró en dosis de 300 g/tonelada de alimento y NORUM, Interagro® (cepas patentadas de *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) a dosis de 200 g/ton de alimento.

Una vez finalizada la engorda, se procedió al sacrificio de las aves bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-033SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres, en el Taller de Carnes también perteneciente al CEA; así como el posterior faenado hasta obtener la canal de las aves de las que se recuperó la pechuga izquierda para obtener las muestras de carne a fin de efectuar las pruebas de calidad.

Para la prueba de colorimetría, se evaluó el color por medio de las coordenadas colorimétricas L, a y b del sistema CIELAB de forma directa sobre la superficie de la pechuga izquierda a las 24 horas después del sacrificio de las que se hicieron tres mediciones a cada pechuga en las zonas superior, media e inferior de las mismas, para posteriormente promediar los valores. Esta medición se hizo con ayuda de un colorímetro espectrofotómetro Konica Minolta modelo CM-600d.

El pH se midió con ayuda de un medidor de tipo aguja (HI-9024) previamente calibrado y con una hoja de bisturí se hicieron tres cortes (superior, medio e inferior) de 1 cm de profundidad en la pechuga izquierda para introducir el electrodo y tomar la lectura. Los tiempos a los que se tomó tales datos fueron posterior al sacrificio, a las 2, 3 y 24 horas.

La prueba de pérdida por cocción se llevó a cabo con muestras de pechuga de pollo 24 horas posteriores al sacrificio y refrigeradas a 4°C. Se cortaron muestras de 3x2x1 cm y se registró el peso inicial de cada una ( $P_1$ ) para posteriormente colocarlas en bolsas selladas al vacío y ser cocinadas por inmersión en un recipiente con agua a 85°C hasta que la temperatura interna de la muestra alcanzó los 80°C, posteriormente se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se limpió el exceso de humedad superficial con papel absorbente y se registró el peso de las muestras postcocción ( $P_2$ ) y por medio de la siguiente ecuación se calculó la pérdida:

$$\text{Pérdida por cocción (\%)} = (P_1 - P_2) / P_1 \times 100$$

La evaluación de la pérdida por goteo se realizó en muestras de carne de las mismas dimensiones y condiciones de maduración que la prueba anterior, a continuación, se registró el peso inicial ( $P_3$ ) y la muestras se colocaron en bolsas plásticas y selladas para almacenarse en refrigeración a 4°C por 24 horas, para tomar el peso de las muestras ( $P_4$ ), después a las 48 horas ( $P_5$ ) y a las 72 horas ( $P_6$ ). Es decir, se evaluó la pérdida por goteo al primer, segundo y tercer día. Con la siguiente ecuación es como se calculó el porcentaje de pérdida:

$$\text{Pérdida por goteo (\%)} = (P_3 - P_4) / P_3 \times 100$$

(Para obtener el valor del porcentaje al segundo y tercer día, se sustituyó el valor  $P_4$  por el valor del peso registrado al segundo ( $P_5$ ) o al tercer día ( $P_6$ ).

Para evaluar la terneza de las muestras se cortaron muestras de las mismas dimensiones y mismo proceso de maduración de la carne de la pechuga izquierda y con ayuda de un texturómetro Texture analyser CT3 Brookfield acoplado con una cuchilla de Warner-Bratzler y en conjunto con su software correspondiente, se registró el valor de la dureza de la carne expresado en Newtons.

El programa de Microsoft Excel 365 se utilizó para registrar, organizar, ordenar y visualizar los datos colectados de cada prueba y por tratamiento. El análisis estadístico se realizó con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion XV y se llevaron a cabo análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Los resultados se expresaron en diagramas de cajas y bigotes, diagramas de Fisher y se formaron tablas para comparar los tratamientos incluyendo sus valores de media, error estadístico y el valor de p.

## Resultados

### pH

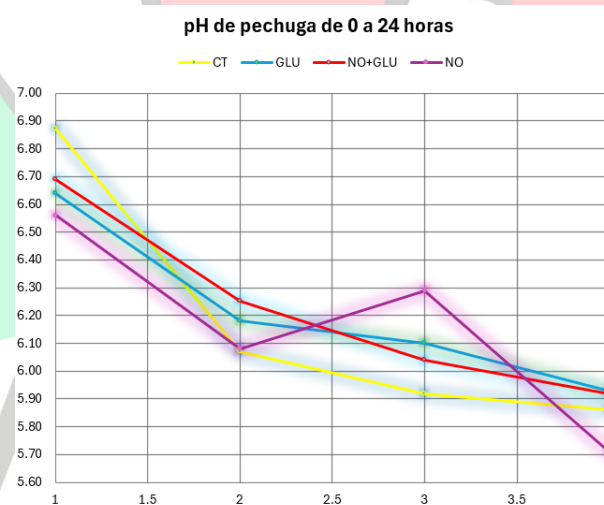
Al evaluar el pH a las 0 horas postmortem se obtuvo una diferencia significativa de los 3 tratamientos respecto a CT, este último con un valor más alto del pH, a su vez también hubo diferencias significativas entre los grupos NO y NO+GLU, con NO presentando los valores más bajos de pH en esta medida de tiempo. La medición a las 2 horas mostró que NO+GLU

mostró el valor más alto con significancia respecto a CT y NO. A las 3 horas de toma del pH se apreció un aumento significativo por parte de NO sobre los otros tratamientos seguido de GLU también con significancia mayor respecto a CT, pero menor que NO. Por último, a las 24 horas los datos demostraron que NO disminuyó su pH siendo significativo, no hubo diferencias en el resto de los grupos. El cuadro 2 resume el comportamiento del pH de los 4 tratamientos a partir de la obtención de los valores de pH y la figura 1 muestra gráficamente tal secuencia.

### Mediciones del pH a lo largo de las primeras 24 horas

Tratamiento	pH 0 hrs	pH 2 hrs	pH 3 hrs	pH 24 hrs
	Media ± E.E.			
CT	6.87 ± 0.0561 <sup>a</sup>	6.07 ± 0.0383 <sup>b</sup>	5.92 ± 0.0271 <sup>c</sup>	5.86 ± 0.0280 <sup>a</sup>
GLU	6.64 ± 0.0162 <sup>bc</sup>	6.18 ± 0.0335 <sup>ab</sup>	6.10 ± 0.0259 <sup>b</sup>	5.93 ± 0.0177 <sup>a</sup>
NO	6.56 ± 0.0298 <sup>c</sup>	6.08 ± 0.0316 <sup>b</sup>	6.29 ± 0.1045 <sup>a</sup>	5.71 ± 0.0597 <sup>b</sup>
NO+GLU	6.69 ± 0.0279 <sup>b</sup>	6.25 ± 0.0620 <sup>a</sup>	6.04 ± 0.0308 <sup>bc</sup>	5.92 ± 0.0278 <sup>a</sup>
p value	0.0000	0.0201	0.0011	0.0004

**Cuadro 2.** Valores de la media y E.E. (error estadístico) para las mediciones de pH 0 hrs (cero horas), pH 2 hrs (dos horas), pH 3 hrs (tres horas) y pH 24 hrs (veinticuatro horas). Los valores por columna que no comparten una letra de superíndice indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ )



**Figura 1.** Gráfica de líneas que corresponde a la curva de pH a través del tiempo para cada tratamiento, los números consecutivos 1, 2, 3 y 4 corresponden respectivamente a las mediciones a las 0, 2, 3 y 24 horas.

### Colorimetría en el sistema CIELab

Los valores para la coordenada L\* mostraron un descenso significativo del valor de GLU, es decir que tiende a un color más oscuro de la carne o de menor luminosidad respecto al resto de tratamientos, mismos que no mostraron diferencia significativa entre ellos. La medición de la coordenada a\* no mostró diferencias significativas entre los grupos, aunque GLU y NO+GLU sí difirieron situándose en los extremos superior e inferior (rojo y verde) respectivamente. Por último, la coordenada b\* evaluada indicó que no hay diferencia significativa entre los grupos respecto a CT, pero si existió una diferencia entre los grupos GLU y NO respecto a NO+GLU situándose en valores altos y el más bajo respectivamente (amarillo y azul). En el cuadro 3 se resumen los hallazgos y diferencias de estas mediciones.

### Medición de la colorimetría por las coordenadas L\*, a\* y b\* en pechugas de pollo de los 4 tratamientos

Tratamiento	L*	a*	b*
	Media ± E.E.		
CT	63.04 ± 0.4843 <sup>a</sup>	4.58 ± 0.2310 <sup>ab</sup>	30.44 ± 0.1069 <sup>ab</sup>
GLU	60.16 ± 0.2509 <sup>b</sup>	5.47 ± 0.3632 <sup>a</sup>	32.26 ± 1.2665 <sup>a</sup>
NO	62.88 ± 0.5674 <sup>a</sup>	4.62 ± 0.3530 <sup>ab</sup>	32.02 ± 1.3581 <sup>a</sup>
NO+GLU	62.45 ± 0.6183 <sup>a</sup>	3.94 ± 0.3996 <sup>b</sup>	27.95 ± 0.7563 <sup>b</sup>

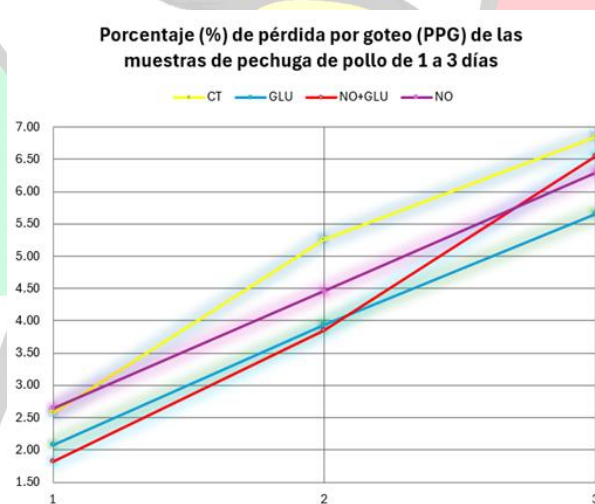
**Cuadro 3.** Valores de la media y E.E. (error estadístico) para las coordenadas L\*, a\* y b\*. Valores por columna que no comparten una letra de superíndice indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### Pérdida por cocción

La prueba de pérdida por cocción (PPC) indicó que hubo una diferencia significativa de NO+GLU que mantuvo una menor pérdida o una mejor retención de agua al ser cocinada la muestra. Por otro lado, NO mostró un peor desempeño con una mayor pérdida por cocción que si bien no fue significativa respecto a CT, fue mayor al resto de grupos y el cuadro 4 muestra los valores que se obtuvieron y su significancia.

### Pérdida por goteo

El análisis de los resultados de esta prueba se expresó en porcentaje (%) y la pérdida por goteo al día 1 (PPG1) indicó que NO+GLU tuvo una menor pérdida por goteo, al segundo día (PPG2), GLU y NO+GLU mostraron un porcentaje menor de pérdida significativo, por último, al día 3 (PPG3) y última evaluación GLU únicamente demostró una menor pérdida por goteo frente al resto de tratamientos y por lo tanto un mejor desempeño en la retención de agua final. El cuadro 4 muestra los valores de la media y error estadístico obtenidos del análisis de los datos. También en la figura 2 se grafica el comportamiento de las pérdidas porcentuales de cada tratamiento.



**Figura 2.** Gráfica de líneas que indica el aumento porcentual a través de los 3 días de medición de la pérdida por goteo

### Dureza de la carne

La ternura o dureza de la carne medida y expresada en Newtons (N) para este trabajo demostró que CT mostró un valor significativamente menor respecto a NO y NO+GLU, pero no para GLU, a su vez, GLU es significativamente menor en dureza que NO, la última columna del cuadro 4 muestra esta comparativa.

### Medición de la pérdida por goteo (PPG), pérdida por cocción (PPC) y dureza de muestras de pechuga de pollo

Tratamiento	PPG1 (%)	PPG2 (%)	PPG3 (%)	PPC (%)	Dureza (N)
	Media ± E.E.				
CT	2.57 ± 0.1682 <sup>ab</sup>	5.25 ± 0.2013 <sup>a</sup>	6.85 ± 0.1211 <sup>a</sup>	33.34 ± 0.7405 <sup>ab</sup>	15.78 ± 0.6686 <sup>c</sup>
GLU	2.07 ± 0.1165 <sup>bc</sup>	3.94 ± 0.1947 <sup>b</sup>	5.65 ± 0.2144 <sup>b</sup>	31.55 ± 0.6623 <sup>b</sup>	16.49 ± 0.4869 <sup>bc</sup>
NO	2.65 ± 0.2286 <sup>a</sup>	4.46 ± 0.2143 <sup>ab</sup>	6.30 ± 0.2740 <sup>ab</sup>	33.76 ± 0.7405 <sup>a</sup>	18.88 ± 0.5807 <sup>a</sup>
NO+GLU	1.82 ± 0.1955 <sup>c</sup>	3.85 ± 0.4038 <sup>b</sup>	6.55 ± 0.6127 <sup>ab</sup>	27.70 ± 0.6982 <sup>c</sup>	18.60 ± 0.9844 <sup>ab</sup>
<i>p value</i>	0.0099	0.0092	0.1977	0.0000	0.0113

**Cuadro 4.** Valores de la media y E.E. (error estadístico) para las mediciones de PPG (pérdida por goteo), PPC (pérdida por cocción) y dureza. Los valores por columna que no compartan una letra de superíndice indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## Discusión y conclusiones

### pH

Los resultados de este estudio revelan que la medición del pH inmediatamente postmortem de la carne de pollo es menor significativamente en los tres tratamientos experimentales (NO, GLU, NO+GLU) frente al grupo CT y a las 24 horas NO se mantuvo con niveles de pH más bajo respecto a todos los tratamientos; en comparativa Wang y colaboradores (2018) evaluando en pollos Lingnan suplementados con glucosa oxidasa y su combinación con *Bacillus amyloliquefaciens* demostró que solamente en el grupo en combinación se redujo significativamente el pH a los 45 minutos postmortem, sin embargo, a las 24 horas no se reportaron diferencias significativas. (26) Stef y colaboradores (2025) reportaron disminución del pH a las 0 horas postmortem comparando el uso de probióticos *B. subtilis* y *B. licheniformis* junto con aceite esencial de árbol de té comercial y la combinación de estos dos con aceite esencial de tomillo, siendo significativamente menor para el primer grupo agregando que a las 24 horas el pH de este grupo también fue el menor de todos los grupos significativamente. (28)

Lo reportado por otros autores es consistente parcialmente con lo aquí descrito, pues si bien las mediciones de pH más inmediatas al sacrificio del ave muestran que la suplementación en conjunto de la glucosa oxidasa y los probióticos disminuyen significativamente, también lo hace la combinación de los probióticos con otros compuestos, además de que a las 24 horas los resultados son variables. El valor normal del pH del músculo de pollo vivo es alrededor de 7.4 y las variaciones ocurren a medida que se transforma en carne. (29) En el músculo de pollo a la 24 horas postmortem el pH se sitúa entre 6.0 y 6.2 (12) aunque otros rangos la establecen ente 5.6 a 5.8 con variaciones según el estrés previo al sacrificio y la técnica del mismo. (28) Este rango nos indica que las diferencias en los valores del pH, aunque significativos no reducen ni lo aumentan para provocar detrimento del producto final. Se sabe que en pollos de engorda, valores de pH muscular por arriba de 6.0 presentan una desnaturalización proteica mínima mientras que valores por debajo de 6.0 contienen una mayor desnaturalización y provoca una apariencia opaca, a mayor pH del músculo más oscura será la carne, dando unos extremos de carnes con pH muy elevado da una pieza oscura, firme y seca mientras que, por el contrario, una carne clara es pálida, blanda y exudativa. También se ha relacionado el pH a la actividad enzimática mitocondrial, a la terneza y la capacidad de retención de agua. (14)

### Colorimetría

Respecto a la colorimetría, nuestros resultados indican que para la coordenada  $L^*$  hubo una disminución por parte del tratamiento GLU como hallazgo principal; Wang y colaboradores (2018) no encontraron diferencias significativas en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  al comparar enramicina, glucosa oxidasa como suplemento y la combinación de esta con *B. amyloliquefaciens*. (26) Tampoco Biswas y colaboradores (2023) no hallaron diferencias significativas para las mediciones de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  al usar *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* (30) mientras que Chunyan y colaboradores (2014) no encontraron diferencias significativas para el eje  $L^*$ , si se demostró que el valor de  $a^*$  fue mayor y el de  $b^*$  menor significativamente respecto al control con el uso de glucosa oxidasa en conjunto con levadura de selenio. (31)

Contrastando con nuestros resultados, no son consistentes entre sí respecto a los valores de  $L^*$  pero si para  $a^*$  y  $b^*$  en los que la mayoría de los autores no indican significancia. El color es muy importante para la percepción de los consumidores de frescura y calidad. Popova (2017) cita que el enrojecimiento de la carne les es más favorable a los consumidores y valores más bajos de  $b^*$  indican una carne menos pálida. (19) El contenido de mioglobina y el pH del tejido muscular son dos factores de importancia que determinan el color de la carne. Los cambios en el color se pueden explicar debido a la mejora de la integridad intestinal y la absorción de nutrientes incluyendo pigmentos como carotenoides y xantofilas y que aumentan los valores de  $b^*$ , mientras que para  $a^*$  se puede atribuir a una mayor circulación, mayor actividad enzimática antioxidante y estabilidad de la mioglobina. El oscurecimiento de la carne sugiere que retiene mejor el pigmento muscular. (32)

### **Pérdida por cocción**

La pérdida por cocción registrada aquí demostró que es menor para NO+GLU significativamente; y de acuerdo con lo reportado por Biswas y colaboradores (2023) reportan una disminución considerable de este parámetro al adicionar probióticos *B. subtilis* y *B. licheniformis* en conjunto. (30) Por su parte Al-Abdullatif y colaboradores (2025) no reportaron diferencia al utilizar *B. subtilis*, pero al utilizar el probiótico con múltiples cepas que incluyen entre otros *Rhodopseudomonas palustris* y *R. shaeroides* ácido láctico bacteriano y *Saccharomyces cerevisiae*. (29) Este balance muestra una inconsistencia, pues no se encontró evidencia significativa para el uso de glucosa oxidasa en conjunto con probióticos, pero si se sustenta el efecto por sí solo de probióticos de diversas especies por separado o en combinaciones, sugiriendo que serían estos los responsables en buena medida de la disminución de la pérdida por cocción en nuestro caso. La pérdida por cocción comienza a los 40°C y si el pH es menor, comienza a menor temperatura, se explica por los cambios en la estructura de la carne, se sabe que a los 46°C el agua dentro de las miofibrillas disminuye mientras que en el espacio intermiofibrilar aumenta, proteínas como la actina y miosina se desnaturalizan y hacen que la carne se endurezca, explicando los cambios en la distribución del agua y el inicio de la pérdida. La desnaturalización de la mioglobina propicia el cambio de color. (15) Al incrementar la capacidad de retención de agua de la carne agregando probióticos, puede ser un beneficio, pues se sabe que esta afecta la cantidad de proteínas musculares, así como cambios en la composición de ácidos grasos y contribuyen a la terneza de la carne. Esto indica que los probióticos tienen la capacidad de retener más humedad de la carne que los antibióticos. (33) Los consumidores preferirán un producto que pueda mantener la humedad durante la cocción para que no esté muy seco ni correoso, Es esencial retener agua en la carne para obtener un mayor rendimiento de producción. La pérdida del peso perdido en este proceso es principalmente agua y pequeñas cantidades de proteínas hidrosolubles y lípidos, el objetivo es reducir esa pérdida para evitar una concentración de las proteínas de las fibras musculares, a mayor concentración de las fibras, más dura será la carne. (15)

### **Pérdida por goteo**

Nuestros resultados mostraron un mejor desempeño de NO+GLU al día 1 y 2 y de GLU al día 2 y 3, medido a través de una menor pérdida por goteo y de importancia la medición final (PPG3), al respecto Wang y colaboradores (2018) por medio del prensado con papel filtro, estimó que la pérdida por goteo a las 24 horas no mostró significancia al usar glucosa oxidasa ni su combinación con *Bacillus amyloliquefaciens* respecto al grupo control, pero si hubo una disminución significativa al compararlo con el uso de enramicina. (26) Por su parte Biswas y colaboradores (2023) evaluando el efecto de *B. subtilis* y *B. licheniformis* no encontraron diferencias significativas para la pérdida por goteo al día 1 y al día 3. (30) Esto indica que hay una contradicción a lo reportado por los autores y lo hallado aquí, se sugiere que la diferencia en los métodos de estimación de la pérdida por goteo influyeron en los resultados finales, aún así el resultado que pone con una mejor capacidad de retención de agua a NO+GLU en las primeras horas y GLU al final debería establecer nuevas investigaciones sobre el efecto de la glucosa oxidasa y las dos cepas de probióticos usadas, así como volver a evaluar por otros métodos el efecto únicamente de la enzima en la pérdida por goteo.

### **Dureza**

Los resultados mostraron que NO y NO+GLU aumentaron la dureza de la carne mientras que CT se mantuvo como la de mayor terneza. Wang y colaboradores (2018) encontraron que la fuerza de corte en muestras de pechuga de pollo fue menor en el grupo suplementado con glucosa oxidasa y *B. amyloliquefaciens* (26) mientras que Chunyan y colaboradores (2014) no hallaron diferencia significativa en la fuerza de corte en pollos Arbor Acres de 42 días suplementados con glucosa oxidasa y levadura de selenio. (31) Estos hallazgos contradicen datos similares consultados, se ha estudiado que los probióticos aumentan la actividad de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, disminuyendo niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que también disminuyen el daño de la membrana celular muscular, preservando la mioglobina y mejorando aspectos como el color y reduciendo la pérdida por goteo. (27) La terneza de la carne es el factor de más importancia para determinar la satisfacción del consumidor, esta se puede afectar negativamente por el tratamiento térmico al disminuir el contenido de agua. (34)

Estas diferencias halladas sugieren que la combinación NO+GLU pueden tener un efecto conjunto que vaya en detrimento de la terneza de la carne, así mismo NO manteniéndose como el grupo con mayor dureza de la carne puede significar que por sí mismo los probióticos tienen un efecto menor que su combinación con una gran variedad de suplementos en la terneza de la carne. También no se descartan las diferencias experimentales como lo son las líneas de pollos de engorda diferentes, las concentraciones de los suplementos, el método de estimación de la fuerza de corte, que para este estudio se realizó con las muestras de pechuga crudas a comparación de técnicas más comunes en las que se mide este parámetro

con las muestras cocinadas. Por último, también es importante destacar que como se abordó anteriormente, ligado a la PPC menor de NO+GLU se puede relacionar a una mayor concentración de fibras musculares y tener este efecto en la dureza registrada, lo que abre nuevas líneas de investigación para determinar el contenido proteico de los productos cárnicos.

En conclusión, la evaluación de los 4 tratamientos generó resultados que los colocan con un mejor desempeño según la prueba, no existió un grupo que indicara una mejor calidad para todos los parámetros fisicoquímicos de calidad que se evaluaron, sin embargo, se reconoce que la combinación NO+GLU tiene potencial al mejorar una mayor cantidad de parámetros como lo fueron la reducción de la pérdida por goteo al día 1 y 2, de la pérdida por cocción y el aumento de la dureza de la pechuga de pollo. Los comparativos con otros trabajos muestran que hay consistencias en los hallazgos parcialmente, por lo que, aunque se tenga documentado la mejora en la calidad de la carne por parte de probióticos y enzimas, se deben abrir nuevas líneas de investigación para considerar el efecto solo en conjunto de estos suplementos, además de la gran variedad de minerales, extractos vegetales y microorganismos con los que se suplementa a los pollos. El uso de NO y GLU parece indicar que en ciertos parámetros mejora la calidad mientras que en otros como en el pH y la colorimetría uno predomina sobre otro, quizás por el efecto en solitario del suplemento y que se habrá de dilucidar en futuras investigaciones.

#### Referencias

1. Estévez-Moreno LX, Miranda-de la Lama GC. Meat consumption and consumer attitudes in México: Can persistence lead to change? *Meat Sci.* 1 de noviembre de 2022;193:108943.
2. jorge.lopez@sader.gob.mx. Dirección General del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | SADER | gob.mx. [citado 9 de diciembre de 2025]. Panorama Agroalimentario | DGSIAPI | SADER | gob.mx. Disponible en: [https://nube.agricultura.gob.mx/panorama\\_siapi/](https://nube.agricultura.gob.mx/panorama_siapi/)./index.html
3. Rebollar S, Posadas Domínguez RR, Rebollar S, Posadas Domínguez RR. Evaluación de los efectos de un cupo de importación al mercado regional y nacional de pollo en México. *Econ Teoría Práctica.* diciembre de 2023;(59):185-203.
4. Zahniser S, Hansen J. Meat Consumption in Mexico, Led by Poultry, Will Continue Rising Over Next Decade, USDA Projections Show. *Amber Waves Econ Food Farming Nat Resour Rural Am.* 1 de agosto de 2024;1-3.
5. Bustamante-Lara TI, Téllez-Sánchez F, Rodríguez-Haros B, Vargas-Canales JM, Reyes-Barrera DM, Rosas-Vargas R, et al. ¿Es México competitivo en el comercio internacional de carne de pollo? *Estud Soc Rev Aliment Contemp Desarro Reg [Internet].* junio de 2023 [citado 9 de diciembre de 2025];33(61). Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2395-91692023000100114&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2395-91692023000100114&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
6. Portillo-Salgado R, Herrera-Haro JG, Bautista-Ortega J, Cigarroa-Vázquez FA. Relationships between technological and nutritional meat quality traits in native Mexican Meleagris gallopavo gallopavo L. *Agro Product [Internet].* 2023 [citado 15 de diciembre de 2025]; Disponible en: <https://ageconsearch.umn.edu/record/353964>
7. Miranda-de La Lama GC, Estévez-Moreno LX, Sepúlveda WS, Estrada-Chavero MC, Rayas-Amor AA, Villarroel M, et al. Mexican consumers' perceptions and attitudes towards farm animal welfare and willingness to pay for welfare friendly meat products. *Meat Sci.* marzo de 2017;125:106-13.
8. Grisolia S. La Gripe Aviaria: Un reto de salud pública [Internet]. Vol. 60. Univ de Castilla La Mancha; 2006 [citado 15 de diciembre de 2025]. Disponible en: [https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=mUg\\_mHtUbjwC&oi=fnd&pg=PA11&dq=la+gripe+aviaria:+un+reto+de+salud+p%C3%BAblica&ots=oLGHF58SWe&sig=4PuqhQJTBdQv3CRWlaHrK-jmk-A](https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=mUg_mHtUbjwC&oi=fnd&pg=PA11&dq=la+gripe+aviaria:+un+reto+de+salud+p%C3%BAblica&ots=oLGHF58SWe&sig=4PuqhQJTBdQv3CRWlaHrK-jmk-A)
9. Purslow P. Introduction to meat quality. En: *New Aspects of Meat Quality [Internet].* Elsevier; 2022 [citado 15 de diciembre de 2025]. p. 1-12. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323858793000313>
10. Mullen AM. New techniques for analysing raw meat quality. 2002 [citado 15 de diciembre de 2025]; Disponible en: <https://www.cabdigitalibrary.org/doi/full/10.5555/20023153044>
11. Kumar P, Verma AK, Umaraw P, Mehta N, Sazili AQ. Processing and preparation of slaughtered poultry. En: *Postharvest and postmortem processing of raw food materials [Internet].* Elsevier; 2022 [citado 17 de diciembre de 2025]. p. 281-314. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128185728000061>
12. Owens CM. Poultry meat processing [Internet]. CRC Press; 2010 [citado 18 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=TjjOBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=poultry+meat+processing+second+edition+owens&ots=54Zd76yXh3&sig=1x6e86MvgQQ4MRgGeHlOD0UizmY>
13. Przybylski W, Hopkins D. Meat quality: Genetic and environmental factors [Internet]. CRC Press; 2015 [citado 18 de diciembre de 2025]. Disponible en: [https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=j9iYcGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=meat+quality+genetic+and+enviromental+factors&ots=M\\_xz\\_svekw&sig=hqWUlc4yR6712RNgJafTKZGmH3U](https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=j9iYcGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=meat+quality+genetic+and+enviromental+factors&ots=M_xz_svekw&sig=hqWUlc4yR6712RNgJafTKZGmH3U)
14. Richardson RI, Mead GC. Ciencia de la Carne de Ave. 2001 [citado 19 de diciembre de 2025]; Disponible en: <https://www.sidalc.net/search/Record/dig-odepa-123456789-58244/Description>
15. Devine C, Dikeman M. Encyclopedia of meat sciences [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 19 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=vL9dAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=encyclopedia+of+meat+science+second+edition&ots=G9s46b8Q0h&sig=yklzkb123IQhGV50nXWOqmNwak0>
16. Nollet LML, editor. Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality [Internet]. 1.a ed. Wiley; 2012 [citado 19 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118352434>
17. Korver DR. Review: Current challenges in poultry nutrition, health, and welfare. *animal.* 1 de junio de 2023;17:100755.
18. Hossain MT, Sardar D, Afsana S, Datta M, Habib MdA. Comparative analysis between multi-strain probiotics and antibiotic as starter feed supplement of poultry on growth performance, serum metabolites and meat quality. *Vet Anim Sci.* 1 de junio de 2024;24:100346.
19. Popova T. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Curr Opin Food Sci.* 1 de abril de 2017;14:72-7.
20. Abun null A, Yahdiyani null N, Indriani null NP. The potential of various types of bacteria as probiotics in poultry. *World J Adv Res Rev.* 30 de enero de 2025;25:658-61.
21. Gao S, Zhang L, Zhu D, Huang J, Yang J, Jiang J, et al. Effects of glucose oxidase and bacillus subtilis on growth performance and serum biochemical indices of broilers exposed to aflatoxin B1 and endotoxin. *Anim Feed Sci Technol.* 1 de abril de 2022;286:115186.

22. Al-Khalaifah H, Mushtaq M, Shoib M, Ullah I, Shah M, Naz S, et al. Mitigating Heat Stress in Broilers: Effects of *Bacillus subtilis* Probiotic and Garlic (*Allium sativum*) Supplementation on Growth Performance, Antioxidant Status, Cecal Microbiota and Immune Response. *Poult Sci.* 1 de noviembre de 2025;104(11):105795.
23. Zhu J, Deng H, Xing L, Luo J, Chen T, Sun J, et al. Vertical transmission of eggshell microbiota modulates preservation efficiency: Metabolites from *Bacillus subtilis* as a novel shelf-life extension strategy. *Int J Food Microbiol.* 2 de enero de 2026;444:111450.
24. Chen X, Zheng A, Chen Z, Yang P, Chen J, Zou Z, et al. Mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* on alleviating lipopolysaccharide-induced oxidative stress in broilers. *Anim Nutr [Internet].* 6 de noviembre de 2025 [citado 22 de diciembre de 2025]; Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654525001611>
25. Li C, Cai H, Li S, Liu G, Deng X, Bryden WL, et al. Comparing the potential of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC18230 with antimicrobial growth promoters for growth performance, bone development, expression of phosphorus transporters, and excreta microbiome in broiler chickens. *Poult Sci.* 1 de noviembre de 2022;101(11):102126.
26. Wang Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Gong L, Wang B, et al. Direct-fed glucose oxidase and its combination with *B. amyloliquefaciens* SC06 on growth performance, meat quality, intestinal barrier, antioxidative status, and immunity of yellow-feathered broilers. *Poult Sci.* 1 de octubre de 2018;97(10):3540-9.
27. Dong S, Li L, Hao F, Fang Z, Zhong R, Wu J, et al. Improving quality of poultry and its meat products with probiotics, prebiotics, and phytoextracts. *Poult Sci.* 1 de febrero de 2024;103(2):103287.
28. Stef L, Corcionivoschi N, Julean C, Callaway T, Simiz E, Marcu A, et al. Integrative Feeding Strategies with Essential Oils and Probiotics to Improve Raw Meat Quality and Carcass Traits in Broiler Chickens. *Agriculture [Internet].* 12 de noviembre de 2025 [citado 11 de enero de 2026];15(22). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0472/15/22/2356>
29. Al-abdullatif AA, Al-Garadi MA, Qaid MM, Matar AM, Alobre MM, Al-Badwi MA, et al. Effects of multi-strain RISCO-NUTRIFOUR (RNFS) probiotics (with phytochemicals) and their administration mode on breast meat quality, carcass traits and growth efficiency of broilers over a 42-day cycle. *Ital J Anim Sci.* 25 de septiembre de 2025;24(1):2052-63.
30. Biswas S, Kim MH, Baek DH, Kim IH. Probiotic mixture (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) a potential in-feed additive to improve broiler production efficiency, nutrient digestibility, caecal microflora, meat quality and to diminish hazardous odour emission. *J Anim Physiol Anim Nutr.* julio de 2023;107(4):1065-72.
31. Chunyan S. Effects of Compound Additive with Glucose Oxidase and Selenium Yeast on Growth Performance, Antioxidant Capacity and Meat Quality of Broilers. *Chin J Anim Nutr [Internet].* 2014 [citado 9 de enero de 2026]; Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Effects-of-Compound-Additive-with-Glucose-Oxidase-Chunyan/0ab84322d87da8b7904a82f6da662a7baebd3eaf>
32. Berberoğlu TM, Riaz R, Gezer A, Yilmaz B, Karadağ Sari E, Karadağoğlu Ö, et al. Effects of Probiotics (*Bacillus subtilis*), Prebiotics (MOS +  $\beta$ -Glucans) and Their Combination on Growth Performance, Duodenal Histomorphology and Meat Quality in Broiler Chickens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg [Internet].* 2025 [citado 11 de enero de 2026]; Disponible en: [https://vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf\\_KVFD\\_3235.pdf](https://vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf_KVFD_3235.pdf)
33. Susalam MK, Harnentis H, Marlida Y, Jamsari J, Ardani LR. The effect of probiotics consortium isolated from fermented fish (Budu) on broiler performances and meat quality. *Int J Vet Sci.* 2024;13(1):100-7.
34. Haščík P, Trembecká L, Bobko M, Čuboň J, Bučko O, Tkáčová J. Evaluation of meat quality after application of different feed additives in diet of broiler chickens. *Slovak J Food Sci [Internet].* 2015 [citado 11 de enero de 2026];9(1). Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=13380230&AN=178553915&h=8jCXX6uth7dSh4JPRIJ4TtoZlQTCtTmvrNQmBpYFFw%2F%2Fyhs6Cmi7TTxpUtl%2BRMmHVSnTAX5skd7X2Hs98nK4kw%3D%3D&crl=c>



## DISEÑO DE NANOCÁPSULAS CARGADAS CON GERANIOL PARA SU USO CONTRA SALMONELLA INFANTIS: EVALUACIÓN EN UN MODELO AVÍCOLA IN VITRO.

K. S. Garcia Salazar, J. A. Maguey Gonzalez, J. D. Latorre, R. López Arellano, E. A. Morales Hipólito, R. Díaz Torres, A. Vázquez Durán, G. Tellez Isaias, A. Méndez Albores, B. Solis Cruz, D. Hernandez Patlan

Nanotechnology Engineering Division, Polytechnic University of the Valley of Mexico.  
Division of Agriculture, Department of Poultry Science, University of Arkansas.  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México  
Unidad de Investigación Multidisciplinaria L14-A1 (Ciencia y Tecnología de Materiales)  
karla.garcia.salazar@upvm.edu.mx

## Resumen

*Salmonella Infantis* (*S. Infantis*) es una bacteria que ha adquirido relevancia en salud pública durante la última década debido a su alta patogenicidad y resistencia a los antibióticos. Por ello, el objetivo del presente estudio fue presentar consideraciones clave para el diseño y desarrollo de nanocápsulas cargadas con geraniol para su administración en el agua de bebida o en el alimento de pollos de engorda, así como evaluar su potencial como agente antimicrobiano frente a *S. Infantis* mediante un ensayo estándar in vitro en microplaca y un modelo que simula el pH y las condiciones del alimento en el buche de los pollos de engorda. Para ello, se empleó un diseño experimental factorial  $3^k$  para la selección de formulaciones basadas en nanocápsulas de geraniol, cuya actividad antimicrobiana fue evaluada en modelos in vitro. Los resultados demostraron que el geraniol por sí solo presenta acción antimicrobiana frente a *S. Infantis*, atribuida principalmente a su lipofiliidad, hidrofobicidad y a la presencia del grupo hidroxilo en su estructura química; sin embargo, al formularse en sistemas nanocapsulares, la interacción entre sus componentes tiende a reducir dicha acción, particularmente en formulaciones que incluyen la mezcla Tween 80:Span 80 y Miglyol® 810N. Asimismo, el modelo in vitro que simula el buche de los pollos de engorda evidenció interacciones entre la formulación y los componentes del alimento, lo que anuló completamente la acción antimicrobiana del geraniol en comparación con la observada en el modelo in vitro en microplaca. Estos resultados destacan la importancia de realizar estudios de preformulación durante el desarrollo de formulaciones basadas en nanocápsulas para asegurar su eficacia, considerando no solo sus propiedades fisicoquímicas y de estabilidad, sino también las posibles interacciones entre los componentes de la formulación y la matriz de aplicación.

**Palabras clave:** geraniol; nanocápsulas poliméricas libres de solventes; *Salmonella Infantis*; efecto antimicrobiano; estudios de interacción; FTIR-ATR; modelos in vitro; industria avícola

## Abstract

*Salmonella Infantis* (*S. Infantis*) is a bacterium that has gained importance in public health over the last decade due to its increasing prevalence in regions such as the United States of America, Latin America, and the European Union. Furthermore, due to its high pathogenicity and antibiotic resistance, there is a need to research new alternatives for its prevention, control, and treatment. Therefore, the objective of the present study was to present key considerations for the design and development of geraniol-loaded nanocapsules for its delivery in the drinking water or feed of broiler chickens, and to evaluate its potential as an antimicrobial agent against *S. Infantis* using a standard in vitro microplate assay and a model that simulates the pH and feed conditions of the crop of broiler chickens. The results demonstrated that geraniol alone exhibits antimicrobial action against *S. Infantis* mainly due to its lipophilicity, hydrophobicity and the presence of the hydroxyl group found in its chemical structure, but when formulated in nanocapsular systems, the interaction of its components tends to reduce its antimicrobial action, especially the mixture of Tween 80:Span 80 and Miglyol® 810N. Furthermore, the use of the in vitro model that simulates the crop of broiler chickens demonstrated that the formulation also has interactions with the feed components, completely nullifying the antimicrobial action of geraniol compared to that obtained in the in vitro microplate model. In conclusion, preformulation studies during the development of nanocapsule-based formulations should be considered for the correct selection of the components of a formulation to ensure its effectiveness and not only consider the physicochemical and stability properties of these as is frequently considered.

**Keywords:** geraniol, solvent-free polymeric nanocapsules, *Salmonella Infantis*, antimicrobial effect, interaction studies, FTIR-ATR, in vitro models, poultry industry.

## 1. Introducción

Las infecciones por *Salmonella* no tifoidea se consideran una importante amenaza para la salud pública, derivadas principalmente del consumo de productos avícolas contaminados con *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, serotipos

Enteritidis (*S. Enteritidis*) y Typhimurium (*S. Typhimurium*), con una estimación de 94 millones de casos de infección y 215,000 muertes anuales [1], con una estimación de 94 millones de casos de infección y 215,000 muertes anuales [2]. Sin embargo, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar *Infantis* (*S. Infantis*) se ha convertido en un serovar cada vez más prevalente a nivel mundial [3]. Hasta 2019, *S. Infantis* era considerado el sexto serotipo más frecuente de salmonelosis humana en Estados Unidos, mientras que en la Unión Europea ocupaba el cuarto lugar en importancia; no obstante, desde 2014 ha sido el serotipo número uno aislado en pollos de engorda y sus derivados, lo que lo convierte en un patógeno transmitido por alimentos de relevancia en salud pública [4]. Aunque la principal vía de transmisión de este patógeno al ser humano es a través de alimentos contaminados de origen avícola, diversos estudios también han descrito su transmisión a través del agua, la transmisión horizontal entre personas, el contacto con animales infectados y el ambiente, lo que ha contribuido al aumento de su prevalencia [5]. Asimismo, se ha reportado que esta bacteria es resistente a múltiples fármacos y presenta una mayor patogenicidad debido a la presencia de un plásmido emergente que codifica factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos e incluso al mercurio [6].

En este contexto, y considerando los marcos regulatorios de diversas autoridades a nivel mundial respecto al uso de antibióticos, existe una necesidad urgente de investigar nuevas alternativas viables que permitan abordar los problemas de resistencia bacteriana. En este sentido, se han estudiado diversas estrategias para la profilaxis, el control y el tratamiento de infecciones bacterianas en animales, entre las que se incluyen la vacunación, el uso de anticuerpos mono y policlonales, péptidos antimicrobianos, probióticos, prebióticos, bacteriófagos, lisinas, enzimas y ciertos fitoquímicos [7].

Entre las alternativas mencionadas, los fitoquímicos representan una opción viable para combatir los problemas de resistencia bacteriana, ya que han demostrado excelentes propiedades antimicrobianas y antioxidantes [8], [9]. Dentro de este grupo se encuentran los aceites esenciales, compuestos naturales bioactivos derivados de plantas, los cuales han mostrado destacadas propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias [10]. Aunque se han reportado numerosos aceites esenciales con actividad antimicrobiana principalmente frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, en el presente estudio se utilizó el geraniol —un alcohol monoterpénico presente en los aceites esenciales de plantas como rosa, jengibre, limón, naranja, lavanda y cannabis— debido a que, tras una revisión sistemática, se identificó como uno de los compuestos con mejores propiedades antimicrobianas, baja toxicidad y alta seguridad, por lo que es considerado generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) [11], [12]. No obstante, limitaciones como su baja solubilidad en medios acuosos, que se traduce en una reducida biodisponibilidad, su baja estabilidad debido a su rápida hidrólisis, así como su intenso sabor y olor, han condicionado su aplicación en la industria avícola [11]. En este sentido, el uso de tecnologías de microencapsulación o nanoencapsulación ha surgido como una estrategia para superar estas limitaciones [13].

El objetivo de este estudio fue presentar consideraciones clave para el diseño y desarrollo de nanocápsulas cargadas con geraniol para su administración en el agua de bebida o en el alimento de pollos de engorda, así como evaluar su potencial como agente antimicrobiano frente a *S. Infantis* mediante un ensayo estándar *in vitro* en microplaca y un modelo que simula el pH y las condiciones del alimento en el buche de los pollos de engorda. Este enfoque tiene como finalidad asegurar la eficacia en modelos *in vivo*, considerando los principios establecidos en la “FDA Modernization Act 2.0 (29 de diciembre de 2022)”, así como las disposiciones del Parlamento Europeo y de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) en 2021, las cuales, aunque fueron concebidas originalmente para aplicaciones en humanos, podrían adaptarse para su uso en animales [14], [15]

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa CDC H3517 de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar *Infantis* (*S. Infantis*), previamente descrita y seleccionada por su resistencia al ácido nalidíxico (NA, 64 µg/mL, número de catálogo N-4382, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), fue utilizada en el presente estudio [16], [17] Brevemente, se colocaron 100 µL de *S. Infantis* provenientes de un alícuota congelada en 10 mL de caldo tripticasa de soya (TSB, número de catálogo 22092, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y

se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se preparó un subcultivo inoculando 50 µL en 10 mL de TSB fresco, el cual se incubó durante 2 h para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (~6 log UFC/mL). Esta concentración de *S. Infantis* se verificó mediante diluciones seriadas y siembra en agar Xilosa Lisina Tergitol-4 (XLT-4, número de catálogo 223410, BD Difco™, Sparks, MD, EE. UU.) suplementado con NA, para la enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC) reales en cada ensayo.

## 2.2 Actividad antimicrobiana del geraniol frente a *S. Infantis* mediante el método en microplaca

Para establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del geraniol (98%, 163333, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) frente a *S. Infantis*, se preparó inicialmente una solución stock de geraniol a una concentración de 20,000 ppm utilizando caldo tripticasa de soya (TSB) suplementado con 2% de Tween 80 (grado USP, Droguería Cosmopolita, Naucalpan, Ciudad de México, México), con el fin de promover la dispersión homogénea del aceite esencial. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de suspensiones con concentraciones de 500, 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 ppm de geraniol en TSB con 2% de Tween 80 en placas Bacti de 96 pozos de fondo plano (método en microplaca, número de catálogo 269787; Nalgene Nunc International, Rochester, NY, EE. UU.), seguidos de 100 µL de una suspensión bacteriana con una concentración de 4.3 log UFC/mL, para alcanzar una concentración final de 4 log UFC/mL en cada pozo. Las concentraciones finales de geraniol evaluadas fueron 250, 500, 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm. El TSB con 2% de Tween 80 se utilizó como control. Las placas se incubaron durante dos horas a 37 °C con agitación orbital (19 rpm; VWR, Houston, TX, EE. UU.). Finalmente, para evaluar la actividad antimicrobiana, se realizaron diluciones decimales, se sembraron en medio selectivo XLT-4 suplementado con NA y se incubaron a 37 °C durante 18–24 h para la enumeración del total de *S. Infantis* (log UFC/mL). La reducción en los recuentos de *S. Infantis* se determinó mediante la diferencia entre los recuentos (log UFC/mL) del grupo control y los tratamientos. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## 2.3 Desarrollo y selección de formulaciones de geraniol basadas en nanocápsulas poliméricas

Las nanocápsulas poliméricas que contienen geraniol se prepararon en dos etapas: (1) la formación de una nanoemulsión (núcleo) mediante agitación magnética (1000 rpm, IKA RO 10 Power, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) a temperatura ambiente durante un minuto, entre la fase oleosa constituida por geraniol, Miglyol® 840 (dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, Dynamit Nobel, Witten, Alemania) y una mezcla de surfactantes Tween 80:Span 80 en proporción 80:20 (grado USP, Droguería Cosmopolita, Naucalpan, Ciudad de México, México), y la fase acuosa constituida por un tampón fosfato 0.2 M pH 6.0; y (2) la deposición de Drugcoat E PO (Vikram Thermo, Gujarat, India) como polímero formador de la cubierta sobre el núcleo, a través de interacciones electrostáticas. El sistema nanocapsular descrito en este estudio se basa en un método previamente reportado por nuestro grupo de investigación [18], con la ventaja adicional de eliminar la necesidad del uso de solventes orgánicos.

La selección de las formulaciones se llevó a cabo mediante un diseño experimental factorial 3<sup>k</sup>, optimizado a 15 formulaciones con 3 puntos centrales para su validación (Tabla Suplementaria S1), considerando como factores Miglyol® 840 (0.5, 1 y 1.5% v/v), una mezcla 80:20 de Tween 80:Span 80 (1.5, 2 y 2.5% v/v) y Drugcoat E PO (5, 10 y 15 mg/mL). El geraniol se mantuvo constante a 1% (v/v) y el volumen total de cada formulación fue de 5 mL. Las variables de respuesta consideradas fueron el tamaño de partícula (nm), el índice de polidispersión (PDI), el potencial zeta (mV) y la eficiencia de encapsulación (EE).

## 2.4 Caracterización fisicoquímica

Los sistemas nanocapsulares cargados con geraniol obtenidos a partir del diseño experimental fueron caracterizados en términos de tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta, utilizando un equipo Malvern Zetasizer (ZetaSizer Pro, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

### 2.4.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI)

El tamaño de partícula y el índice de polidispersión (PDI) se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), tras la dilución de las formulaciones en tampón fosfato 0.2 M pH 6.0 (1:40), con el fin de mantener las características de los sistemas nanocapsulares y reducir los efectos de viscosidad y dispersión. El análisis se realizó en una celda desechable DTS1070 a 25 °C, utilizando un ángulo de detección por retrodispersión de 173° y considerando índices de refracción y absorción de 1.30 y 0.001, respectivamente. En cada determinación se realizaron 11 corridas para obtener una lectura estable.

### 2.4.2 Potencial zeta

El potencial electrocinético de las formulaciones se determinó mediante velocimetría láser Doppler (LDV), la cual calcula valores promedio de movilidad electroforética. Brevemente, las formulaciones se diluyeron adecuadamente para evitar desplazamientos de carga (1:40 en tampón fosfato 0.2 M pH 6.0). Las determinaciones se llevaron a cabo a 25 °C, con un periodo de equilibración de 120 s. Cada muestra se analizó por triplicado y cada medición comprendió 11 corridas para obtener una lectura estable. Los resultados se analizaron utilizando el software ZS Xplorer versión 3.2.1.11 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Reino Unido).

### 2.4.3 Eficiencia de encapsulación

La cuantificación del geraniol en las formulaciones se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis (espectrofotómetro UV-Vis, Varian, Cary 100 Tablet, Mulgrave, Australia). Para cada formulación, se colocaron 0.5 mL de la formulación en tubos Eppendorf de 2 mL, seguidos de la adición de 0.5 mL de HCl 2 M y 1 mL de acetonitrilo (ACN), con el fin de lograr la separación completa de los componentes de la formulación y el geraniol. Las mezclas se agitaron en vórtex durante 15 s y posteriormente se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 min a 20 °C (Microfuge R20, Beckman Coulter Life Sciences, Palo Alto, CA, EE. UU.). Posteriormente, se tomaron 0.015 mL del sobrenadante y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL, seguido de la adición de 2.5 mL de una mezcla 50:50 de ACN y tampón fosfato 0.2 M (pH 6.0), previamente ajustada a pH 1.2 con HCl 2 M. Finalmente, la solución resultante se agitó en vórtex durante 15 s para asegurar su completa homogenización. El geraniol se detectó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 210 nm.

La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó mediante un enfoque de cuantificación en dos etapas. Para ello, el geraniol total se cuantificó inicialmente en cada una de las formulaciones líquidas utilizando la metodología previamente descrita. Para la cuantificación del geraniol encapsulado en los sistemas nanocapsulares poliméricos, las formulaciones líquidas se congelaron a -80 °C (congelador DR) y posteriormente se liofilizaron (LabConco Freezone 4.5, Kansas City, MO, EE. UU.) durante 12 h a -49 °C y bajo un vacío de 1.370 mBar. Las formulaciones liofilizadas se rehidrataron en el volumen correspondiente (considerando el volumen de la formulación liofilizada) y se procesaron de manera idéntica a la cuantificación del geraniol total. El porcentaje de encapsulación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{A}{B} \times 100$$

donde **A** corresponde a la concentración de geraniol en las formulaciones liofilizadas y **B** a la concentración total de geraniol en las formulaciones líquidas.

## 2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las formulaciones mediante ensayos en microplaca

La capacidad antimicrobiana de las dos mejores formulaciones obtenidas (F3 y F9), considerando un tamaño promedio de partícula ( $\leq 125$  nm), un índice de polidispersión (PDI) menor a 0.1 y una mayor eficiencia de encapsulación, se evaluó en placas Bacti de 96 pozos de fondo plano. Las concentraciones de geraniol evaluadas fueron de 1000 y 3000 ppm, y la formulación correspondiente a 3000 ppm pero sin geraniol se consideró como blanco. Para alcanzar dichas concentraciones, se realizaron diluciones de las formulaciones en caldo tripticasa de soja (TSB). La concentración de S.

Infantis utilizada en el estudio fue de aproximadamente 4 log UFC/mL. Una vez que las formulaciones estuvieron en contacto con *S. Infantis*, las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C con agitación orbital (20 rpm; VWR, Houston, TX, EE. UU.). Posteriormente, se realizaron diluciones decimales, se sembraron en medio selectivo XLT-4 suplementado con NA y se incubaron a 37 °C durante 12 h para la enumeración del total de *S. Infantis* (UFC). En esta evaluación, el control fue TSB con 2% de Tween 80 y el blanco fue la formulación F3 sin geraniol. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## 2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las formulaciones mediante un modelo que simula el buche de pollos de engorda

Se desarrolló un modelo in vitro para simular el pH y las condiciones de alimentación del buche de los pollos de engorda, siguiendo protocolos previamente publicados [19], con ligeras modificaciones. Para ello, se colocaron 3 g de alimento comercial (Nutrición Técnica Animal S.A. de C.V., Querétaro, México), con un contenido de proteína del 26% (12.64 MJ/kg de energía metabolizable), y 10 mL de tampón citrato 0.1 M pH 5.0 en tubos de centrifugación de polipropileno de 50 mL. Posteriormente, se añadieron los volúmenes correspondientes de las formulaciones para alcanzar concentraciones de geraniol de 300 y 3000 ppm en tubos independientes, incluyendo también un blanco para cada concentración. De igual forma, se añadió el volumen correspondiente de una suspensión bacteriana de *S. Infantis* para alcanzar una concentración final de 4 log UFC/mL. A continuación, los tubos se incubaron durante 30 min a 40 °C bajo agitación orbital (19 rpm; VWR, Houston, TX, EE. UU.) y con una inclinación de 30°, con el fin de simular las condiciones fisiológicas del buche de los pollos de engorda y facilitar la homogenización. Tras la incubación, el contenido de los tubos se homogenizó mediante agitación en vórtex; posteriormente, se tomaron alícuotas de 0.2 mL, las cuales se colocaron en placas Bacti de 96 pozos de fondo plano para realizar diluciones decimales, siembra en medio selectivo XLT-4 suplementado con NA e incubación a 37 °C durante 12 h, con el objetivo de enumerar el total de *S. Infantis* (UFC). En esta evaluación, el control fue TSB con 2% de Tween 80 y los blancos correspondieron a las formulaciones F3 y F9 sin geraniol. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## 2.7 Estudios de interacción de los componentes de la formulación

### 2.7.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

Los estudios de interacción entre los componentes que conforman los sistemas nanocapsulares se llevaron a cabo mediante FTIR-ATR, considerando únicamente las proporciones de cada uno de ellos presentes en la formulación F9, ya que fue la formulación que presentó el menor tamaño de partícula y la que contenía la mayor proporción de la mezcla Tween 80:Span 80 y Miglyol® 840, en comparación con la formulación F3. En este sentido, se adquirieron los espectros FTIR de geraniol, Miglyol® 840, la mezcla 80:20 de Tween 80:Span 80 y Drugcoat E PO, así como de sus mezclas, incluyendo Geraniol:Tween 80:Span 80, Miglyol® 840:Tween 80:Span 80, Geraniol:Tween 80:Span 80:Drugcoat E PO, Miglyol® 840:Tween 80:Span 80:Drugcoat E PO y la formulación completa. Los espectros se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro FTIR NIR/MIR (Perkin Elmer, Norwalk, CA, EE. UU.) equipado con una unidad ATR de diamante Miracle, con un rango de escaneo de 4000 a 450 cm<sup>-1</sup>, un promedio de 32 barridos y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Para cada muestra se generó un espectro de fondo y se realizó una corrección de línea base, con el fin de facilitar la comparación y establecer posibles interacciones entre los componentes.

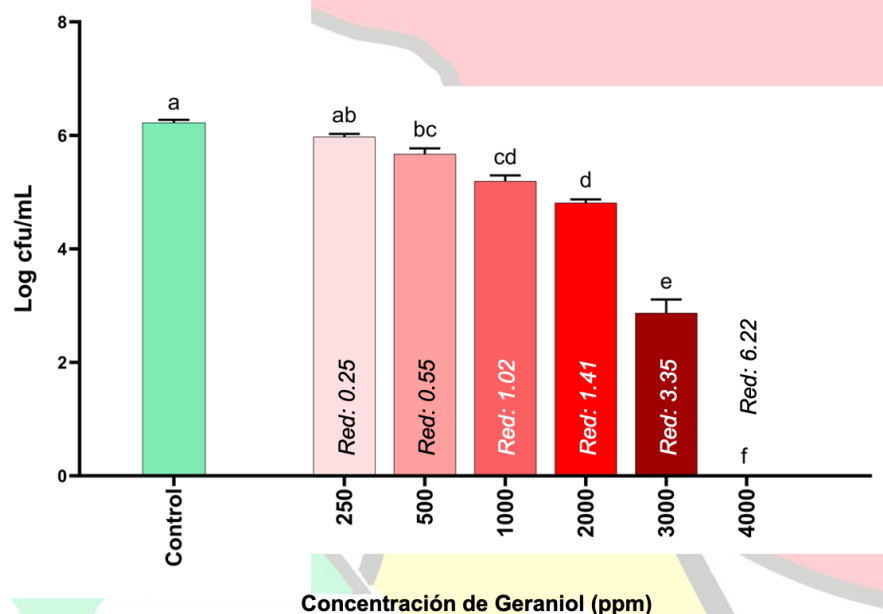
### 2.7.2 Actividad antimicrobiana en el modelo que simula el buche de pollos de engorda

La capacidad antimicrobiana de las mezclas de geraniol—Tween 80:Span 80, Miglyol® 840—Tween 80:Span 80, geraniol—Miglyol® 840—Tween 80:Span 80, geraniol—Tween 80:Span 80—Drugcoat E PO, Miglyol® 840—Tween 80:Span 80—Drugcoat E PO y geraniol—Miglyol® 840—Tween 80:Span 80—Drugcoat E PO (Formulación 9) se evaluó en el modelo in vitro que simula el buche de los pollos de engorda, bajo las mismas consideraciones empleadas para las formulaciones completas en el ensayo estándar en microplaca, ajustando las concentraciones de geraniol a 3000 ppm. El control utilizado en esta evaluación fue tampón citrato pH 5.0. Cada ensayo se realizó por triplicado.

### 3. Resultados

#### 3.1 Actividad antimicrobiana del geraniol frente a *S. Infantis* mediante el método en microplaca

Los resultados de la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de geraniol frente a *S. Infantis* se muestran en la Figura 1. Los resultados evidenciaron diferencias significativas a partir de concentraciones de geraniol de 500 ppm en comparación con el control (TSB con 2% de Tween 80). De hecho, las diferencias significativas más pronunciadas se observaron a una concentración de geraniol de 3000 ppm, ya que esta fue capaz de reducir los recuentos de *S. Infantis* en más de la mitad (3.35 log UFC/mL) en comparación con el control. Cabe destacar que, a una concentración de geraniol de 4000 ppm, los recuentos de *S. Infantis* se redujeron completamente (6.22 log UFC/mL), estableciéndose esta concentración como la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los ensayos posteriores.



**Figura 1.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del geraniol frente a *S. Infantis* mediante un modelo in vitro en microplaca. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE. Las barras con diferentes literales se consideran estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ );  $n = 3$ .

#### 3.2 Desarrollo y selección de formulaciones de geraniol basadas en nanocápsulas poliméricas

La Tabla Suplementaria S1 muestra la matriz experimental del diseño factorial  $3^k$ , considerando los niveles codificados y no codificados de cada factor; sin embargo, para la evaluación del diseño se utilizó la matriz no codificada. Asimismo, la Tabla Suplementaria S1 presenta los resultados de las variables de respuesta de cada formulación (tamaño de partícula, PDI, potencial zeta y EE), destacando que las formulaciones 3, 10 y 13 correspondieron a los puntos centrales del diseño para su validación.

Los efectos de cada factor (%) evaluados en el diseño experimental, considerando los coeficientes del modelo para cada variable estudiada, se muestran en la Figura 2. El tamaño de partícula de las formulaciones osciló entre 73.6 y 273.0 nm. Factores como Drugcoat E PO, la mezcla Tween 80:Span 80 y el efecto cuadrático de Miglyol® 840 mostraron un efecto positivo significativo sobre el tamaño de partícula ( $p < 0.05$ ), mientras que Miglyol® 840 y la interacción Miglyol® 840—

Drugcoat E PO presentaron un efecto negativo, es decir, tendieron a reducir significativamente el tamaño de partícula ( $p < 0.05$ ) (Figura 2A). La ecuación del modelo fue la siguiente:  $\text{Tamaño de partícula} = 132.494 - 82.6786(\text{Miglyol}^{\circledR} 840) + 10.75(\text{Tween}80:\text{Span}80) + 28.0625(\text{Drugcoat E PO}) + 26.5411(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)^2 - 19.5(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)(\text{Drugcoat E PO})$

El coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  ajustado) del modelo fue de 94.77%, lo que indicó que el modelo explicó adecuadamente la variabilidad de la respuesta y, por lo tanto, permitió identificar de manera eficiente las condiciones necesarias para obtener un tamaño de partícula determinado.

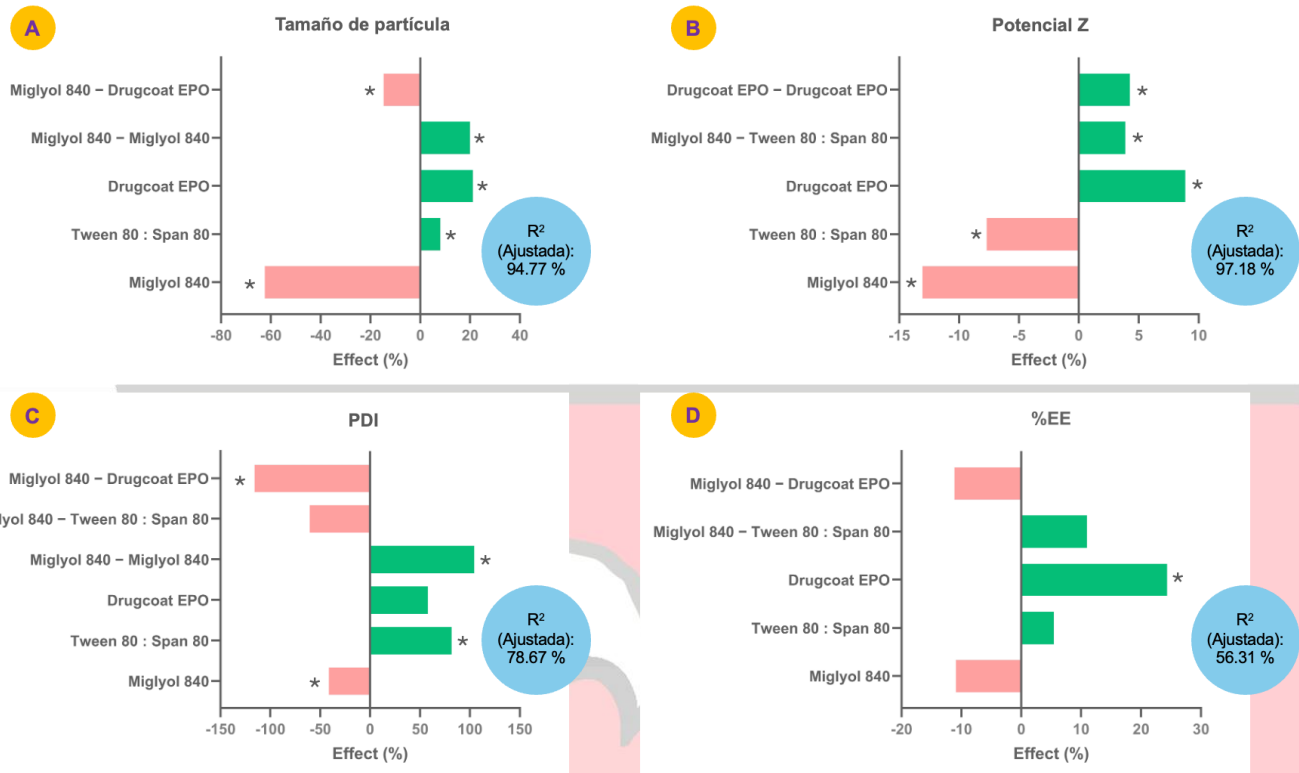
En el caso del índice de polidispersión (PDI), los valores obtenidos oscilaron entre 0.03 y 0.27. Los factores que incrementaron significativamente este parámetro fueron la proporción Tween 80:Span 80 y el efecto cuadrático de Miglyol<sup>®</sup> 840 (Figura 2B). Por el contrario, Miglyol<sup>®</sup> 840 y la interacción Miglyol<sup>®</sup> 840—Drugcoat E PO presentaron un efecto negativo sobre el PDI, es decir, contribuyeron a una reducción significativa de este parámetro. El modelo presentó un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  ajustado) de 78.67%, y su ecuación fue:  $\text{PDI} = 0.0488036 - 0.0201036(\text{Miglyol}^{\circledR} 840) + 0.039825(\text{Tween } 80:\text{Span } 80) + 0.0282625(\text{Drugcoat E PO}) + 0.0509036(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)^2 - 0.029525(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)(\text{Tween } 80:\text{Span } 80) - 0.056525(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)(\text{Drugcoat E PO})$ .

El modelo que describió la variabilidad del potencial zeta mostró un  $R^2$  ajustado de 97.18%. Los factores que incrementaron significativamente este parámetro fueron Drugcoat E PO, el efecto cuadrático de Drugcoat E PO y la interacción Miglyol<sup>®</sup> 840—Drugcoat E PO, lo cual era esperable considerando que Drugcoat E PO constituye la capa más externa de la nanocápsula y, por lo tanto, es el componente que mayor influencia ejerce sobre la estimación del potencial zeta (Figura 2C).

La ecuación del modelo correspondiente fue:  $\text{Potencial zeta} = 13.5 - 1.7625(\text{Miglyol}^{\circledR} 840) - 1.0375(\text{Tween } 80:\text{Span } 80) + 1.2(\text{Drugcoat E PO}) + 0.525(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)(\text{Tween } 80:\text{Span } 80) + 0.575(\text{Drugcoat E PO})^2$ .

En cuanto a la eficiencia de encapsulación (%EE), únicamente Drugcoat E PO presentó un efecto significativo, incrementando dicho parámetro (Figura 2D). Sin embargo, el modelo mostró un  $R^2$  ajustado de 56.31%, lo que indica una capacidad limitada para explicar la variabilidad observada. La ecuación obtenida fue:  $\%EE = 31.3838 - 3.425(\text{Miglyol}^{\circledR} 840) + 1.70945(\text{Tween } 80:\text{Span } 80) + 7.64055(\text{Drugcoat E PO}) + 3.45(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)(\text{Tween } 80:\text{Span } 80) - 3.5(\text{Miglyol}^{\circledR} 840)(\text{Drugcoat E PO})$ . No obstante, los puntos centrales del diseño mostraron resultados consistentes.

AVEM  
Aviespecialistas de México

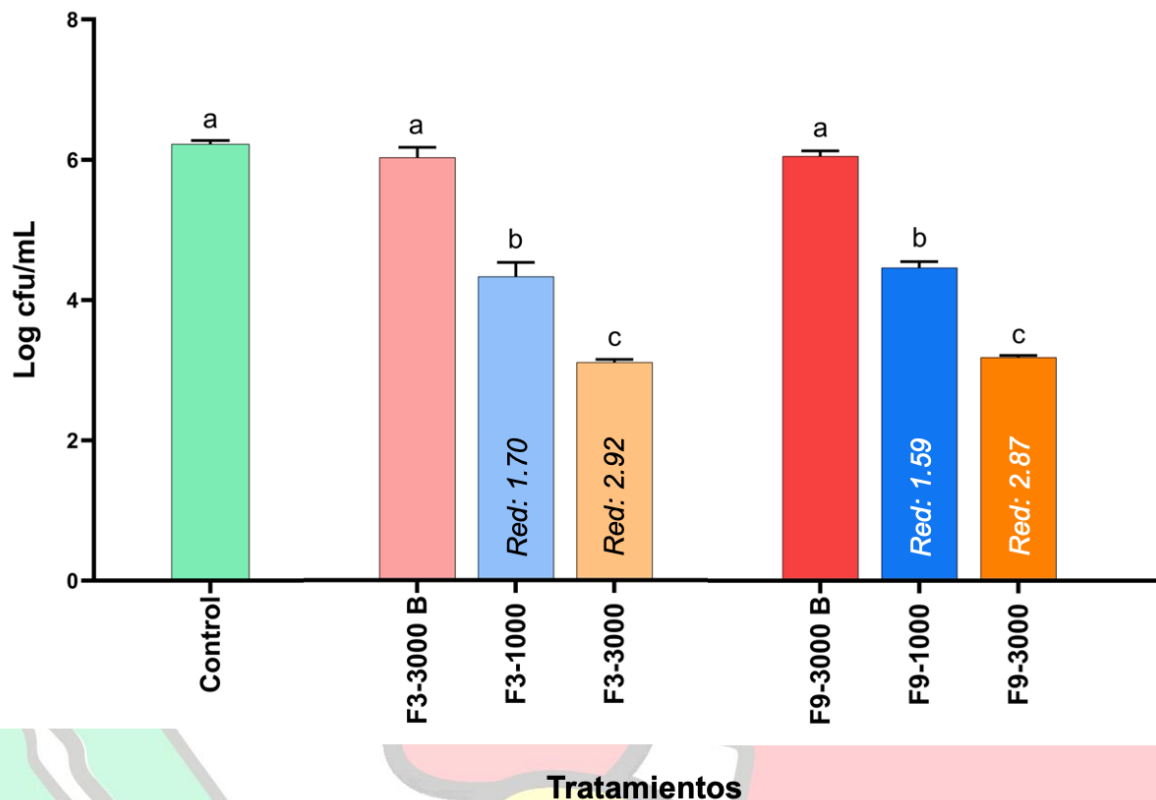


**Figura 2.** Efectos de los factores estudiados en el diseño de experimentos sobre las variables de respuesta: A) Tamaño de partícula (nm), B) Potencial Z (mV), C) Índice de polidispersión (PDI) y D) Eficiencia de encapsulación del geraniol (%), utilizado para optimizar la formulación de nanocápsulas poliméricas de geraniol. \* Indica efectos significativos ( $p < 0.05$ ).

Considerando los resultados del diseño experimental, se seleccionaron dos formulaciones por presentar un tamaño de partícula adecuado ( $<125$  nm) y un PDI inferior a 0.20: la formulación 3 (F3) y la formulación 9 (F9). La formulación F3 presentó un tamaño de partícula de 122.0 nm, un PDI bajo (0.06), un potencial zeta de 12.4 mV y una eficiencia de encapsulación de 40.6%, mientras que la formulación F9 mostró un tamaño de partícula menor (89.6 nm), aunque con un PDI ligeramente mayor (0.12), un potencial zeta de 11.0 mV y una %EE de 49.2% (Tabla Suplementaria S1). Aunque otras formulaciones, como F8, presentaron valores más elevados de eficiencia de encapsulación, no fueron seleccionadas debido a su mayor tamaño de partícula (273.0 nm) y PDI (0.27), parámetros asociados a una menor estabilidad y a una menor homogeneidad de tamaño de las nanocápsulas, respectivamente.

### 3.3 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Formulaciones Obtenidas Mediante Ensayos en Microplaca

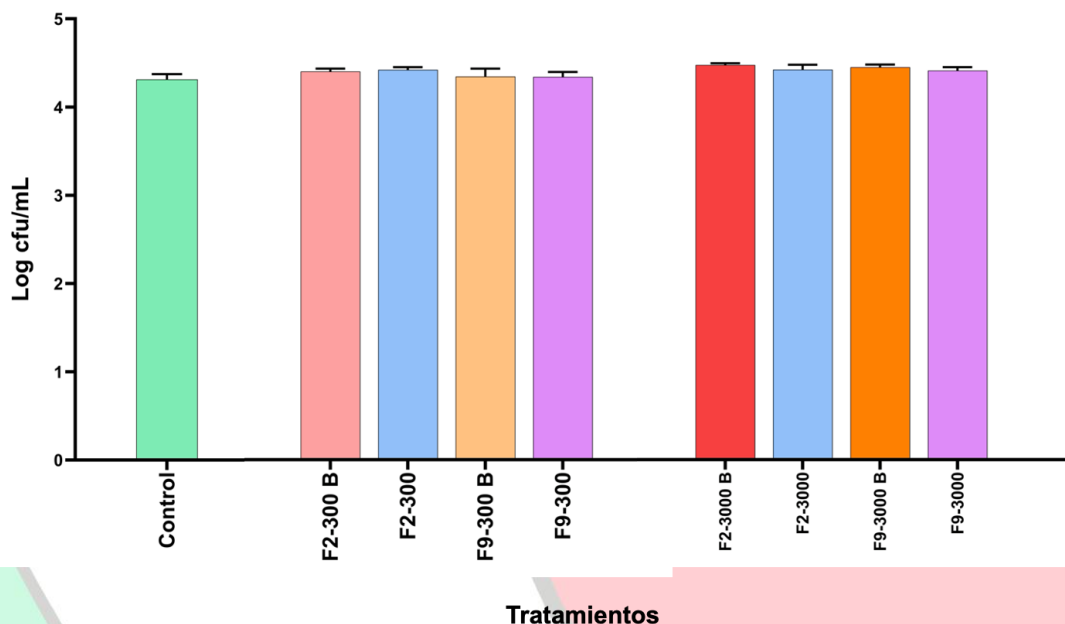
La actividad antimicrobiana de las formulaciones F3 y F9 frente a *Salmonella* Infantis fue evaluada mediante ensayos en microplaca de 96 pozos, cuyos resultados se muestran en la Figura 3. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y las formulaciones blanco correspondientes a F3 (F3-3000 B) y F9 (F9-3000 B); sin embargo, en ambos casos la concentración bacteriana aumentó ligeramente en poco más de 2 Log CFU/mL tras dos horas de incubación. Por otro lado, al evaluar las formulaciones con una concentración de geraniol de 1000 ppm (F3-1000 y F9-1000), se observó una disminución significativa en la concentración de *S. Infantis* de 1.70 y 1.59 Log CFU/mL, respectivamente, en comparación con sus blancos correspondientes, sin que existieran diferencias significativas entre ambas formulaciones. Asimismo, a la concentración de 3000 ppm de geraniol en las formulaciones F3-3000 y F9-3000, la concentración bacteriana de *S. Infantis* se redujo en 2.92 y 2.87 Log CFU/mL, respectivamente, en comparación tanto con el control como con los blancos correspondientes. Estos resultados indican que el efecto antimicrobiano observado en las formulaciones evaluadas se atribuye principalmente a la presencia de geraniol.



**Figura 3.** Determinación de la actividad antimicrobiana de dos formulaciones de geraniol basadas en sistemas nanocapsulares poliméricos frente a *S. Infantis* mediante un ensayo *in vitro* en microplaca, considerando concentraciones de 1000 y 3000 ppm de geraniol. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE. <sup>a-c</sup> Las barras con letras diferentes se consideran significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Cada grupo experimental se evaluó por triplicado ( $n = 3$ ). F3) Geraniol – Miglyol 810N – Tween 80:Span 80 (1% – 1% – 2%) y F9) Geraniol – Miglyol 810N – Tween 80:Span 80 (1% – 1.5% – 2.5%).

### 3.4 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Formulaciones en el Ensayo del Buche

Además de evaluar la actividad antimicrobiana de las formulaciones mediante ensayos en microplaca, su eficacia también fue analizada utilizando un modelo *in vitro* que simula las condiciones fisiológicas del buche de pollos de engorda en términos de pH y presencia de alimento. Los resultados de la actividad antimicrobiana obtenidos con este modelo *in vitro* del buche se muestran en la Figura 4. Tras 30 min de exposición de las formulaciones F3 y F9 en una matriz compleja que involucró un pH de 5.0, alimento y una concentración inicial de *S. Infantis* de 4.31 Log CFU/mL, ninguna de las concentraciones de geraniol evaluadas (300 y 3000 ppm) en las formulaciones seleccionadas (F3 y F9) mostró actividad antimicrobiana; de hecho, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Estos resultados sugieren la existencia de un efecto antagonista entre los componentes de la formulación y las interacciones con los componentes de la matriz del alimento, lo que condujo a la anulación del efecto antimicrobiano del geraniol. En este caso, la concentración de *S. Infantis* no se modificó, ya que el tiempo de incubación fue de solo 30 min, a diferencia de las 2 h utilizadas en el ensayo en microplaca.



**Figura 3.** Actividad antimicrobiana de dos formulaciones de geraniol basadas en nanocápsulas poliméricas frente a *S. Infantis* en un modelo in vitro que simula las condiciones del buche en términos de pH y presencia de alimento. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE. Cada grupo experimental se evaluó por triplicado ( $n = 3$ ).

### 3.5 Estudios de Interacción de los Componentes de la Formulación

#### 3.5.1 FTIR-ATR

Los espectros FTIR de geraniol, Tween 80:Span 80, Miglyol® 810N, Drugcoat E PO y sus combinaciones en las proporciones presentes en la formulación F9 se muestran en la Figura 5. En el espectro FTIR correspondiente al geraniol (Figura 5A), la vibración de estiramiento asociada a los grupos hidroxilo (O–H) se observa a  $3326\text{ cm}^{-1}$ . Asimismo, las bandas localizadas en  $2959\text{ cm}^{-1}$  y  $2909\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de estiramiento de los grupos  $-\text{CH}_2$ . La banda ubicada en  $1670\text{ cm}^{-1}$  se asocia con la deformación angular del enlace C–O. Por otro lado, las bandas observadas a  $1440\text{ cm}^{-1}$  y  $1378\text{ cm}^{-1}$  están relacionadas con las vibraciones simétricas y asimétricas del grupo carboxilato, respectivamente. Finalmente, la vibración de estiramiento del doble enlace C=C se localiza a  $996\text{ cm}^{-1}$ .

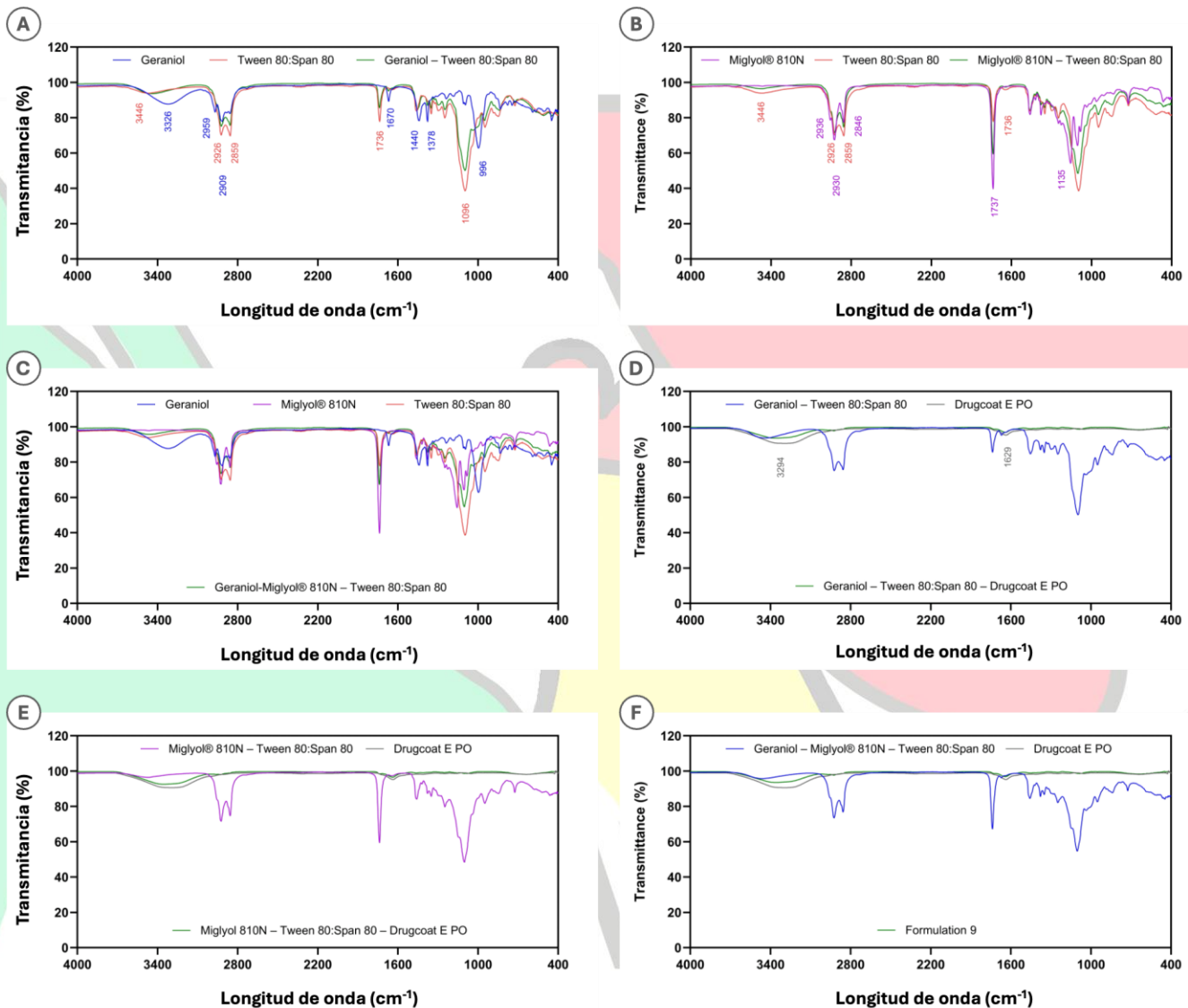
En el caso de la mezcla de surfactantes (Tween 80:Span 80, 70:30), las vibraciones de estiramiento observadas en las bandas a  $3446\text{ cm}^{-1}$ ,  $2926\text{ cm}^{-1}$  y  $2859\text{ cm}^{-1}$ , así como a  $1736\text{ cm}^{-1}$  y a  $1440\text{ cm}^{-1}$  y  $1378\text{ cm}^{-1}$ , se asocian con los grupos funcionales O–H,  $-\text{CH}_2$ , C–H, C=O (carbonilo) y C–O, respectivamente (Figura 5A).

El espectro FTIR correspondiente a la combinación de geraniol y Tween 80:Span 80 (28.6:71.4) muestra una clara desaparición de las bandas asociadas a los grupos O–H, C–O, a las vibraciones simétricas y asimétricas del carboxilato y al grupo C=O del geraniol (Figura 5A), lo que indica la posible formación de enlaces de hidrógeno o efectos de encapsulación micelar, los cuales podrían limitar la biodisponibilidad del compuesto activo. De hecho, el espectro FTIR de esta combinación se asemeja estrechamente al de la mezcla Tween 80:Span 80, lo que sugiere una interacción fuerte entre ambos componentes.

Por otra parte, el espectro FTIR de Miglyol® 810N (Figura 5B) presenta cinco bandas de transmitancia correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C–H ( $2936\text{ cm}^{-1}$ ,  $2930\text{ cm}^{-1}$  y  $2846\text{ cm}^{-1}$ ), C=O ( $1737\text{ cm}^{-1}$ ) y C–O–C ( $1135\text{ cm}^{-1}$ ). De manera interesante, en la combinación de Miglyol® 810N y Tween 80:Span 80 (37.5:62.5), las vibraciones de estiramiento ubicadas a  $2936\text{ cm}^{-1}$  y  $1135\text{ cm}^{-1}$ , características de Miglyol® 810N, presentan una disminución en su intensidad y un ligero desplazamiento, lo que indica la existencia de una interacción leve entre estos componentes (Figura 5B).

El espectro FTIR de la mezcla de geraniol, Miglyol® 810N y Tween 80:Span 80 (20:30:50, Figura 5C) muestra un patrón similar al observado en las mezclas de geraniol con Tween 80:Span 80 y de Miglyol® 810N con Tween 80:Span 80, lo que confirma adicionalmente la presencia de interacciones entre los distintos componentes del sistema.

Finalmente, en las Figuras 5D–F se demuestra de manera clara que el polímero Drugcoat E PO se deposita sobre la superficie de los núcleos oleosos compuestos por geraniol y Tween 80:Span 80, Miglyol® 810N y Tween 80:Span 80, así como por geraniol, Miglyol® 810N y Tween 80:Span 80, confirmando la formación exitosa del sistema nanocapsular.

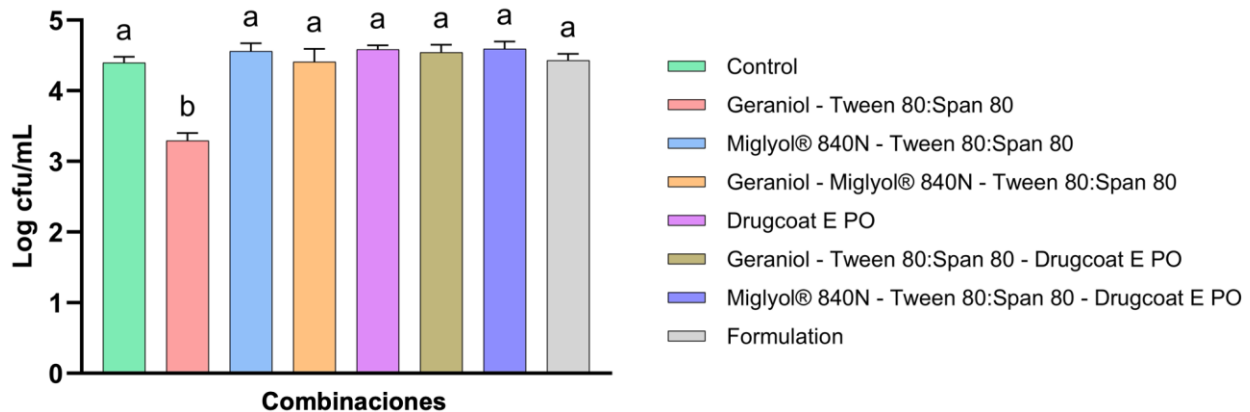


**Figura 4.** Espectros FTIR-ATR de: A) geraniol, Tween 80:Span 80 y su combinación; B) Miglyol® 810N, Tween 80:Span 80 y su combinación; C) geraniol, Miglyol® 810N, Tween 80:Span 80 y su combinación; D) geraniol-Tween 80:Span 80 y Drugcoat E PO; E) Miglyol® 810N-Tween 80:Span 80 y Drugcoat E PO; y F) formulación completa.

### 3.5.2 Modelo de buche *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana

Una vez identificadas las interacciones entre los componentes de la F9 mediante FTIR-ATR, se determinó la actividad antimicrobiana de las mezclas de geraniol – Tween 80:Span 80, Miglyol® 840 – Tween 80:Span 80, geraniol – Miglyol® 840 – Tween 80:Span 80, geraniol – Tween 80:Span 80 – Drugcoat E PO, Miglyol® 840 – Tween 80:Span 80 – Drugcoat E PO y geraniol – Miglyol® 840 – Tween 80:Span 80 – Drugcoat E PO (Formulación 9) frente a *S. Infantis*, mediante un estudio *in vitro* que simula el buche de pollos de engorda (Figura 6).

Los resultados demuestran que hubo una reducción en la actividad antimicrobiana del geraniol cuando estuvo presente junto con Tween 80:Span 80; sin embargo, logró reducir significativamente la concentración de *S. Infantis* en 1.10 Log UFC/mL en comparación con el control. No obstante, ninguna otra combinación, incluidas aquellas que contenían geraniol, mostró un efecto antimicrobiano, por lo que puede establecerse una anulación de los efectos antimicrobianos debida a la interacción entre los componentes de la formulación e incluso con los componentes del alimento, ya que en las pruebas en microplaca la F9 mostró una mayor reducción en la concentración de *S. Infantis*.



**Figura 5.** Actividad antimicrobiana de combinaciones binarias y ternarias de componentes en formulaciones nanocapsulares a base de geraniol. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE. Cada grupo experimental se evaluó por triplicado (n = 3).

#### 4. Discusión

*S. Infantis* es un serovar zoonótico emergente de *Salmonella* que puede transmitirse a los seres humanos a través de los alimentos, por lo que se considera un importante problema de salud pública debido a su reciente aumento en prevalencia y diseminación en países como Estados Unidos, la Unión Europea y América Latina [2]. Aunque esta bacteria ha sido aislada en cerdos y bovinos, se encuentra con mayor frecuencia en pollos de engorda, siendo el tercer serotipo de *Salmonella* de mayor importancia [3], [20], y, desde 2014, el principal serotipo aislado en aves de corral en la Unión Europea [3], [20], y, desde 2014, el principal serotipo aislado en aves de corral en la Unión Europea [1]. Asimismo, se ha reportado que esta bacteria representa un problema a nivel mundial debido a su asociación con altos niveles de resistencia a antibióticos, incluidos cefalosporinas de tercera generación y quinolonas[2]

En este contexto, la investigación de alternativas viables a los antibióticos para combatir la resistencia bacteriana representa un desafío significativo. Entre las alternativas que se están evaluando se encuentra el grupo de los aceites esenciales, los cuales han demostrado excelentes propiedades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas [21]. No obstante, algunas de las principales limitaciones que restringen el uso de los aceites esenciales incluyen su baja estabilidad debido a su alta volatilidad, su rápida degradación al exponerse a la luz y al oxígeno, su baja solubilidad en medios acuosos y su aroma y sabor intensos, lo que condiciona su incorporación en el alimento o en el agua de bebida para el tratamiento o control de enfermedades bacterianas en animales [22]. Por ello, en el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana del geraniol, tanto en su forma libre como formulado en un sistema basado en nanocápsulas, frente a *S. Infantis*, utilizando dos modelos in vitro: un ensayo estándar en microplaca y un modelo que simula las condiciones fisiológicas del buche de pollos de engorda.

Los resultados obtenidos demostraron que, a una concentración de 500 ppm de geraniol, la concentración de *S. Infantis* se redujo significativamente (0.55 Log CFU/mL) en comparación con el control (6.22 Log CFU/mL), mientras que a una

concentración de 4000 ppm se observó una inhibición completa del crecimiento de *S. Infantis* (Figura 1). Estos resultados concuerdan con lo reportado en otro estudio, en el que se describieron inhibiciones significativas del crecimiento de *S. Typhimurium* a 1000 ppm (0.1%) y una inhibición completa a 5000 ppm (0.5%), utilizando el método de microdilución en caldo, con una concentración inicial de *S. Typhimurium* de 6.18 Log CFU/mL [11]. Se ha descrito que el mecanismo mediante el cual el geraniol ejerce su actividad antimicrobiana está relacionado con su lipofilidad y/o hidrofobicidad y, particularmente, con la presencia del grupo hidroxilo en su estructura química, el cual provoca la disrupción de la membrana celular, la inhibición de la captación de oxígeno y alteraciones a nivel de la fosforilación oxidativa [23].

Con base en estos resultados, se desarrolló y optimizó un sistema nanocapsular que contiene geraniol mediante un diseño de experimentos, con el objetivo de mejorar su estabilidad y reducir su aroma y sabor intensos. Esto se logró mediante la incorporación de un polímero con función protectora y enmascarante del sabor (Drugcoat E PO, copolímero de metacrilato), para su administración en el agua de bebida de pollos de engorda. Las formulaciones F3 y F9 presentaron las mejores características en términos de tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial zeta y eficiencia de encapsulación (Tabla suplementaria S1). La eficiencia de encapsulación resulta particularmente relevante, ya que el proceso de liofilización permitió la obtención de una formulación sólida, lo que la hace adecuada para su inclusión en el alimento de pollos de engorda.

Estas formulaciones se evaluaron mediante un ensayo en microplaca (Figura 3), y los resultados obtenidos fueron similares a los observados para el geraniol libre (Figura 1), lo que sugiere que el efecto antimicrobiano fue atribuible principalmente al geraniol y no a los demás componentes de la formulación. A un pH similar al del TSB (aproximadamente 7.1), el polímero Drugcoat E PO permanece insoluble, pero facilita la permeación del geraniol [24].

En este contexto, las formulaciones también fueron evaluadas mediante un modelo in vitro que simula las condiciones de pH y la presencia de alimento en el buche de pollos de engorda (Figura 4), previamente descrito por nuestro grupo de investigación [19]. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que, en lugar de reducir los recuentos de *S. Infantis*, el efecto antimicrobiano del geraniol fue completamente anulado, incluso a concentraciones tan elevadas como 3000 ppm, lo que sugiere la existencia de interacciones fuertes entre los componentes de la formulación y la matriz alimenticia.

Por lo tanto, con el fin de corroborar estos hallazgos, se llevaron a cabo estudios de interacción entre los componentes de la formulación mediante análisis FTIR (Figura 5). Los resultados sugirieron una fuerte correlación entre el geraniol, la mezcla de Tween 80:Span 80 y Miglyol® 810N. De hecho, en el geraniol, una de las vibraciones de estiramiento más importantes correspondientes a los grupos hidroxilo (O–H, 3326 cm<sup>-1</sup>) [25], [26], [27] desapareció en la mezcla de geraniol con Tween 80:Span 80 [28] (Figura 5A). Este comportamiento se relaciona con la disminución de la actividad antimicrobiana observada en el modelo in vitro que simula el buche (Figura 6), ya que, aunque la reducción de *S. Infantis* fue significativa con respecto al control, esta fue únicamente de 1.10 Log CFU/mL. Estos resultados difieren ligeramente de los obtenidos en el ensayo en microplaca, donde los recuentos de *S. Infantis* se redujeron en casi 3 Log CFU/mL.

Aunque ambos surfactantes son no iónicos y se utilizan ampliamente en la estabilización de emulsiones y nanoemulsiones, se ha reportado que pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas entre estos surfactantes y los aceites esenciales, lo que limita la cantidad de aceite esencial disponible y, en consecuencia, reduce sus efectos antimicrobianos y antioxidantes; este efecto se observa de manera más pronunciada cuando la proporción de surfactante es mayor con respecto al aceite esencial en una formulación [29], [30]. Por lo tanto, en las etapas tempranas del desarrollo de sistemas nanocapsulares basados en aceites esenciales estabilizados con surfactantes, resulta fundamental evaluar el comportamiento mediante FTIR para identificar posibles interacciones y seleccionar los componentes más adecuados.

Aunque se observaron interacciones leves entre Miglyol® 810N y la mezcla de Tween 80:Span 80, y se ha reportado la interacción de algunos ácidos grasos con aceites esenciales [31], [32], [33], cuando se evaluó la mezcla de geraniol, Miglyol® 810N y Tween 80:Span 80 no se observaron comportamientos diferentes en los espectros FTIR en comparación con las mezclas de dos componentes (geraniol—Tween 80:Span 80 y Miglyol® 810N—Tween 80:Span 80). En consecuencia, estos hallazgos sugieren que los componentes presentes en la compleja matriz alimenticia interactuaron con la formulación, lo que condujo a la completa anulación de la actividad antimicrobiana del geraniol, tal como se muestra en la Figura 6.

Los sistemas nanocapsulares desarrollados en el presente estudio se obtuvieron mediante un método libre de solventes orgánicos basado en emulsificación/deposición [34], [35]. Para ello, en una primera etapa se obtuvo una nanoemulsión estabilizada con una combinación 80:20 de Tween 80:Span 80 y, posteriormente, mediante interacciones electrostáticas, el polímero Drugcoat E PO fue depositado sobre los núcleos de la emulsión. La deposición de Drugcoat E PO se llevó a cabo debido a que, al pH de la formulación (pH 6), su grupo amino alquilo se encuentra protonado [24], lo que favoreció su interacción con el núcleo cargado negativamente, principalmente debido a los grupos carboxilo presentes en Miglyol® 810N. La formación de los sistemas nanocapsulares fue corroborada durante el análisis de interacciones mediante FTIR, ya que en las Figuras 5D–F se observa claramente que el comportamiento espectral de la formulación corresponde al del polímero Drugcoat E PO [36]. Adicionalmente, el olor característico del geraniol se redujo de manera significativa, lo que respalda una encapsulación exitosa y un efecto eficaz de enmascaramiento.

## 5. Conclusiones

El desarrollo de plataformas nanotecnológicas como alternativas a los antibióticos representa una estrategia prometedora para abordar los desafíos asociados con la resistencia bacteriana y los problemas de salud pública relacionados con patógenos como *S. Infantis*. No obstante, la efectividad de estos nanosistemas no depende únicamente de la obtención de propiedades fisicoquímicas favorables y de una adecuada estabilidad. En ausencia de estudios de preformulación apropiados, incluso nanosistemas bien caracterizados pueden fracasar bajo condiciones reales de producción avícola. Por lo tanto, resulta esencial llevar a cabo evaluaciones exhaustivas de preformulación que orienten la selección adecuada de los componentes de la formulación.

Así mismo, el uso de modelos *in vitro* que simulen de manera cercana las condiciones fisiológicas de los pollos de engorda es fundamental para evaluar de forma confiable la eficacia antimicrobiana de este tipo de formulaciones, dado que el alimento constituye una matriz compleja que también puede afectar su desempeño. Actualmente, se están desarrollando investigaciones adicionales enfocadas en la evaluación de surfactantes alternativos, con el objetivo de mejorar el desempeño del sistema nanocapsular basado en geraniol frente a *S. Infantis*.

La presente investigación establece un precedente relevante para el desarrollo de sistemas nanocapsulares robustos que contienen aceites esenciales, con un énfasis particular en la importancia de los estudios de preformulación y en el empleo de modelos *in vitro* que simulen condiciones *in vivo*, con el fin de garantizar su eficacia como agentes antimicrobianos. Este enfoque resulta especialmente valioso, ya que muchos productos se desarrollan sin exhibir el efecto esperado debido a que son evaluados directamente en modelos *in vivo* o en la especie objetivo, especialmente a nivel veterinario en especies de producción como las aves, sin considerar adecuadamente las interacciones previas que pueden condicionar su efectividad, así como su potencial aplicación en humanos.

## 6. Referencias

- [1] L. Montoro-Dasi, L. Lorenzo-Rebenaque, A. Marco-Fuertes, S. Vega, and C. Marin, "Holistic Strategies to Control Salmonella Infantis: An Emerging Challenge in the European Broiler Sector," 2023. doi: 10.3390/microorganisms11071765.
- [2] D. M. Alvarez, R. Barrón-Montenegro, J. Conejeros, D. Rivera, E. A. Undurraga, and A. I. Moreno-Switt, "A review of the global emergence of multidrug-resistant Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis," *Int J Food Microbiol*, vol. 403, p. 110297, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110297>.
- [3] J. Mattock et al., "A One Health Perspective on Salmonella enterica Serovar Infantis, an Emerging Human Multidrug-Resistant Pathogen.," *Emerg Infect Dis*, vol. 30, no. 4, pp. 701–710, Apr. 2024, doi: 10.3201/eid3004.231031.
- [4] A. Georganas, G. Graziosi, E. Catelli, and C. Lupini, "Salmonella enterica Serovar Infantis in Broiler Chickens: A Systematic Review and Meta-Analysis.," *Animals (Basel)*, vol. 14, no. 23, Nov. 2024, doi: 10.3390/ani14233453.
- [5] M. R. Powell and M. S. Williams, "Trends in Salmonella Infantis human illness incidence and chicken carcass prevalence in the United States; 1996–2019," *Risk Analysis*, vol. 44, no. 10, pp. 2396–2402, 2024.
- [6] K. Kranjc, J. Avberšek, N. Šemrov, O. Zorman-Rojs, and D. Barlič-Maganja, "Salmonella Infantis Adhesion to Various Surfaces and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Commercial Disinfectants," *Pathogens*, vol. 13, no. 11, p. 999, 2024.
- [7] R. Gupta and S. Sharma, "Role of alternatives to antibiotics in mitigating the antimicrobial resistance crisis," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 156, no. 3, pp. 464–477, 2022.
- [8] S. C. Izah, M. T. Joshua, K. E. Torru, C. T. Ngun, M. C. Ogwu, and M. Hait, "Antimicrobial resistance and the role of herbal medicine: challenges, opportunities, and future prospects," *Herbal Medicine Phytochemistry: Applications and Trends*, pp. 1–26, 2023.
- [9] B. Prakash, A. Kumar, P. P. Singh, and L. S. Songachan, "1 - Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals: Current status and future perspective," B. B. T.-F. and P. P. of P. Prakash, Ed., *Academic Press*, 2020, pp. 1–45. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818593-3.00001-4>.
- [10] F. A. Omonijo, L. Ni, J. Gong, Q. Wang, L. Lahaye, and C. Yang, "Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production," *Animal Nutrition*, vol. 4, no. 2, pp. 126–136, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>.

- [11] S. I. Ekonomou, P. Akshay Thanekar, D. A. Lampru, E. Weaver, O. Doran, and A. C. Stratakos, "Development of Geraniol-Loaded Liposomal Nanoformulations against Salmonella Colonization in the Pig Gut.," *J Agric Food Chem*, vol. 70, no. 23, pp. 7004–7014, Jun. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c00910.
- [12] E. Ghasemi-Gojani, I. Kovalchuk, and O. Kovalchuk, "Cannabinoids and terpenes for diabetes mellitus and its complications: from mechanisms to new therapies," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 33, no. 12, pp. 828–849, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.08.003>.
- [13] H. L. de S. Rodrigues, I. M. M. Kolososki, V. P. Benevides, M. M. S. Saraiva, and A. Berchieri Junior, "Essential oils used in the poultry industry: Would it be an effective green alternative against Salmonella spp. dissemination and antimicrobial resistance?," *The Microbe*, vol. 6, p. 100248, 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100248>.
- [14] J. J. Han, "FDA Modernization Act 2.0 allows for alternatives to animal testing," 2023, Wiley Online Library.
- [15] A. Gangwal and A. Lavecchia, "Artificial intelligence in preclinical research: enhancing digital twins and organ-on-chip to reduce animal testing," *Drug Discov Today*, vol. 30, no. 5, p. 104360, 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104360>.
- [16] Y. Dong, A. L. Iniguez, B. M. M. Ahmer, and E. W. Triplett, "Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, no. 3, pp. 1783–1790, Mar. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.3.1783-1790.2003.
- [17] L. A. Wythe, D. K. Dittoe, K. M. Feye, E. G. Olson, L. M. Perry, and S. C. Ricke, "Reduction of Salmonella Infantis on skin-on, bone-in chicken thighs by cetylpyridinium chloride application and the impact on the skin microbiota.," *Poult Sci*, vol. 101, no. 2, p. 101409, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.psj.2021.101409.
- [18] D. Hernandez-Patlan et al., "Development of Chitosan and Alginate Nanocapsules to Increase the Solubility, Permeability and Stability of Curcumin," *J Pharm Innov*, 2018, doi: 10.1007/s12247-018-9341-1.
- [19] D. Hernandez-Patlan et al., "Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against Salmonella enteritidis infection and intestinal permeability in broiler chickens: A pilot study," *Front Microbiol*, vol. 9, no. JUN, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01289.
- [20] S. Sevilla-Navarro, J. Torres-Boncompote, J. Garcia-Llorens, M. Bernabéu-Gimeno, P. Domingo-Calap, and P. Catalá-Gregori, "Fighting Salmonella Infantis: bacteriophage-driven cleaning and disinfection strategies for broiler farms," *Front Microbiol*, vol. 15, p. 1401479, 2024.
- [21] A. Y. AlMahdi et al., "Antibacterial activity of herbal essential oils against Gram-positive and Gram-negative bacteria with a potential for multidrug resistance," *Journal of Angiotherapy*, vol. 8, no. 2, pp. 1–7, 2024.
- [22] Ö. Altay, K. Özgün, İ. Işıl, K. Mehmet, E. Figen Kaymak, and S. M. and Jafari, "Spray drying encapsulation of essential oils; process efficiency, formulation strategies, and applications," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 64, no. 4, pp. 1139–1157, Feb. 2024, doi: 10.1080/10408398.2022.2113364.
- [23] A. Fajdek-Bieda, J. Pawlińska, A. Wróblewska, and A. Łuś, "Evaluation of the Antimicrobial Activity of Geraniol and Selected Geraniol Transformation Products against Gram-Positive Bacteria," 2024. doi: 10.3390/molecules29050950.
- [24] N. Fine-Shamir and A. Dahan, "Methacrylate-copolymer Eudragit EPO as a solubility-enabling excipient for anionic drugs: investigation of drug solubility, intestinal permeability, and their interplay," *Mol Pharm*, vol. 16, no. 7, pp. 2884–2891, 2019.
- [25] L. R. M. de Andrade, M. Guilger-Casagrande, T. Germano-Costa, and R. de Lima, "Polymeric nanorepellent systems containing geraniol and icaridin aimed at repelling *Aedes aegypti*," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 15, p. 8317, 2022.
- [26] Z.-J. Yang, D. Zhou, Y.-X. Fang, and H.-B. Ji, "Shape-selective separation of geraniol and nerol via noncovalent interactions with  $\beta$ -cyclodextrin," *Sep Sci Technol*, vol. 51, no. 1, pp. 168–180, 2016.
- [27] P. Babaei, M. R. Farahpour, and Z. G. Tabatabaei, "Fabrication of geraniol nanophytosomes loaded into polyvinyl alcohol: A new product for the treatment of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J Tissue Viability*, vol. 33, no. 1, pp. 116–125, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2023.11.002>.
- [28] M. Sahu et al., "Fabrication of Cu<sub>2</sub>ZnSnS<sub>4</sub> Light Absorber Using a Cost-Effective Mechanochemical Method for Photovoltaic Applications," 2022. doi: 10.3390/ma15051708.
- [29] Q. Ma, P. M. Davidson, and Q. Zhong, "Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80," *Int J Food Microbiol*, vol. 226, pp. 20–25, 2016.
- [30] W. Wang et al., "Microemulsion of Cinnamon Essential Oil Formulated with Tea Polyphenols, Gallic Acid, and Tween 80: Antimicrobial Properties, Stability and Mechanism of Action," 2023. doi: 10.3390/microorganisms11010002.
- [31] F. Fratianni et al., "Fatty acid composition, antioxidant, and in vitro anti-inflammatory activity of five cold-pressed prunus seed oils, and their anti-biofilm effect against pathogenic bacteria," *Front Nutr*, vol. 8, p. 775751, 2021.
- [32] A. Sethi, M. Ahmad, T. Huma, and W. Ahmad, "Pharmacokinetic variables of medium molecular weight cross linked chitosan nanoparticles to enhance the bioavailability of 5-fluorouracil and reduce the acute oral toxicity," *Drug Deliv*, vol. 28, no. 1, pp. 1569–1584, 2021.
- [33] K. Ye, D. Zhao, X. Shi, and X. Lu, "Use of caprylic/capric triglyceride in the encapsulation of demetholized peppermint fragrance leading to smaller and better distributed nanocapsules," *RSC Adv*, vol. 6, no. 87, pp. 84119–84126, 2016.
- [34] A. L. Lima, T. Gratieri, M. Cunha-Filho, and G. M. Gelfuso, "Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose," *Methods*, vol. 199, pp. 54–66, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.07.009>.
- [35] S. Deng, M. R. Gigliobianco, R. Censi, and P. Di Martino, "Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 5, p. 847, 2020.
- [36] A. N. Shirazi, M. Imani, and S. Sharifi, "Direct Condensation Reaction for Grafting of Polyethylene Glycol Monomethyl Ether on Poly (Methacrylic Acid-co-Methyl Methacrylate) for Application in Biomedical Engineering," *Am J Biomed Eng*, vol. 1, no. 1, pp. 13–19, 2012.

Aviespecialistas de México

# BIOCARBONES DERIVADOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE COCO, NARANJA Y GUAYABA PARA LA ADSORCIÓN DE AFLATOXINA B1 EN UN MODELO AVIAR IN VITRO

K. S. García Salazar, A. Méndez Albores, E. A. Morales Hipólito, J. A. Maguey González, G. Téllez Isaias, A. Vázquez Durán, R. López Arellano, B. Solis-Cruz y D. Hernandez Patlan.

División de Ingeniería en Nanotecnología, Universidad Politécnica del Valle de México.

Unidad de Investigación Multidisciplinaria L14-A1 (Ciencia y Tecnología de Materiales), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán.

Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA.

<sup>5</sup>Gut Healt LLC, Fayetteville, AR 72703, USA.

karla.garcia.salazar@upvm.edu.mx

## Resumen

La aflatoxina B1 (AFB1) es una micotoxina altamente tóxica producida por hongos filamentosos que, al contaminar los piensos destinados a pollos de engorda, compromete la salud, el desempeño productivo y la inocuidad de los productos avícolas. En la práctica, la mitigación de este riesgo se ha basado en el uso de adsorbentes inorgánicos como zeolitas, arcillas y aluminosilicatos; sin embargo, estos materiales presentan limitaciones importantes, entre ellas baja especificidad y posible secuestro de nutrientes. Como alternativa sustentable, los residuos agroindustriales lignocelulósicos se han propuesto como precursores de materiales biosorbentes de bajo costo y alto valor agregado. En este trabajo se obtuvieron biocarbones a partir de desechos agroindustriales de cáscara de coco, cáscara de naranja y hojas de guayaba, los cuales se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de barrido, punto de carga cero, potencial zeta y tamaño de partícula, así como área superficial y tamaño de poro, con el fin de relacionar sus propiedades fisicoquímicas con su capacidad de unión de AFB1. Así mismo, se evaluó su capacidad de adsorción de AFB1 en soluciones buffer a diferentes pH y en un modelo aviar in vitro que simula las condiciones del tracto gastrointestinal en cuanto a pH, actividad enzimática y presencia de alimento. Los resultados demostraron que los biocarbones obtenidos de los residuos agroindustriales presentaron capacidad para adsorber AFB1, pero el obtenido de cáscara de coco presentó significativamente un mejor desempeño derivado principalmente de su estructura porosa y composición superficial, seguido del biocarbón obtenido a partir de cáscaras de naranja y de hojas de guayaba, siendo este último el que presentó la menor capacidad adsorbente. Estos hallazgos respaldan el uso de residuos agroindustriales como biosorbentes sustentables de AFB1 para mitigar sus problemas en sistemas de producción avícola.

## Palabras Clave:

Aflatoxina B1; residuos agroindustriales; biocarbones; adsorción; modelo in vitro; tracto gastrointestinal aviar

## 1. Introducción

Las micotoxinas son compuestos naturales producidos en su mayoría por hongos filamentosos bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad. Estos hongos colonizan cultivos y alimentos almacenados, por lo que se estima que en el mundo afectan anualmente a más del 25% de los cultivos. Una vez generadas, las micotoxinas contaminan una amplia variedad de alimentos como cereales y piensos, provocando efectos adversos en los organismos que las consumen tales como carcinogénesis, teratogénesis, e inmunosupresión, principalmente, por lo que representa un serio problema de salud pública y seguridad alimentaria a nivel mundial [1]. Entre las micotoxinas más estudiadas y reguladas, por sus importantes efectos sobre la salud pública, se encuentra la Aflatoxina B1 (AFB1), producida principalmente por especies del género *Aspergillus*, especialmente *A. flavus* y *A. parasiticus*.

La aflatoxina B1 (AFB1) ha sido identificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como un carcinógeno de tipo 1, y se le considera uno de los agentes más peligrosos en la generación de cáncer hepático. Su presencia en los piensos animales, en particular en el alimento destinado a pollos de engorda, representa un riesgo

considerable para la salud de las aves, así como una ruta de entrada importante a la cadena alimentaria humana a través del consumo de carne, huevo y productos derivados [2].

En México, la avicultura es una de las actividades agropecuarias más importantes, tanto en términos económicos como nutricionales. Estas características han convertido a este sector agroalimentario en un pilar clave de la economía mexicana [3]. Sin embargo, esta importancia también conlleva grandes desafíos, ya que la presencia de contaminantes como la AFB1 en los piensos destinados a pollos de engorda puede impactar negativamente tanto en la salud animal y la productividad del sector, como en la calidad e inocuidad de los productos avícolas ofrecidos al consumidor. Para mitigar los efectos negativos de la AFB1 en la producción avícola, se han desarrollado distintas estrategias; como el uso de materiales adsorbentes, los cuales, son una alternativa que busca minimizar las pérdidas económicas derivadas de la contaminación del alimento, al mismo tiempo que procura preservar la salud de las aves y mantener la calidad de los productos destinados al consumo humano [4]. Tradicionalmente, los adsorbentes utilizados eran de origen inorgánico, como arcillas y zeolitas; no obstante, en los últimos años, ha aumentado el interés por alternativas orgánicas más sostenibles, económicas y accesibles derivado de su inespecificidad. En particular, el uso de residuos agroindustriales de origen lignocelulósico como precursores de materiales adsorbentes ofrece una opción prometedora alineada con el aprovechamiento de desechos. [5].

En el presente trabajo se evaluó la capacidad adsorbente de tres biocarbones derivados de residuos agroindustriales (cáscara de coco, cáscara de naranja y hojas de guayaba) para la remoción de AFB1, utilizando un modelo *in vitro* que simula las condiciones fisiológicas durante el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal de pollos de engorda. Esta propuesta busca aportar soluciones sostenibles que impulsarán una producción avícola más segura, eficiente y sustentable, promoviendo el aprovechamiento de residuos locales y contribuyendo tanto a la seguridad alimentaria como a la reducción del impacto ambiental.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Aflatoxina B1

Se empleó un estándar de aflatoxina B1 (AFB1, pureza  $\geq 98\%$ , Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) con una masa total de 1 mg. El compuesto se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO,  $\geq 99.5\%$ , grado analítico, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y se llevó a un volumen final de 20 mL para obtener una solución stock a una concentración de 49,000 ppb (ng/mL). Esta solución stock se utilizó posteriormente para la preparación de las soluciones estándar de 250 ppb empleadas en los diferentes ensayos experimentales. La solución stock se mantuvo protegida de la luz y bajo condiciones de congelación hasta su utilización.

### 2.2 Obtención de los biocarbones

Los desechos agroindustriales empleados fueron obtenidos de diferentes regiones del país: la cáscara de coco procedía de frutos recolectados en San Luis Acatlán, Guerrero, México, la cáscara de naranja se obtuvo de naranjas provenientes de Tihuatlán, Veracruz, México, y las hojas de guayabo fueron recolectadas de un árbol perteneciente al invernadero de la Universidad Politécnica del Valle de México (UPVM), México. Todos estos desechos agroindustriales fueron lavados cuidadosamente con agua destilada para eliminar impurezas superficiales y restos orgánicos. Posteriormente, se secaron a temperatura ambiente durante dos semanas con el fin de eliminar la humedad.

Una vez secos estos desechos agroindustriales, se sometieron a un proceso de carbonización controlada en un horno mufla (Marla J-15, México). La cáscara de naranja y las hojas de guayaba se carbonizaron a 360 °C durante 60 minutos, mientras que la cáscara de coco se trató considerando mismo tiempo que los otros materiales, pero a una temperatura ligeramente mayor (400 °C), para eliminar los compuestos volátiles y promover la formación de estructuras carbonosas iniciales con una red de poros incipiente. En todos los casos se evitó la combustión completa, promoviendo únicamente la degradación térmica controlada.

Tras la carbonización, los biocarbones obtenidos se retiraron del horno mufla y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después, los biocarbones fueron triturado en un mortero hasta obtener un polvo fino, con el propósito de reducir el tamaño de partícula, y así maximizar la superficie de contacto y hacer más eficiente la etapa de activación. Una vez reducido el tamaño de partícula, los biocarbones se sometieron a un segundo calentamiento a 720 °C durante 60 minutos, con el objetivo de desarrollar la estructura porosa y generar sitios activos de adsorción. Finalmente, los biocarbones se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se tamizaron con malla No. 35, para homogeneizar tamaño de partícula.

## 2.3 Caracterización de los biocarbones

### 2.3.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR- ATR)

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier de los tres biocarbones fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro infrarrojo Frontier SP8000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR) (DuraSamPIIR II, Smiths Detection, Warrington, Reino Unido), en un rango de barrido de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , con un promedio de 32 barridos y una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se recopiló un espectro de fondo entre cada muestra y se aplicó una corrección de línea base y ATR a cada espectro para su posterior análisis.

### 2.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis morfológico de los tres biocarbones se realizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6060 LV (JEOL Ltd., Tokio, Japón). El análisis microscópico se llevó a cabo a 100x, 500x y 1000x aumentos con un voltaje de aceleración de 10.0 kV y una distancia de trabajo de 14 mm. Antes del análisis, cada muestra fue fijada en un porta muestras de cobre con cinta de carbono.

### 2.3.3. Punto de carga cero y potencial zeta

El punto de carga cero se determinó siguiendo una metodología previamente descrita [6]. Para ello, se colocaron 10 mg de cada biocarbón en tubos conteniendo agua desionizada ajustada a diferentes pHs (pH inicial = 1, 3, 5, 7, 9 y 11). Posteriormente, se agitaron y se realizó la lectura de pH final en los sobrenadantes con un electrodo de vidrio. Finalmente, los resultados fueron analizados en función del pH inicial y el  $\Delta\text{pH}$  (pH inicial – pH final).

El potencial electrocinético de los biocarbones se determinó mediante velocimetría láser Doppler (LDV), es decir, por movilidad electroforética utilizando un instrumento Zetasizer MALVERN (ZetaSizer Pro, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Brevemente, las muestras de los biocarbones en los diferentes pHs fueron analizadas (mismas que para el punto de carga cero). Las determinaciones se realizaron a 25 °C con un periodo de equilibrio de 120 s. Se midieron por triplicado cada muestra, y cada medición comprendió 11 ciclos para obtener una lectura estable. Los resultados se analizaron con el software ZS Xplorer (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Reino Unido).

### 2.3.4. Área superficial y tamaño de poro

El área superficial se determinó empleando isoterma de adsorción de nitrógeno con un analizador Autosorb 1-MP (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, Florida, USA). El área superficial se calculó utilizando la ecuación de Brunauer-Emmet-Teller (BET) a 77 °K (-196.15 °C). La porosidad y distribución de tamaño de poro se determinó mediante simulación por Teoría Funcional de la Densidad (DFT) y Monte Carlo (DFT/Monte-Carlo).

### 2.3.5. Determinación de tamaño de partícula por Difracción de Luz Dinámica (DLS)

El tamaño de partículas de los biocarbones se determinó en un analizador de difracción láser equipado con un sistema de polvo seco Tornado (LS 13 320, Beckman Coulter, FL, USA). Este analizador de tamaño de partícula contaba con un diodo láser de 5 mW con una longitud de onda de 750 nm. Las muestras se cargaron en un cilindro de plástico para obtener un valor de oscurecimiento entre el 4 % y el 8 %. Los datos se recopilaron y analizaron con el software LS 13 320 XR ADAPT versión 1.2.323 (Beckman Coulter, FL, USA).

## 2.4. Desarrollo de método analítico por UPLC

La cuantificación de AFB1 se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC®) Acquity H-Class, equipado con un sistema de bomba cuaternaria, inyector automático y detector de matriz de fotodiodos (PDA, Waters, Milford, MA, EE. UU.). Para el análisis cromatográfico, se empleó una columna Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm, Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) a 40 °C. La fase móvil consistió en una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (55:25:20) a un flujo isocrático de 0.3 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL, con un tiempo total de análisis de 5 min. La detección se realizó a una longitud de onda de 360 nm, y la adquisición y procesamiento de los datos se efectuó con el software Empower 3 (Waters, 2010, Milford, MA, EE. UU.). El método analítico resultó ser preciso y lineal en un intervalo de concentraciones de AFB<sub>1</sub> de 10 a 250 ppb.

### 2.4.1. Selección del filtro

La selección del filtro se evaluó comparando las concentraciones de AFB1 obtenidas tras el análisis de seis soluciones independientes sin filtrar y filtradas a través de Acrodiscos (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI, USA) de Nylon, celulosa regenerada (CR), acetato de celulosa (CA), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno hidrófilo (GHP) y Politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.2 µm. La solución estándar utilizada tenía una concentración de 250 ppb de AFB1 a pH 6.8.

## 2.5. Estudios de adsorción *in vitro* de AFB1 en soluciones buffer

En estos estudios de adsorción, los biocarbones se evaluaron a una concentración de 0.05% (p/v) en soluciones de AFB1 preparadas a pH 1.2 (buffer de cloruros), 5.0 (Buffer de acetatos) y 6.8 (Buffer de fosfatos). Estas soluciones de AFB1 tenían una concentración de 250 ppb (µg/L). Para esto, en tubos Falcon de polipropileno de 15 mL, se colocaron 2.5 mg de cada biocarbón y se adicionaron 5 mL de las soluciones de AFB1. Los tubos se mantuvieron en agitación a 19 rpm con ayuda de un agitador orbital (modelo 3500, VWR international, Radnor, PA, USA) durante 15 minutos a 40 °C en una incubadora de demanda bioquímica de oxígeno (modelo 2020, VWR, Houston, TX, EE. UU.). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C (Microfuge R20, Beckman Coulter Life Sciences, Palo Alto, CA, USA), y los sobrenadantes se pasaron a través de filtros de Politetrafluoroetileno de 0.2 µm (PTFE Acrodysc; Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) para su posterior análisis por UPLC. Como control positivo se consideró solo la solución buffer con AFB1 y como control negativo los biocarbones en solución buffer sin AFB1.

## 2.6. Evaluación del mecanismo de adsorción de AFB1 mediante FTIR

Posterior a los estudios de adsorción *in vitro* de AFB1 en soluciones buffer, se realizó un análisis complementario con el propósito de elucidar el posible mecanismo de adsorción de la AFB1 por parte de los biocarbones. Para esto, se decantó cuidadosamente el sobrenadante de los tubos centrifugados en el punto 2.5 hasta mantener únicamente material sólido en el fondo de los tubos. Entonces, los tubos se colocaron en un horno y se mantuvieron a 60 °C durante 48 h para garantizar un secado completo de los biocarbones. Finalizado el proceso de secado, los biocarbones con y sin AFB1 se analizaron mediante FTIR bajo las mismas condiciones descritas en el punto 2.3.1 y los espectros obtenidos se compararon para explicar en mejor medida el mecanismo de adsorción considerando la intensidad, forma o desplazamiento de las bandas características de los grupos funcionales presentes en los biocarbones.

## 2.7. Estudios de adsorción en el modelo *in vitro* de digestibilidad

La adsorción de AFB1 por parte de los biocarbones se evaluó en un modelo *in vitro* que simula las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal del pollo de engorda en cuanto a pH, actividad enzimática y alimentación, considerando publicaciones previas, pero con ligeras modificaciones [7], [8]. Además, se incluyeron dos controles, una zeolita no comercial proveniente de Taxco, Guerrero, México (Tamaño < 250 µm) y una pared celular de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafMannan, Lesaffre Iberica S.A., Valladolid, España). Para ello, se utilizó una incubadora de demanda bioquímica de oxígeno (modelo 2020, VWR, Houston, TX, EE. UU.) ajustada a 40 °C y personalizada con un

agitador orbital (VWR, Houston, TX, USA) para mezclar los componentes del modelo contenidos en un tubo Falcon de polipropileno de 50 mL a una velocidad de 19 rpm. Los tubos se mantuvieron en un ángulo de inclinación de 30° para facilitar la mezcla adecuada de los componentes del modelo.

Para simular el buche, el primer compartimiento del tracto simulado, se colocaron 125 mg de maíz molido, el cual previamente fue pasado por malla No. 60 para homogeneizar el tamaño de partícula, así como 4.5 mg de cada biocarbón (0.05%) y 46 µL de una solución de AFB1 a una concentración de 49 ppm (µg/mL) en un tubo Falcon de 50 mL, para alcanzar una concentración de 250 ppb al final del modelo (sección intestinal). Posteriormente, se añadieron 5 mL de HCl 0.03 M (36-38% JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), alcanzando un pH entre 5.0 y 5.2. Entonces, los tubos se agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex y se incubaron durante 30 min con agitación continua. Una vez que se concluyó con el primer compartimiento, se adicionaron 3000 U de pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por cada g de alimento contenida en 1.25 mL de HCl 1.5 M para simular las condiciones del proventrículo, alcanzando así un pH 1.4 y 2.0. Los tubos se agitaron nuevamente y se incubaron por otros 45 min en agitación constante. Finalmente, para simular la sección intestinal (pH 6.4 a 6.8), se agregaron 6.75 mg de pancreatina 8x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por cada g de alimento en 3.25 mL de una solución de bicarbonato de sodio 1.0 M en cada tubo y se incubaron por 2 h adicionales.

Concluido el modelo (3h 15 min), los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C (Microfuge R20, Beckman Coulter Life Sciences, Palo Alto, CA, USA) y se tomó una alícuota del sobrenadante, la cual se filtró a través de un filtro de PTFE de 0.2 µm. El filtrado obtenido se colocó en viales para determinar la concentración residual de AFB1 por UPLC. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado, considerando un control positivo para el cálculo del porcentaje de AFB1 adsorbido.

## 2.7.1. Estandarización del modelo

### 2.7.1.1. Estudios de adsorción enzima-AFB1

Estos estudios también se realizaron considerando el modelo aviar *in vitro* de digestibilidad, por lo que se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura y tiempos de incubación, así como de adición de medios para alcanzar los diferentes pHs, pero no se incluyó alimento ni los biocarbones. Brevemente, en un tubo Falcon de 50 mL se adicionaron 46 µL de una solución de AFB1 a una concentración de 49000 ppb para alcanzar una concentración de 250 ppb al final del modelo (sección intestinal), seguido de la adición de los medios para alcanzar los diferentes pH con o sin la inclusión de enzimas. En el caso del compartimiento que simula el proventrículo se adicionaron 3000 U/g de maíz de pepsina y para la sección intestinal pancreatina 8x en una concentración de 6.84 mg/g de maíz. La cantidad adicionada de enzimas estuvo basada en la inclusión de 125 mg de maíz en el modelo. Al finalizar el modelo, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C y se tomó una alícuota del sobrenadante, la cual se filtró a través de un filtro de PTFE de 0.2 µm. El filtrado obtenido se colocó en viales para determinar la concentración residual de AFB1 por UPLC. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado, considerando un control positivo sin enzimas para el cálculo del porcentaje de AFB1 adsorbido.

### 2.7.1.2 Estudios de adsorción maíz-AFB1

Al igual que los estudios de adsorción enzima-AFB1, la adsorción de AFB1 por parte del maíz molido se evaluó en el modelo aviar *in vitro* de digestibilidad. Para esto, se colocaron diferentes cantidades de maíz en tubos Falcon de 50 mL (125, 250, 500, 1000 y 2000 mg), sin la adición de biocarbones, zeolitas, pared celular de levadura o enzimas (pepsina/pancreatina). Posteriormente, se adicionaron 46 µL de una solución de AFB1 a una concentración de 49 000 ppm para alcanzar una concentración de 250 ppb al final del modelo (sección intestinal). Cada compartimiento simulado del modelo y el tratamiento de las muestras se realizaron bajo las mismas condiciones descritas en el punto 2.7.

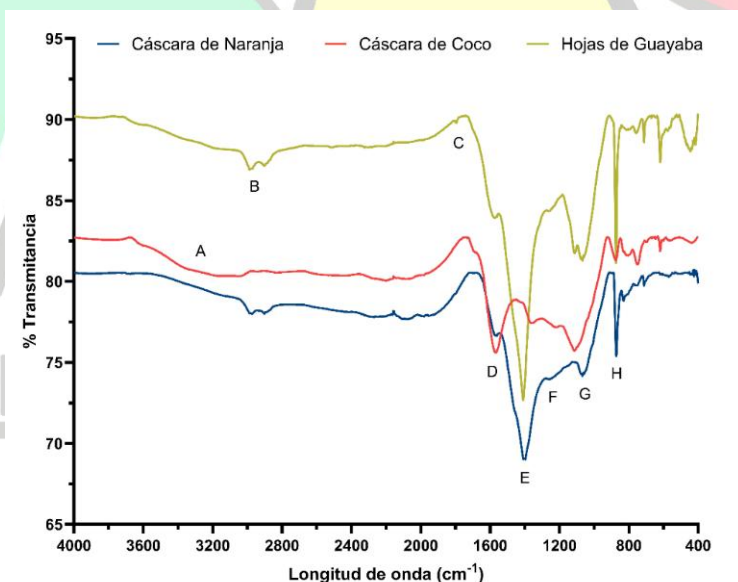
### 3. Resultados

Se obtuvieron tres biocarbones a partir de desechos agroindustriales: cáscara de coco, cáscara de naranja y hoja de guayaba. Dichos biocarbones fueron sometidos a caracterización fisicoquímica mediante la determinación de su carga superficial (potencial Z), punto de carga cero, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y tamaño de partícula por difracción láser. Además, se realizó la determinación de área superficial junto con tamaño de poro y un análisis morfológico a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Finalmente, se evaluó su capacidad para adsorber AFB1 en modelos in vitro.

#### 3.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada

Los espectros FTIR de los biocarbones obtenidos a partir de cáscara de coco, cáscara de naranja y hoja de guayaba se presentan en la Figura 1, mientras que las bandas características identificadas se resumen en la Tabla 1.

En los tres biocarbones se observaron bandas asociadas a estructuras lignocelulósicas. En la región de  $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$  se identificaron señales débiles correspondientes al estiramiento O–H de grupos hidroxilo residuales. Además, señales asociadas a vibraciones C–H alifáticas fueron localizadas entre  $2920$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$ , pero se muestran muy tenues o prácticamente inexistentes en los biocarbones. La banda ubicada en la región de  $1700\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$ , atribuida al estiramiento C=O de ácidos carboxílicos (–COOH), se presentó con muy baja intensidad en el biocarbón obtenido a partir de hojas de guayaba, pero en los otros dos biocarbones no fue detectada. Así mismo, en la región de  $1396\text{--}1446\text{ cm}^{-1}$  se observaron señales claras atribuibles a grupos carboxilato (–COO<sup>–</sup>), con un pico marcado en  $1396\text{ cm}^{-1}$  para el biocarbón obtenido de las cáscaras de naranja y una señal similar en  $1408\text{ cm}^{-1}$  para el obtenido de las hojas de guayaba. Las señales localizadas entre  $1620$  y  $1570\text{ cm}^{-1}$  permanecieron en los tres materiales, lo que corresponde a vibraciones C=C aromáticas. También se detectaron bandas intensas en la región de  $1115\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ , asociadas al estiramiento C–O de alcoholes, fenoles o ésteres. En este intervalo se identificaron picos en  $1113$  y  $1167\text{ cm}^{-1}$  para la cáscara de coco,  $1064\text{ cm}^{-1}$  para la cáscara de naranja, y señales en  $1080$ ,  $1065$  y  $1112\text{ cm}^{-1}$  para la hoja de guayaba. Finalmente, en la región de  $873\text{--}500\text{ cm}^{-1}$  se observaron señales débiles asociadas a vibraciones C–H aromáticas y a la red carbonosa en los tres biocarbones.



**Figura 6.** Comparación de los espectros de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FT-IR) de los biocarbones derivados de desechos agroindustriales.

**Tabla 1.** Asignación de los principales grupos funcionales observados en los espectros FTIR de biocarbones derivados de cáscara de coco, cáscara de naranja y hoja de guayaba.

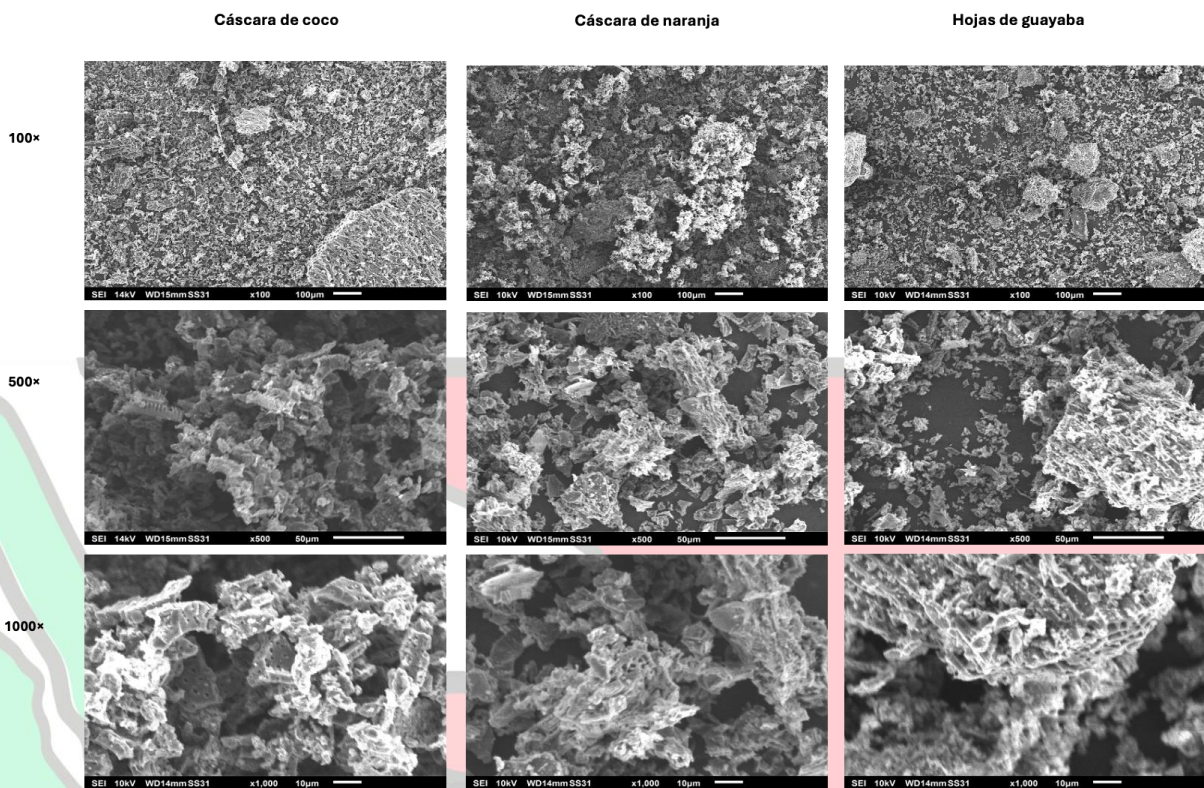
Bandas	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Cáscara de naranja	Cáscara de coco	Hoja de guayaba
A	3500–3300	O–H (alcoholes, fenoles, lignocelulósicos residuales)	3435	No encontrado	No encontrado
B	2920–2850	C–H alifático (–CH <sub>2</sub> , –CH <sub>3</sub> )	2901	No encontrado	2903
C	1740–1700	C=O (carbonilos, carboxilos, ésteres)	No encontrado	No encontrado	1792
D	1620–1570	C=C aromático (lignina, estructuras grafíticas)	1592	1571	4572
E	1396–1446	δ(C–H) / COO <sup>-</sup> (carboxilatos)	1396	1354	1408
F	1200–1250	C–N (aminas)	1256	No encontrado	No encontrado
G	1115–1000	C–O (alcoholes, fenoles, ésteres)	1067	1111	1067
H	873–500	C–H aromático / C–C esqueleto carbonoso	872	748	615

### 3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 2 muestra las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los biocarbones derivados de cáscara de naranja, cáscara de coco y hoja de guayaba a diferentes aumentos (100×, 500× y 1000×). En general, los tres biocarbones presentan una morfología heterogénea, con partículas de forma irregular, superficies rugosas y presencia de cavidades.

- Biocarbón derivado de cáscara de coco. A bajos aumentos (100× y 500×), en el biocarbón se muestran fragmentos con bordes fracturados y superficie irregular, pero en el mayor aumento (1000×), se observaron microcanales y poros abiertos con morfología circular y alargada, con diámetros aproximados entre 0.5 y 1 μm, correspondientes a macroporos. Estas cavidades se distribuyen de manera interconectada sobre la superficie del material.
- Biocarbón derivado de cáscara de naranja. A 100×, el biocarbón exhibió una estructura aglomerada y de aspecto esponjoso. A mayores aumentos (500× y 1000×), se distinguieron fragmentos con caras planas y regiones fracturadas, generando espacios amplios entre partículas, sin observarse poros bien definidos.
- Biocarbón derivado de hoja de guayaba. A aumentos de 100× y 500×, este biocarbón mostró agregados de partículas con regiones laminares y fibrilares, así como estructuras en forma de malla. A 1000×, la superficie presentó una textura arrugada y fibrosa, con microcavidades poco profundas distribuidas de manera irregular.

En conjunto, aunque los tres biocarbones presentan rugosidad superficial y cavidades, se observaron diferencias claras en la morfología y distribución de las estructuras superficiales entre los materiales.



**Figura 7.** Micrografías SEM de los biocarbones derivados de residuos agroindustriales (cáscara de coco, cáscaras de naranja y hojas de guayaba) obtenidas a diferentes aumentos (100x, 500x, y 1000x).

### 3.3. Potencial Z

El potencial Z de los biocarbones evaluados mostró un comportamiento dependiente del pH, como se presenta en la Figura 3. El biocarbón derivado de la cáscara de coco presentó la mayor carga negativa, comenzando en  $-3.5$  mV a pH 1 y disminuyendo de manera continua hasta aproximadamente  $-60$  mV en el intervalo de pH 9–11. Así mismo, el biocarbón derivado de la cáscara de naranja exhibió valores negativos en todo el intervalo de pH evaluado, iniciando en  $-2.1$  mV a pH 1, con una disminución progresiva hasta  $-51.3$  mV a pH 5. Posteriormente, se observó una ligera reducción del potencial zeta hacia valores alrededor de  $-30$  mV en condiciones alcalinas (pH 7–11). Por su parte, el biocarbón derivado de las hojas de guayaba presentó valores positivos en condiciones ácidas, con un valor de  $+16.1$  mV a pH 1. Sin embargo, después de pH 3, el potencial Z cambió negativamente a  $-17.6$  mV y a pH de 11 disminuyó aún más ( $-35.9$  mV).

En general, los tres biocarbones mostraron un incremento de la carga negativa conforme aumentó el pH, aunque con diferencias en el comportamiento inicial en medio ácido.

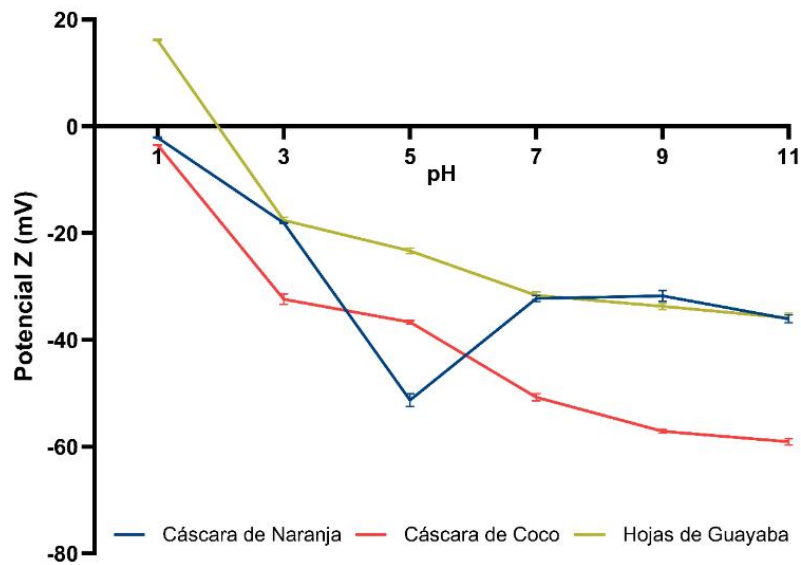


Figura 8. Relación entre el potencial zeta (Pz) y el pH en diferentes biocarbones derivados de desechos agroindustriales.

### 3.4. Punto de carga cero (pHpzc)

El punto de carga cero (pHpzc) de los biocarbones se determinó mediante el método de variación de pH, graficando el cambio de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) en función del pH inicial (Figura 4). El valor de pHpzc se identificó en la intersección de cada curva con el eje horizontal ( $\Delta\text{pH} = 0$ ). El biocarbón derivado de cáscara de coco presentó un pHpzc entre pH 8 y 9, mientras que los de cáscara de naranja y la hoja de guayaba mostraron valores más elevados, aproximadamente en pH 11.

Estos valores indican diferencias en el comportamiento ácido-base de las superficies de los biocarbones evaluados.

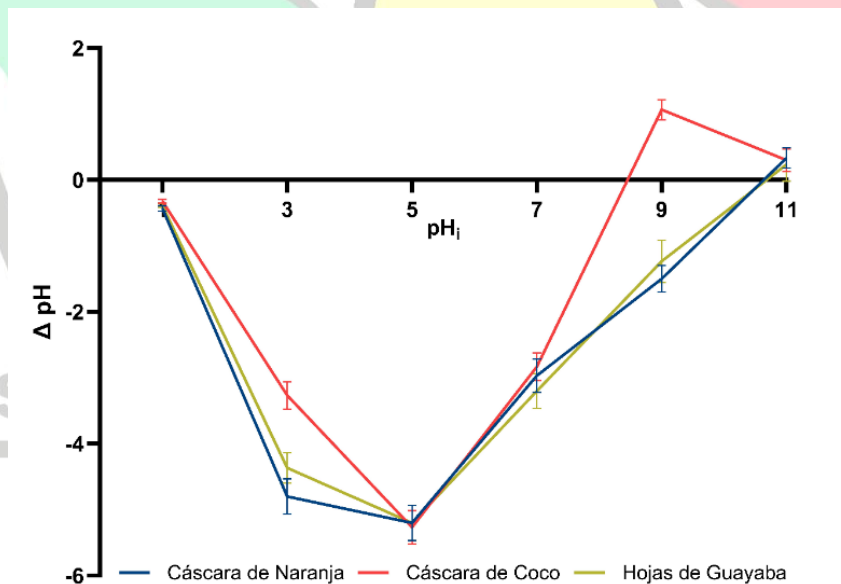


Figura 9. Punto de carga cero (pHpzc) de los biocarbones derivados de desechos agroindustriales.

### 3.5. Área Superficial y tamaño de poro

La Tabla 2 muestra los valores de área superficial específica y tamaño medio de poro obtenidos mediante análisis BET para los biocarbones obtenidos. El biocarbón de cáscara de coco presentó la mayor área superficial, con un valor de 179.7 m<sup>2</sup>/g, y el menor tamaño medio de poro, de 2.8 nm. En el caso del biocarbón de cáscara de naranja mostró un área superficial de 29.8 m<sup>2</sup>/g y un tamaño de poro de 5.7 nm, mientras que el de hojas de guayaba presentó la menor área superficial, de 9.6 m<sup>2</sup>/g, y el mayor tamaño medio de poro (18.8 nm).

**Tabla 2.** Área superficial y tamaño medio de poro de los biocarbones derivados de desechos agroindustriales mediante análisis de BET

Biocarbón	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño medio de Poro (nm)
Cáscara de Naranja	29.8	5.7
Cáscara de Coco	179.7	2.8
Hojas de Guayaba	9.6	18.8

### 3.6. Tamaño de partícula por difracción láser

La Tabla 3 presenta los resultados del análisis de tamaño de partícula por difracción láser de los biocarbones evaluados. El proceso de molienda generó distribuciones relativamente homogéneas, con tamaños medios comprendidos entre 55.30 y 82.88 μm. El biocarbón de cáscara de coco presentó un tamaño medio de 69.45 μm y una mediana de 67.03 μm, con valores de D<sub>10</sub> = 23.29 μm y D<sub>90</sub> = 118.90 μm, lo que indica una distribución moderadamente amplia de tamaños de partícula. Por su parte, el biocarbón derivado de cáscara de naranja mostró el menor tamaño medio de partícula, con un valor de 55.30 μm y una mediana de 50.42 μm, así como valores de D<sub>10</sub> = 16.40 μm y D<sub>90</sub> = 102.10 μm, lo que sugiere una mayor susceptibilidad a la fragmentación durante el proceso de molienda. Mientras tanto, el biocarbón derivado de hojas de guayaba presentó el mayor tamaño medio de partícula, de 82.88 μm, y una mediana de 84.93 μm, con un intervalo amplio entre D<sub>10</sub> = 21.28 μm y D<sub>90</sub> = 140.50 μm, reflejando una distribución más heterogénea.

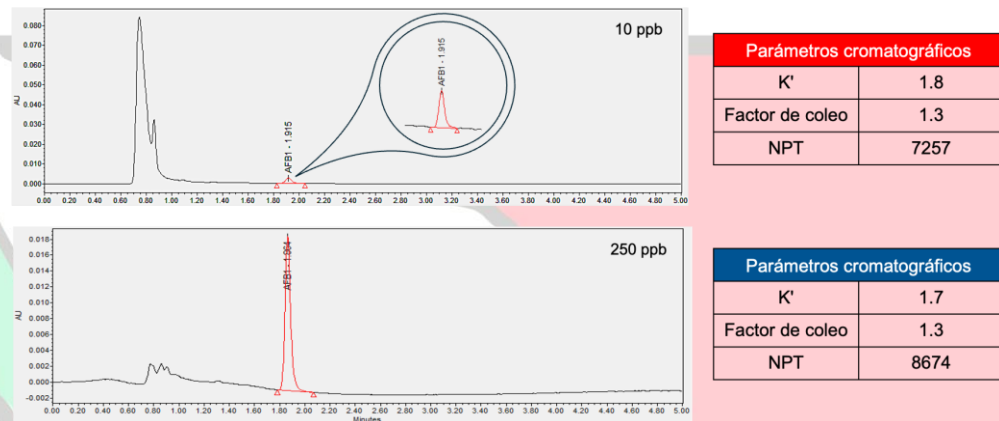
En general, el orden del tamaño medio de partícula fue: hoja de guayaba > cáscara de coco > cáscara de naranja.

**Tabla 3.** Tamaño de partícula de los biocarbones derivados de desechos agroindustriales determinados por difracción láser.

Biocarbón	Media (μm)	Mediana (μm)	D10 (μm)	D90 (μm)
Cáscara de Coco	69.45	67.03	23.29	118.90
Cáscara de Naranja	55.30	50.42	16.40	102.10
Hojas de Guayaba	82.88	84.93	21.28	140.50

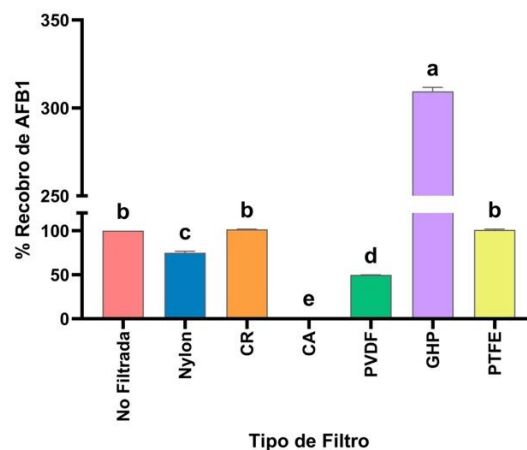
### 3.7. Cuantificación de AFB1 por UPLC-PDA

Se desarrolló un método analítico por UPLC-PDA para la cuantificación de aflatoxina B1 (AFB1), el cual resultó ser lineal en un intervalo de concentraciones de 10 a 250 ppb de AFB1. La Figura 5 muestra los cromatogramas obtenidos para soluciones estándar de AFB1 a concentraciones de 10 y 250 ppb, en los cuales se observa un tiempo de retención cercano a 1.9 min. Además, los parámetros cromatográficos como  $K'$ , factor de coeio y número de platos teóricos fueron de 1.8, 1.3 y 7257, lo cual cumple con lo marcado para métodos cromatográfico. Estos resultados evidencian que el método desarrollado es adecuado para la determinación confiable de AFB1 en las condiciones de estudio.



**Figura 10.** Cromatograma de la AFB1 a 10 y 250 ppbs y sus parámetros cromatográficos correspondientes. NPT: número de platos teóricos.

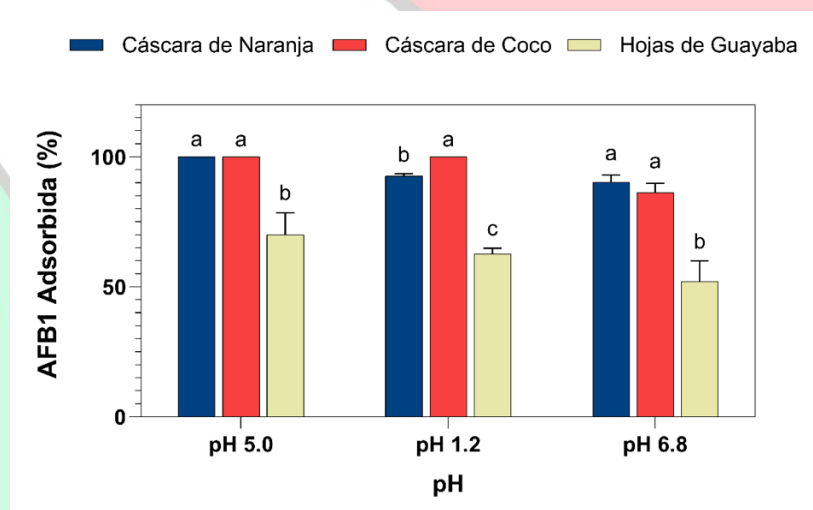
El desarrollo del método analítico también consideró la influencia del filtro. Para esto se compararon soluciones de AFB1 a 250 ppb filtradas a través de 6 tipos diferentes de Acrodiscos de 0.2  $\mu\text{m}$  con soluciones no filtradas (Figura 6). Los resultados mostraron que no hay influencia del proceso de filtración cuando se utilizaron los filtros de CR y PTFE ya que no se presentaron diferencias significativas en comparación con las soluciones no filtradas. En el caso de los filtros de nylon, PVDF y CA retuvieron 24.98%, 50.26% y 98.64% de AFB1, respectivamente. Interesantemente, con el filtro GHP se obtuvo recobro 309.44% de AFB1.



**Figura 11.** Influencia del filtro en el recobro de AFB1. Los resultados están dados como la Media  $\pm$  SE, (n=6). CR: celulosa regenerada, CA: acetato de celulosa, PVDF: fluoruro de polivinilideno, GHP: polipropileno hidrófilo y PTFE: politetrafluoroetileno.

### 3.8. Estudios de Adsorción en soluciones Buffer

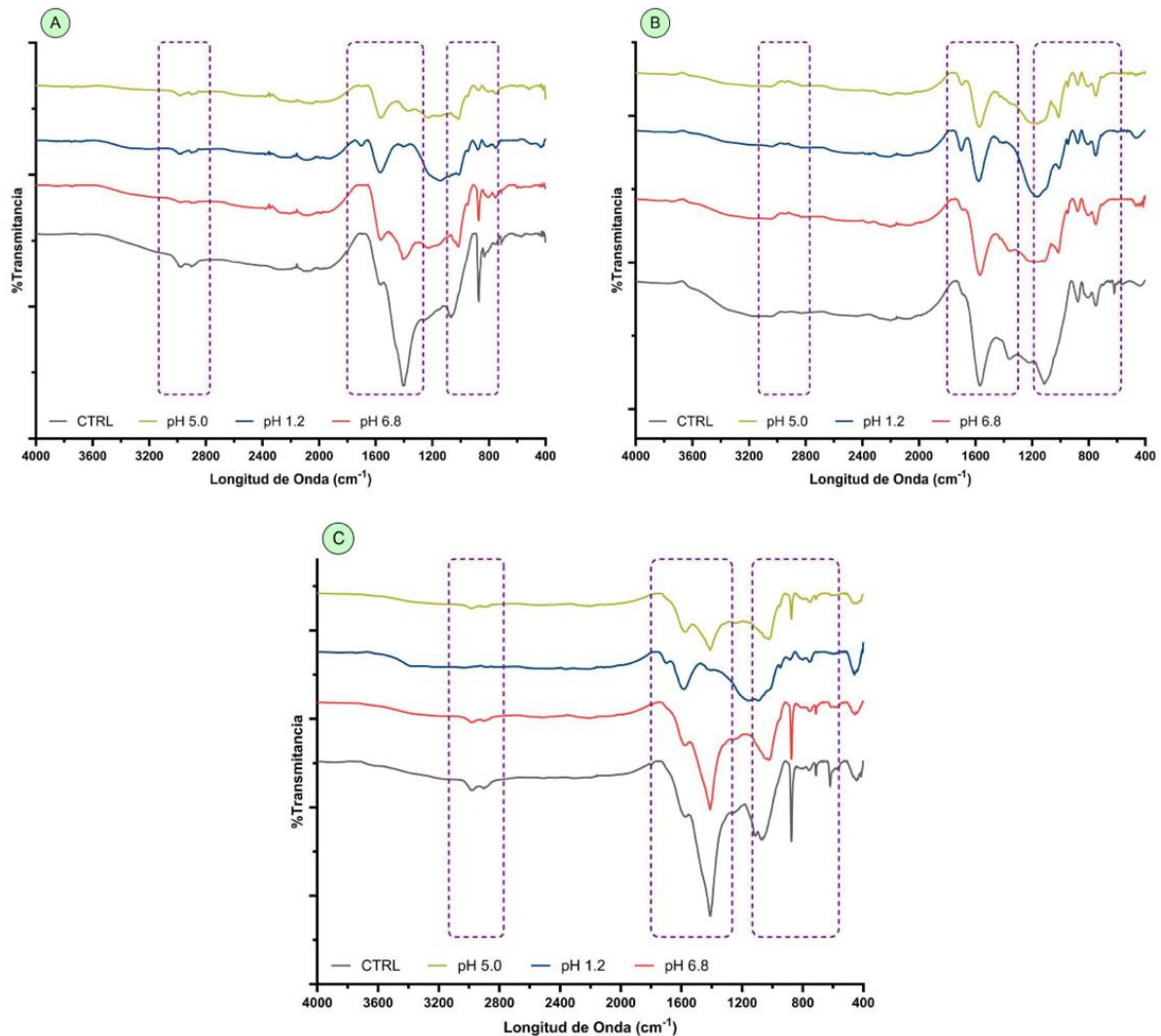
En las tres condiciones de pH evaluadas, las biomásas mostraron una alta eficiencia en la adsorción de AFB1 a una concentración de 250 ppb (Figura 7). A pH 5.0, los biocarbones derivados de cáscara de coco y cáscara de naranja alcanzaron una adsorción cercana al 100 %, mientras que el biocarbón derivado de hoja de guayaba presentó un valor inferior ( $\approx 70$  %). A pH 1.2, el biocarbón de cáscara de coco mantuvo una adsorción del 100 %, siendo estadísticamente superior a la observada en el biocarbón derivado de la cáscara de naranja ( $\approx 92$  %). En este mismo pH, el biocarbón derivado de hoja de guayaba mostró significativamente la menor capacidad de adsorción ( $\approx 67$  %) en comparación con los otros biocarbones. Finalmente, a pH 6.8 se observaron resultados comparables a los anteriores, con valores de adsorción de 90 % para el biocarbón derivado de cáscara de naranja, 86 % para el de cáscara de coco y 52 % para el de hoja de guayaba. No obstante, no se presentaron diferencias significativas entre los biocarbones derivados de cáscara de coco y naranja.



**Figura 12.** Capacidad de adsorción de 3 biocarbones derivados de desechos agroindustriales de cáscara de coco, cáscara de naranja y hojas de guayaba al 0.05% en diferentes pH considerando una concentración de AFB1 de 250 ppb. Los resultados están dados como la Media  $\pm$  SE, (n=3).

Con la finalidad de elucidar el mecanismo de adsorción de los biocarbones, se obtuvieron espectros FTIR antes y después del proceso de adsorción (Figura 8). En el biocarbón derivado de cáscara de naranja (Figura 8A), se observó una disminución en la intensidad de la banda asociada a vibraciones C=C aromáticas ( $\sim 1406$   $\text{cm}^{-1}$ ) en las tres condiciones de pH evaluadas, siendo este efecto más evidente a pH 5.0. Así mismo, la banda ubicada alrededor de  $873$   $\text{cm}^{-1}$  mostró una atenuación a pH 5.0 y 1.2, mientras que a pH 6.8 presentó una intensidad intermedia.

En el biocarbón de cáscara de coco (Figura 8B), la banda correspondiente a C=C aromático ( $\sim 1571$   $\text{cm}^{-1}$ ) presentó una reducción de intensidad en los tres pH evaluados, con un efecto más pronunciado en condiciones ácidas (pH 5.0 y 1.2). De manera similar, en el biocarbón de hojas de guayaba (Figura 8C), las bandas localizadas alrededor de  $1409$  y  $874$   $\text{cm}^{-1}$  disminuyeron su intensidad tras la exposición a la AFB1, aunque a pH 6.8 la banda en  $874$   $\text{cm}^{-1}$  se mantuvo más intensa en comparación con las condiciones ácidas.

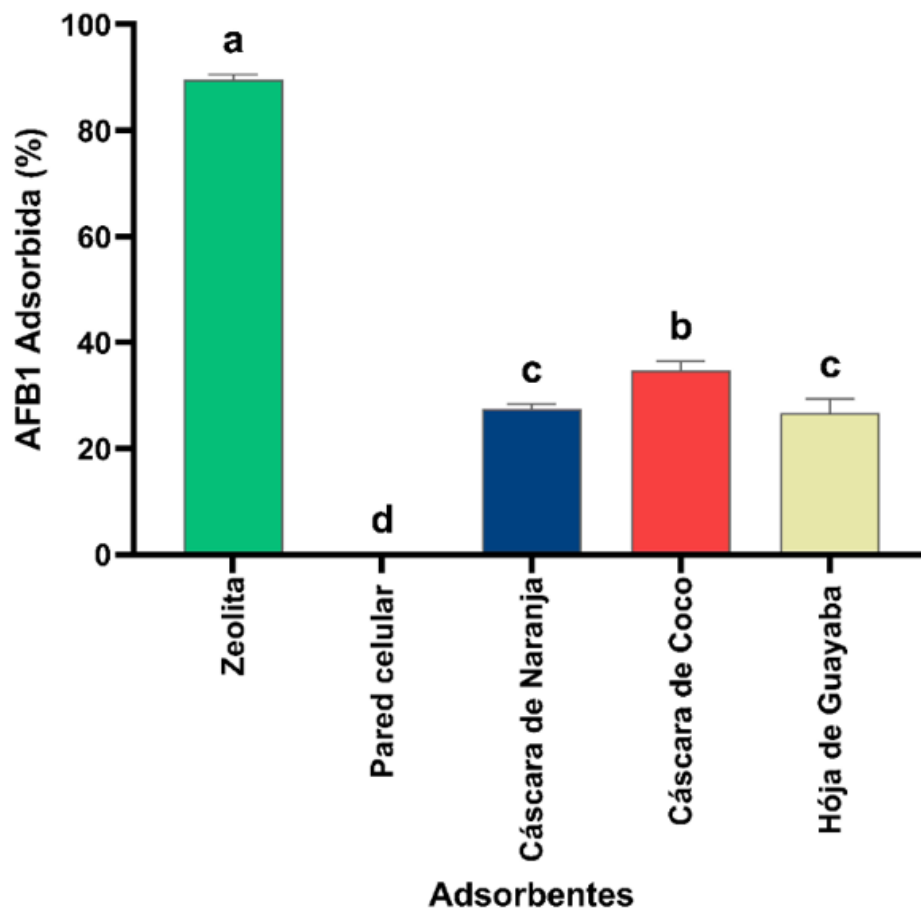


**Figura 13.** Espectros FTIR de los biocarbones derivados de A) Cáscara de Naranja, B) Cáscara de Coco y C) Hojas de Guayaba, antes y después de ser expuestos a la AFB1 en diferentes pHs.

### 3.9. Estudios de adsorción en un modelo *in vitro* de digestibilidad

La Figura 9 muestra los resultados de adsorción de AFB1 por parte de los biocarbones, así como de zeolita y pared celular de levadura, evaluados en un modelo *in vitro* de digestibilidad que simula las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos de engorda. La adsorción se evaluó únicamente en la fase que simula el intestino (pH 6.8). La zeolita, utilizada como control positivo, presentó una alta capacidad adsorbente, con un valor de 89.64 %. En contraste, la pared celular de levadura, utilizada como control negativo, no mostró capacidad de adsorción de AFB1 en el modelo (0.00 %). Mientras tanto, los biocarbones presentaron una capacidad adsorbente moderada. El biocarbón derivado de cáscara de coco mostró una adsorción significativamente mayor (32.96 %) en comparación con los biocarbones obtenidos de cáscara de naranja (27.44 %) y hojas de guayaba (26.73 %). No se observaron diferencias significativas entre los biocarbones derivados de cáscara de naranja y hojas de guayaba.

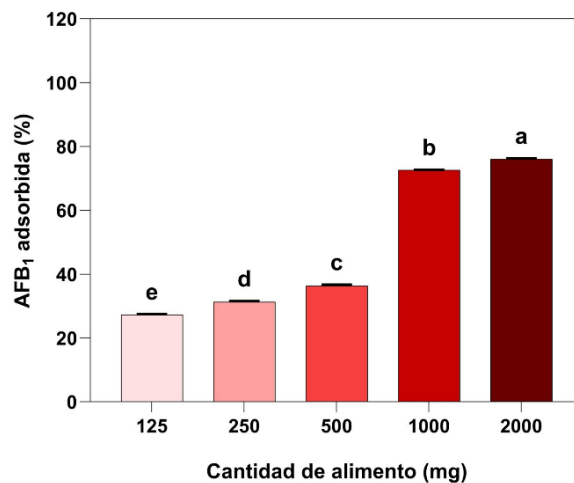
Durante la fase de ajuste del modelo, se observó que el maíz molido retuvo entre 25 y 30 % de AFB1. Así mismo, las enzimas digestivas empleadas en el modelo (pepsina y pancreatina) no mostraron efecto sobre la adsorción o degradación de AFB1.



**Figura 14.** Capacidad de adsorción de 3 biocarbones derivados de desechos agroindustriales de cáscara de coco, cáscara de naranja y hojas de guayaba al 0.05% en un modelo in vitro de digestibilidad aviar considerando una concentración de AFB1 de 250 ppb. Los resultados están dados como la Media  $\pm$  SE, (n=3).

### 3.10. Estudios de adsorción maíz-AFB1

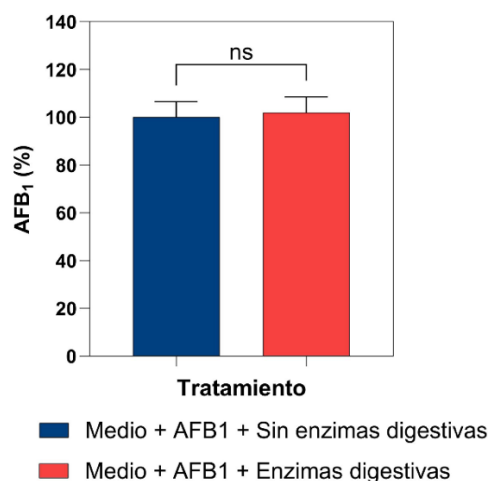
La Figura 10 muestra el porcentaje de AFB1 adsorbida en función de la cantidad de alimento (maíz) evaluada en el modelo aviar in vitro de digestibilidad. A cantidades bajas de maíz (125 y 250 mg), la adsorción de AFB1 fue limitada, con valores entre 27.3 y 31.3 %. En particular, a 125 mg se observó una adsorción significativamente menor en comparación con el resto de los tratamientos. Al incrementar la cantidad de maíz a 500 mg, la adsorción de AFB1 aumentó de manera significativa, alcanzando un valor aproximado de 36.3 %, en comparación con las cantidades de 125 y 250 mg. Además, a cantidades elevadas de maíz (1000 y 2000 mg), se observó un incremento pronunciado y significativo en la adsorción de AFB1, alcanzando valores de 72.6 % y 76.1 %, respectivamente. Las diferencias observadas entre todos los tratamientos confirman una dependencia directa entre la cantidad de alimento y la adsorción de AFB1 en el modelo in vitro.



**Figura 10.** Porcentaje de AFB1 adsorbida en función de la cantidad de alimento evaluada dentro del modelo aviar in vitro de digestibilidad.

### 3.11. Estudios de adsorción enzima-AFB1

La **Figura 11** muestra la concentración de AFB1 en el modelo in vitro de digestibilidad aviar en **presencia y ausencia de enzimas digestivas**. Los resultados indicaron que la adición de **enzimas digestivas**, específicamente **pepsina** en el compartimiento que simula el proventrículo y **pancreatina** en la fase intestinal, **no presentaron capacidad de adsorción de AFB1, pues no se mostraron cambios significativos** en el porcentaje de AFB1 presente en el medio en comparación con el tratamiento sin enzimas.



**Figura 15.** Concentración de AFB1 en el modelo in vitro de digestibilidad aviar en presencia y ausencia de enzimas digestivas.

#### 4. Discusión y conclusiones

Los residuos agroindustriales representan una de las principales problemáticas ambientales asociadas a los sistemas de producción agroalimentaria, debido a los grandes volúmenes que se generan anualmente y a su limitada valorización. En particular, residuos lignocelulósicos como la cáscara de coco, la cáscara de naranja y las hojas de guayaba se producen en cantidades considerables, alcanzando millones de toneladas, y poseen una composición rica en celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que los convierte en precursores atractivos para la obtención de biocarbones [5]. El interés en estos materiales radica en su potencial para adquirir una “segunda vida” como adsorbentes, contribuyendo a la reducción del impacto ambiental y aprovechando sus propiedades estructurales y químicas para la remoción de contaminantes [9]

Durante los procesos de carbonización y activación, la composición del precursor influye directamente en el desarrollo de la porosidad, el área superficial y la exposición de grupos funcionales en la superficie del material [10]. Estas características son determinantes en los procesos de adsorción, ya que gobiernan tanto la accesibilidad de los sitios activos como la naturaleza de las interacciones con el adsorbato [11]. Aunque el tamaño de partícula suele considerarse un parámetro relevante, diversos estudios han demostrado que no constituye uno de los factores con mayor influencia en la adsorción de contaminantes como la aflatoxina B1 (AFB1), cuando se compara con la química superficial y el tamaño de poro del material [12].

En este sentido, la caracterización fisicoquímica de los biocarbones resulta indispensable para interpretar su comportamiento adsorbente. La evaluación del punto de carga cero (pHpzc) y del potencial Z permitió identificar las condiciones en las que la superficie de los biocarbones adquiere carga positiva o negativa, así como el intervalo de pH en el que la carga superficial se aproxima a la neutralidad. En este estudio, los biocarbones mostraron valores de pHpzc cercanos a pH 8-9 para la cáscara de coco y alrededor de pH 11 para la cáscara de naranja y las hojas de guayaba, lo que explica la predominancia de carga negativa de los biocarbones en condiciones de pH fisiológicamente simuladas. Esta información es relevante porque la carga de la superficie del adsorbente, en combinación con el estado iónico de la micotoxina, determina la intensidad de las interacciones electrostáticas y contribuye a explicar en qué condiciones se alcanza una capacidad máxima de adsorción.

De manera complementaria, los análisis FTIR evidenciaron que los biocarbones conservan grupos funcionales característicos de precursores lignocelulósicos, principalmente grupos oxigenados y estructuras aromáticas, los cuales pueden participar activamente en el proceso de adsorción [13]. Dado que la AFB1 es una molécula predominantemente neutra, la adsorción no depende exclusivamente de fuerzas electrostáticas.

Bajo esta perspectiva, el mecanismo de adsorción se atribuye principalmente a la acción sinérgica de interacciones hidrofóbicas entre las estructuras aromáticas del biocarbón y la micotoxina, así como la formación de puentes de hidrógeno con los grupos oxigenados remanentes, lo que coincide con lo reportado previamente en la literatura [8]. Así mismo, la determinación del área superficial y el tamaño de poro mostró diferencias claras entre los biocarbones evaluados, reflejo de su distinta composición precursora y de su comportamiento durante la carbonización [14]. En particular, el biocarbón derivado de cáscara de coco presentó la mayor área superficial ( $\approx 180 \text{ m}^2/\text{g}$ ) y un tamaño de poro promedio cercano a 2.8 nm, mientras que los biocarbones derivados de la cáscara de naranja y las hojas de guayaba mostraron áreas superficiales menores ( $\approx 30$  y  $\approx 10 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectivamente) y poros de mayor tamaño.

Una vez concluida la etapa de caracterización, se procedió a evaluar la capacidad de adsorción de AFB1 en un primer nivel mediante estudios en soluciones buffer. En estas condiciones controladas, los tres biocarbones demostraron poseer capacidad adsorbente, alcanzando valores elevados de remoción de la micotoxina. Específicamente, el biocarbón de cáscara de coco mostró adsorciones cercanas al 100 % a pH 1.2 (proventrículo) y 5.0 (buche), mientras que los biocarbones de cáscara de naranja y hojas de guayaba presentaron eficiencias ligeramente menores, especialmente a pH 6.8 (intestino). Estos resultados indican que la combinación de porosidad adecuada y química superficial favorece la interacción con la AFB1.

El mejor desempeño del biocarbón de cáscara de coco se atribuye a su mayor contenido de lignina, componente que favorece la formación de una estructura carbonosa aromática de alta estabilidad térmica. Esta composición promueve el desarrollo de una red de poros estructurada, incrementando el área superficial específica mediante el aumento de la superficie interna disponible [5]. En contraste, los biocarbones derivados de cáscara de naranja y hojas de guayaba, que presentan un menor contenido de grupos funcionales asociados a lignina y una mayor proporción de celulosa y hemicelulosa, desarrollan estructuras con menor área superficial y poros de mayor tamaño, los cuales contribuyen en menor medida a la superficie específica, reflejándose en una capacidad adsorbente inferior. Este comportamiento concuerda con lo reportado previamente para materiales lignocelulósicos con composiciones similares [15] [16].

Para cuantificar de manera confiable la adsorción de AFB1, fue necesario contar con un método analítico que permitiera cuantificar la micotoxina con adecuada selectividad y mínima interferencia de matriz. En este sentido, la cromatografía de líquidos se reconoce como una técnica confirmatoria robusta para la determinación de aflatoxinas, en comparación con métodos basados en técnicas fluorométricas o inmunológicas, las cuales pueden verse afectados por interferencias de matriz, disponibilidad de insumos o variabilidad adicional [17] [18]. Por esta razón, se desarrolló un método por cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento (UPLC-PDA), el cual presentó un comportamiento lineal en el intervalo de 10–250 ppb, un tiempo de retención alrededor de 1.9 min y un factor de coelución aproximado de 1.3, cumpliendo con los parámetros cromatográficos requeridos para la cuantificación de AFB1. Este enfoque constituye una alternativa accesible y reproducible, adecuada para el seguimiento de procesos de adsorción de AFB1 tanto en sistemas simples como en modelos *in vitro* más complejos.

Una vez desarrollado el método analítico, se reconoció la necesidad de evaluar el desempeño de los biocarbones en condiciones más cercanas a la realidad fisiológica. Por ello, se implementó un modelo *in vitro* de digestibilidad aviar que simula las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos de engorda. Este modelo fue previamente ajustado y validado, ya que durante su desarrollo se observaron interacciones entre la AFB1 y el maíz, lo que evidenció que la matriz alimenticia puede influir significativamente en la disponibilidad de la micotoxina.

Los resultados mostraron que la cantidad de alimento tiene un efecto directo sobre la fracción de AFB1 retenida, observándose que, al incrementar la cantidad de maíz de 125 a 2000 mg, la adsorción total de AFB1 aumentó de aproximadamente 27–31% hasta valores cercanos al 75%. Dicho comportamiento se relaciona con la composición compleja del maíz, rica en almidón y proteínas, con una fracción menor de componentes lignocelulósicos [19], lo que podría generar un fenómeno de “competencia” entre el maíz y los biocarbones por la micotoxina. Por esta razón, el modelo fue ajustado para minimizar la adsorción atribuible al maíz y permitir que los resultados reflejaran principalmente la capacidad adsorbente propia de los biocarbones.

Adicionalmente, se evaluó el posible efecto de las enzimas digestivas empleadas en el modelo, con el objetivo de determinar si estas podían adsorber o degradar la AFB1. Los resultados indicaron que dichas enzimas no ejercen un efecto significativo sobre la micotoxina, confirmando que las variaciones observadas se deben principalmente a fenómenos de adsorción.

Finalmente, bajo condiciones fisiológicamente simuladas, el biocarbón derivado de cáscara de coco mantuvo la mayor capacidad adsorbente, con valores de 32.96 %, seguido por los biocarbones de cáscara de naranja y hojas de guayaba, con adsorciones de 27.44 % y 26.73 %, respectivamente. Aunque estos valores son menores que los obtenidos en soluciones buffer, refuerzan que las propiedades intrínsecas del material continúan desempeñando un papel determinante incluso en sistemas más complejos.

A partir de estas observaciones, aunque los tres biocarbones presentan mecanismos de adsorción similares, la eficiencia global del proceso se ve fuertemente influenciada por la estructura porosa y el área superficial específica de los materiales. En particular, únicamente los poros con dimensiones mayores o más cercanas al tamaño del adsorbato contribuyen de manera efectiva a la adsorción, ya que generan un efecto de confinamiento que incrementa la energía de interacción y favorece una retención más eficiente de la micotoxina [20] [21]. Esta dinámica justifica el desempeño superior del biocarbón derivado de cáscara de coco frente a los materiales obtenidos de cáscara de naranja y hojas de guayaba, y concuerda con lo reportado previamente, indicando que el fenómeno de adsorción está principalmente influenciado por

la accesibilidad de la red porosa y no por el tamaño de partícula del adsorbente [12]. Estos hallazgos evidencian que la capacidad adsorbente de los biocarbones depende de una interacción compleja entre la composición del material, sus propiedades fisicoquímicas y el entorno en el que se evalúa. Si bien factores como la matriz alimenticia pueden limitar la adsorción total de AFB1, los resultados posicionan al biocarbón de cáscara de coco como el material más prometedor para futuras evaluaciones in vivo, debido a su naturaleza lignocelulósica, mayor área superficial, estructura porosa adecuada y desempeño consistente bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

En conclusión, el aprovechamiento de residuos agroindustriales lignocelulósicos como precursores para la obtención de biocarbones constituye una alternativa sustentable para la mitigación de aflatoxina B1 (AFB1) en sistemas avícolas. No obstante, los resultados del presente estudio evidencian que la evaluación de estos materiales no debe limitarse a sistemas simples, sino considerar escenarios que reflejen de manera más realista las condiciones fisiológicas en las que serán aplicados. En este contexto, el uso de modelos in vitro de digestibilidad aviar permitió identificar interacciones relevantes entre la micotoxina, el alimento y el adsorbente, las cuales no son evidentes en ensayos convencionales y pueden condicionar significativamente el desempeño de los materiales. Este enfoque resalta la importancia de incorporar etapas de evaluación previas a su aplicación en modelos in vivo, que orienten la selección adecuada de adsorbentes. En conjunto, este trabajo establece un marco metodológico para la evaluación de biocarbones funcionales destinados a la mitigación de micotoxinas, aportando criterios que pueden contribuir al desarrollo de estrategias más eficientes, reproducibles y sustentables en la industria avícola.

#### Referencias

- [1] C.-N. C. Serrano-Coll Héctor Alejandro, "Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos," vol. 29, no. 1, 2015.
- [2] C. A. Mallmann and R. Rauber, "Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves," 2007. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/228614446>
- [3] T. I. Bustamante-Lara et al., "¿Es México competitivo en el comercio internacional de carne de pollo?," Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional, vol. 33, no. 61, Mar. 2023, doi: 10.24836/ES.V33I61.1276.
- [4] R. Bhat, R. V. Rai, and A. A. Karim, "Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns," Compr Rev Food Sci Food Saf, vol. 9, no. 1, pp. 57–81, Jan. 2010, doi: 10.1111/J.1541-4337.2009.00094.X.
- [5] N. Mejías-Brizuela, Orozco-Guillen, Galáan-Hernández, and Néstor, "Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México," vol. 2, no. 6, pp. 27–41, 2016, Accessed: May 05, 2025. [Online]. Available: [www.ecorfan.org/spain](http://www.ecorfan.org/spain)
- [6] A. Zavala-Franco et al., "Assessing the Aflatoxin B1 Adsorption Capacity between Biosorbents Using an In Vitro Multicompartmental Model Simulating the Dynamic Conditions in the Gastrointestinal Tract of Poultry," Toxins 2018, Vol. 10, Page 484, vol. 10, no. 11, p. 484, Nov. 2018, doi: 10.3390/TOXINS10110484.
- [7] D. Hernandez-Patlan et al., "Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against salmonella enteritidis infection and intestinal permeability in broiler chickens: A pilot study," Front Microbiol, vol. 9, no. JUN, p. 382212, Jun. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.01289/BIBTEX.
- [8] B. Solís-Cruz et al., "Evaluation of Chitosan and Cellulosic Polymers as Binding Adsorbent Materials to Prevent Aflatoxin B1, Fumonisin B1, Ochratoxin, Trichothecene, Deoxynivalenol, and Zearalenone Mycotoxicoses Through an In Vitro Gastrointestinal Model for Poultry," Polymers 2017, Vol. 9, Page 529, vol. 9, no. 10, p. 529, Oct. 2017, doi: 10.3390/POLYM9100529.
- [9] S. Saval, "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro," vol. 16, no. 2, 2012.
- [10] U. Sevilla, "Manual del Carbón Activo," 2011, Accessed: May 07, 2025. [Online]. Available: [www.aguapedia.net](http://www.aguapedia.net)
- [11] R. F. Reinoso and M. M. Sabio, "El carbón activado en procesos de descontaminación," Departamento de Química Inorgánica. Universidad de Alicante. España, 2002.
- [12] X. Li, Y. Ju, Y. Song, Z. Yan, and Q. Li, "Particle Size and Internal Structure of Deformed Coal: Microstructure and Adsorption/Desorption Characteristics of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>," Front Earth Sci (Lausanne), vol. 10, p. 876196, May 2022, doi: 10.3389/FEART.2022.876196/BIBTEX.
- [13] T. Sewring, J. Durruty, L. Schneider, H. Schneider, T. Mattsson, and H. Theliander, "Acid Precipitation of Kraft Lignin from Aqueous Solutions: The Influence of pH, Temperature, and Xylan," Journal of Wood Chemistry and Technology, vol. 39, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2019, doi: 10.1080/02773813.2018.1488870;ISSUE:ISSUE:DOI.
- [14] A. C. Lua, "A comparative study of the pore characteristics and phenol adsorption performance of activated carbons prepared from oil-palm shell wastes by steam and combined steam-chemical activation," Green Chemical Engineering, vol. 5, no. 1, pp. 85–96, Mar. 2024, doi: 10.1016/J.GCE.2022.11.004.
- [15] M. E. Tenorio Peñafiel, "Valorización de residuos agroindustriales como adsorbentes para la remoción de fármacos de uso común de aguas contaminadas.," Jan. 2021.
- [16] T. K. Vazquez-Ortiz et al., "Adsorptive potential of two natural enterosorbents for removing aflatoxin B1 under simulated gastric and small intestinal conditions," Mycotoxin Research 2025 41:2, vol. 41, no. 2, pp. 373–383, Mar. 2025, doi: 10.1007/S12550-025-00588-Z.
- [17] A. Vaz, A. C. Cabral Silva, P. Rodrigues, and A. Venâncio, "Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products," Microorganisms, vol. 8, no. 2, p. 246, 2020.
- [18] L. Mochamad and B. Hermanto, "High-performance liquid chromatography ultraviolet-photodiode array detection method for aflatoxin B1 in cattle feed supplements," 2017, doi: 10.14202/vetworld.2017.932-938.
- [19] K. E. Bach Knudsen, "Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding," Anim Feed Sci Technol, vol. 67, no. 4, pp. 319–338, Aug. 1997, doi: 10.1016/S0377-8401(97)00009-6.
- [20] L. Chen, T. Ji, L. Mu, Y. Shi, H. Wang, and J. Zhu, "Pore size dependent molecular adsorption of cationic dye in biomass derived hierarchically porous carbon," J Environ Manage, vol. 196, pp. 168–177, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2017.03.013.
- [21] J. Guo and A. C. Lua, "Textural and chemical characterisations of activated carbon prepared from oil-palm stone with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and KOH impregnation," Microporous and Mesoporous Materials, vol. 32, no. 1–2, pp. 111–117, Nov. 1999, doi: 10.1016/S1387-1811(99)00096-7.

# COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS PROBIÓTICOS COMERCIALES SOBRE HUEVO SUCIO, PRODUCTIVIDAD Y MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS LIBRES DE JAULA DE UNA GRANJA COMERCIAL EN MÉXICO POSTERIOR A UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO POR INFECCIÓN CON *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

López González Victor Hugo, Ibarra Macari María Beatriz

Excelling

victor\_lopez@excelling.com.mx

## Resumen

El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de un probiótico multicepa a base de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, y un probiótico comercial que contiene *Bacillus licheniformis* sobre el huevo sucio, el desempeño productivo y la recuperación de la microbiota intestinal en gallinas ponedoras en sistema libre de jaula, posterior a un tratamiento antibiótico por infección con *Clostridium perfringens*. Se utilizaron 18,000 gallinas Hy-Line de 31 a 41 semanas de edad, distribuidas en dos grupos: Probiótico con 3 cepas de *Bacillus* (Multicepa) y un probiótico comercial con una cepa de *Bacillus licheniformis* (BL). Se registraron porcentaje de huevo sucio, parámetros productivos, mortalidad, huevo acumulado por ave alojada y conteos bacterianos obtenidos mediante hisopado cloacal. Los resultados mostraron que Multicepa favoreció una reducción significativa del porcentaje de huevo sucio (3.94 %) y una recuperación productiva más temprana, en comparación con BL (13.82 %), incrementando la proporción de huevo de primera. Asimismo, el grupo Multicepa presentó mayores conteos de bacterias mesófilas y coliformes comensales, lo que sugiere una recuperación más eficiente de la microbiota intestinal post-antibiótico. En conclusión, el probiótico multicepa representa una alternativa eficaz para mejorar la calidad del huevo y la estabilidad productiva en incluso bajo condiciones de estrés sanitario.

**Palabras Clave:** Enteritis necrótica, recuperación post-antibiótica, huevo de primera, bacterias mesófilas, coliformes comensales, mortalidad.

## Introducción

El mercado para la producción de gallinas libres de jaula es favorable y se encuentra en expansión, ya que los consumidores se están volviendo cada vez más exigentes respecto a productos provenientes de sistemas que garanticen el bienestar animal. En este contexto, se ha adoptado el sistema de producción libre de jaula, el cual permite que las gallinas criadas sin jaulas expresen comportamientos naturales. Sin embargo, diversos factores pueden afectar los sistemas de producción alternativos, y la inclusión adecuada de probióticos puede mejorar la eficiencia productiva, reducir la morbilidad, disminuir la mortalidad y la contaminación ambiental, además de mejorar la inocuidad alimentaria. [1]

Una opción interesante es la inclusión de probióticos en las dietas avícolas, ya que estos consisten en diversas especies bacterianas benéficas, hongos o levaduras que no solo promueven el crecimiento animal, sino que también inhiben microorganismos patógenos, tales como *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* [1], siendo los tipos A y C de este último los agentes causales de la enteritis necrótica [2].

En 2019 Hernández Patlán et. al. demostraron con un probiótico multicepa (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloquiquefaciens* y *Bacillus licheniformis*) la disminución de la proliferación de *Clostridium perfringens* así como la disminución de la viscosidad del contenido intestinal en modelos de enteritis necrótica in vitro e in vivo, esto atribuido a la capacidad de los bacilos de producir lipopéptidos antimicrobianos y bacteriocinas [3]. También demostraron la producción de diferentes enzimas como lipasa, proteasa y carbohidrasas [4], además de exhibir la capacidad de mejorar la integridad intestinal [3]. En ese sentido el uso de *Bacillus licheniformis* (BL) como probiótico para producción animal ha sido ampliamente utilizado por su capacidad de producir enzimas y sustancias antimicrobianas [5]. Lei, K. et. al. reportaron en 2013 que *Bacillus licheniformis* mejoró la producción de gallinas de postura así como la calidad de cascarón mientras que Qin Songke 2017 encontraron mejoras en el sistema inmunológico, antioxidante y modificación de microbiota intestinal [6].

Este trabajo tiene como objetivo comparar el efecto de la adición de un probiótico comercial que contiene *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloquiquefaciens* y *Bacillus licheniformis* (Multicepa) vs un Probiótico que contiene *Bacillus licheniformis* (BL) en el agua de bebida de gallinas de postura que previamente presentaron enfermedad por *Clostridium perfringens* y que

recibieron antibioterapia, sobre parámetros productivos y recuperación de microbiota, a partir de las 31 semanas de edad hasta las 41 semanas de edad.

### Materiales y Métodos

Se utilizaron 18000 gallinas Hy-Line de 31 hasta las 41 semanas de edad, fueron alojadas en casetas con ambiente natural. El manejo, alimentación y medicina preventivo fueron los habituales de la granja. La distribución de tratamientos se muestra en el cuadro 1

Tratamiento	Numero de aves	Dosis	Frecuencia
Multicepa	9000	1 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL	3 veces por semana
BL	9000	8 x 10 <sup>8</sup> UFC/animal	Diariamente

Cuadro 1. Distribución de tratamientos, la dosis y frecuencia de administración fueron a recomendación del fabricante

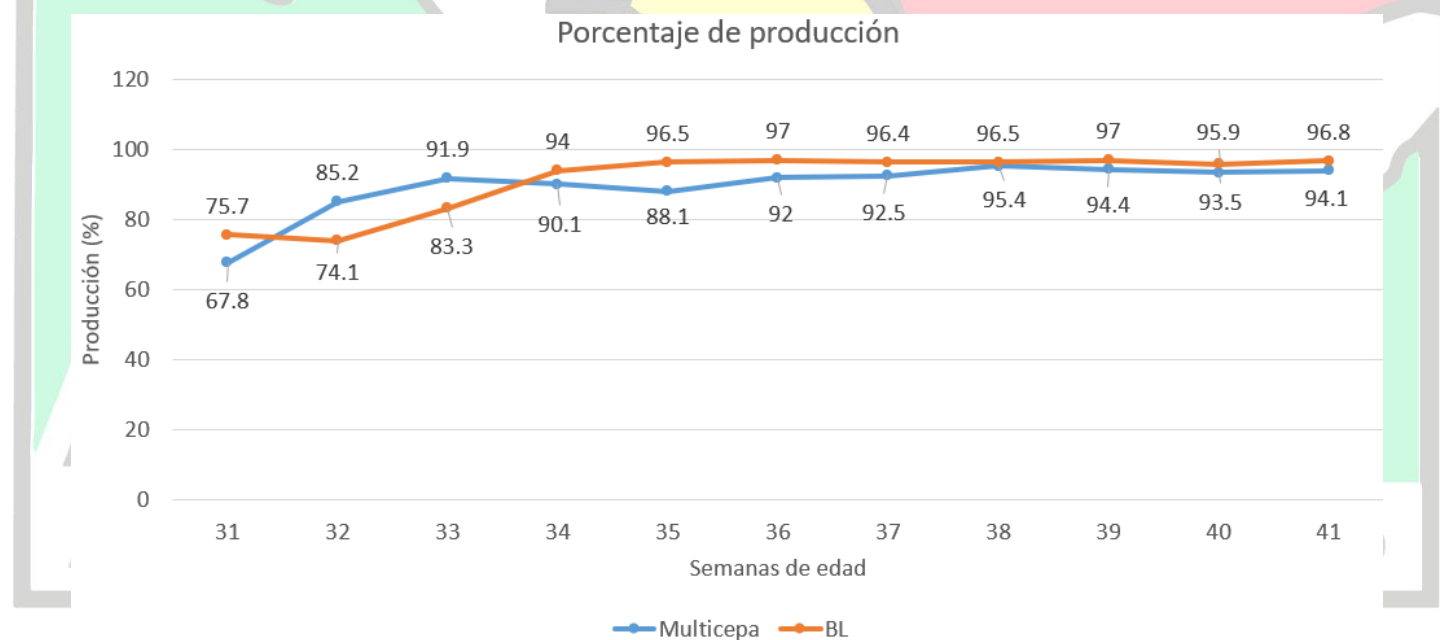
Las casetas cuentan con tinacos de 750 L y bombas dosificadoras de para la adición de ambos tratamientos. La prueba comenzó un día después de que ambas casetas concluyeron la antibioterapia.

Para la evaluación de parámetros productivos se llevó un registro semanal de: producción %, mortalidad semanal, huevos/ave alojada, huevo sucio, por otra parte, la evaluación microbiológica fue realizada mediante conteos bacterianos de mesófilas, coliformes y salmonella.

Para el muestreo se realizaron hisopados cloacales, tomando de forma aleatoria 15 aves por cada grupo. Las muestras de cada grupo se dividieron en 3 pools de 5 hisopos cada uno. Cada hisopo se introdujo en medio de Stuart, debidamente refrigerado o colocado en hielo hasta su envío al laboratorio.

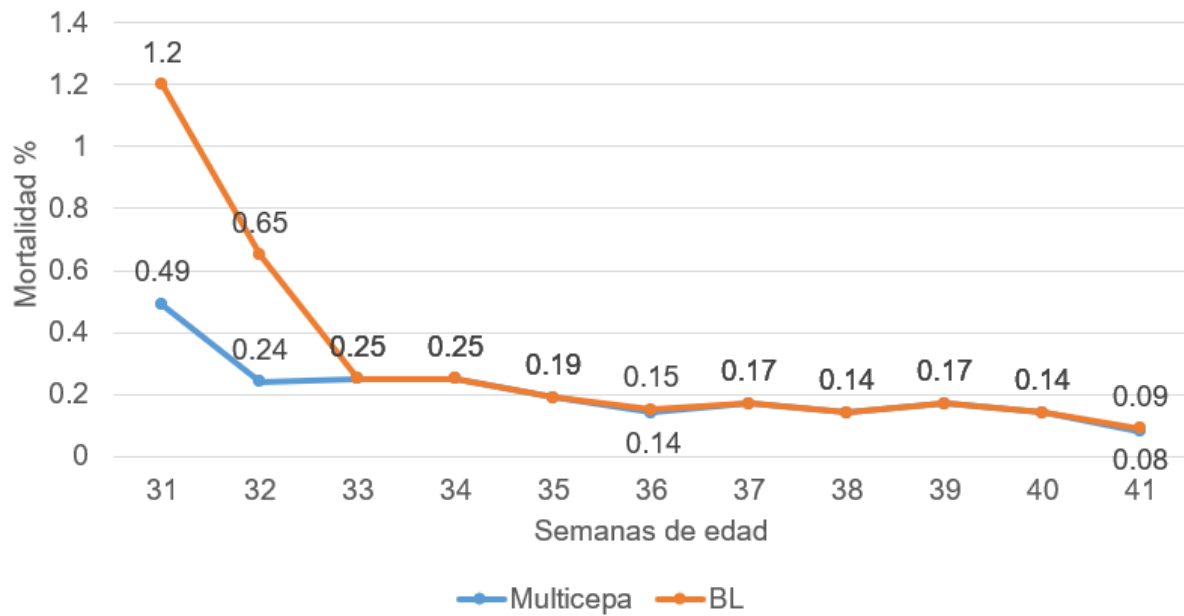
### Resultados

En las figuras 1-4, se observa el comportamiento productivo de los grupos durante la prueba.



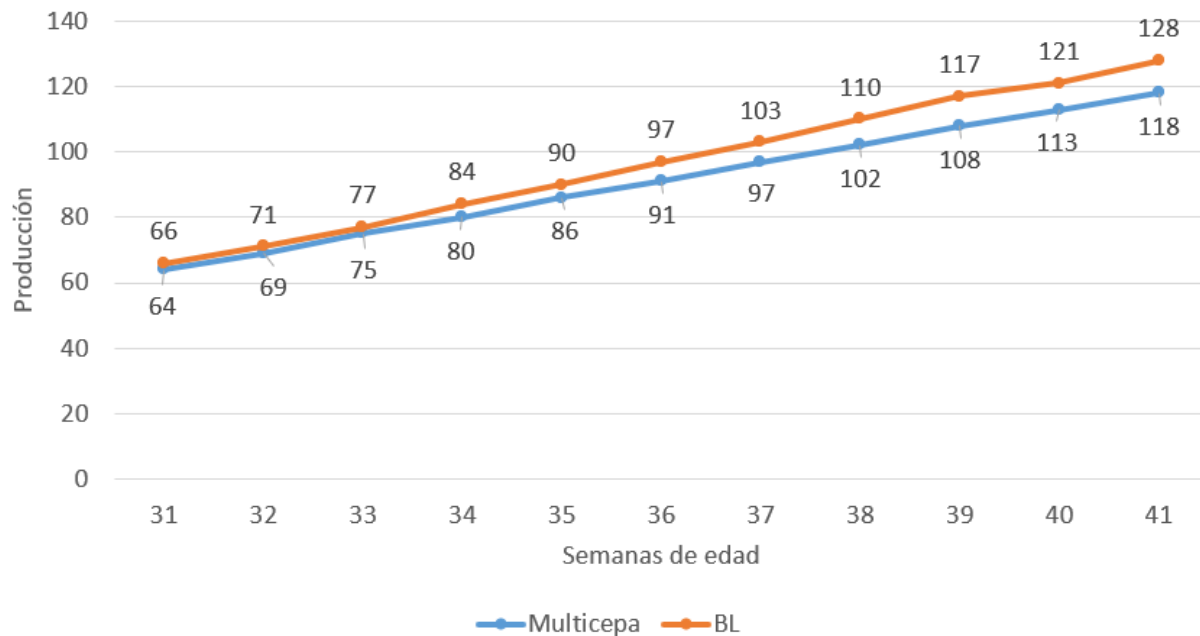
**Figura 1.** El porcentaje de producción al inicio de la prueba es inferior en el grupo Multicepa, mostrando recuperación desde la semana 32, mientras que el grupo BL mejoró a partir de la semana 33. Hacia la semana 35 el grupo Multicepa presentó un leve descenso en la productividad a causa de un desafío viral (diagnóstico no compartido por la empresa), regresando a la productividad de 92% en la semana 36. EL promedio de producción durante la prueba fue de 89.54% para el grupo Multicepa y de 91.2% para BL.

### Mortalidad Semanal

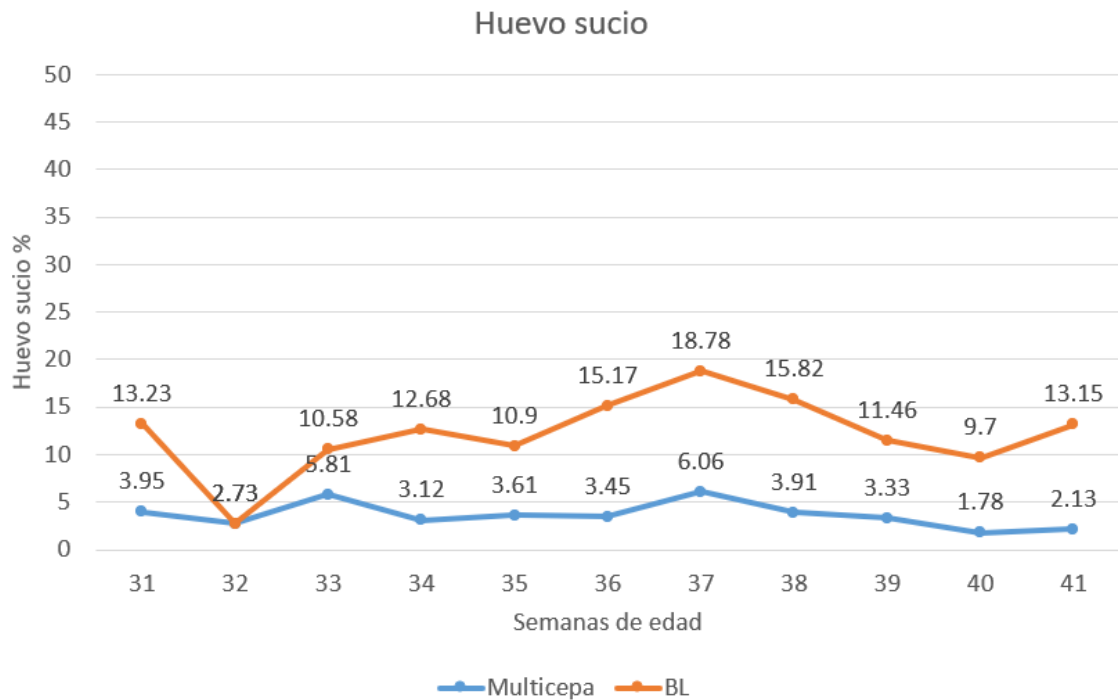


**Figura 2.** La mortalidad fue ligeramente mayor en el grupo BL al inicio de la prueba (semanas 31-33), con un promedio de 0.3% al final de la prueba, mientras que el grupo Multicepsa registró una mortalidad de promedio 0.2%. La mortalidad no aumentó en el grupo multicepsa en presencia del desafío respiratorio de la semana 35.

### Huevo acumulado por ave alojada



**Figura 3.** La cantidad de huevo acumulado por ave alojada fue superior para BL durante el periodo de prueba.



**Figura 4.** El comportamiento de huevo sucio fue más estable en el grupo Multicepsa, se mantuvo por debajo de 10% durante toda la prueba promediando 3.6% mientras que BL promedió 14.03%.

Los resultados de los conteos bacterianos obtenidos por hisopado cloacal, se muestran en el cuadro 2.

Inicio de prueba (Semana 31)			
	Coliformes UFC/mL (Log <sub>10</sub> )	Mesofílicas UFC/mL (Log <sub>10</sub> )	Salmonella
Multicepsa	3.38	6.35	0
BL	1.80	6.38	0
Mitad de prueba (Semana 36)			
	Coliformes UFC/mL (Log <sub>10</sub> )	Mesofílicas UFC/mL (Log <sub>10</sub> )	Salmonella
Multicepsa	4.15	7.16	0
BL	2.64	7.02	0
Final de prueba (Semana 41)			
	Coliformes UFC/mL (Log <sub>10</sub> )	Mesofílicas UFC/mL (Log <sub>10</sub> )	Salmonella
Multicepsa	3.95	7.48	0
BL	2.0	7.30	0

**Cuadro 2.** Conteos de bacterias coliformes, mesofílicas y *Salmonella sp.*, al inicio, mitad y final de la prueba. Durante todo el periodo el grupo Multicepsa tuvo conteos mayores de bacterias mesofílicas y coliformes.

## Discusión

Los resultados obtenidos en la presente prueba permiten evaluar el impacto de ambos probióticos sobre el desempeño productivo de gallinas en sistema libre de jaula, posteriores a un tratamiento antibiótico aplicado como medida terapéutica frente a una infección por *Clostridium perfringens*. La presencia previa de esta infección representó un factor relevante que afectó los indicadores productivos de ambos grupos al inicio del periodo de evaluación.

En este contexto, el grupo Multicepa inició el periodo experimental con un menor porcentaje de producción (67.8%) en comparación con el grupo BL (75.7%); sin embargo, mostró una recuperación progresiva desde la primera semana de evaluación hasta la semana 35, cuando se vio afectado por la incidencia de un desafío respiratorio, el cual coincidió con un descenso transitorio en la producción (88.1%), seguido de una recuperación en las semanas subsecuentes, sin observarse un incremento en la mortalidad. Este comportamiento sugiere que la respuesta productiva del grupo estuvo influenciada por el contexto sanitario y que el tratamiento tiene un efecto favorable bajo condiciones sanitarias adversas. Por su parte, el grupo BL no presentó nuevos desafíos sanitarios durante el periodo de prueba y mostró una recuperación productiva sostenida desde la semana 33. Estas mismas afectaciones iniciales consecuencia de *Clostridium perfringens* en ambos grupos y el desafío respiratorio durante la prueba al grupo Multicepa, se relacionan con las variaciones en el indicador de huevo acumulado por ave alojada, siendo los resultados 128 huevos para el grupo BL y 118 para el grupo Multicepa.

En cuanto a la mortalidad, ambos grupos presentaron valores bajos con diferencia mínima (0.3% para BL y 0.2% para Multicepa) a lo largo del periodo experimental, lo que indica que, bajo las condiciones del estudio, ninguno de los tratamientos se asoció con incrementos en este indicador.

Con relación al parámetro huevo sucio, el grupo Multicepa presentó una reducción significativa del huevo sucio, siendo esta la variable productiva en la que se expresó con mayor claridad el efecto del tratamiento. Aunque el grupo BL alcanzó una mayor cantidad de huevo acumulado, mostró un porcentaje elevado de huevo sucio (14.03 %), lo que limita la proporción de huevo apto para comercialización. En ese sentido, el probiótico Multicepa redujo de manera sobresaliente la incidencia de huevo sucio (3.6 %), lo que se tradujo finalmente en una mayor cantidad de huevo de primera disponible para venta.

Con respecto a los conteos bacterianos, el grupo Multicepa mostró un efecto positivo en la recuperación de la microbiota posterior al tratamiento antibiótico, al presentar conteos más elevados de bacterias mesofílicas y coliformes. Estos resultados se relacionan directamente con el porcentaje de huevo sucio, y sugieren un aumento en la diversidad bacteriana, particularmente de microorganismos que crecen a 37 °C (mesofílicos) y coliformes comensales. Asimismo, las bacterias coliformes mantuvieron una proporción considerablemente menor en relación con el total de bacterias mesofílicas, lo que indica un equilibrio microbiano más favorable.

Por el contrario, los menores conteos de ambas poblaciones bacterianas observadas en el grupo BL sugieren una recuperación más limitada de la microbiota intestinal, lo cual se correlacionó con un incremento en la proporción de huevo sucio durante el periodo de evaluación.

En conjunto, Dong Dai et al. (2022) proponen que la microbiota intestinal actúa como un modulador central de la calidad del huevo a través del eje microbiota–intestino–hígado–tracto reproductivo, lo que resalta la importancia de estrategias nutricionales y probióticas orientadas a mantener un equilibrio microbiano adecuado, especialmente en etapas de estrés sanitario o posterior al uso de antibióticos [7].

## Conclusión

En conclusión, la literatura disponible sobre el uso de probióticos para la recuperación de la microbiota intestinal posterior a tratamientos antibióticos en gallinas ponedoras es aún limitada. No obstante, los resultados de la presente prueba aportan evidencia que indica que la administración del probiótico multicepa (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*) se asoció con una menor incidencia de huevo sucio y una modulación favorable de la microbiota intestinal en comparación con el probiótico BL, asimismo fue evidente que el grupo multicepa también tuvo una recuperación de la producción aún bajo condiciones sanitarias adversas sin observarse aumento en la mortalidad lo que sugiere que este enfoque representa una alternativa viable para la reducción de huevo sucio y la mejora del perfil de la microbiota intestinal en sistemas de producción comercial.

Referencias

- [1] Silva,W.J.d.; Sousa, J.S. et. al. Intestinal Microbiota of Commercial Laying Hens in a Cage-Free System Fed with Probiotics. *Animals*. 2025.
- [2] Hargis, Billy. Enteritis necrótica en aves de corral. Manual Merck. 2023
- [3] Hernandez-Patlan D, et. al. Impact of a Bacillus Direct-Fed Microbial on Growth Performance, Intestinal Barrier Integrity, Necrotic, Enteritis Lesions, and Ileal Microbiota in Broiler Chickens Using a Laboratory Challenge Model. *Front. Vet. Sci* 2019.
- [4] Hernandez-Patlan D, et. al. Whole-Genome Sequence and Interaction Analysis in the Production of Six Enzymes From the Three Bacillus Strains Present in a Commercial Direct-Fed Microbial (NorumTM) Using a Bliss Independence Test. *Front. Vet. Sci*. 2022.
- [5] Qin S., et. al. Effects of Bacillus licheniformis on growth performance, immune and antioxidant functions, and intestinal microbiota of broilers. *Poultry Science*, vol. 103, 2024.
- [6] Lei K., Influence of dietary inclusion of Bacillus licheniformis on laying performance, egg quality, antioxidant enzyme activities, and intestinal barrier function of laying hens. *Poultry Science*. Vol. 92. 2024
- [7] Dong Dai, et. al. Intestinal microbiota of layer hens and its association with egg quality and safety. *Poultry Science*. 2022.



# UNA VACUNA DE SEGUNDA GENERACIÓN FORMULADA CON ESPOROZOITOS COMPLETOS DE *Eimeria tenella* PROTEGE EFICAZMENTE CONTRA UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL SEVERA

M.A. Juárez Estrada, A. Gayosso Vázquez, G. Tellez Isaias, R.A. Alonso Morales

Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves. F.M.V.Z.- U.N.A.M. Departamento de Genética y Bioestadística. F.M.V.Z.- U.N.A.M. Department of Poultry Science, University of Arkansas, U.S.A.  
britoco@unam.mx

## Resumen

En el presente estudio se investigó el grado de protección contra una infección experimental con una dosis de  $3 \times 10^4$  ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*/ave después de vacunar con una vacuna de segunda generación formulada con  $5.3 \times 10^6$  esporozoitos completos de *E. tenella* (100 µg/dosis/ave) como inmunógeno, el cual fue emulsionado con un adyuvante compuesto por nanopartículas y aceite vegetal (IMS 1313 N VG Montanide™) (Vacuna: EtSz-IMS1313). Veinte aves Leghorn libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad fueron inyectadas subcutáneamente en el tercio posterior medio del cuello con la vacuna EtSz-IMS1313 (1 mL/dosis/ave) en el primer y décimo día de edad. El nivel de inmunidad específica se evaluó a través de una infección experimental utilizando una dosis de saturación de ooquistes esporulados homólogos a los 21 días de edad. El índice anticoccidial (IAC) calculado para cada grupo mostró la eficacia de la vacuna EtSz-IMS1313 con un IAC de 187. El control inyectado sin inmunógeno, solo con el adyuvante mostró un IAC de 18, y el control no inmunizado y desafiado mostró un IAC de -28. La magnitud de la respuesta inmune específica de IgYs séricos de las aves SPF inmunizadas con la vacuna EtSz-IMS1313 al día 14 y 28 de edad se analizó con ELISA indirecta, se determinó un nivel de respuesta altamente significativa hacia esporozoitos y merozoitos de 2ª generación de *E. tenella* (Título: 2.5-2.7) en comparación al suero de las aves SPF obtenido al día de edad previo a su vacunación (Título: 0.25-0.4). En el ensayo de *Western blott* los anticuerpos en ambas fechas de evaluación reconocieron los mismos polipéptidos de la transferencia SDS-PAGE. Se identificaron polipéptidos inmunodominantes similares en ambas etapas del ciclo de vida de *E. tenella* con pesos moleculares de 120, 105, 94, 70, 38 y 19 kDa. Los anticuerpos IgY específicos a ambos zoitos de *E. tenella* provenientes de las aves inmunizadas con la vacuna experimental EtSz-IMS1313 muestran amplia posibilidad para la identificación de epítomos tipo B que pueden ser candidatos potenciales en vacunas de tercera generación. El nivel de protección obtenido con la vacuna EtSz-IMS1313 frente a un desafío directo de sobresaturación fue exitoso.

Palabras Clave: Apicomplexa, Adyuvante de nanopartículas, Dosis de saturación, Inmunodominante, Merozoitos.

## Introducción

La enfermedad parasitaria más importante en las aves domésticas (*Gallus gallus*) en México y el mundo es la coccidiosis aviar [1]. Esta enfermedad es particularmente problemática en la industria avícola debido a las condiciones intensivas bajo las cuales las aves se crían. El método de control de mayor uso es la inclusión de fármacos anticoccidianos en el alimento, sin embargo, se ha observado un surgimiento paulatino de cepas de *Eimeria* spp resistentes a los fármacos más comúnmente utilizados, además al categorizar como antibióticos a todos los ionóforos ha habido un incremento de prohibición en su uso [2]. Una alternativa de prevención es el empleo de vacunas con ooquistes esporulados viables salvajes y/o atenuados (1ª gen.), sin embargo, estas vacunas presentan varias desventajas que limitan su uso extendido en la producción avícola [2]. Una alternativa de control novedosa para la prevención y control de la coccidiosis aviar es el desarrollo de vacunas obtenidas con base a ingeniería genética, las vacunas ADN y recombinantes subunitarias muestran amplias perspectivas para su empleo en la avicultura comercial [3]. Sin embargo, se desconoce exactamente que fracciones de las diferentes fases de vida del parásito son las más inmunodominantes, conservadas e inmunoprotectoras [3]. Para el desarrollo de este tipo de inmunógenos ADN y recombinante subunitarios es crucial identificar y seleccionar los epítomos T y B más inmunodominantes e inmunoprotectores [3]. La fase inicial de infección de *Eimeria* a nivel intestinal es el esporozoito (Sz), sin embargo, las fracciones más inmunodominantes, conservadas e inmunoprotectoras de este aún no se logran caracterizar, por lo cual, el desarrollo actual de una vacuna recombinante eficaz sigue considerándose un reto científico [2]. Una estrategia de aproximación es el uso de una vacuna de segunda generación basada en Sz completos de *E. tenella* [1], lo cual actualmente es factible realizar con base al uso de adyuvantes modernos formulados con nanopartículas y aceite vegetal, estos a diferencia de otros adyuvantes utilizados en el pasado permiten mantener en la vacuna experimental al zoito asexual integro, su inmunización parenteral en aves SPF permitiría obtener anticuerpos IgY séricos *versus* el Sz de *E. tenella* (Et) (primera fase de invasión intracelular del parásito) los cuales vinculados *in vivo* a una protección inmune eficaz pueden favorecer la identificación de epítomos de células B que podrían emplearse

potencialmente en vacunas recombinantes multiepitópicas quiméricas de tipo multivalente [2]. En el presente estudio se evalúa el grado de protección que induce una vacuna de esporozoitos completos de *E. tenella* ante un desafío severo con una dosis controlada de sobresaturación. Adicionalmente los anticuerpos de las aves SPF inmunizadas con los esporozoitos completos de *E. tenella* se emplearon para la identificación de polipéptidos preponderantes en las dos fases zoito asexuales de *E. tenella* de mayor relevancia durante la infección a nivel del enterocito aviar.

## Materiales y Métodos

La vacuna experimental para cada dosis individual fue formulada con  $5.3 \times 10^6$  esporozoitos intactos e inactivados de *E. tenella* (100 µg de esporozoitos) homogenizados con el adyuvante Montanide™ (IMS 1313 N VG PR) compuesto por nanopartículas y aceite vegetal (Vacuna: EtSz-IMS1313), la vacuna fue elaborada de acuerdo con lo descrito por Juárez-Estrada *et al* [1]. Cuatro grupos de 10 pollitos SPF Leghorn White c/uno (dos réplicas por tratamiento, n=20) fueron colocados en jaulas colocadas en batería. El 1<sup>er</sup> grupo fue el control No vacunado-No desafiado. El 2<sup>o</sup> grupo fue el Vacunado-Desafiado, las aves se inyectaron por vía subcutánea (SC) en el dorso posterior medio del cuello al día de edad con 1 mL/ave de la vacuna experimental EtSz-IMS1313, 10 días después se reforzó con la misma dosis (1 mL) por la misma vía. Las aves del 3<sup>er</sup> grupo fueron inyectadas vía SC con el adyuvante emulsionado en PBS estéril (1 mL) bajo el mismo esquema de vacunación aplicado al 2<sup>o</sup> grupo. Los pollitos del 4<sup>o</sup> grupo fueron el grupo control No vacunado-Desafiado, las aves recibieron únicamente una inyección SC de 1 mL de PBS estéril con el mismo esquema del 2<sup>o</sup> grupo. Al día 21 de edad cada ave del 2<sup>o</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> grupo fueron desafiados *per os* con una dosis de  $3 \times 10^4$  ooquistes esporulados de *E. tenella*/ave. Las aves del primer grupo solo recibieron agua destilada estéril vía oral en esa misma fecha. Al día 21 de edad y 7 días post-desafío (PC) todas las aves fueron pesadas individualmente. Al día 28, las aves del primer grupo fueron sacrificadas humanitariamente, a las aves desafiadas se les efectuó la eutanasia y se evaluaron las lesiones cecales de acuerdo a la escala de Johnson & Reid (1970). Durante el periodo de prepatencia se registró la mortalidad diaria. Las variables de protección anticoccidiana se verificaron al término del periodo de prepatencia. El porcentaje de supervivencia, la ganancia relativa porcentual de peso, la cantidad total de ooquistes eliminados en heces (OPGH) y la severidad en la patología de las lesiones en el tracto gastrointestinal se utilizaron como razón individual para generar el índice de protección anticoccidiana (IAC) de acuerdo a lo descrito por McManus *et al* [4]. Se obtuvieron antígenos solubles (Ag) de Sz y merozoitos (Mz) de segunda generación de *E. tenella* de acuerdo a la metodología descrita por Constantinoiu *et al* [5,6]. La cinética de producción de anticuerpos IgY contra los antígenos Sz y Mz 2<sup>a</sup> generación de *E. tenella* obtenidos en los muestreos de las aves no vacunadas al día 1, y de las aves vacunadas a los días 14 y 28 de edad, se efectuó con la técnica indirecta de ELISA (n=8) [5]. Los antisueros se evaluaron en ensayos de *Western blot* (Wb) (n=2) para identificar su inmunoreactividad específica hacia Ag de Sz y Mz de 2<sup>a</sup> generación de *E. tenella* de acuerdo con lo descrito previamente por Constantinoiu *et al* [6].

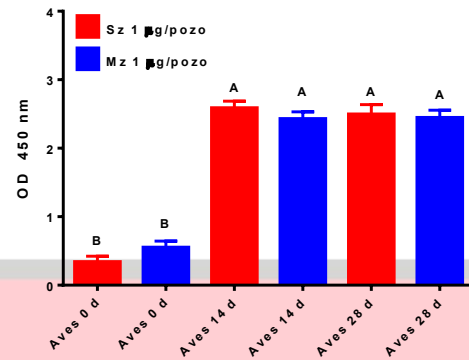
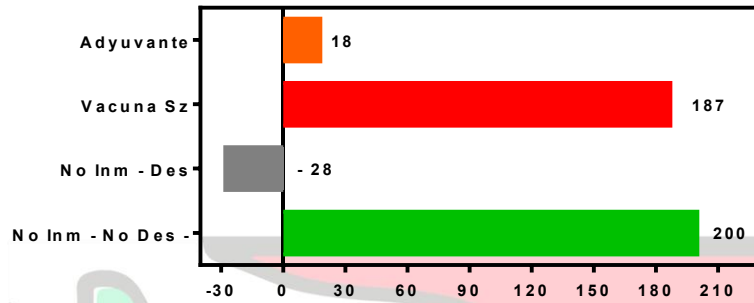
## Resultados

**Tabla 1.** Viabilidad, ganancia de peso, grado de lesiones, eliminación de ooquistes en heces en las aves desafiadas.

Grupos	Viabilidad (%)	Gan. Rel. de Peso (%)	Cal. Lesiones (Media ± DE)	Elim. Ooq. ( $\times 10^6$ ) (media ± DE)	Índice Anticoccidial (IAC)
1 <sup>er</sup> No Vac.-No Des.	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	200
2 <sup>o</sup> Vacunado	100.0 <sup>a</sup>	94.8 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.70 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.09 <sup>b</sup>	187
3 <sup>er</sup> Solo adyuvante	71.0 <sup>b</sup>	23.0 <sup>c</sup>	3.03 ± 0.79 <sup>b</sup>	3.93 ± 0.36 <sup>a</sup>	18
4 <sup>o</sup> No Vac.-Desaf,	76.9 <sup>b</sup>	-27.2 <sup>d</sup>	3.80 ± 0.25 <sup>a</sup>	3.44 ± 1.22 <sup>a</sup>	-28

<sup>a,b,c,d</sup> Literal diferente en la misma columna indica diferencia estadística entre grupos, ANDEVA, prueba post-hoc Tukey(P<0.05).

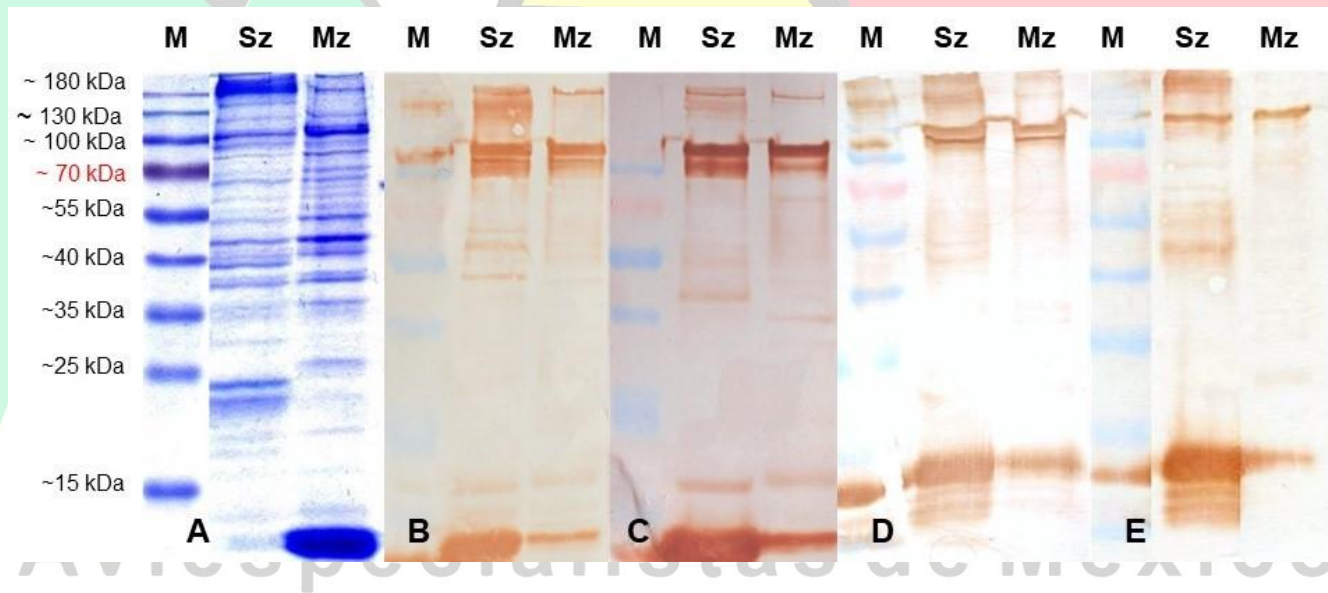
En la Tabla 1 se muestran los parámetros de respuesta al desafío con una dosis de saturación. Se observó un nivel de protección eficaz de la vacuna de segunda generación EtSz-IMS1313, con un IAC de 187, mientras que el grupo No vacunado-Desafiado mostró un IAC extremadamente negativo (IAC -28), el grupo señuelo (solo adyuvante) mostró un valor de 18 del índice de protección anticoccidial calculado (Tabla 1, Figura 1).



**Figura 1.** Índice de protección anticoccidial en aves vacunadas con esporozoitos completos de *E. tenella*.

**Figura 2.** Respuesta de anticuerpos séricos al día 14 y 28 de edad contra zoitos asexuales de *E. tenella* de aves vacunadas con esporozoitos de *E. tenella*

La respuesta de anticuerpos séricos después de la vacunación fue similar hacia ambos estadios zoitos asexuales de *E. tenella*, se observó un pico a las 2 semanas post-vacunación (PV) que 14 días después se mantuvo en forma de meseta (*plateau*) (Figura 2). En el reconocimiento antigénico de ambos sobrenadantes solubles de antígenos zoitos asexuales de *E. tenella* se observaron dos polarizaciones de polipéptidos, el primer rango de polarización entre  $\approx 82$  y  $\approx 125$  kDa, y el segundo entre  $\approx 21$  y  $27.5$  kDa (Figura 3).



**Figura 3.** Fraccionamiento proteico en SDS-PAGE al 12% de esporozoitos (Sz) y merozoitos (Mz) (A), *Western blot* de suero anti-Sz de *E. tenella* a los 14 días PV (1:100) (B,C) (n=2), reconocimiento de suero anti-Sz de *E. tenella* a los 28 días PV (1:100) (D,E) (n=2). M es el marcador molecular estándar.

### Discusión

En investigaciones previas se ha reportado que algunos parásitos muertos utilizados como inmunógenos y administrados como vacunas por diferentes vías no logran inducir suficiente inmunidad protectora [1]. No obstante, se han realizado numerosos estudios utilizando proteínas solubles del esporozoito de *E. tenella* como inmunógenos, este tipo de reactivos han generado únicamente protecciones parciales (30% -70%) frente a infecciones experimentales con dosis de desafío no siempre estandarizadas de forma análoga a la estandarización de la dosis empleada en el presente estudio. La vacuna experimental EtSz-IMS1313 mostró una excelente protección en la prueba de desafío, fue mayor (94% protección IAC) a

la observada en los grupos controles desafiados (Aduvante y No vacunado-Desafiado). La diferencia en efectividad de la vacunación usando como inmunógenos proteínas solubles de *E. tenella* (estudios previos) o el esporozoito intacto (estudio actual) es difícil de interpretar, ya que, hasta donde se conoce, no existen informes previos sobre el uso de esporozoitos inactivados completos como vacuna en pruebas de desafío homólogo [1]. Hasta la fecha, se han descrito muy pocas vacunas que utilicen esporozoitos completos de *E. tenella* [1]. El uso de esporozoitos vivos como vacuna no ha mostrado mayores avances hasta hoy en día debido principalmente a las dificultades técnicas, lo laborioso de su fabricación y el alto costo del procedimiento, lo cual ha limitado la comercialización de este tipo de vacunas de segunda generación en la industria avícola (CoxAbic®) [2]. Aunque los pollitos expuestos a una infección natural prolongada también llegan a desarrollar anticuerpos vs antígenos tipo B protectores, la vacunación de pollitos jóvenes con una dosis SC de EtSz-IMS1313 podría limitar una respuesta rápida y significativa de anticuerpos a nivel de la mucosa, respuesta que *per se* sea suficiente para neutralizar la infección *in situ*. Posiblemente la protección inmunológica observada aquí podría derivar de otro mecanismo efector inmune, quizá uno mediado por células (e.g. LT CD8+). Se requieren efectuar estudios adicionales para determinar si uno o más componentes celulares de la mucosa intestinal podrían estar involucrados en la protección observada en el grupo vacunado. Los anticuerpos producidos en las aves SPF inmunizadas con esporozoitos completos de *E. tenella* reaccionaron de manera similar a ambos antígenos zoitos asexuales de *E. tenella*, aun cuando la vacuna estaba dirigida a solo uno de ellos (Sz), es evidente que existen reacciones cruzadas entre ambas etapas del parásito lo que implica la presencia de los mismos antígenos en ambos zoitos, lo cual sugiere que la mayoría de los antígenos reconocidos son comunes a ambos ciclos de vida del parásito [1]. El incremento de anticuerpos contra ambas etapas de vida fue bastante similar en magnitud, lo que respalda aún más el argumento de que las dos etapas invasivas comparten los mismos antígenos. Los anticuerpos de las aves SPF mostraron un nivel más alto de unidades O.D. inmediatamente después de la primera inmunización, lo que ayuda a explicar los resultados exitosos obtenidos en la prueba de vacunación/desafío. El análisis WB permitió identificar algunas diferencias antigénicas entre Sz y Mz de 2ª generación, aunque de acuerdo al Wb de la figura 3 la mayor parte de los antígenos parecen ser comunes entre ambos zoitos. Se ha descrito que una buena proporción de estas proteínas tienen funciones críticas en las interacciones huésped-parásito [3]. Dado que la compartimentación de los antígenos-patógeno es un factor importante en su accesibilidad al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del huésped, las proteínas identificadas en los parásitos Apicomplexa regularmente se clasifican en proteínas secretoras, proteínas de superficie y proteínas internas [2,6]. En el presente estudio la polarización de polipéptidos de mayor peso indica una alta reactogenicidad de las proteínas descritas como micronemas, mientras que la polarización hacia polipéptidos de menor peso indica la presencia de antígenos de superficie de tipo GPI-I SAG [1]. Las proteínas y antígenos de superficie de *E. tenella* secretados por el Sz desempeñan un papel crítico en la interacción huésped-parásito, esto implica la formación del complejo-móvil-de-unión de membrana (MJ). Por lo cual, estas proteínas interactivas se deben considerar como candidatas putativas potenciales en vacunas de tipo recombinante poliepitópicas quimeras basándonos en la estrategia de cortar la vía de invasión desde el inicio de la infección con la finalidad de interrumpirla [3]. La adecuada identificación y éxito en las pruebas de vacunación/desafío utilizando las secuencias genéticas de proteínas derivadas del Sz son un paso crucial para el desarrollo de vacunas recombinantes eficaces.

### Conclusión

Una vacuna de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* adyuvados en nanopartículas y aceite vegetal administrada vía parenteral protege a las aves eficazmente contra una infección experimental con una dosis de sobresaturación.

### Perspectiva

El análisis de la respuesta inmune protectora de una vacuna de esporozoitos completos de *E. tenella* contribuye a la identificación y evaluación de epítomos B que pueden auxiliar en el diseño de vacunas recombinantes efectivas desarrolladas por medio de ingeniería genética.

### Agradecimiento

Se agradece a la D.G.A.P.A.-U.N.A.M. por el apoyo al proyecto PAPIIT IN IN206926 “Desarrollo de inmunógenos recombinantes para la prevención de la coccidiosis aviar en México”

Referencias

- [1] Juárez-Estrada MA, Gayosso-Vázquez A, Tellez-Isaias G, Alonso-Morales RA. Protective Immunity Induced by an Eimeria tenella Whole Sporozoite Vaccine Elicits Specific B-Cell Antigens. *Animals*. 2021 May 9;11(5):1344.
- [2] Blake, D.P.; Pastor-Fernández, I.; Nolan, M.J.; Tomley, F.M. Recombinant anticoccidial vaccines - a cup half full? *Infect. Gen. Evol.* 2017, 55. 358-365.
- [3] Juárez-Estrada MA, Tellez-Isaias G, Graham DM, Laverty L, Gayosso-Vázquez A, Alonso-Morales RA. Identification of Eimeria tenella sporozoite immunodominant mimotopes by random phage-display peptide libraries—a proof of concept study. *Front Vet Sci.* 2023 Jul 24;10:1223436.
- [4] McManus, E.C.; Campbell, W.C.; Cuckler, A.C. Development of resistance to quinoline coccidiostats under field and laboratory conditions. *J. Parasitol.* 1968, 54, 1190-1193.
- [5] Constantinoiu CC, Molloy JB, Jorgensen WK, Coleman GT. Development and validation of an ELISA for detecting antibodies to Eimeria tenella in chickens. *Veterinary Parasitology.* 2007 Dec;150(4):306–13
- [6] Constantinoiu CC, Molloy JB, Jorgensen WK, Coleman GT. Antibody response against endogenous stages of an attenuated strain of Eimeria tenella. *Veterinary Parasitology.* 2008 Jul;154(3–4):193–204.



# IMPACTO DE UN PROBIÓTICO MULTICEPA DE *BACILLUS* SPP. EN LA PIGMENTACIÓN CUTÁNEA Y EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO DE POLLOS DE ENGORDA SOMETIDOS A COCCIDIOSIS

Ma Beatriz Ibarra Macari, María del Carmen Mojica Enriquez, Gloria Samantha Ortega Alvarado, Yared Arturo Moreno Arenas  
Excelling S.A. de C.V.  
samantha\_ortega@excelling.com.mx

## Resumen

El presente estudio evaluó el efecto de la adición de un probiótico basado en *Bacillus* spp. sobre el desempeño productivo y la pigmentación cutánea en pollos de engorda sometidos a un desafío coccidiano no controlado. La coccidiosis causada por *Eimeria* spp. constituye una de las principales causas de daño entérico subclínico en sistemas intensivos de producción avícola, comprometiendo la integridad intestinal y reduciendo la eficiencia de absorción de nutrientes y pigmentos dietarios, con impacto negativo en la ganancia de peso y la coloración de la piel. En este contexto, la pigmentación cutánea no solo representa un atributo de calidad del producto final, sino también un indicador indirecto del estado funcional del epitelio intestinal.

Durante el periodo experimental, las aves que recibieron el probiótico presentaron un mayor peso vivo final (3,201 g) en comparación con el grupo control (3,147 g), lo que representó una diferencia de 54 g a favor del tratamiento. Asimismo, se observó una mayor ganancia diaria de peso (+1.15 g/día), una mejora en la conversión alimenticia (1.58 vs. 1.63; -0.05 unidades) y una menor mortalidad acumulada (4.2 % vs. 5.1 %), equivalente a una reducción del 0.87 %. Estas mejoras productivas se reflejaron en una mayor producción por área, con 51.12 kg/m<sup>2</sup> en el grupo probiótico frente a 50.3 kg/m<sup>2</sup> en el control (+0.82 kg/m<sup>2</sup>).

Adicionalmente, la evaluación de la pigmentación cutánea mediante análisis colorimétrico mostró una tendencia consistente a valores superiores en el grupo tratado, con incrementos de 2 a 3 unidades delta a lo largo del ciclo productivo, incluso bajo condiciones de desafío entérico. Estos resultados sugieren que la suplementación con *Bacillus* spp. contribuyó a preservar la funcionalidad intestinal, facilitando la absorción de xantofilas y nutrientes, y permitiendo a las aves mantener un desempeño productivo y una pigmentación adecuada pese a un entorno sanitario adverso.

En conjunto, los hallazgos de este estudio indican que el uso de probióticos basados en *Bacillus* spp. puede representar una herramienta eficaz para mitigar los efectos negativos del desafío coccidiano sobre la salud intestinal, el desempeño zootécnico y la calidad del producto final en pollos de engorda.

**Palabras Clave:** Coccidia, calidad de canal, salud intestinal, enteritis, microbiota intestinal

## Abstract

The present study evaluated the effect of supplementation with a *Bacillus* spp.–based probiotic on productive performance and skin pigmentation in broiler chickens subjected to an uncontrolled coccidial challenge. Coccidiosis caused by *Eimeria* spp. is one of the main causes of subclinical enteric damage in intensive poultry production systems, compromising intestinal integrity and reducing the efficiency of nutrient and dietary pigment absorption, with a negative impact on body weight gain and skin coloration. In this context, skin pigmentation represents not only a quality attribute of the final product but also an indirect indicator of the functional status of the intestinal epithelium.

During the experimental period, birds receiving the probiotic exhibited a higher final live body weight (3,201 g) compared with the control group (3,147 g), representing a difference of 54 g in favor of the treatment. In addition, higher average daily gain (+1.15 g/day), improved feed conversion ratio (1.58 vs. 1.63; -0.05 units), and lower cumulative mortality (4.2% vs. 5.1%), equivalent to a reduction of 0.87%, were observed. These productive improvements were reflected in greater production per unit area, with 51.12 kg/m<sup>2</sup> in the probiotic group compared with 50.3 kg/m<sup>2</sup> in the control (+0.82 kg/m<sup>2</sup>). Furthermore, skin pigmentation assessed by colorimetric analysis showed a consistent trend toward higher values in the treated group, with increases of 2 to 3 delta units throughout the production cycle, even under enteric challenge conditions. These results suggest that supplementation with *Bacillus* spp. contributed to preserving intestinal functionality, facilitating the absorption of xanthophylls and nutrients, and allowing birds to maintain productive performance and adequate pigmentation despite an adverse sanitary environment.

Overall, the findings of this study indicate that the use of *Bacillus* spp.–based probiotics may represent an effective strategy to mitigate the negative effects of coccidial challenge on intestinal health, productive performance, and final product quality in broiler chickens.

**Key Words:** Coccidia, carcass quality, intestinal health, enteritis, intestinal microbiota

## Introducción

La producción avícola moderna enfrenta un desafío estructural, satisfacer la creciente demanda global de proteína animal bajo esquemas cada vez más restrictivos en el uso de antibióticos. De acuerdo con las proyecciones de las Naciones Unidas, habrá más de 9 mil millones de personas en el planeta para el año 2050, acompañado de un aumento de 26% en el consumo per cápita de carne, dominado principalmente por el pollo (FAO, 2010; OECD-FAO, 2010) (Ritzi, M. M., et al, (2016).

). Sin embargo, la reducción en el uso de antibióticos y anticoccidiales ha evidenciado la importancia de consolidar estrategias integrales preventivas que sostengan la integridad intestinal y la estabilidad del ecosistema entérico frente a patógenos. Bajo estas condiciones, los desafíos entéricos adquieren mayor relevancia productiva, destacando entre ellos la coccidiosis como uno de los principales efectores negativos de la industria. Esta enfermedad es causada por protozoarios del género *Eimeria* que colonizan y destruyen el epitelio intestinal, generando un daño profundo en la fisiología digestiva. Se ha estimado que la coccidiosis aviar está asociada con aproximadamente USD 14.5 mil millones de pérdidas económicas a nivel mundial, incluidas las pérdidas de producción, prevención y tratamiento Blake, D. P., et al, (2020).. La infección por *Eimeria* spp. puede manifestarse de forma aguda, con signología clínica evidente y consecuencias inmediatas sobre la salud del ave. No obstante, la forma subclínica de la enfermedad representa el principal reto productivo, ya que su curso sostenido y frecuentemente inadvertido induce un daño progresivo sobre las células epiteliales intestinales. Este deterioro continuo se traduce en pérdidas acumulativas de productividad, reducción en la ganancia de peso y una disminución en la capacidad del ave para expresar plenamente su potencial genético Blake, D. P., et al, (2020)..

Desde una perspectiva funcional, el daño epitelial provocado por *Eimeria* spp. afecta de manera directa los procesos de digestión y absorción de lípidos, esenciales para la incorporación de pigmentos carotenoides de la dieta. En particular, la alteración de las vellosidades intestinales y de los enterocitos compromete la absorción de xantofilas, lo que se refleja en una menor deposición de pigmentos en piel y tejidos periféricos, aun cuando el aporte dietario sea adecuado. Este fenómeno convierte a la pérdida de pigmentación cutánea en un indicador sensible de disfunción intestinal subclínica, Abdel-Rahman, M. A., & Kim, I. H. (2020).

Adicionalmente, la lesión epitelial altera la integridad de la barrera intestinal, incrementando la permeabilidad y favoreciendo la entrada de patógenos secundarios, lo que exacerba la inflamación local y profundiza la ineficiencia en la utilización de nutrientes. En conjunto, estos procesos amplifican el impacto productivo de la coccidiosis subclínica, consolidándola como una de las principales causas de pérdida silenciosa de desempeño y calidad en el pollo de engorda. Desde una perspectiva fisiológica, el intestino del pollo es un ecosistema altamente especializado donde la microbiota juega un papel central en la nutrición, inmunidad y herramienta frente a enfermedades. Esta microbiota forma una relación simbiótica con el intestino del pollo, que es esencial para la salud y la producción avícola Oakley, B. B., & Kogut, M. H. (2016).

La disrupción de este ecosistema por *Eimeria* compromete la función de barrera.

Bajo este escenario y la búsqueda de estrategias no antibióticas, los probióticos emergen como una herramienta estratégica para restaurar la homeostasis intestinal. La FAO y la OMS definen a los probióticos como “microorganismos vivos no patógenos, que cuando se administran en cantidad adecuada confieren beneficios para la salud del huésped” Blake, D. P., et al, (2020).. Entre ellos, los probióticos basados en *Bacillus* han adquirido un interés particular en producción avícola debido a su estabilidad tecnológica y funcional.

Desde el punto de vista funcional, múltiples estudios han demostrado que los microorganismos a base de *Bacillus* protegen directamente la integridad intestinal, mejorando así el rendimiento productivo. *Los probióticos a base de bacillus* no actúan como un agente anticoccidial directo, sino como un modulador del ecosistema intestinal, capaz de mitigar las consecuencias fisiopatológicas del desafío coccidiano. Se ha reportado que su suplementación “altera de manera benéfica la microbiota gastrointestinal, reduciendo la colonización por *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, y ejerce un efecto protector frente a la coccidiosis” Ritzi, M. M., et al, (2016).

Estos efectos se explican por múltiples mecanismos de acción: “competencia por sitios de adhesión, producción de ácidos orgánicos, producción de compuestos antimicrobianos, modulación del sistema inmunológico, mejora en la actividad de las enzimas digestivas y competencia por nutrientes” Hong, H. A., et al, 2005). En conjunto, estos mecanismos contribuyen a preservar la integridad del epitelio intestinal, limitar la inflamación inducida por *Eimeria spp.* y favorecer la absorción eficiente de nutrientes y pigmentos dietarios, lo que posiciona a los probióticos de *Bacillus* como una intervención integral que actúa simultáneamente sobre microbiota, inmunidad y función epitelial. En síntesis, la evidencia disponible respalda el concepto de que el uso estratégico de probióticos basados en *Bacillus subtilis* puede transformar el intestino del pollo de engorda de un órgano altamente vulnerable bajo desafío coccidial a un sistema más resiliente, funcional y productivo. Por ello, el presente estudio se enfoca en evaluar el impacto de un probiótico basado en *Bacillus* sobre la integridad intestinal, la respuesta pigmentaria y el desempeño productivo de pollos de engorda sometidos a infección por *Eimeria spp.*

## Objetivo

Evalúa el efecto de la suplementación de un probiótico a base de *Bacillus spp.* sobre el desempeño productivo y la pigmentación cutánea en pollos de engorda.

## Materiales y Métodos

Se utilizaron un total de 178,206 pollos de engorda Ross 308, machos y hembras, desde el día de la eclosión hasta los 49 días de edad. Las aves fueron alojadas en casetas de ambiente controlado y distribuidas de manera aleatoria, diferenciando machos y hembras, en dos tratamientos experimentales: un grupo control y un grupo suplementado con un probiótico a base de *Bacillus spp.*

El Tratamiento 1 (Control) estuvo conformado por tres casetas, mientras que el Tratamiento 2 (Probiótico) incluyó cuatro casetas; en ambos tratamientos, cada caseta se subdividió internamente para alojar machos y hembras por separado.

Durante todo el periodo experimental, las aves tuvieron acceso ad libitum a agua y alimento. El consumo de alimento se registró de forma diaria. Todas las aves fueron alimentadas con una dieta isonutritiva y balanceada, formulada a base de maíz y pasta de soya, y ajustada a los requerimientos nutricionales correspondientes a cada fase productiva.

El programa preventivo de salud se mantuvo de acuerdo con los protocolos rutinarios establecidos por la empresa, sin modificaciones durante el estudio.

Desde el día de llegada y posteriormente de manera semanal, se seleccionó una muestra representativa de aves por caseta, las cuales fueron pesadas individualmente. A partir de estos registros se calcularon los parámetros productivos de peso corporal, ganancia de peso, Kg por m<sup>2</sup> consumo de alimento (CA) y conversión alimenticia, mortalidad, rastreo de pigmento diario y detección y cuantificación diferencial de *Eimeria spp.*

## Resultados

### ➤ Cuadro 1. Peso Por Sexo

SEMANA	0	1	2	3	4	5	6	7
MACHO PROBIÓTICO	41.7	191.7	503.0	1041.2	1619.0	2081.5	2869.9	3356.3
MACHO CONTROL	42.5	192.5	488.6	975.0	1438.4	2035.5	2727.5	3341.8
HEMBRA PROBIÓTICO	43.0	187.0	461.8	859.9	1232.6	1823.0	2365.3	
HEMBRA CONTROL	44.0	197.6	479.0	937.3	1246.3	1795.0	2375.0	

### ➤ Cuadro 2. Peso tratamiento

SEMANA	0	1	2	3	4	5	6	7
CONTROL	43.0	194.2	485.4	962.4	1374.3	1955.3	2610.0	3147.0
PROBIÓTICO	42.0	190.5	492.7	995.9	1522.4	2016.9	2743.7	3201.1

➤ Cuadro 3. Uniformidad

SEMANA	1	2	3	4	5	6	7
CONTROL	6.83	6.15	7.1	7.4		6.01	11.88
PROBIÓTICO	5.28	5.18	7.3	5.22	5.66	5.22	5.91

➤ Cuadro 4. Ganancia diaria de peso por caseta

SEMANA	1	2	3	4	5	6	7	GDP TOTAL
C1 (PROBIÓTICO)	22.55	47.27	80.51	85.96	58.66	122.65	56.79	69.91
C2 (PROBIÓTICO)	20.82	45.57	76.57	82.76	62.69	116.23	73.54	70.47
C3 (PROBIÓTICO)	19.34	40.49	56.87	53.24	84.35	77.48	52.87	56.68
C4 (PROBIÓTICO)	19.46	42.57	73.05	78.94	76.84	99.00	78.16	68.97
C5 (CONTROL)	21.94	39.45	66.22	44.14	81.10	86.86	75.73	61.22
C7 (CONTROL)	21.71	41.46	65.26	65.29	91.57	106.71	79.54	69.49
C10 CONTROL)	21.15	43.14	73.71	67.10	73.33	100.29		

➤ Cuadro 5. Ganancia diaria de peso por tratamiento

SEMANA	1	2	3	4	5	6	7	GDP TOTAL
PROBIÓTICO	20.5	44.0	71.8	75.2	70.6	103.8	65.3	66.51
CONTROL	21.6	41.3	68.4	58.8	82.0	98.0	77.6	65.36

➤ Cuadro 6. Kg por m<sup>2</sup> promedio tratamiento

Probiótico	51.125
Control	50.3

➤ Cuadro 7. Kg por m<sup>2</sup> promedio sexo

PROBIÓTICO	51.27	50.7
CONTROL	50.3	50.3

➤ Cuadro 8. Consumo de alimento semanal acumulado

SEMANA	Caseta 1	Caseta 2	Caseta 3	Caseta 4	Caseta 5	Caseta 7	Caseta 10
1	174.83	172.10	185.68	179.46	187.45	178.77	182.55
2	364.93	371.16	336.66	380.81	348.25	375.51	375.82
3	633.21	622.74	522.61	624.02	507.80	618.99	622.49
4	746.72	724.59	682.57	763.86	670.17	711.97	763.08
5	1138.84	1102.35	907.68	1119.11	930.41	1114.32	1085.35
6	874.56	937.60	1006.28	941.31	1068.97	834.39	899.42
7	1199.83	1176.62	1098.93	1127.89	1419.07	1240.29	1176.29
TOTAL	5132.93	5107.16	4740.41	5136.46	5132.12	5074.24	5104.99

➤ Cuadro 9. Consumo de alimento semanal acumulado sexo/tratamiento

PROBIÓTICO	5125.52	4740.41
CONTROL	5089.62	5132.12
DIFERENCIA	+35.90	-391.71

➤ Cuadro 10. Conversión alimenticia

SEMANA	1	2	3	4	5	6	7
PROBIÓTICO	0.96	1.10	1.15	1.24	1.46	1.42	1.58
CONTROL	0.94	1.14	1.18	1.35	1.48	1.46	1.63

➤ Cuadro 11. % de Mortalidad por caseta

Probiótico (Caseta 1-4), control (Caseta 5,7,10)

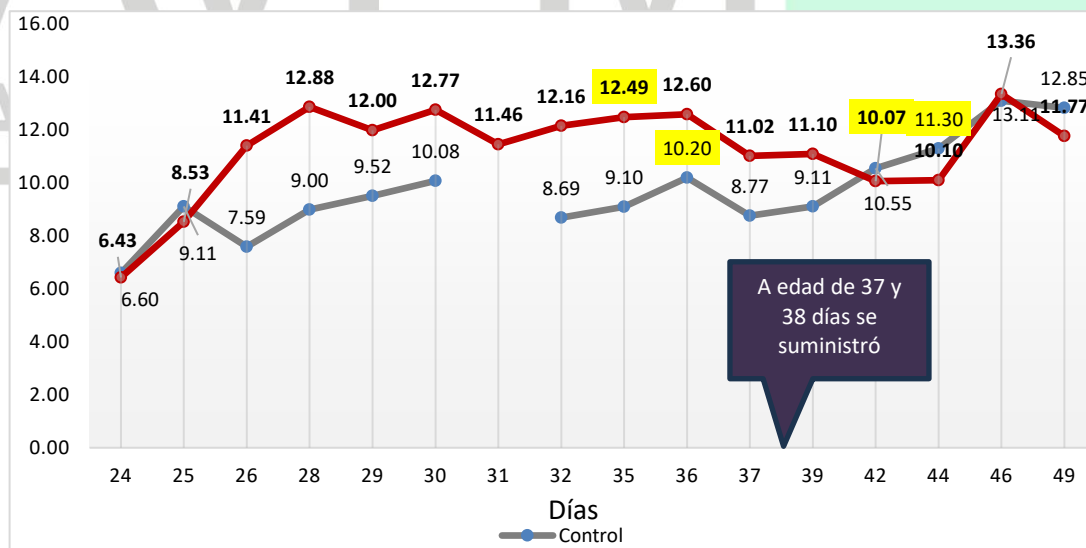
SEMANA	1	2	3	4	5	6	7
C1	1.13	1.63	2.55	3.4	3.89	4.29	4.96
C2	0.95	1.47	2.3	3.1	3.55	3.97	4.65
C3	1.32	1.86	2.28	2.61	2.8	3.04	3.4
C4	0.77	1.34	2.01	2.46	2.73	3.41	3.94
C5	0.88	1.45	2.61	3.28	3.62	3.93	4.16
C7	1.17	1.93	2.59	3.19	3.71	4.28	5.23
C10	1.04	1.86	2.57	3.28	3.8	4.38	5.93

➤ Cuadro 12. % de Mortalidad por tratamiento

SEMANA	1	2	3	4	5	6	7
PROBIÓTICO	1.0	1.6	2.3	2.9	3.2	3.7	4.2
CONTROL	1.0	1.7	2.6	3.3	3.7	4.2	5.1

Diferencia promedio de mortalidad de 0.87% lo cual para el numero total de aves evaluadas (178,206) representaría 1,549 pollos más

➤ Grafico 1. Mediciones de pigmento continuas:



➤ Cuadro 13. Detección y cuantificación de Ooquistes de *Eimeria Spp.*

Fecal general	22 y 23 días	28 y 29 días	35 y 36 días
Probiótico	3 300	21 000	15 350
Control	50	3 700	500

Fecal <i>E. acervulina</i>	22 y 23 días	28 y 29 días	35 y 36 días
Probiótico	1 800	1 200	50
Control	50		

Fecal <i>E. maxima</i>	22 y 23 días	28 y 29 días	35 y 36 días
Probiótico	1 100	5 400	3 300
Control		1 100	200

### Conclusión

El desarrollo del presente estudio se llevó a cabo bajo condiciones ambientales caracterizadas por altos niveles de humedad, las cuales favorecieron la presentación de un desafío coccidiano no controlado a lo largo del ciclo productivo. Esta situación quedó evidenciada mediante el conteo de ooquistes, donde el grupo suplementado con el probiótico basado en *Bacillus spp.* presentó una mayor presión del desafío parasitario en comparación con el grupo control. Asimismo, no puede descartarse una interacción sinérgica entre *Eimeria spp.* y patógenos entéricos oportunistas, como *Clostridium spp.*, condición ampliamente documentada en escenarios de disbiosis intestinal y daño epitelial.

A pesar de enfrentar un desafío entérico más severo, las aves del grupo tratado demostraron una mayor capacidad para solventar las alteraciones fisiopatológicas asociadas, manteniendo e incluso mejorando los parámetros productivos evaluados respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que la suplementación con el probiótico contribuyó a preservar la integridad intestinal, modular el ecosistema microbiano y optimizar la eficiencia en la digestión y absorción de nutrientes, aun bajo condiciones adversas.

En conjunto, los hallazgos del presente estudio indican que el soporte a la salud intestinal mediante probióticos basados en *Bacillus spp.* puede desempeñar un papel clave en la resiliencia productiva del pollo de engorda frente a desafíos entéricos complejos, permitiendo sostener el desempeño zootécnico en escenarios de alta presión ambiental y sanitaria, como aquellos asociados a la coccidiosis subclínica.

### Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con los reportados por otros grupos de investigación que han evaluado el uso de probióticos basados en *Bacillus spp.* en pollos de engorda, particularmente bajo condiciones de desafío entérico. Diversos estudios han documentado incrementos en peso corporal final, mejora en la ganancia diaria y reducción en la conversión alimenticia en aves suplementadas con *Bacillus subtilis*, en comparación con grupos control, aun en escenarios de presión sanitaria moderada a alta (Jeong y Kim, 2014; Jayaraman et al., 2017; Park et al., 2020).

De manera similar a lo observado en este ensayo, investigaciones que incorporaron *Bacillus spp.* en sistemas comerciales o semi-comerciales han reportado mejor uniformidad de lote y menor mortalidad, sugiriendo una mayor resiliencia fisiológica frente a desafíos ambientales y entéricos (Zhang et al., 2012; Lee et al., 2019). En modelos de desafío coccidiano natural o inducido, se ha descrito que la suplementación con *Bacillus* permite atenuar las pérdidas productivas asociadas a *Eimeria spp.*, aun cuando la carga parasitaria no se reduzca de forma directa, lo cual coincide con la mayor presión de desafío observada en el grupo tratado en el presente estudio (Giannenas et al., 2014; Ritzi et al., 2016).

En cuanto a la eficiencia productiva, meta-análisis recientes han confirmado que los probióticos basados en *Bacillus* generan mejoras modestas pero consistentes en conversión alimenticia y ganancia de peso, con variabilidad dependiente

de la cepa, dosis y condiciones de manejo (Abd El-Hack et al., 2020). Esta variabilidad también ha sido reportada por otros autores, quienes no siempre encuentran diferencias significativas en todos los parámetros, especialmente en condiciones de bajo desafío sanitario (Latorre et al., 2015), lo que refuerza la importancia del contexto productivo.

Respecto a la pigmentación cutánea, aunque la literatura es más limitada, estudios previos han señalado mejoras indirectas en parámetros relacionados con la absorción de nutrientes liposolubles y calidad de canal en aves suplementadas con probióticos, particularmente bajo condiciones de daño intestinal subclínico (Mountzouris et al., 2010; Giannenas et al., 2016). Estos hallazgos son concordantes con las mejores mediciones de pigmentos observadas a lo largo del ciclo productivo en el grupo tratado.

En conjunto, los resultados del presente estudio se alinean con la evidencia disponible que indica que la suplementación con *Bacillus spp.* puede contribuir a sostener el desempeño productivo y la calidad del ave bajo desafíos entéricos complejos, aun cuando la presión sanitaria sea elevada, reforzando su papel como herramienta de soporte a la salud intestinal en sistemas de producción intensivos.

#### Referencias

- Abd El-Hack, M. E., et al, (2020).  
Probiotics in poultry feed: A comprehensive review.  
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 104(6), 1835–1850.  
<https://doi.org/10.1111/jpn.13454>
- Abdel-Rahman, M. A., & Kim, I. H. (2020).  
Effects of dietary supplementation with probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality, and fecal microbial shedding in broiler chickens.  
Animals, 10(10), 1794.  
<https://doi.org/10.3390/ani10101794>
- Blake, D. P., et al, (2020).  
Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens.  
Veterinary Research, 51, 115.  
<https://doi.org/10.1186/s13567-020-00837-2>
- Giannenas, I., et al, (2014).  
Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and coccidial load in broiler chickens.  
Poultry Science, 93(4), 1147–1157.  
<https://doi.org/10.3382/ps.2013-03700>
- Giannenas, I., et al, (2016).  
Consumption of probiotics affects carcass characteristics, meat quality and oxidative stability in broiler chickens.  
Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 67(3), 155–166.  
<https://doi.org/10.12681/jhvms.15645>
- Hong, H. A., et al, (2005).  
The use of bacterial spore formers as probiotics.  
FEMS Microbiology Reviews, 29(4), 813–835.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>
- Jayaraman, S., et al, (2017).  
Use of *Bacillus subtilis* PB6 as a potential probiotic to improve performance and gut health of broiler chickens challenged with *Salmonella enteritidis*.  
Journal of Applied Poultry Research, 26(3), 373–381.  
<https://doi.org/10.3382/japr/pfx020>
- Jeong, J. S., & Kim, I. H. (2014).  
Effect of *Bacillus subtilis* supplementation on performance, egg quality, intestinal microflora and immune response of broiler chickens.  
Livestock Science, 162, 96–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.01.012>
- Latorre, J. D, et al. (2015).  
Evaluation of a *Bacillus subtilis* direct-fed microbial on broiler performance, intestinal morphology and immune response.  
Poultry Science, 94(6), 1296–1304.  
<https://doi.org/10.3382/ps/pev057>
- Lee, K. W., et al, (2019).  
Effects of *Bacillus*-based direct-fed microbials on growth performance, gut health, and immune response in broiler chickens.  
Journal of Animal Science and Biotechnology, 10, 52.  
<https://doi.org/10.1186/s40104-019-0362-4>

Mountzouris, K. C., et al (2010).

Evaluation of the efficacy of a probiotic containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus strains on broiler performance and intestinal microbiota.

Poultry Science, 89(1), 58–67.

<https://doi.org/10.3382/ps.2009-00308>

Oakley, B. B., & Kogut, M. H. (2016).

Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal microbiome and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression.

Frontiers in Veterinary Science, 3, 11.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00011>

Park, J. H., et al, (2020).

Effect of dietary supplementation of Bacillus subtilis on growth performance, nutrient digestibility, and gut microbiota in broiler chickens.

Animals, 10(7), 1151.

<https://doi.org/10.3390/ani10071151>

Ritzi, M. M., et al, (2016).

Combination of probiotics and coccidiosis vaccine enhances protection against Eimeria infection in broiler chickens.

Poultry Science, 95(5), 1064–1071.

<https://doi.org/10.3382/ps/pew016>

Zhang, Z. F., et al, (2012).

Effects of Bacillus subtilis UBT-MO2 on growth performance, nutrient digestibility, relative immune organ weight and intestinal microbiota in broiler chickens.

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 25(7), 984–990.

<https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12036>



## LA SUPLEMENTACIÓN CON COMPUESTOS DERIVADOS DE LA LEVADURA MODULA LA MICROBIOTA INTESTINAL, REDUCE LA MORTALIDAD Y MEJORA EL DESEMPEÑO DE LOS POLLOS DE ENGORDE EN CONDICIONES COMERCIALES

Rosiane de Souza Camargos, Adriana Nogueira Figueiredo, Letícia Moreira dos Santos, Magdalena Couste, Mariana Nascimento

Aleris Nutrition - Rua Antônio Christi, 503 - Loteamento Parque Industrial, Jundiaí – SP, Brasil

Aleris Europe, Lda - Rua Odette de Saint-Maurice, 3L (-1), Esc. C, Lisboa, Portugal

Sapiens Microbiome - Av. Reynaldo Porcari, 1731 – Medeiros, Jundiaí – SP, Brasil

\*rosianecamargos@alerisnutrition.com

### Resumen

La modulación de la microbiota intestinal es un factor clave para mejorar la salud intestinal y el desempeño productivo en pollos de engorde. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con compuestos derivados de la levadura en condiciones comerciales. Se utilizaron 438.700 pollos de engorde, distribuidos en un grupo control y un grupo suplementado (500 g/ton), evaluándose mortalidad, peso final, conversión alimenticia y microbiota intestinal mediante secuenciación del ARNr 16S. La suplementación redujo la mortalidad y mejoró el peso final y la conversión alimenticia, efectos asociados a un aumento de la diversidad microbiana y a un mayor Índice de Robustez. Se concluye que la mejora del desempeño productivo estuvo asociada a cambios favorables en la microbiota intestinal promovidos por los compuestos derivados de la levadura

**Palabras clave:** Antibióticos; Biomarcadores; Inteligencia artificial; Levadura; Producción avícola; Salud intestinal

### Introducción

La intensificación de la producción avícola ha permitido avances significativos en eficiencia productiva; sin embargo, también ha incrementado los desafíos relacionados con la salud intestinal, el manejo del estrés y el control de enfermedades entéricas [1]. El intestino de las aves no solo cumple funciones digestivas, sino que representa un órgano clave para la inmunidad y el metabolismo, estando estrechamente relacionado con el desempeño productivo y la supervivencia de los animales [2].

La microbiota intestinal desempeña un papel central en la digestión de nutrientes, la exclusión competitiva de patógenos, la modulación del sistema inmune y la producción de metabolitos beneficiosos, como los ácidos grasos de cadena corta [3; 4]. Alteraciones en el equilibrio de esta comunidad microbiana pueden conducir a estados de disbiosis, asociados con menor eficiencia alimenticia, mayor susceptibilidad a enfermedades y aumento de la mortalidad [5].

En los últimos años, la restricción en el uso de antibióticos promotores de crecimiento ha impulsado la búsqueda de alternativas nutricionales capaces de mantener la salud intestinal de forma sostenible [6]. En este escenario, los compuestos derivados de la levadura han ganado relevancia por su capacidad de interactuar selectivamente con la microbiota intestinal. Estas fracciones bioactivas, obtenidas a partir de procesos controlados de fermentación, incluyen componentes posbióticos y moléculas funcionales que pueden influir positivamente en la composición y funcionalidad del ecosistema intestinal.

A diferencia de estrategias convencionales, el uso de compuestos derivados de la levadura permite una modulación más precisa de la microbiota, favoreciendo el establecimiento de un estado de eubiosis caracterizado por mayor diversidad microbiana, estabilidad y resiliencia frente a desafíos sanitarios [7; 8]. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de la suplementación con compuestos derivados de la levadura sobre el desempeño productivo y la microbiota intestinal de pollos de engorde criados en condiciones comerciales.

### Materiales y Métodos

El estudio se desarrolló bajo condiciones comerciales de producción avícola en Europa Central, utilizando un total de 438.700 pollos de engorde de lote mixto (machos y hembras), alojados en galpones comerciales convencionales. El período experimental comprendió desde el primer día de vida hasta los 42 días de edad, siguiendo las prácticas de manejo, bioseguridad y bienestar animal habituales de la granja evaluada.

Las aves fueron distribuidas en dos tratamientos experimentales: (i) grupo control, alimentado exclusivamente con una dieta comercial estándar formulada para cubrir los requerimientos nutricionales de la línea genética utilizada, sin suplementación adicional; y (ii) grupo suplementado, que recibió la misma dieta comercial estándar, con la inclusión de

compuestos derivados de la levadura a una dosis de 500 g por tonelada de alimento, incorporados “on top” en la formulación. Cada tratamiento estuvo compuesto por dos galpones, totalizando 219.600 aves en el grupo control y 219.100 aves en el grupo suplementado.

Las dietas fueron suministradas *ad libitum* durante todo el período experimental, y el programa de alimentación siguió las fases habituales de inicio, crecimiento y finalización, de acuerdo con las prácticas de la granja. No se realizaron modificaciones en el manejo, densidad de alojamiento ni en los programas sanitarios entre los tratamientos, con el fin de aislar el efecto de la suplementación nutricional.

Los parámetros zootécnicos evaluados incluyeron la mortalidad acumulada (%), el peso final promedio de las aves (kg) al final del ciclo productivo y la conversión alimenticia. La mortalidad fue registrada diariamente y expresada como porcentaje acumulado al final del período experimental. El peso final se obtuvo a partir de los registros productivos de la granja, y la conversión alimenticia fue calculada como la relación entre el consumo total de alimento y el peso vivo producido.

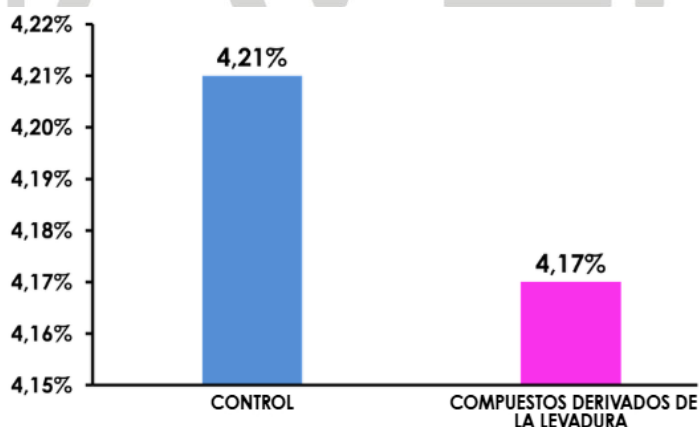
Para la evaluación de la microbiota intestinal, a los 21 días de edad se seleccionaron aleatoriamente seis aves representativas por tratamiento. Esta muestra se consideró representativa del ambiente microbiológico de cada galpón, ya que la microbiota refleja principalmente las condiciones sanitarias y de manejo del sistema, y no únicamente el número total de aves alojadas. Por ello, se adoptó un muestreo más restringido, independiente del tamaño del lote, siguiendo criterios habituales en estudios de caracterización microbiana. Las muestras biológicas se recolectaron mediante hisopado cloacal, utilizando material estéril, y fueron acondicionadas y enviadas a laboratorio especializado para su análisis microbiológico. La caracterización de la microbiota se realizó mediante secuenciación del gen ARNr 16S, permitiendo la identificación taxonómica de los géneros bacterianos presentes en cada tratamiento.

Los datos de secuenciación fueron procesados e interpretados mediante una plataforma de inteligencia artificial SAPIENS® que integra grandes volúmenes de información de microbioma y parámetros productivos. A partir de este análisis, se determinaron indicadores de diversidad (número de géneros diferentes dentro de cada tratamiento), riqueza microbiana (número total de géneros identificados), así como la identificación y cuantificación de biomarcadores microbianos positivos y negativos. Adicionalmente, se calculó el Índice de Robustez Microbiana, el cual se determina considerando la diversidad microbiana observada y el número de biomarcadores microbianos negativos identificados por la plataforma. Estos biomarcadores presentan distintos grados de importancia, asignándose un factor de ponderación (“peso”), de manera que la presencia y abundancia de determinados microorganismos puede resultar más perjudicial que la de otros.

## Resultados

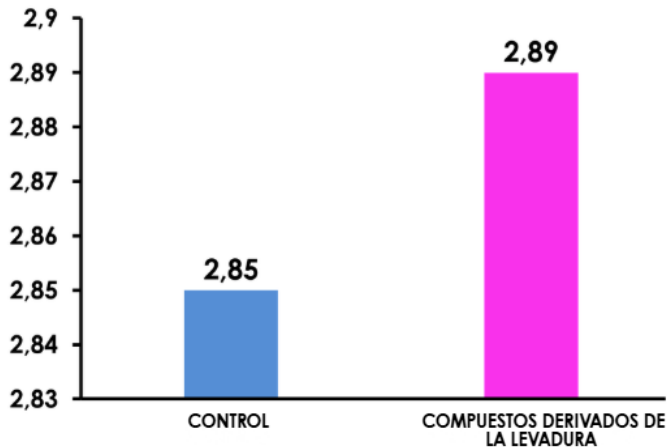
La suplementación con compuestos derivados de la levadura promovió mejoras consistentes en los parámetros productivos de los pollos de engorde, incluso bajo un escenario de alto desempeño inicial del grupo control. La mortalidad acumulada (Gráfico 1) fue ligeramente menor en el grupo suplementado (4,17 %) en comparación con el control (4,21 %). Aunque la diferencia porcentual fue leve, en este escenario representó aproximadamente 176 aves adicionales mantenidas en el bandada, demostrando un impacto productivo significativo a escala comercial.

**Gráfico 1.** Mortalidad (%) de las aves durante el período de evaluación con o sin suplementación de compuestos derivados de la levadura



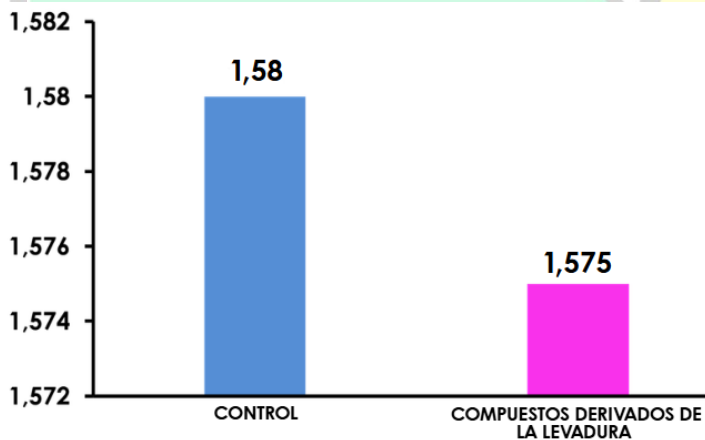
El peso final promedio (Gráfico 2) de las aves suplementadas fue de 2,89 kg, frente a 2,85 kg del grupo control, lo que corresponde a un incremento de 40 g por ave. Cuando este aumento se proyecta al total del lote, equivale al rendimiento adicional de más de 6.000 pollos, destacando la importancia de pequeñas mejoras individuales en sistemas de producción intensivos.

**Gráfico 2.** Peso final (kg) de los pollos de engorde con o sin suplementación de compuestos derivados de la levadura.



Asimismo, la conversión alimenticia (Gráfico 3) fue mejor en el grupo suplementado (1,575) respecto al control (1,580), lo que se tradujo en un ahorro estimado de 2.193,5 kg de alimento durante el ciclo productivo.

**Gráfico 3.** Conversión alimenticia de los pollos de engorde con o sin suplementación de compuestos derivados de la levadura



Estas mejoras en el desempeño zootécnico se asociaron estrechamente con cambios en la microbiota intestinal. El análisis microbiológico reveló un aumento relevante en la diversidad bacteriana en el grupo suplementado, con la identificación de 445 géneros frente a 240 en el grupo control, lo que representa un incremento aproximado del 85 %. Este efecto se evidenció claramente tanto mediante el análisis visual de las nubes de palabras (Figura 1) como a través de los datos cuantitativos de diversidad y riqueza (Tabla 1).

**Figura 1** - Nubes de palabras que representan la microbiota de los grupos con o sin suplementación de compuestos derivados de la levadura



**Tabla 1.** Diversidad y riqueza de la microbiota de los grupos con o sin suplementación de compuestos derivados de la levadura

	Control	Compuestos derivados de la levadura
<b>Riqueza*</b>	17309	17402
<b>Diversidad**</b>	240	445

\* El número total de géneros bacterianos en la microbiota;  
\*\* Cuántos géneros diferentes se encuentran en un mismo tratamiento.

De forma complementaria, dado que el aumento de la diversidad microbiana por sí solo no siempre es informativo, el Índice de Robustez Microbiana (Figura 2) adquiere mayor relevância. El grupo suplementado presentó un valor superior (7,07) en comparación con el control (4,02), indicando una transición hacia un estado de eubiosis intestinal. Este índice integra la presencia y abundancia de biomarcadores negativos, haciendo la evaluación de la microbiota más tangible y funcional.



**Figura 2.** Índice de robustez de los grupos con o sin suplementación de compuestos derivados de la levadura

**Discusión y conclusiones**

Los resultados indican que los beneficios observados en el desempeño productivo de los pollos de engorde estuvieron asociados a una modulación positiva de la microbiota intestinal promovida por la suplementación con compuestos derivados de la levadura. Aunque las diferencias en los parámetros zootécnicos puedan considerarse moderadas desde un punto de vista numérico, su impacto adquiere gran relevancia en sistemas de producción a gran escala comercial y refleja cambios fisiológicos significativos a nivel intestinal.

La mejora en la mortalidad, el peso final y la conversión alimenticia puede explicarse, en gran medida, por la modulación positiva de la microbiota intestinal. El aumento significativo en la diversidad bacteriana y el mayor Índice de Robustez

Microbiana observados en el grupo suplementado son consistentes con un perfil compatible con eubiosis intestinal, caracterizado por una comunidad microbiana más estable, funcional y resiliente. Este equilibrio microbiano favorece una digestión más eficiente de los nutrientes y reduce la incidencia de alteraciones entéricas subclínicas que, aunque no siempre se manifiestan clínicamente, afectan negativamente el desempeño productivo.

Adicionalmente, la mayor abundancia relativa de biomarcadores microbianos positivos, junto con la reducción de biomarcadores negativos, sugiere un ambiente intestinal con menor presión inflamatoria y mayor capacidad metabólica. Este perfil microbiano contribuye al mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal, mejora la absorción de nutrientes y fortalece la respuesta inmunitaria local. En conjunto, estos mecanismos fisiológicos contribuyen a explicar la mejor eficiencia alimenticia y el incremento del crecimiento observados en las aves suplementadas.

En este contexto, los resultados confirman que la mejora del rendimiento productivo no fue un efecto aislado, sino la consecuencia directa de una mejora en la microbiota intestinal. La suplementación con compuestos derivados de levadura actuó como un modulador estratégico de esta microbiota, optimizando la función intestinal y, en consecuencia, maximizando el potencial productivo de los pollos de engorde. Estos hallazgos refuerzan la importancia de los enfoques nutricionales centrados en la microbiota intestinal como pilar fundamental para una avicultura moderna, eficiente y sostenible.

#### Referencias

- [1] Ayana, G. U., & Kamutambuko, R. (2024). Probiotics in disease management for sustainable poultry production. *Advanced Gut & Microbiome Research*, 2024(1), 4326438.
- [2] Bedford, M. R., & Apajalahti, J. H. (2022). The role of feed enzymes in maintaining poultry intestinal health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(5), 1759-1770.
- [3] Yoo, J. Y., Groer, M., Dutra, S. V. O., Sarkar, A., & McSkimming, D. I. (2020). Gut microbiota and immune system interactions. *Microorganisms*, 8(10), 1587.
- [4] Yao, Y., Cai, X., Fei, W., Ye, Y., Zhao, M., & Zheng, C. (2022). The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(1), 1-12.
- [5] Kogut, M. H. (2019). The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal feed science and technology*, 250, 32-40.
- [6] Sachdeva, A., Tomar, T., Malik, T., Bains, A., & Karnwal, A. (2025). Exploring probiotics as a sustainable alternative to antimicrobial growth promoters: mechanisms and benefits in animal health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1523678.
- [7] Roto, S. M., Rubinelli, P. M., & Ricke, S. C. (2015). An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 28.
- [8] Bilal, R. M., Hassan, F. U., Saeed, M., Rafeeq, M., Zahra, N., Fraz, A., ... & Alagawany, M. (2023). Role of yeast and yeast-derived products as feed additives in broiler nutrition. *Animal Biotechnology*, 34(2), 392-401.



AVEM  
Aviespecialistas de México

## LOS PROBIÓTICOS ADICIONADOS EN EL AGUA MEJORAN EL CRECIMIENTO DE POLLOS DE ENGORDA EN SISTEMA DE PRODUCCIÓN CONVENCIONAL

Oscar Vazquez, Josué Arroyo, Víctor Naranjo, Maria Ortiz  
Evonik México S.A. de C.V., Evonik Guatemala S.A., Colegio de Postgraduados  
oscar.vazquez@evonik.com

### Resumen

*Bacillus amyloliquefaciens* ha emergido como un probiótico prometedor para la producción avícola, aunque sus efectos bajo condiciones comerciales requieren mayor evaluación. Este estudio evaluó el impacto de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 suplementado en agua de bebida sobre el desempeño productivo y características de canal en pollos Cobb 500. Un total de 1,222 pollitos mixtos de un día de edad fueron distribuidos en dos grupos (611 aves/grupo): Control (agua sin tratamiento) y PBA (agua suplementada con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a  $5 \times 10^8$  UFC/L). El peso corporal semanal y la ganancia diaria de peso fueron evaluados en 60 aves por tratamiento (30 machos y 30 hembras) durante los 42 días del ciclo productivo. En el día 49, 20 aves por tratamiento (10 machos y 10 hembras) fueron procesadas para evaluar características de canal. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía con  $P < 0.05$  como nivel de significancia. El peso corporal en la semana 6 fue significativamente mayor en el grupo PBA (2,652.6 g vs 2,534.7 g;  $P < 0.05$ ), representando una ventaja de 117.9 g (+4.6%). La ganancia diaria de peso mostró un patrón bifásico con diferencias significativas en semanas 1, 3, 5, 6 y 7 (variando de +7.5% a +12.8% en PBA), sugiriendo beneficios acumulativos del probiótico. Notablemente, la mortalidad acumulada fue 3.6 puntos porcentuales menor en PBA (5.66% vs 9.29%) lo que equivale a una reducción relativa de 39%. El índice de conversión alimenticia mejoró 3.5% en la fase final sin cambios en consumo de alimento, indicando mayor utilización de nutrientes. No se detectaron diferencias significativas en el rendimiento en canal evaluadas al día 49 ( $P > 0.05$ ).

Los resultados demuestran que *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en agua de bebida mejora el crecimiento y viabilidad en pollos de engorda mediante función intestinal mejorada, sin afectar la composición de la canal. Este probiótico representa una alternativa efectiva para optimizar el desempeño productivo bajo condiciones comerciales de producción.

**Palabras Clave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, pollos de engorda, probiótico, desempeño productivo, salud intestinal.

### Abstract

*Bacillus amyloliquefaciens* has emerged as a promising probiotic for poultry production, though its effects under commercial conditions require further evaluation. This study assessed the impact of *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 supplemented in drinking water on productive performance and carcass characteristics in Cobb 500 broilers. A total of 1,222 one-day-old mixed broilers were distributed into two groups (611 birds/group): Control (untreated water) and PBA (water supplemented with *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 at  $5 \times 10^8$  CFU/L). Weekly body weight and daily weight gain were evaluated in 60 birds per treatment (30 males and 30 females) throughout the 42-day production cycle. At day 49, 20 birds per treatment (10 males and 10 females) were processed to assess carcass characteristics. Data were analyzed using one-way ANOVA with  $P < 0.05$  as significance level.

Body weight at week 6 was significantly higher in PBA group (2,652.6 g vs 2,534.7 g;  $P < 0.05$ ), representing a 117.9 g advantage (+4.6%). Daily weight gain showed a biphasic response pattern with significant differences in weeks 1, 3, 5, 6, and 7 (ranging from +7.5% to +12.8% in PBA), suggesting cumulative probiotic benefits. Notably, accumulated mortality was 3.6 percentage points lower in the PBA group (5.66% vs 9.29%) which corresponds to a 39% relative reduction. Feed conversion efficiency improved 3.5% in the final phase without changes in feed intake, indicating enhanced nutrient utilization. No significant differences were detected in carcass yield evaluated on day 49 ( $P > 0.05$ ) ( $P > 0.05$ ). Results demonstrate that *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 in drinking water improves broiler growth and viability through enhanced intestinal function and digestive efficiency, without affecting carcass composition. This probiotic represents an effective alternative to optimize productive performance under commercial production conditions.

**Key Words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, broilers, probiotic, growth performance, gut health

### Introducción

La industria avícola moderna enfrenta el desafío constante de maximizar la eficiencia productiva manteniendo la salud intestinal de las aves, especialmente ante la restricción global de antibióticos promotores de crecimiento. En este

contexto, los probióticos basados en especies esporuladas, como *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940, han surgido como una alternativa eficaz para estabilizar la microbiota, mejorar la digestibilidad de nutrientes y fortalecer la barrera intestinal frente a patógenos comunes en sistemas convencionales (Gharib-Naseri, y otros, 2021).

Aunque la suplementación en el alimento es la vía más común, la administración de probióticos a través del agua de bebida ofrece ventajas estratégicas, como una distribución más rápida y flexible durante periodos críticos de estrés o recepción de los pollitos [2]. Estudios recientes indican que cepas específicas como *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 no solo modulan la respuesta inmune, sino que pueden igualar el rendimiento productivo obtenido con antibióticos tradicionales al reducir la inflamación intestinal y optimizar la conversión alimenticia [3] [4]. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y el rendimiento de la canal en pollos de engorda criados bajo condiciones comerciales de producción en México.

## Materiales y Métodos

### Ubicación y animales

El estudio se realizó en una unidad de producción comercial y experimental ubicada en Tonalá, Jalisco, México, entre julio y septiembre de 2025. Se utilizaron 1,222 pollitos mixtos de un día de edad, de la estirpe Cobb 500, con un peso vivo inicial promedio de 42 g. Las aves fueron alojadas en una nave de ambiente natural con piso de cemento y cama de viruta de madera nueva.

### Manejo y alimentación

La recepción de los pollitos se realizó en rodetes equipados con criadoras de campana a gas, manteniendo una temperatura en la cama de 30 a 32 °C durante la primera semana. Al día 5 de edad, todas las aves fueron inmunizadas vía intramuscular contra la enfermedad de Newcastle (cepa LaSota, 0.25 mL/ave) y tratadas profilácticamente con un antibiótico de amplio espectro (fosfomicina sódica 30 mg, tartrato de tilosina 78 mg, sulfato de gentamicina 18 mg) a una dosis de 0.5 mL/kg de peso vivo.

El programa de alimentación fue de dos fases utilizando una dieta comercial en migaja (MPG AVI®, M.P.G. S.A. de C.V.). La fase de Iniciación (días 1–14) con 20.5% de proteína cruda (PC), 2.5% de grasa cruda (GC), 3.5% de fibra cruda (FC), 8% de cenizas y 12% de humedad; mientras que la fase de Finalización (días 15–49) aportó 19% de PC, 5% de GC, 4% de FC, 8% de cenizas y 12% de humedad. La fase de inicio contenía Nicarbacina en dosis de 125 mg/kg, y la fase finalización Salinomicina sódica en dosis 60 mg/kg como coccidiostato. Durante la primera semana el alimento se suministró en bandejas de recepción para estimular el consumo y, a partir del día 7, se utilizaron comederos colgantes de tolva y bebederos de campana con acceso al agua ad libitum.

### Diseño experimental y tratamientos

El estudio tuvo una duración productiva de 42 días; adicionalmente, se registró el peso vivo hasta el día 49, coincidiendo con el sacrificio de una submuestra de aves para la evaluación de canal. Las aves se distribuyeron en dos grupos experimentales ( $n = 611$  aves/grupo), cada uno alojado en un corral independiente y abastecido por un depósito de agua exclusivo de 1,000 L. Los tratamientos fueron: Control, agua de bebida convencional sin aditivos, y PBA, agua de bebida suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (Ecobiol® Fizz, Evonik Operations GmbH), administrado en tabletas efervescentes ( $5 \times 10^{11}$  UFC/tableta) a razón de una tableta por cada 1,000 L de agua, para alcanzar una concentración estimada de  $5 \times 10^8$  UFC/L de forma continua durante todo el ciclo.

### Variables productivas y rendimiento de la canal

Se registraron diariamente el consumo de alimento y la mortalidad por corral. Para la evaluación del peso vivo, se seleccionaron aleatoriamente 60 aves por tratamiento (30 machos y 30 hembras) cada semana; para el análisis estadístico se formaron subgrupos promedio (5 grupos de machos y 5 de hembras), considerados como unidades de observación para peso corporal y ganancia diaria de peso (GDP). Con estos datos se calcularon la GDP, el consumo de alimento acumulado, la mortalidad y el índice de conversión alimenticia (ICA). Adicionalmente, se calculó el Índice de Productividad (IP) acumulado al día 42 mediante la fórmula  $IP = [(peso\ promedio, kg \times viabilidad, \%) / (edad\ en\ días \times ICA)] \times 100$ , donde la viabilidad corresponde al porcentaje de aves vivas al sacrificio. En el día 49, se seleccionaron al azar 20 aves por tratamiento, distribuidas en dos repeticiones (5 machos y 5 hembras por repetición), que fueron trasladadas a una planta

de procesamiento comercial. Las aves fueron insensibilizadas, sacrificadas por desangrado y evisceradas de acuerdo con los procedimientos estándar de la planta; se registraron el peso al sacrificio y el peso de la canal caliente, y se calculó el rendimiento de canal como [(peso de canal caliente / peso al sacrificio) × 100].

### Análisis estadístico

Los datos de peso semanal, ganancia diaria de peso, peso al sacrificio, peso de la canal caliente y porcentaje de rendimiento se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene). Posteriormente, fueron sujetas a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía utilizando el software JMP Pro 18 (SAS Institute Inc., 2024). Se declararon diferencias significativas con un valor de  $P < 0.05$  y tendencias con  $P < 0.10$ . Debido a la naturaleza del diseño experimental (un corral por tratamiento), el consumo de alimento, la conversión alimenticia y la mortalidad se reportaron únicamente como estadísticos descriptivos sin inferencia estadística.

### Resultados

El peso corporal acumulado fue superior ( $P < 0.05$ ) en pollos suplementados con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (PBA) comparado con Control en las semanas 1, 3, 5, y 6, con diferencias de 13 g (+6.1%), 59 g (+6.4%), 126 g (+6.3%), 118 g (+4.7%) respectivamente (Cuadro 1). No se detectaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en las semanas 2 y 4, sugiriendo un patrón bifásico de respuesta. Estas mejoras en peso corporal son consistentes con las ganancias diarias de peso reportadas en el Cuadro 2 y destacan el efecto positivo del probiótico sobre la velocidad de crecimiento, particularmente en fases inicial (semana 1) y final (semanas 5-7) del ciclo productivo.

**Cuadro 1.** Peso corporal semanal acumulado de pollos de engorda (Cobb 500) tratados con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en agua de bebida bajo condiciones de producción comercial.

Variables	Tratamiento <sup>2</sup>		EEM	Valor P
	Control	PBA		
Peso corporal, g				
Semana 1	215.22b	228.30a	2.91	0.005
Semana 2	432.67	431.33	7.44	0.900
Semana 3	914.93b	973.63a	11.20	0.001
Semana 4	1509.20	1515.00	15.29	0.791
Semana 5	2012.30b	2138.37a	39.75	0.036
Semana 6	2534.70b	2652.60a	27.42	0.006
Semana 7	2952.40b	3324.80a	82.46	0.005

<sup>a,b</sup>Medias en la misma fila con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). <sup>2</sup>Control = agua de bebida sin probióticos, PBA = agua de bebida suplementada con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a concentración de  $5 \times 10^8$  UFC/L; EEM = error estándar de la media.

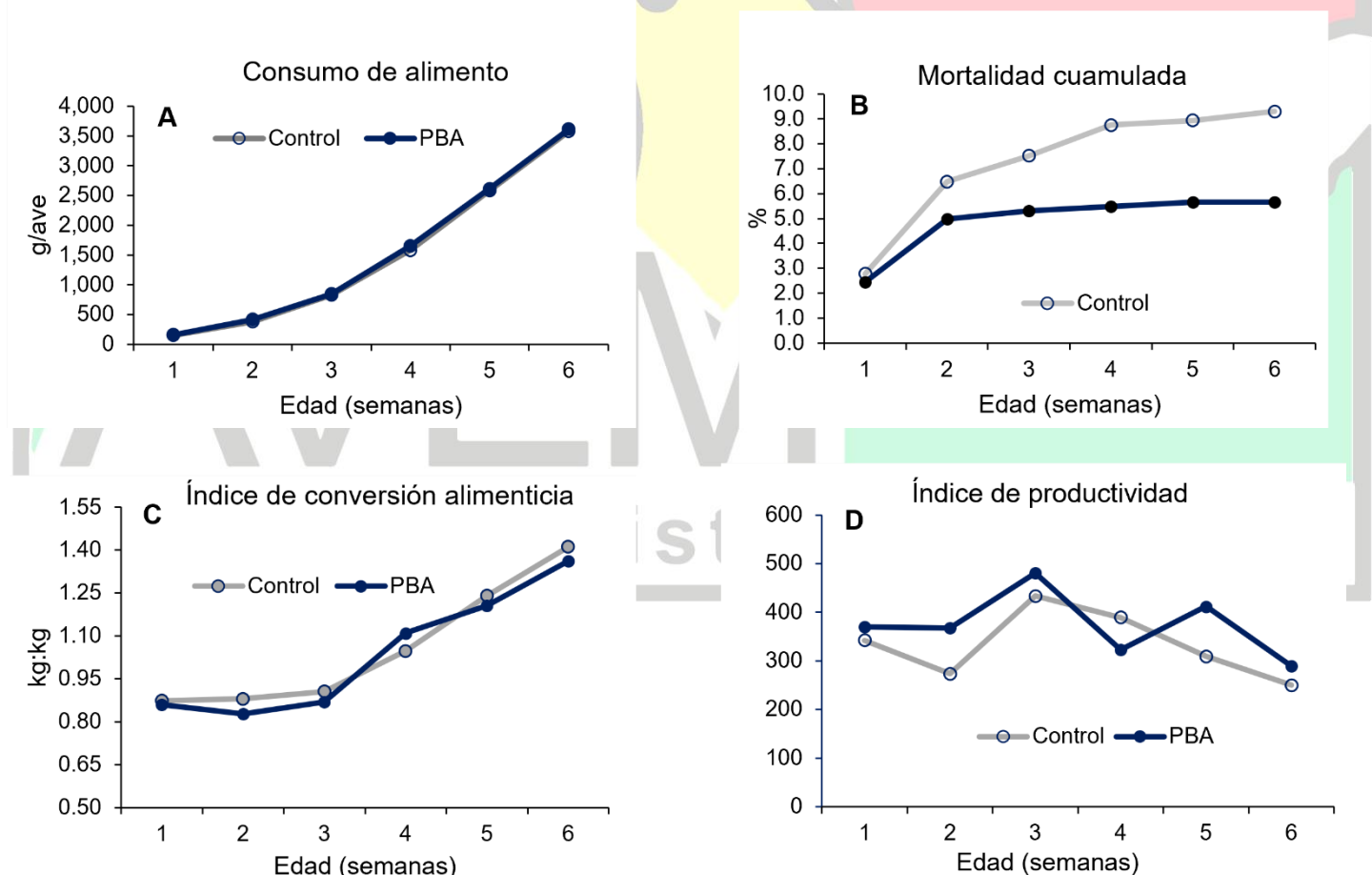
La ganancia diaria de peso (GDP) replicó el patrón observado en peso corporal, con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las semanas 1, 3, 5, 6 y 7 (Cuadro 2). El grupo PBA alcanzó GDP superiores en todas las semanas con diferencias significativas, con incrementos que variaron desde +7.5% en la semana 1 hasta +12.8% en la semana 7 ( $P = 0.005$ ). Notablemente, el efecto del probiótico se amplificó progresivamente durante el ciclo productivo, sugiriendo un beneficio acumulativo sobre la eficiencia digestiva y/o salud intestinal.

**Cuadro 2.** Ganancia diaria de peso semanal de pollos de engorda (Cobb 500) tratados con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en agua de bebida bajo condiciones de producción comercial.

Variables	Tratamiento <sup>z</sup>			Valor P
	Control	PBA	EEM	
Ganancia diaria peso, g/d				
Semana 1	24.75b	26.61a	0.42	0.005
Semana 2	27.90	27.81	0.53	0.900
Semana 3	41.57b	44.36a	0.53	0.001
Semana 4	52.40	52.61	0.55	0.791
Semana 5	56.29b	59.90a	1.14	0.036
Semana 6	59.35b	62.16a	0.65	0.006
Semana 7	59.40b	66.99a	1.68	0.005

<sup>a,b</sup>Medias en la misma fila con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). <sup>z</sup>Control = agua de bebida sin probióticos, PBA = agua de bebida suplementada con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a concentración de  $5 \times 10^8$  UFC/L; EEM = error estándar de la media.

Los datos de algunos parámetros productivos que se muestran en la Figura 1 son solo descriptivos a nivel de corral ya que por las limitaciones del estudio no se sometieron a análisis de varianza. El consumo acumulado de alimento fue similar entre tratamientos. La mortalidad acumulada fue 3.6 puntos porcentuales menor en PBA lo que equivale a una reducción relativa de 39%. El índice de conversión alimenticia mostró mejoría de 3.5% en PBA en la fase final. El peso vivo final fue 4.6% superior en PBA. El Índice de Productividad en la semana 6, fue 15.7% superior en PBA comparado con el grupo Control.



**Figura 16.** Efecto de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en agua de bebida sobre parámetros productivos en pollos de engorda (Cobb 500) bajo condiciones comerciales de producción. (A) Consumo acumulado de alimento por ave (g/ave); (B) Mortalidad acumulada (%); (C) Índice de conversión alimenticia (ICA); (D) Índice de productividad calculado como:  $[(\text{Peso promedio, kg} \times \text{viabilidad, \%}) / (\text{Edad en días} \times \text{ICA})] \times 100$ . Control = agua convencional sin aditivos (○); PBA = agua suplementada con *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a  $5 \times 10^8$  UFC/L (●). Los datos representan valores observados de un corral por tratamiento (611 aves/corral) sin repeticiones.

No se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.5716$ ) en el rendimiento de canal que fue 74.16% en promedio en el día 49.

## Discusión

El presente estudio demostró que *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en agua de bebida mejoró significativamente el peso corporal en pollos Cobb 500, alcanzando 117.9 g adicionales (+4.6%) en la semana 6. Este hallazgo es consistente con Gharib-Naseri et al. [1], quienes atribuyeron los beneficios a mejora en función intestinal y reducción de inflamación. Li et al. [3] demostraron que polisacáridos bacterianos exógenos con potencial antiinflamatorio explican la mejora sostenida en crecimiento de pollos que recibieron el probiótico *B. amyloliquefaciens*. Un hallazgo relevante fue el patrón bifásico con amplificación progresiva del efecto sobre GDP (de +7.5% en semana 1 a +12.8% en semana 7), sugiriendo beneficio acumulativo contrastando con aditivos típicos cuyo efecto se diluye con la edad. Richad et al.[4] reportó que *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 mejora la morfología intestinal incrementando área de absorción y eficiencia nutricional. Zhang et al. [2] reportaron que probióticos en agua mejoran función inmune y capacidad antioxidante, permitiendo mayor asignación de nutrientes hacia crecimiento somático. Estos mecanismos complementarios explican la mejora en GDP, particularmente en fases finales cuando demandas nutricionales son máximas. Comercialmente, la diferencia de 117.9 g al día 42 equivale de manera estimada a 2,358 kg adicionales en un lote de 20,000 pollos, demostrando potencial para alcanzar pesos de mercado con mayor eficiencia.

Los parámetros productivos de la Figura 1 son observaciones descriptivas a nivel de corral sin replicación estadística. El consumo acumulado fue similar, indicando que el probiótico no afectó la ingesta voluntaria. La reducción en mortalidad (39% menor en PBA vs Control; 5.66% vs 9.29%) es el hallazgo más relevante, consistente con beneficios de *Bacillus spp.* reportados en literatura [3] (Gharib-Naseri, y otros, 2021). El índice de conversión alimenticia mostró una mejora de 5 puntos que representa una reducción de 3.5% en la fase final. El Índice de Productividad en la semana 6 fue 39.3 puntos mayor en el tratamiento PBA comparado con el grupo Control. Estos hallazgos descriptivos merecen validación mediante estudios con replicación estadística adecuada.

La ausencia de diferencias en el rendimiento en canal sugiere que el probiótico mejora principalmente la velocidad de crecimiento sin alterar la composición corporal final. Este patrón es consistente con mecanismos de acción basados en eficiencia digestiva más que en cambios en particionamiento de nutrientes hacia músculo versus grasa.

En conclusión, *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 administrado en agua de bebida se asoció a una mejora significativa crecimiento de pollos de engorda Cobb 500 bajo las condiciones específicas de este estudio, principalmente a través de mejora en función intestinal y reducción de mortalidad, sin alterar la composición corporal final. Estos resultados sugieren que el probiótico representa una alternativa efectiva para optimizar desempeño productivo bajo condiciones comerciales de producción. Se requieren estudios adicionales con replicación estadística para validar estos hallazgos y explorar su aplicación en diferentes sistemas de producción y líneas genéticas.

Referencias

- [1] K. Gharib-Naseri, J. C. P. Dorigam, K. Doranalli, N. Morgan, R. A. Swick, M. Choct y S.-B. Wu, «Bacillus amyloliquefaciens CECT 5940 improves performance and gut function in broilers fed different levels of protein and/or under necrotic enteritis challenge,» *Animal Nutrition*, vol. 7, nº 1, pp. 185-197, 2021.
- [2] S. Li, P. Chen, Q. Li, X. Wang, J. Peng, P. Xu, H. Ding, Z. Zhou, D. Shi y Y. Xiao, «Bacillus amyloliquefaciens TL promotes gut health of broilers by the contribution of bacterial extracellular polysaccharides through its anti-inflammatory potential,» *Frontiers in Immunology*, vol. 15, p. 1455996, 2024.
- [3] R. Richad, T. W. Pangestingsih y M. H. Wibowo, «The effects of Bacillus amyloliquefaciens CECT 5940 supplementation on the health performance and gut morphology of broiler chickens.,» *German Journal of Veterinary Research*, vol. 4, nº 3, pp. 74-82, 2024.
- [4] L. Zhang, R. Zhang, H. Jia, Z. Zhu, H. Li y Y. Ma, «Supplementation of probiotics in water beneficial growth performance, carcass traits, immune function, and antioxidant capacity in broiler chickens,» *Open Life Sciences*, vol. 16, nº 1, pp. 311-322, 2021.



# FARMACOCINÉTICA DE UN PREPARADO A BASE DE UN FITOBIÓTICO CON ENROFLOXACINA DIHIDRATO CLORHIDRATO PARA AVES DE PRODUCCIÓN EN TRASPATIO

Gutiérrez OL, Sumano LH, Gracia MJ, Mendoza BJ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica, Universidad Nacional Autónoma de México.  
cdejmemoza@gmail.com

## Resumen

Dado el desafío global que se ha generado en el mundo por el incremento en la tasa de resistencias de las bacterias a los antibacterianos (RAMs), se ha exhortado a la comunidad médica y veterinaria a buscar nuevas soluciones al reto cada vez más ominoso de las RAMs. Con esta visión en mente se preparó y caracterizó un prototipo de microcápsulas de enrofloxacin incluida en alginato e incluyendo también cúrcuma como fitobiótico (MAEC) y se evaluaron sus farmacocinéticas plasmáticas (PK) posterior a dosis bolo o *ad libitum* mediante una técnica analítica que mide actividad antibacteriana/concentración de la enrofloxacin. Se compararon las PKs con un preparado de enrofloxacin en alginato, pero sin fitobiótico y con la enrofloxacin en solución vía agua de bebida. En todos los casos se procuró una dosis de 10 mg/kg. Para la dosis bolo se establecieron si se lograban las proporciones PK/PD (farmacocinética/farmacodinamia:  $C_{MAX}/CMI$  y  $AUC/CMI$ ) utilizando valores de CMI de bacterias poco sensibles o resistentes, v.g., 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El prototipo MAEC fue aceptado y no hubo rechazo al alimento y logró actividades/concentraciones plasmáticas excepcionalmente elevadas con proporciones PK/PD que cubren los desafíos de las CMI mencionadas. Con las MAEC se garantiza una eficacia clínica única en casos de infecciones con patógenos resistentes y puede emplearse como tratamiento metafiláctico y/o para prevenir algunas infecciones como la transmisión vertical de micoplasmosis a huevo fértil por gallinas reproductoras.

**Palabras clave:** cúrcuma, enrofloxacin, relación PK/PD

## Introducción

México es el 4° productor mundial de huevo (2.77 millones de toneladas anuales) y el primer consumidor del mismo (24.7 kg anuales *per cápita*) y se sitúa en el quinto lugar como productor de pollo a nivel mundial (3.8 millones de toneladas/año). A su vez, en el aporte de proteína por sector pecuario, la carne de pollo corresponde al 38.3 %, seguido del huevo con 16.9 %, entre los dos alimentos aportan el 55.2% de proteína de origen pecuario a los mexicanos [1]. Se puede asumir que la producción de pollo es una de las industrias pecuarias con mayor exigencia productiva en México y en el mundo pues se consume alrededor de 73.8 millones de toneladas de huevo/año, en nuestro país se producen aproximadamente 36.1 millones de pollos por semana [2], [3]. A nivel mundial, la producción total de huevos aumentó de 61.7 millones de toneladas en 2008 a 76.7 millones de toneladas en 2018, un aumento notable del 24% en diez años y se espera que para el 2030 el aumento en producción sea superior al 25%. Con estas expectativas en la producción y considerando que la calidad debe mantenerse, es menester mejorar la producción avícola globalmente. Sobre todo, en un entorno en el que ya se han documentado casos de resistencia bacteriana a la enrofloxacin a las dosis habituales de 10 mg/kg [4], [5]. Además, en la actualidad se deben seguir las premisas de una salud, en particular en lo que se refiere a disminuir la generación de resistencias bacterianas con preparados que fomenten las resistencias.

Conforme aumenta el conocimiento de los mecanismos de resistencia bacterianos, se han buscado diversas estrategias para optimizar sus acciones. Uno de los más estudiados en Veterinaria de producción por su accesibilidad económica es mediante el uso de aceites esenciales y/o extractos vegetales (fitobióticos) que se han ponderado como potenciadores o sinérgicos cuando se usan en combinación con algunos de los antibacterianos de uso común en la clínica veterinaria avícola. Se espera que la investigación mundial genere un efecto combinado tal que supere el desempeño que produce una actividad antimicrobiana sola [6]-[8].

Se ha descubierto que la actividad sinérgica ejercida con aceites esenciales o extractos vegetales reduce la dosis mínima eficaz de antibióticos en el tratamiento de infecciones. En este sentido resulta relevante considerar que la asociación de antibióticos con aceites esenciales o extractos de vegetales puede ser dirigido a bacterias resistentes, dado que entre ellos pueden tener mecanismo de acción complementaria que del lugar a nuevas opciones terapéuticas contra dichas cepas. Se cree que el uso de fitobióticos para prevenir el surgimiento de resistencias bacterianas es una de las opciones más

asequibles debido a que los fitobióticos contienen diversos principios activos potenciales y con ello un abanico de actividades antibacterianas. Al menos en este sentido los fitobióticos superan a los antimicrobianos convencionales que sólo tienen un mecanismo de acción [6]-[8]. De tal suerte que, tanto a nivel industrial como con la avicultura de traspatio, se requieren estudios que evalúen a los fitobióticos quienes, por añadidura son muy a menudo inocuos. Más aún, se ha demostrado que contribuyan a mejorar la salud intestinal y con ello hacen a las aves más productivas y sin mayor impacto al entorno ecológico [9], [10].

Aunado a lo dicho, es importante mencionar que las aves tienen el tracto gastrointestinal más corto de todas las especies pecuarias, lo cual les confiere cortos tiempos de absorción de los antibacterianos, por lo que es importante realizar investigaciones para optimizar su uso en la clínica y en particular para generar preparados farmacéuticos que alcancen las variables farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) idóneas que requiere cada principio activo [11], [12]. En este ensayo se eligió a la enrofloxacin como antibacteriano a mejorar en actividad/concentración. Se ha establecido que es un antibacteriano dependiente de la concentración (cd), que requiere de manera óptima lograr las siguientes variables PK/PD para considerar que se hace uso óptimo de este valioso fármaco:  $C_{max}/CMI \geq 10-12$  (que la concentración máxima lograda dividida entre la concentración mínima inhibitoria resulte en los valores dichos) y/o que  $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$  (que el valor del área bajo la curva de la concentración plasmática en 24 horas, dividido entre la CMI, resulte en el valor [12]).

Dado lo anterior, se presenta como objetivo de este ensayo el uso de una nueva formulación farmacéutica de enrofloxacin incluida en microcápsulas de alginato desecadas (MAEC) e incorporadas en el alimento. Por ello se describen sus rasgos farmacéuticos relevantes y se compara su farmacocinética con la de la enrofloxacin administrada en el agua de bebida y/o sin fitobióticos, priorizando las relaciones ya señaladas como meta, esto es:  $C_{max}/CMI \geq 10-12$  y  $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$ . Para este estudio se tomaron como valores de CMI clave los denominados *breakpoints* (puntos de inflexión) aceptados en la literatura formal de tres bacterias clave: *E. coli*; *Pasteurella multocida* y *Haemophilus gallinarum*.

## Materiales y Métodos

El diseño del estudio y el manejo de animales cumplieron con las regulaciones mexicanas y las de la Universidad Nacional de Autonomía de México (UNAM) para el uso de animales experimentales según lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999.

Se preparó el prototipo de enrofloxacin-cúrcuma-alginato en microcápsulas secas (MAEC) (Figura 1) utilizando una solución de alginato de sodio (2.5% p/v) que contenía enrofloxacin (7% p/v) y cúrcuma en polvo (2% p/v). Se hizo una solución de enrofloxacin con cúrcuma y alginato con agitación magnética constante. Posteriormente, mediante goteo con ayuda de una aguja calibre 20 G x 38 mm se dejó caer en una solución de  $CaCl_2$  con agitación magnética constante para producir, al instante de contacto, las microcápsulas. Las micropartículas se recuperaron, recuperaron y secaron a temperatura ambiente no mayor a 20°C durante 48 h.

Las MAEC se caracterizaron y se calculó la eficiencia de atrapamiento (EE%) de enrofloxacin y cúrcuma por técnica analítica directa y mediante detección y cuantificación de la enrofloxacin y cúrcuma residual en la solución de  $CaCl_2$ . Se empleó un método por HPLC para la enrofloxacin y un método espectrofotométrico UV-Vis con un espectrómetro S2000 para la cúrcuma, utilizando una fuente de luz de deuterio DT1000, una interface de puerto serie SAD500 (Ocean Optics, Inc.), con cubeta de cuarzo de 10 mm de recorrido. Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente, y los datos se presentan como media  $\pm$  DE. La tasa de atrapamiento de los principios activos (EE%) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de PA en MAEC}}{\text{Total de PA en MAEC}} \times 100$$

La carga de la enrofloxacin y cúrcuma en las MAEC (%DL) se determinó dispersando en medios de liberación de buffer de fosfato pH  $7.8 \pm 0.1$  (100 mL) con agitación magnética suave durante 24 h para liberar toda la enrofloxacin atrapada. La solución se centrifugó a 27,000 g durante 1 hora y se determinaron las concentraciones de enrofloxacin como se indica

anteriormente. El por ciento de carga de fármaco se expresó como la fracción de masa del fármaco atrapado en relación con la masa de las microcápsulas de alginato y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Carga de PA en MAEC (\%)} = \frac{\text{Masa de PA}}{\text{Masa de microcápsulas de alginato}} \times 100$$

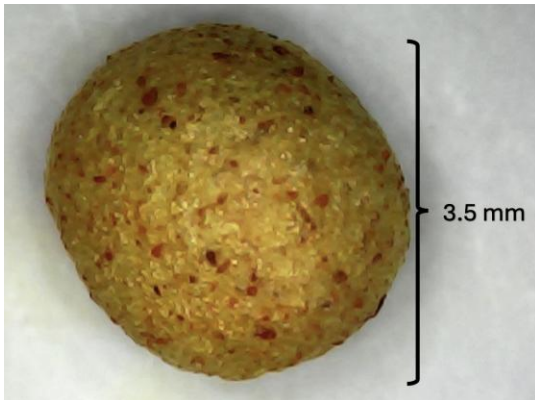
Estos mismos estudios se realizaron para las microcápsulas de enrofloxacin alginato sin cúrcuma [13].

Los estudios farmacocinéticos se realizaron en una granja de traspatio de tipo familiar con 400 pollos Arbor-Across de aproximadamente 1 kg de peso, El consumo de alimento y de agua fueron conforme a los lineamientos de la estirpe. Se administraron las MAEC en forma de bolo y *ad libitum*. En el primer caso se les administró de manera forzada para obtener un perfil farmacocinético de dosis única directa y la dosificación *ad libitum* se realizó para obtener el comportamiento de las MAEC en la forma que se lograría su consumo en campo. Cada grupo se conformó con 20 animales con 3 repeticiones por grupo (total 60 animales por grupo). Los grupos quedaron conformados de la siguiente forma: **Grupo B<sub>bolo</sub>**: dosis oral tipo bolo de enrofloxacin mediante depósito directo de 10 mg/kg de una solución en agua al 0.1% en el esófago usando una sonda rígida; **Grupo MAEC<sub>bolo</sub>**: dosis oral bolo de MAEC mediante depósito directo de 10 mg/kg de enrofloxacin, depositando el prototipo directamente en el esófago mediante sonda rígida y para lograr su administración completa se les incluyó en una suspensión de harina de arroz al 1%; se trabajó un grupo constituido como el anterior pero sin cúrcuma; **Grupo MAE<sub>bolo</sub>**: dosis oral bolo de MAE mediante depósito directo de 10 mg/kg de enrofloxacin, depositándolas directamente en el esófago mediante sonda rígida e incluidas en una suspensión de harina de arroz al 1 %; **Grupo B<sub>ad-libitum</sub>**: dosis oral *ad libitum* de enrofloxacin de aproximadamente 10 mg/kg a través del agua de bebida con Baytril® al 0.1% y con un consumo calculado de agua al día de aproximadamente 180 mL/ave; **Grupo MAEC<sub>ad-libitum</sub>**: que recibió la dosis oral de enrofloxacin de aproximadamente 10 mg/kg por administración *ad libitum* en el alimento, calculando el número de MAECs/pollo de acuerdo con su consumo promedio de alimento de 150 g/ave/día y finalmente el **Grupo MAE<sub>ad-libitum</sub>**: que recibió la dosis oral de enrofloxacin *ad libitum* de aproximadamente 10 mg/kg vía su alimento, calculando el consumo como el grupo anterior. Las MAEC y MAE se mezclaron con el alimento manualmente.

Con asistencia técnica se tomaron 4 muestras de sangre por tiempo (no más de 3 mL/pollo) de la vena radial, en los siguientes tiempos: cero (antes de cualquier medicación), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 horas, en los grupos de dosis bolo, y a las cero, 2, 4, 8, 12 y 24 horas por tres días en los grupos que recibieron la medicación *ad libitum*. Se marcó en cada ocasión a las aves muestreadas con pintura es aerosol y nunca se sangró a un ave más de 3 veces. Dado que era importante evaluar la actividad antibacteriana de las concentraciones séricas se decidió evaluarlas mediante la técnica analítica de actividad concentración propuesta por Bennett [14] y validado en el Depto. de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, UNAM y que permite determinar la relación de concentración y actividad antibacteriana.

## Resultados

Los MAEC y MAE se obtuvieron como partículas de color amarillento con una superficie lisa irregular de aspecto aperlado ovaladas y en ocasiones con morfología parecida a una gota. Su tamaño medio fue de  $3.5 \pm 0.8$  mm por  $2.5 \pm 0.7$  mm, como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Microfotografía de microcápsulas de alginato + enrofloxacin + cúrcuma (MAEC), secadas al aire al 5%.

El EE% determinado para MAE fue  $96.7 \pm 0.5\%$  para enrofloxacin y para MAEC fue de  $95.9 \pm 0.6\%$  para enrofloxacin y de  $94.3 \pm 0.6\%$  para cúrcuma. Los grados de %DL fueron de  $68.5 \pm 0.7\%$  y  $67.25 \pm 2.0\%$  para enrofloxacin en MAE y MAEC, respectivamente.

En el Cuadro 1 y Figura 2, se presentan los valores medios  $\pm 1$  DE de las curvas de actividad antibacteriana/concentraci3n en plasma y los parámetros farmacocinéticos obtenidos para los grupos de administraci3n tipo bolo. En ese mismo cuadro se presentan como referencia a su eficacia clínica las relaciones PK/PD, tomando el punto de corte de susceptibilidad para *E coli* en 0.1 y 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para bacterias sensibles y en su límite de susceptibilidad, respectivamente. En el cuadro 1 y figura 3 se presentan los valores medios  $\pm 1$  DE de las curvas de actividad antibacteriana/concentraci3n y los parámetros farmacocinéticos obtenidos para los grupos de administraci3n *ad libitum*.

Parámetros	GRUPOS					
	B <sub>bolo</sub>	B <sub>ad-libitum</sub>	MAEC <sub>bolo</sub>	MAEC <sub>ad-libitum</sub>	MAE <sub>bolo</sub>	MAE <sub>ad-libitum</sub>
C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$1.6 \pm 0.2^a$	$1.6 \pm 0.5^a$	$12.8 \pm 0.5^b$	$12.9 \pm 0.5^b$	$2.9 \pm 0.3^c$	$2.9 \pm 0.6^c$
T <sub>max</sub> (h)	$2.8 \pm 0.5^a$	-	$20.0 \pm 11^a$	-	$10.4 \pm 5.8^a$	-
K <sub>el</sub> (h)	$0.15 \pm 0.02^a$	-	$0.04 \pm 0.1^a$	-	$0.08 \pm 0.3^a$	-
T <sub>1/2el</sub>	$4.8 \pm 0.02^a$	-	$0.04 \pm 0.1^a$	-	$0.08 \pm 0.3^a$	-
AUC <sub>0-24</sub> ( $\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}$ )	$11.5 \pm 0.5^a$	$11.2 \pm 6.5$	$91 \pm 3.8^b$	$84 \pm 63.6^c$	$12.9 \pm 2.8^c$	$12.5 \pm 6.5^c$
AUMC <sub>0-∞</sub> ( $\mu\text{g}/\text{h}^2/\text{mL}$ )	$11.9 \pm 0.6$	$1523 \pm 145$	$140.3 \pm 39$	$11951 \pm 768$	$21.5 \pm 6.5$	$2256 \pm 345$
MRT <sub>0-∞</sub> (h)	$8.4 \pm 0.2$	-	$23.9 \pm 14.3$	-	$13.3 \pm 6.5$	-
Fr (%)	-	-	791.3	498.3	150.4	304.1
<b>Relaciones PK/PD</b>						
C <sub>MAX</sub> /CMI <sub>0.1</sub> <sup>*</sup>	16 <sup>*</sup>	116 <sup>*</sup>	128 <sup>*</sup>	129 <sup>*</sup>	29 <sup>*</sup>	29 <sup>*</sup>
AUC <sub>0-24</sub> /MIC <sub>0.1</sub> <sup>*</sup>	115	112	910 <sup>*</sup>	840 <sup>*</sup>	129 <sup>*</sup>	125 <sup>*</sup>
C <sub>MAX</sub> /MIC <sub>0.5</sub> <sup>*</sup>	3.2	3.2	25.6 <sup>*</sup>	25.8 <sup>*</sup>	5.8 <sup>*</sup>	5.8 <sup>*</sup>
AUC <sub>0-24</sub> /MIC <sub>0.5</sub> <sup>*</sup>	57.5	56	455 <sup>*</sup>	420 <sup>*</sup>	64.5	62.5

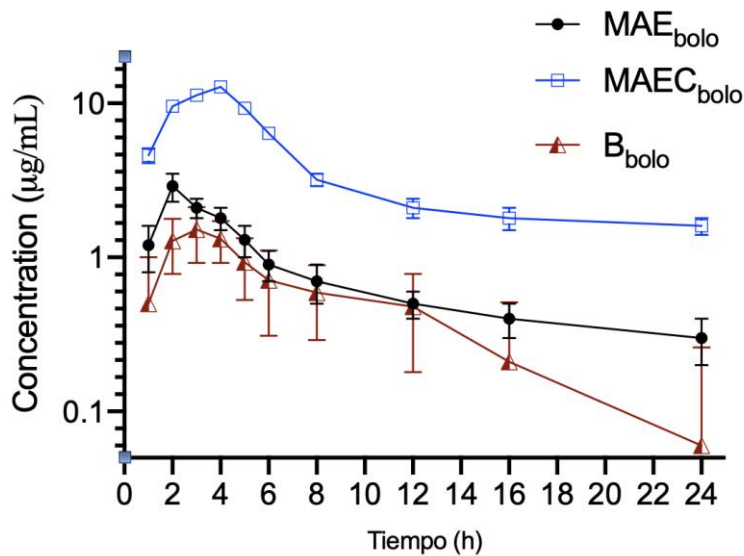
**Cuadro 1.** Valores medios  $\pm$  DE de los parámetros farmacocinéticos (PK) y las relaciones PK/PD para enrofloxacin en pollo de engorda medicado con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg como dosis en los siguientes grupos: B<sub>bolo</sub>; Grupo MAEC<sub>bolo</sub>; Grupo MAE<sub>bolo</sub>; Grupo B<sub>ad-libitum</sub>; Grupo MAEC<sub>ad-libitum</sub>; Grupo MAE<sub>ad-libitum</sub>.

C<sub>max</sub>, concentraci3n sérica máxima; T<sub>max</sub>, tiempo para alcanzar C<sub>max</sub>; T<sub>1/2</sub> λ, vida media de eliminaci3n; AUC<sub>0-24</sub>, área bajo la curva de concentraci3n vs. tiempo en 24 h; AUC<sub>0-∞</sub>, área bajo la curva de concentraci3n vs. tiempo de 0 a ∞; AUMC<sub>0-∞</sub>, área bajo la curva de concentraci3n vs. tiempo/momento; Fr, biodisponibilidad relativa en comparaci3n con el grupo B (por ejemplo, AUC<sub>0-24MAEC</sub>/AUC<sub>0-24B</sub> × 100); MRT, Tiempo medio de residencia

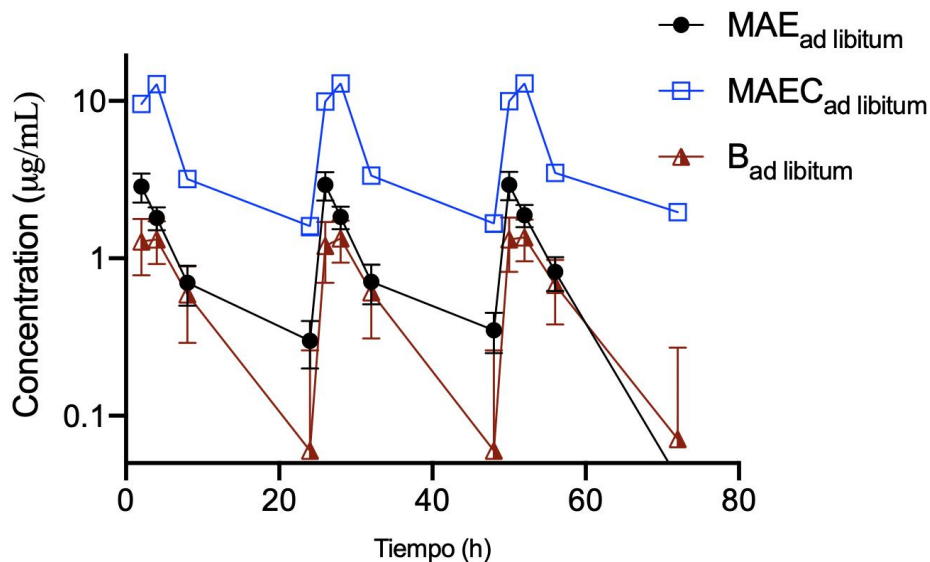
\* PK/PD, relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas. El punto de corte bacteriano susceptible para las relaciones PK/PD de C<sub>max</sub>/CMI (Para considerarse adecuado debe ser al menos 10 veces superior a la CMI) y AUC<sub>0-24</sub>/CMI (Para ser adecuado debe ser mayor a 125) fue de 0.1 y 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

\* Valores que cubrieron correctamente la relación PK/PD

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes dentro de cada fila indican una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 2.** Perfiles plasmáticos de la actividad antibacteriana/concentración de la enrofloxacin logrados en pollo de engorda posterior a la administración en dosis bolo. Se estudiaron los siguientes grupos:  $B_{\text{bolo}}$ : dosis oral tipo bolo de enrofloxacin mediante depósito directo de 10 mg/kg de una solución en agua al 0.1% en el esófago usando una sonda rígida; Grupo  $MAEC_{\text{bolo}}$ : dosis oral bolo de MAEC mediante depósito directo con sonda rígida a dosis de 10 mg/kg de enrofloxacin y liberando la carga de una suspensión de harina de arroz al 1 %, directamente en el esófago; Grupo  $MAE_{\text{bolo}}$ : de manera similar al grupo anterior.



**Figura 3.** Perfiles plasmáticos de enrofloxacin logrados en pollo de engorda en los siguientes grupos:  $B_{\text{ad-libitum}}$ : dosis oral de enrofloxacin por administración *ad libitum* de aproximadamente 10 mg/kg con base en su consumo de agua al día (180 mL) utilizando Baytril® al 0.1%;  $MAEC_{\text{ad-libitum}}$ : que recibió la dosis oral de enrofloxacin de aproximadamente 10 mg/kg por administración *ad libitum* en el alimento, calculando el número de MAECs/pollo de acuerdo con un consumo de 150 g de alimento/día;  $MAE_{\text{ad-libitum}}$ : que recibió la dosis oral de enrofloxacin sin cúrcuma de la misma manera que  $MAEC_{\text{ad-libitum}}$ .

## Discusión

El tubo gastrointestinal (TGI) en las aves tiene rasgos anatómicos y diferencias fisiológicas que las hace únicas y deben considerarse al diseñar un medicamento. Como el tránsito del alimento y medicamentos por el TGI es muy rápido, el uso de sistemas de liberación modificada puede favorecer la estancia de los principios activos y favorecer su biodisponibilidad [12]. Con esta premisa en mente, la combinación de antibacterianos y fitobióticos puede generar un efecto de promoción de la absorción por un lado y que se potencie por la acción conjunta de ambos de manera coordinada. Si se logra la combinación de un efecto potenciado de antimicrobiano y fitobiótico junto con un diseño de liberación modificada-prolongada que mejore la biodisponibilidad, se puede mejorar la eficacia de los antibacterianos como lo muestran las relaciones PK/PD del Cuadro 1. La manera en que se logra el efecto complementario puede ser diversa. Por ejemplo, mediante la inhibición de bombas de eflujo presentes en las bacterias o inhibiendo enzimas destructoras de antibióticos, alterando la permeabilidad de las membranas bacterianas, o incluso sumándose a la farmacodinamia del antibacteriano [15], [16]. Por añadidura, se han caracterizado otros efectos de los fitobióticos como: efectos antiinflamatorias y antioxidantes, mejorando la respuesta inmune del organismo, y minimizando el daño al microbiota intestinal [15]-[17]. Estos efectos son obviamente complementarios a la acción de los antibacterianos [15]-[18]. Se ha ponderado la combinación de fitobióticos con antibacterianos para hacer más amplio el espectro, incluidas bacterias, hongos y virus [15]-[18] y se postula que por ello se puede cubrir un rango más amplio de infecciones. Se ha identificado que la cúrcuma afecta las bombas de eflujo bacterianas y otros mecanismos que las bacterias utilizan para expulsar a las fluoroquinolonas de su interior, aumenta la permeabilidad de las membranas bacterianas y facilita el ingreso de fluoroquinolonas al citoplasma bacteriano [19], [20]. Más aún, la cúrcuma tiene propiedades antibacterianas por sí sola. Se ha reportado su actividad contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* (incluyendo cepas resistentes a la metilicina) y *Escherichia coli* [15]-[18].

En ese sentido, los resultados obtenidos indican claramente que los valores más altos se lograron para la administración de MAEC<sub>bolo</sub> y MAEC<sub>ad libitum</sub>. Cuando se analizan las variables PK/PD detalladas en el Cuadro 1, resulta evidente que se espera una respuesta clínica muy superior al dosificar con MAEC, por comparación al B<sub>bolo</sub> y B<sub>ad libitum</sub> y MAE<sub>bolo</sub> y MAE<sub>ad libitum</sub>. Cuando se asumió el valor denominado punto de inflexión o interfase entre bacterias sensible y resistentes (0.5 µg/mL), se puede señalar claramente el inicio de la falta de eficacia de los preparados que no contienen cúrcuma; por ejemplo, con una cepa resistente de *E. coli*. Así, las relaciones PK/PD de AUC<sub>0-24</sub>/CMI<sub>0.5</sub> resultaron en susceptibilidad aceptable solamente para el grupo MAEC administrado tanto en el ensayo de dosis bolo como en el ensayo de administración *ad libitum*. Ya se ha ponderado el uso de dosis mayores a 10 mg/kg para tratar de cubrir clínicamente la mayoría de las infecciones [4], [5]. El uso de MAEC cubre eficientemente casos de resistencia y se presenta en este ensayo como un verdadero avance en la quimioterapia de casos clínicos resistentes/desafiantes en avicultura y en consonancia con el exhorto de la OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal) de generar nuevas opciones antimicrobianas [21], [22]. Con las proporciones únicas de PK/PD logradas con MAEC se garantiza una eficacia clínica en casos clínicos causados por patógenos resistentes y puede emplearse como tratamiento metafiláctico y/o para prevenir algunas infecciones como la transmisión vertical de micoplasmosis a huevo fértil por gallinas reproductoras. Finalmente, vale la pena destacar que tanto los MAEC como los MAE fueron consumidos con aparente avidez por las aves. Además, se les puede dosificar a las aves a manera de aderezo en su comida.

## Referencias

1. Unión Nacional de avicultores. Expectativas 2023. [Consultado enero 2025]. Disponible en: <https://una.org.mx/>
2. FAO. Production of livestock and livestock commodities. Statistical Yearbook World Food and Agriculture 2024. [Consultado enero 2025]. Disponible en: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/d784864f-7f28-49d2-903e-6680d09a9d97/content/cd2971en.html>
3. FAO. Revisión del Desarrollo Avícola. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2013.
4. R. Temmerman, L. Pelligand, W. Schelstraete, G. Antonissen, A. Garmyn, M. Devreese. Enrofloxacin Dose Optimization for the Treatment of Colibacillosis in Broiler Chickens Using a Drinking Behaviour Pharmacokinetic Model. *Antibiotics*. 2021; 10, 604.
5. Y. Wei, Y. Li, H. Zhao, Y. Zhao, Y. Wang, H. Ding, H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of enrofloxacin against *Klebsiella pneumoniae* in an in vivo infection model in young chicks. *Poultry Science*, 2024; 103(8), 103868.
6. P. Soo, B. Chin, H. Cai, S. Hua. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J*. 2014 Feb 7:8:6-14.
7. L. Mundy, B. Pendry, M. Rahman. Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine. *Journal of Herbal Medicine*. 2016; 6(2), 53-58.

8. P. Angelini. Plant-derived antimicrobials and their crucial role in combating antimicrobial resistance. *Antibiotics*. 2024; 13(8), 746.
9. H. Ren, W. Vahjen, T. Dadi, E. M. Saliu, F.G. Boroogeni, J. Zentek. Synergistic effects of probiotics and phytobiotics on the intestinal microbiota in young broiler chicken. *Microorganisms*. 2019; 7(12), 684.
10. U.E. Obianwuna, X Chang, V.U. Oleforuh-Okoleh, P.N. Onu, H. Zhang, K. Qiu, S. Wu. Phytobiotics in poultry: revolutionizing broiler chicken nutrition with plant-derived gut health enhancers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2024; 15(1), 1-33.
11. M.I. Gaucher, S. Quessy, A. Letellier, J. Arsenault, M. Boulianne. Impact of a drug- free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poultry Science*. 2005; 94:1791–1801
12. L.H. Sumano, O.L. Gutiérrez. *Farmacología Clínica en Aves*. Cuarta edición. México D.F: Mc Graw Hill Interamericana México. 2009.
13. L. Gutiérrez, M. Monroy-Barreto, P. García-Guzmán, H. Sumano. Pharmaceutical Design of a Formulation of Enrofloxacin-Alginate and Its Strategic Dosage To Achieve Mutant Prevention PK/PD Ratios In Broiler Chickens, *Current Pharmaceutical Design*. 2023; 29.
14. J.V. Bennett, J.L. Brodie, E.J. Benner, W.M. Kirby. Simplified, Accurate Method for Antibiotic Assay of Clinical Specimens. *Applied Microbiology*. 1966; 14(2)
15. S. Roudashti, H. Zeighami, H. Mirshahabi, S. Bahari, A. Soltani, F. Haghi. Synergistic activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftazidime and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing related genes and virulence traits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017; 33, 1-8.
16. A. Kali, D. Bhuvaneshwar, P.M. Charles, K.S. Seetha. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2016; 7(3), 93.
17. N. Ameer, M. Hanif, M. Azeem, K. Mahmood, F.R.S. Chughtai, N. Ramzan, K. Pandey. Synergistic antibacterial effect of highly permeable curcumin and ciprofloxacin containing self-emulsifying drug delivery system against urinary tract bacterial infections. 2022.
18. S.A. Marathe, R. Kumar, P. Ajitkumar, V. Nagaraja, D. Chakravorty. Curcumin reduces the antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Typhi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68(1), 139-152.
19. F.A. Aderemi, O.M Alabi. Turmeric (*Curcuma longa*): an alternative to antibiotics in poultry nutrition. *Translational Animal Science*. 2023; 7(1), txad133.
20. C. Laganá, E.S.B. Saldanha, J.R. Sartori, P.H.N. Turco, E. Gonzales, R.L. Luciano, V.B. Fascina. Turmeric on poultry production: A Review. *Agricultural Sciences*. 2019; 10(12), 1592.
21. C. Dall. WHO calls for coordinated effort to boost antibiotic development. Univeristy of Minnestota. August 7, 2024. [Consultado diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.cidrap.umn.edu/antimicrobial-stewardship/who-calls-coordinated-effort-boost-antibiotic-development>
22. WHO. Antibacterial pipeline trends and recommendations to enhance research and development: policy brief. World Health Organization. 5 August 2024. [Consultado diciembre de 2024] Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240097735>



# RESPUESTAS EN PRODUCTIVIDAD, MICROBIOLOGÍA Y MICROBIOTA INTESTINAL EN POLLOS DE ENGORDA ADICIONADOS CON SUSTANCIAS HÚMICAS EN ALIMENTO O AGUA DE BEBIDA

María de Lourdes Angeles, Sergio Gómez Rosales, José Martín Ruvalcaba Gómez  
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal-INIFAP, Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP  
gomez.sergio@inifap.gob.mx

## Resumen

El uso de sustancias húmicas (SH) extraídas de lombricomposta (LC) se ha evaluado para reducir el uso de los antibióticos promotores del crecimiento (APC), con beneficios en la productividad y salud de pollos de engorda; pero no se han llevado a cabo experimentos para conocer los cambios en la microbiota intestinal en pollos en condiciones que simulan la cría comercial. El objetivo fue determinar la respuesta productiva, microbiología del agua e intestino y microbiota intestinal (yeyuno) en pollos adicionados con SH de LC en alimento o agua de bebida. Se usaron 400 pollos de 1-42 días alojados en 16 corrales, asignados a 4 tratamientos: 1) Alimento con BMD y coccidiostatos (APC); 2) Alimento sin BMD ni coccidiostato, con 0.35% de extracto deshidratado de SH (EDSH); 3) Alimento sin BMD ni coccidiostato; el agua de bebida adicionada con 25% de lixiviado de LC (LSH); 4) Alimento sin BMD ni coccidiostato; el agua de bebida adicionada con 25% de extracto alcalino de LC (EASH). Los resultados de producción y microbiología se sometieron a ANOVA por medio del SAS y la microbiota a análisis de bioinformática. La GDP fue menor ( $P < 0.05$ ) en pollos con EASH en comparación con los otros tratamientos. La mortalidad fue mayor ( $P < 0.05$ ) con APC, intermedia con EDSH y LSH y menor en EASH. En el agua de bebida, el conteo de BAT, *E. coli* y *Salmonella* spp fue similar entre tratamientos. En el contenido intestinal, el conteo y frecuencia relativa de BAT y *E. coli* fue similar entre tratamientos; pero *Salmonella* spp no se encontró en pollos APC. En las comunidades bacterianas, el filo predominante fue Firmicutes alcanzando el 98 % de abundancia relativa total siendo mayor en los tratamientos con SH. A nivel familiar Lactobacillaceae fue mayor ( $P < 0.05$ ) y a nivel de género Ligilactobacillus aumentó ( $P < 0.05$ ) en EDSH en comparación con APC. En conclusión, el crecimiento de pollos APC, EDSH y LSH fue similar, por lo que las SH pueden reducir el uso de APC debido principalmente a que incrementan la abundancia de bacterias ácido lácticas, potencialmente probióticas, que disminuyen el pH y restringen la colonización de bacterias patógenas.

**Palabras claves:** Pollos de engorda, promotores del crecimiento, Firmicutes

## Introducción

El uso de antibióticos promotores del crecimiento en animales se ha prohibido debido a la frecuente identificación de bacterias resistentes a los antimicrobianos que ponen en riesgo la salud de los animales y el humano. A nivel global se están evaluando diferentes tipos de productos para substituir o reducir el uso de los antibióticos promotores del crecimiento en animales. Dentro de estos productos, el uso de sustancias húmicas (SH) ha tenido resultados muy alentadores en la productividad y salud de animales de granja como pollos de engorda, gallinas de postura, codornices, conejos, cerdos, becerros y vacas [1]. En años recientes se ha evaluado un extracto deshidratado de SH (EDSH) provenientes de LC en pollos de engorda, pavas y cerdos al destete y finalización reportándose beneficios en la productividad y la salud [2]. Aunque hay varias teorías que describen algunos mecanismos de acción de las SH, se desconoce el órgano blanco o sitio exacto de actividad asociado a las mejoras en la eficiencia productiva de los animales [1]. En pavas, la suplementación con SH mejoró la integridad intestinal y ejerció cambios hacia una microbiota más saludable, aumentándose el número de bacterias productoras de ácido butírico en el ciego [3]. En pollos de engorda se desconoce si las SH extraídas de LC promueven en el intestino una microbiota benéfica y su asociación con mejoras en productividad. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la respuesta productiva, microbiología del agua e intestino y microbiota intestinal (yeyuno) en pollos adicionados con SH de LC en alimento o agua de bebida.

## Materiales y Métodos

Se usaron 400 pollos Ross 308 de un día de vida, que fueron alojados en grupos de 25 en corrales de piso con medidas de 1x2 m. Los corrales fueron provistos con cama de aserrín, un comedero semiautomático y un bebedero de campana. La caseta es de ambiente natural y la temperatura y ventilación se regulan mediante cortinas colocadas en las paredes

laterales. La temperatura interna de la caseta se mantuvo en 32° C al llegar los pollitos y se redujo 2° C cada semana, usando criadoras de gas. Al final de la tercera semana las criadoras fueron retiradas. Los corrales fueron asignados aleatoriamente a 4 tratamientos: 1) Alimento adicionado con un antibiótico promotor del crecimiento y un coccidiostato durante todo el ciclo de engorda (APC); 2) Alimento sin antibiótico ni coccidiostato, pero adicionado con 0.35% de EDSH; 3) Alimento sin antibiótico ni coccidiostato; el agua de bebida fue adicionada con 25% de lixiviado de lombricomposta como fuente SH (LSH); 4) Alimento sin antibiótico ni coccidiostato; el agua de bebida fue adicionada con 25% de extracto alcalino de lombricomposta como fuente SH (EASH). En la dieta APC, se incluyó BMD como promotor del crecimiento durante todo el ciclo de producción y una combinación de nicarbacina y monensina de 1-21 días y salinomicina de 22-42 días como coccidiostatos. Los procedimientos de extracción y preparación del EDSH, LSH y EASH fueron descritos en trabajos previos [4, 5]. Las primeras dos semanas el LSH y EASH fueron provistos por medio de bebederos de botella, y posteriormente, a través de tanques de 40 L de capacidad conectados a los bebederos de campana. Los alimentos fueron formulados con maíz blanco, pasta de soya y cubrieron las recomendaciones de nutrientes de la estirpe en tres etapas: 1-14, 15-28 y 29-42 días. Los alimentos fueron ofrecidos en harina y a libre acceso.

Los pollos fueron pesados el día 1, y posteriormente a los 42 días de edad, para obtener el peso corporal y calcular la ganancia diaria de peso (GDP). Se llevó también registro del consumo de alimento (CDA), conversión alimenticia (CA) y mortalidad. El día 41 del estudio, se seleccionaron dos pollos por corral y fueron inoculados con un polisacárido capsular de *E. coli* por vía intraperitoneal. El día 42, se tomaron muestras de agua de todos los bebederos y se sacrificaron los dos pollos inoculados para tomar muestras del contenido intestinal e hígado para llevar a cabo cultivos bacterianos para cuantificar el conteo total de bacterias, *E. coli* y *Salmonella spp.* En los dos pollos sacrificados, se cortó una porción de 2 cm de la parte media del yeyuno, se abrió y se expuso la mucosa; se eliminó los restos de contenido, de manera delicada, usando una jeringa con agua destilada. La mucosa se raspó con una laminilla de vidrio y se colocó en un vial, que fue congelado inmediatamente usando nitrógeno líquido. En el mismo vial se puso el raspado de los dos pollos. Los viales fueron colocados en un congelador a -70° C. Se pesaron 200 mg de mucosa intestinal para la extracción y purificación del ADN de células microbianas; para la ruptura de las paredes bacterianas se realizó el proceso de lisis mecánica por batido de microesferas siguiendo los procedimientos indicados en el manual del kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (D4300, ZYMO RESEARCH., Irvine, CA. USA.). El ADN purificado fue eluido en 100 µl de agua libre de ADNasa/ ARNasa proporcionado en el mismo kit. El material genómico fue cuantificado usando 1 µl de ADN usando un espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). La integridad del DNA se verificó usando un gel de agarosa al 1%. Las muestras de ADN se mantuvieron en congelación a -80 °C hasta su posterior uso. Las muestras fueron enviadas a un laboratorio especializado para llevar a cabo los análisis de microbioma.

Bioinformática en microbioma. La calidad de las secuencias se evaluó mediante la herramienta Trimmomatic, incluyendo el recorte y la eliminación de regiones de baja calidad. Posteriormente, la visualización de secuencias se realizó con la herramienta MultiQC. Las secuencias quiméricas y de baja calidad se eliminaron con el módulo DADA2, mientras que la asignación taxonómica se realizó utilizando como referencia la base de datos SILVA v-132 (99% de similitud de secuencias) a través del pipeline nf-core amplicon v2.3.2. Las características observadas, la uniformidad, la confianza y los índices de Shannon, como medidas de diversidad alfa, se calcularon mediante el módulo QIIME2. Mientras tanto, la beta-diversidad se estimó mediante el método "UniFrac ponderado" a través de las distancias basadas en la abundancia de Variante de Secuencia de Amplificación (ASV) en las muestras. La predicción funcional de las comunidades bacterianas también se realizó en el pipeline nf-core amplicon, a través de PICRUSt2, con base en lecturas filtradas de QIIME2.

Análisis estadístico. Los resultados de comportamiento productivo y microbiología fueron sometidos a análisis de varianza, usando los procedimientos de GLM del SAS. Se usó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos. La unidad experimental fue el corral y se tuvo cuatro repeticiones por tratamiento. Las diferencias entre medias fueron evaluadas usando el método de la Diferencia Mínima Significativa. En el microbioma, las puntuaciones de abundancia relativa de los principales ASV observados a nivel de género en muestras de ileon se utilizaron para la comparación por pares mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ), así como para el cálculo de las puntuaciones de correlación de Pearson, utilizando el software SPSS v. 29.02.0 (IBM, Corp., NY, EE. UU.). Los gráficos se generaron con el software Origin v. 2022 (OriginLab, Northampton, MA, EE. UU.).

## Resultados

El comportamiento reproductivo y mortalidad se presentan en la Tabla 1. El peso final y CDA tendieron a ser menores ( $P < 0.10$ ) y la GDP fue menor ( $P < 0.05$ ) en los pollos suplementados con EASH en comparación con los pollos de los otros tratamientos. La mortalidad fue mayor ( $P < 0.05$ ) con APC, intermedia con EDSH y LSH y menor en EASH. Los resultados de microbiología se presentan en la Tabla 2. En el agua de bebida, el conteo de BAT, *E. coli* y *Salmonella spp* fue similar entre tratamientos; la frecuencia relativa de aislados de *E. coli* fue mayor en APC y la de *Salmonella* fue mayor en EASH. En el contenido intestinal, el conteo y frecuencia relativa de BAT y *E. coli* fue similar entre tratamientos; pero *Salmonella spp* no se encontró en pollos APC y mostró baja frecuencia relativa en los otros tratamientos.

**Tabla 1. Comportamiento productivo de pollos 1 a 42 días de edad adicionados con sustancias húmicas.**

	APC <sup>a</sup>	EDSH	LSH	EASH	EEM <sup>b</sup>
Peso día 1, g	43.60	43.20	44.00	43.60	0.490
Peso día 42, g	2726.7 <sup>c</sup>	2648.1 <sup>c</sup>	2667.5 <sup>c</sup>	2378.8 <sup>d</sup>	64.030
Consumo de alimento, g/día	97.71 <sup>c</sup>	94.05 <sup>c</sup>	93.54 <sup>c</sup>	83.82 <sup>d</sup>	2.492
Ganancia de peso, g/día	62.58 <sup>e</sup>	59.09 <sup>e</sup>	59.50 <sup>e</sup>	52.69 <sup>f</sup>	1.634
Conversión alimenticia	1.55	1.58	1.56	1.59	0.015
Mortalidad, %	11.98 <sup>e</sup>	9.52 <sup>f</sup>	10.02 <sup>f</sup>	5.81 <sup>g</sup>	1.616

<sup>a</sup> APC= Antibióticos promotores del crecimiento; EDSH= Extracto deshidratado de sustancias húmicas; LSH= Lixiviado de sustancias húmicas; EASH= Extracto alcalino de sustancias húmicas.

<sup>b</sup> Error estándar de la media.

<sup>c-d</sup> Efecto de tratamiento,  $P < 0.10$ .

<sup>e-f</sup> Efecto de tratamiento,  $P < 0.05$ .

En las comunidades bacterianas, no se observaron diferencias significativas en la diversidad alfa de las muestras, considerando las características observadas, la uniformidad, los índices de confianza y de Shannon, según la prueba de Kruskal-Wallis. El filo predominante fue *Firmicutes*, independientemente del tratamiento (Tabla 3), y alcanzó hasta el 98 % de la abundancia relativa total en las comunidades bacterianas. Numéricamente, se observaron valores de abundancia relativa más altos en los grupos EDSH, LSH y EASH en comparación con el grupo APC. Sin embargo, solo se observaron diferencias estadísticas para el filo *Actinobacteriota* ( $P = 0.03$ ), que se redujo en el grupo EDSH con respecto al grupo APC (0.2 y 1.8, respectivamente). A nivel familiar (Tabla 4), algunas familias mostraron cambios ( $P < 0.05$ ) en la abundancia relativa en EDSH con respecto a APC, como *Lactobacillaceae* (91.99 y 53.18, respectivamente;  $P = 0.02$ ), *Corynebacteriaceae* (0.13 y 1.16, respectivamente;  $P = 0.04$ ), *Peptostreptococcaceae* (0.06 y 18.85, respectivamente;  $P = 0.01$ ), *Aerococcaceae* (0.02 y 1.42, respectivamente;  $P = 0.01$ ) y *Staphylococcaceae* (0.12 y 1.59, respectivamente;  $P = 0.03$ ). A nivel de género (Tabla 5), las abundancias relativas de *Ligilactobacillus* aumentaron ( $P < 0.05$ ) en EDSH en comparación con APC (33.88 vs. 13.52,  $P = 0.04$ ). Mientras tanto, otros géneros bacterianos exhibieron abundancias relativas menores en comparación con el grupo APC, incluyendo *Corynebacterium* (0.13 vs 1.16,  $P = 0.04$ ), *Staphylococcus* (0.10 vs 0.92,  $P = 0.04$ ), *Aerococcus* (0.02 vs 0.70,  $P = 0.01$ ), *Brachybacterium* (0.00 vs 0.45,  $P = 0.03$ ), *Jeotgalicoccus* (0.03 vs 0.59,  $P = 0.05$ ), y otros *Peptostreptococcales* (0.00 vs 18.74,  $P = 0.01$ ).

**Tabla 2. Microbiología del agua de bebida y contenido intestinal.**

	APC <sup>a</sup>	EDSH	LSH	EASH
Agua de bebida				
Bacterias aerobias totales	5.70	8.30	.	8.48
Frecuencia relativa	1/6	1/6	0/5	1/6
Porcentaje	16.67	16.67	0.00	16.67
E. coli	.	.	.	8.40
Frecuencia relativa	0/6	0/6	0/5	1/6
Porcentaje	0	0	0	16.67
Salmonela spp	.	.	.	.
Frecuencia relativa	0/6	0/6	0/5	0/6
Porcentaje	0	0	0	0
Intestino				
Bacterias aerobias totales	4.84	5.64	5.71	5.15
Frecuencia relativa	6/8	6/8	5/8	5/8
Porcentaje	100	100	100	100
E. coli	5.46	5.19	4.78	5.10
Frecuencia relativa	6/8	4/8	5/8	5/8
Porcentaje	100	67	100	100
Salmonela spp	.	4.24	4.18	4.65
Frecuencia relativa	0/8	2/8	1/8	1/8
Porcentaje	0	33	20	20

<sup>a</sup> APC= Antibióticos promotores del crecimiento; EDSH= Extracto deshidratado de sustancias húmicas; LSH= Lixiviado de sustancias húmicas; EASH= Extracto alcalino de sustancias húmicas.

**Tabla 3. Abundancia relativa de los principales filos de bacterias.**

Filos	Abundancia relativa				Comparación entre grupos (valor de P)					
	APC	EDSH	LSH	EASH	APC- LSH	APC- EASH	APC- EDSH	LSH- EASH	LSH- EDSH	EASH- LSH
Firmicutes	78.4	95.4	95.1	97.8	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Bacteroidota	1.6	1.2	0.6	0.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Proteobacteria	3.3	1.7	2.2	0.4	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Actinobacteriota	1.8	0.2	1.4	1.3	NS	NS	0.03	NS	NS	NS
Acidobacteriota	0.1	0.0	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dependentiae	0.1	0.2	0.1	0.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Patescibacteria	0.0	0.1	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Campylobacterota	13.7	1.1	0.5	0.1	NS	0.04	NS	NS	NS	NS
Planctomycetota	0.0	0.0	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Verrucomicrobiota	0.1	0.0	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Euryarchaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cyanobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Chloroflexi	0.0	0.0	0.0	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Other	0.8	0.0	0.1	0.1	NS	NS	0.02	NS	NS	NS

<sup>a</sup> APC= Antibióticos promotores del crecimiento; EDSH= Extracto deshidratado de sustancias húmicas; LSH= Lixiviado de sustancias húmicas; EASH= Extracto alcalino de sustancias húmicas.

**Tabla 4. Abundancia relativa de las principales familias de bacterias.**

Filo	Abundancia relativa				Comparación entre grupos (valor de P)					
	APC	EDSH	LSH	EASH	APC- LSH	APC- EASH	APC- EDSH	LSH- EASH	LSH- EDSH	EASH- LSH
Lactobacillaceae	53.18	91.99	89.77	86.57	NS	NS	0.02	NS	NS	NS
Chitinophagaceae	1.53	1.22	0.54	0.12	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Streptococcaceae	0.29	0.74	0.91	4.51	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Xanthobacteraceae	0.48	0.72	1.33	0.19	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Corynebacteriaceae	1.16	0.13	1.14	0.34	NS	NS	0.04	NS	NS	NS
Peptostreptococcaceae	18.85	0.06	0.86	2.03	NS	0.03	0.01	NS	NS	NS
Vermiphilaceae	0.06	0.05	0.07	0.10	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Reyraneliaceae	0.35	0.02	0.02	0.01	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Other_Candidatus	0.00	0.06	0.02	0.00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Aerococcaceae	1.42	0.02	0.37	0.30	NS	NS	0.01	NS	NS	NS
Campylobacteraceae	13.74	1.09	0.50	0.15	NS	0.04	NS	NS	NS	NS
Staphylococcaceae	1.59	0.12	0.49	0.42	NS	NS	0.03	NS	NS	NS
Peptostreptococcales- Tissierellales_Family XI	1.60	1.04	1.71	0.94	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Babeliales_UBA12409	0.07	0.10	0.02	0.00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Comamonadaceae	0.20	0.13	0.14	0.02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lactobacillaceae	53.18	91.99	89.77	86.57	NS	NS	0.02	NS	NS	NS
Chitinophagaceae	1.53	1.22	0.54	0.12	NS	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>a</sup> APC= Antibióticos promotores del crecimiento; EDSH= Extracto deshidratado de sustancias húmicas; LSH= Lixiviado de sustancias húmicas; EASH= Extracto alcalino de sustancias húmicas.

**Tabla 5. Abundancia relativa de los principales géneros de bacterias.**

Filo	Abundancia relativa				Comparación entre grupos (valor de P)					
	APC	EDSH	LSH	EASH	APC- LSH	APC- EASH	APC- EDSH	LSH- EASH	LSH- EDSH	EASH- LSH
Lactobacillus	35.91	40.62	57.22	46.44	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ligilactobacillus	13.52	33.88	9.73	26.36	NS	NS	0.04	NS	0.05	NS
Lactobacillaceae_HT002	2.66	12.91	18.93	3.89	0.02	NS	NS	0.03	NS	NS
Enterococcus	0.66	1.39	0.82	2.86	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Corynebacterium	1.16	0.13	1.14	0.34	NS	NS	0.04	NS	NS	NS
Anaerococcus	1.51	1.02	1.56	0.58	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Staphylococcus	0.92	0.10	0.32	0.22	NS	NS	0.04	NS	NS	NS
Aerococcus	0.70	0.02	0.12	0.11	NS	NS	0.01	NS	NS	NS
Brachybacterium	0.45	0.00	0.15	0.16	NS	NS	0.03	NS	NS	NS
Campylobacter	13.74	1.09	0.50	0.15	NS	0.05	NS	NS	NS	NS
Jeotgalicoccus	0.59	0.03	0.05	0.09	NS	NS	0.05	NS	NS	NS
Other	18.74	0.00	0.75	1.48	NS	NS	0.01	NS	NS	NS
Peptostreptococcales										
Facklamia	0.47	0.00	0.16	0.14	NS	NS	0.01	NS	NS	NS
Streptococcus	0.29	0.74	0.91	4.51	NS	0.05	NS	NS	NS	NS
Other Clostridia UCG	0.10	0.00	0.01	0.05	NS	NS	0.03	NS	NS	NS

<sup>a</sup> APC= Antibióticos promotores del crecimiento; EDSH= Extracto deshidratado de sustancias húmicas; LSH= Lixiviado de sustancias húmicas; EASH= Extracto alcalino de sustancias húmicas.

## Discusión

Para reducir la dependencia de antibióticos como promotores de crecimiento en la industria avícola, se han propuesto diversas estrategias, incluyendo el uso de prebióticos y probióticos, y compuestos naturales, como las SH, o incluso la combinación de dos o más productos [5]. En particular, las SH se consideran compuestos orgánicos que incluyen ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas, y se han asociado fuertemente con el suelo, debido a que alrededor del 80% de la materia orgánica del suelo está compuesta por SH. Se ha demostrado que estas moléculas tienen la capacidad de inhibir patógenos, disminuir los niveles de estrés, modular las respuestas inflamatorias e inmunitarias, entre otros [6].

En el presente estudio, se evaluó el efecto modulador de las SH sobre la productividad y la microbiota intestinal, lo que resultó en una reducción en la abundancia relativa de los filos *Proteobacteria* y *Campylobacteria*, y, en particular, en la reducción de las familias *Corynebacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Campylobacteriaceae* y *Staphylococcaceae*. Estos cambios resultaron en un aumento de la familia *Lactobacillaceae*, que abarca al menos 31 géneros, incluyendo los géneros que componen el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) [7]. Como era de esperar, se observaron cambios en algunos géneros relacionados con BAL, como *Ligilactobacillus*, *Aerococcus*, *Streptococcus* y *Limosilactobacillus*. En pavas, la suplementación con SH mejoró la integridad intestinal y ejerció cambios hacia una microbiota más saludable, aumentándose el número de bacterias productoras de ácido butírico en el ciego [3]; así mismo se han reportado mayores conteos de BAL en pollos adicionados con EDSH, usando técnicas de cultivo en placa [5, 8]. Estos resultados contrastan con lo reportados para gallinas ponedoras suplementadas con SH, en los cuales no se observó ningún efecto en el recuento de BAL en el contenido intestinal (intestino delgado y ciego), sin embargo, se mejoró la productividad y calidad del huevo [9].

A nivel familiar, las SH también aumentaron *Lactobacillaceae* que está fuertemente representada por *Lactobacilli*, que se han descrito como eficientes fermentadores de carbohidratos que contribuyen a disminuir el pH y restringir la colonización de otras bacterias [10, 11]. Esto podría explicar la reducción en la abundancia observada para las familias *Peptostreptococcaceae*, *Aerococcaceae* y *Staphylococcaceae*, lo que resulta en el aumento de géneros benéficos, como algunos miembros de *Lactobacillaceae*, incluyendo *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Ligilactobacillus* y *Limosilactobacillus*. En particular, *Ligilactobacillus*, un género derivado del género *Lactobacillus* (anteriormente conocido como *Lactobacillus salivarius*) que incluye al menos 16 especies [12], aumentó significativamente en los grupos EDSH y EASH. Algunas especies, como *Ligilactobacillus aviarius*, se han reportado como miembros frecuentes de la microbiota gastrointestinal de las aves de corral, presentando mayores abundancias relativas en el duodeno, el yeyuno y el íleon (entre el 0.5 y el 60 %) [13]. Algunas especies del género *Ligilactobacillus*, como *L. salivarius*, se han descrito como potencialmente probióticas debido a sus propiedades funcionales, que podrían aprovecharse en humanos y en animales, debido a su potencial para regular la microbiota intestinal y mejorar el estado de salud del huésped [14]. Probablemente estos cambios en la composición de la microbiota están asociados a las mejoras en la productividad de los pollos del presente trabajo, lo que coincide con investigaciones previas en pollos [4, 5] y pavas [3].

Desde una perspectiva funcional, la suplementación con SH se ha asociado con un aumento del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nitrógeno, riboflavina y energía, así como con una reducción de la producción de amoníaco fecal y la actividad de la ureasa [15, 16]. El aumento de la abundancia relativa de *Firmicutes*, el principal miembro del íleon [11], podría contribuir al mantenimiento de la homeostasis intestinal y la degradación de la fibra dietética [17]. En el presente estudio, se predijeron 392 vías metacíclicas como parte del perfil funcional de las comunidades bacterianas de la mucosa del yeyuno, algunas de las cuales aumentaron con la suplementación con SH. La predicción mostró un aumento, mediante la suplementación con SH, en la frecuencia de algunas vías que producen lactato y acetato, como la fermentación del piruvato, la degradación del acetileno, la derivación de *Bifidobacterium* y las vías de la glucólisis. Se observó aumento en la degradación de la sacarosa, que produce fructosa-6-fosfato, que se metaboliza a través de la vía de derivación de *Bifidobacterium*, cuya frecuencia predicha también aumentó con la suplementación de SH [18, 19].

## Conclusiones

El crecimiento de pollos en los tratamientos con APC, EDSH y LSH fue similar, por lo que las SH pueden reducir el uso de APC debido principalmente a que incrementan la abundancia de BAL, potencialmente probióticas, que disminuyen el pH y restringen la colonización de bacterias patógenas, especialmente la familia *Lactobacillaceae* que está fuertemente representada por *Lactobacilli*.

## Referencias

- [1] M. de L. Angeles, S. Gómez-Rosales, and G. Téllez-Isaias. Mechanisms of Action of Humic Substances as Growth Promoters in Animals. En: Makan Abdelhadi. Humus and Substances - Recent Advances. Abdelhadi, M., Ed.; IntechOpen: Londres, Reino Unido, 2022.
- [2] J. A. Maguey-González, S. Gómez-Rosales, M. de L. Angeles, and G. Téllez-Isaias, G. Use of Humic Substances from Vermicompost in Poultry. En: Téllez-Isaias G. The Global Antimicrobial Resistance Epidemic - Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions. IntechOpen. Londres, Reino Unido, 2022.
- [3] J. A. Maguey-González, J. Liu, G. Zhang, J. D. Latorre, J. O. Hernández-Ramírez, N. R. María de Jesús, R. Senas-Cuesta, S. Gómez-Rosales, A. María de Lourdes, A. Stein et al. Assessment of the Impact of Humic Acids on Intestinal Microbiota, Gut Integrity, Ileum Morphometry, and Cellular Immunity of Turkey Poults Fed an Aflatoxin B1-Contaminated Diet. *Toxins*. 16:122. 2024. <https://doi.org/10.3390/toxins16030122>
- [4] S. Gómez-Rosales, and M. de L. Angeles. Addition of a worm leachate as source of humic substances in the drinking water of broiler chickens. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 28:215-222. 2015.

- [5] A. Domínguez-Negrete, S. Gómez-Rosales, M. de L. Angeles, L. H. López-Hernández, T. C. Reis de Souza, J. D. Latorre-Cárdenas, and G. Téllez-Isaias. Addition of different levels of humic substances extracted from worm compost in broiler feeds. *Animals*. 11: 3199. 2021.
- [6] K. M. Islam, A. Schuhmacher, and J. M. Gropp. Humic acid substances in animal agriculture. *Pak. J. Nutr.* 4:126–134. 2005.
- [7] A. Rajput, S. M. Chauhan, O. S. Mohite, J. C. Hyun, O. Ardalani, L. J. Jahn, M. OA. Sommer, and B. O. Palsson. Pangenome analysis reveals the genetic basis for taxonomic classification of the Lactobacillaceae family. *Food Microbiol.* 115:104334. 2023.
- [8] A. Domínguez-Negrete, S. Gómez-Rosales, M. de L. Angeles, L. H. López-Hernández, T. C. Reis-de Souza, Y. López-García, A. Zavala-Franco, and G. Téllez-Isaias. Effect of the addition of humic substances as growth promoter in broiler chickens under two feeding regimens. *Animals*. 9:1101. 2019.
- [9] D. Mudroňová, V. Karaffová, B. Semjon, P. Nad', J. Koščová, M. Bartkovský, A. Makiš, L. Bujnák, J. Nagy, J. Mojžišová, and S. Marcincák. Effects of Dietary Supplementation of Humic Substances on Production Parameters, Immune Status and Gut Microbiota of Laying Hens. *Agriculture*. 11: 744. 2021.
- [10] M. Crhanova, D. Karasova, H. Juricova, J. Matiasovicova, E. Jahodarova, T. Kubasova, Z. Seidlerova, A. Cizek, and I. Rychlik. Systematic Culturomics Shows that Half of Chicken Caecal Microbiota Members can be Grown in Vitro Except for Two Lineages of Clostridiales and a Single Lineage of Bacteroidetes. *Microorganisms*. 7:496. 2019.
- [11] I. Rychlik. Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. *Animals* 10:103. 2020.
- [12] M. Tohno, Y. Tanizawa, H. Sawada, M. Sakamoto, M. Ohkuma, and H. Kobayashi. A novel species of lactic acid bacteria, *Ligilactobacillus pabuli* sp. nov., isolated from alfalfa silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 72. 2022.
- [13] B. Rios Galicia, J. S. Sáenz, T. Yergaliyev, A. Camarinha-Silva, and J. Seifert. Host specific adaptations of *Ligilactobacillus aviarius* to poultry. *Curr. Res. Microb. Sci.* 5:100199. 2023.
- [14] Y. Yang, X. Song, G. Wang, Y. Xia, Z. Xiong, and L. Ai. Understanding *Ligilactobacillus salivarius* from Probiotic Properties to Omics Technology: A Review. *Foods* 13:895. 2024.
- [15] C. Tang, W. Kong, H. Wang, H. Liu, L. Shi, V. A. Uyanga, J. Zhao, X. Wang, H. Lin, and H. Jiao. Effects of fulvic acids on gut barrier, microbial composition, fecal ammonia emission, and growth performance in broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 32:100322. 2023.
- [16] L. Liu, N. Yang, Y. Chen, Z. Xu, Q. Zhang, X. Miao, Y. Zhao, G. Hu, L. Liu, Z. Song, and X. Li. Effects of fulvic acid on broiler performance, blood biochemistry, and intestinal microflora. *Poult. Sci.* 103:103273. 2024.
- [17] Y. Sun, S. Zhang, Q. Nie, H. He, H. Tan, F. Geng, H. Ji, J. Hu, and S. Nie. Gut firmicutes: Relationship with dietary fiber and role in host homeostasis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 63:12073–12088. 2023.
- [18] S. J. Reid, and V. R. Abratt. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:312–321. 2005.
- [19] R. Caspi, R. Billington, I. M. Keseler, A. Kothari, M. Krummenacker, P. E. Midford, W. K. Ong, S. Paley, P. Subhraveti, and P. D. Karp. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 48:D445–D453. 2020.



## EVALUACIÓN DE ALGUNAS VARIABLES EN EL CONTEO DE OOQUISTES DE *EIMERIA* SPP. POR LA TÉCNICA DE MCMMASTER

Santos Sánchez Vanessa, Fuente Martínez Benjamín, Velasco Hernández Xóchitl  
Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
mvzvanessantos.san@gmail.com

### Resumen

En el presente trabajo de investigación básica y aplicada se evaluaron algunas de las variables comúnmente usadas en la técnica estándar de McMaster sobre el conteo de ooquistes de *Eimeria* spp. con el objetivo de aportar información práctica de como influyen estas modificaciones en el resultado y el diagnóstico final. Estas variables suelen emplearse en algunos laboratorios de diagnóstico para facilitar la observación y el conteo de las muestras de heces o cama y agilizar la obtención de resultados sin una validación metodológica previa, por lo anterior, se analizaron tres variables distintas: el uso de una de tres soluciones de flotación (solución salina saturada de cloruro de sodio, sulfato de zinc y sulfato de magnesio); el conteo parcial de la cámara de McMaster (media cámara) comparada con el conteo de cámara, aplicando factores de corrección, en comparación con el conteo total de la cámara (12 celdas); y el empleo de métodos físicos de filtrado (gasa y colador) frente a un control sin filtrado. Los resultados fueron procesados mediante un análisis estadístico con la prueba T de Student y una prueba de probabilidad con un valor de  $p < 0.05$ . Se observó que el uso de alguna de las tres soluciones analizadas es indistinto y no mostraron diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ); el conteo por parcelas, ajustado a factores de corrección, no mostró una diferencia significativa con relación al conteo total de la cámara de McMaster ( $p > 0.05$ ). En contraste, el uso de un método físico de filtrado (gasa o colador) repercutió significativamente de forma negativa los resultados del conteo ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el conteo de la mitad de la cámara puede usarse de forma segura bajo un manejo adecuado de las muestras y la estandarización de los factores de corrección; por otra parte, se recomienda evitar el filtrado de la muestra, mientras que la elección de alguna solución diferente (con una densidad igual o similar a 1.2 g/mL) puede emplearse según su disponibilidad y costo.

**Palabras Clave:** *Eimeria*, conteo de ooquistes, McMaster, solución de sulfato de magnesio, solución de sulfato de zinc y solución salina saturada de cloruro de sodio.

### Abstract

Some of the most commonly used modifications to the standard McMaster technique for counting *Eimeria* spp oocysts were evaluated with the aim of providing practical information on the effect of these variations on oocyst counts and subsequent final diagnosis. These variables are often used in some diagnostic laboratories to facilitate observation and counting in fecal or litter samples and to speed up obtaining results without prior methodological validation. Therefore, three different variables were analyzed: the use of one of three flotation solutions: saturated sodium chloride solution as control, zinc sulfate solution, and magnesium sulfate solution; partial counting of the McMaster chamber (half chamber counting) compared to counting the entire chamber; and the use of two different physical filtration methods (gauze and strainer) compared to an unfiltered control. The results were processed using statistical analysis with Student T-test with  $p$ -value  $< 0.05$ . It was observed that the use of any of the three solutions analyzed was indistinct and did not show a statistically significant difference ( $p > 0.05$ ). The count of a half chamber compared to counting the entire chamber did not show a significant difference ( $p > 0.05$ ). In contrast, the use of a physical filtering method (gauze or strainer) had a significantly negative impact on the counting results ( $p < 0.05$ ). It is concluded that counting a half chamber can be safely used under proper sample handling and standardization of correction factors; on the other hand, it is recommended to avoid filtering sample, while the choice of a different solution (with a density equal or similar to 1.2 g/mL) can be used depending on its availability and cost.

**Key Words:** *Eimeria*, oocysts count, McMaster, magnesium sulfate solution, zinc sulfate solution and saturated sodium chloride solution.

### Introducción

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria causada por diferentes especies de protozoarios de la familia Apicomplexa y género *Eimeria*. (1)

El pollo de engorda es particularmente susceptible a esta enfermedad debido a la intensidad de la crianza en caseta, crianza en piso y alta densidad de las poblaciones. Este parásito afecta la integridad y funcionalidad del tracto intestinal del ave; se presenta de manera clínica y subclínica con signos variados como: enteritis, diarreas en ocasiones mucosas o sanguinolentas, disminución del consumo de alimento, disminución de la ganancia de peso, mala pigmentación y desuniformidad de la parvada.

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la historia clínica, conteo de ooquistes y observación de lesiones a la necropsia. La técnica de McMaster es una técnica coproscópica cuantitativa predilecta para conocer la carga parasitaria de un individuo o población; esta técnica es ampliamente utilizada en la avicultura debido a su practicidad y costo. Sin embargo, la precisión y sensibilidad de los resultados depende de la estandarización del proceso. (2)

A pesar de ser una técnica estandarizada, en la actualidad se han implementado variables (uso de cámaras con diferentes volúmenes, conteos por parcela, soluciones diferentes con una densidad similar y métodos de filtrado), con la finalidad de agilizar los tiempos en el procesamiento de las muestras. Al adoptar alguna variable sin legitimación de esta, se podrían comprometer los resultados, llevando a una subestimación y en consecuencia un posible diagnóstico erróneo. (3)

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto en el conteo y diagnóstico cuantitativo de ooquistes de *Eimeria* spp. de algunas variables de la técnica de McMaster, y así, aportar información práctica para el Médico Veterinario Zootecnia.

## Materiales y Métodos

El presente estudio se desarrolló bajo un diseño experimental comparativo para evaluar el efecto de las tres variables más usadas para la técnica de McMaster. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves (DMZA), en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); durante el periodo que comprende de marzo del 2023 a febrero del 2025.

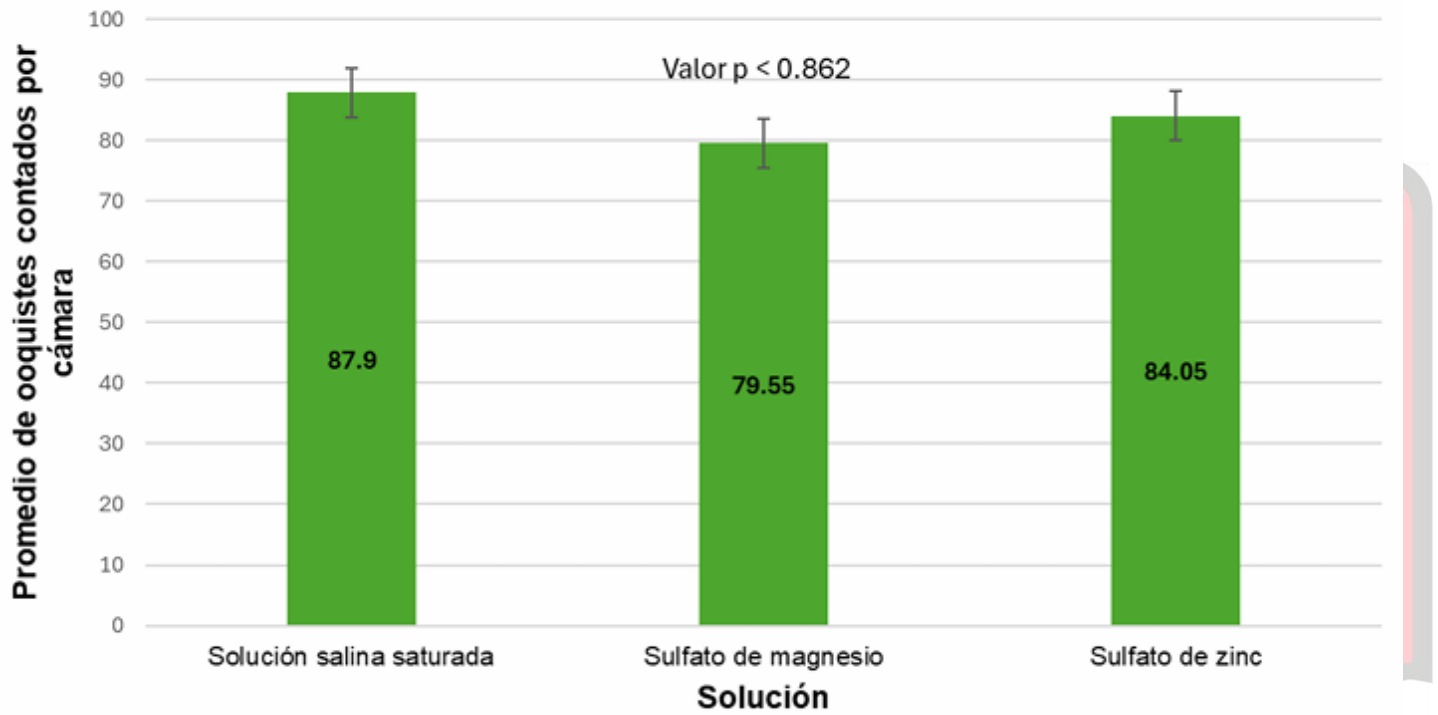
Se utilizaron muestras de heces de aves libres de coccidias, procedentes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), ubicado en la delegación Tláhuac, Cd. de México. Las muestras fueron sometidas a una prueba de McMaster para verificar la presencia o ausencia de coccidias, para posteriormente, ser estandarizadas a una concentración de 34,000 ooquistes/mL, obtenido de la titulación de un inóculo de origen vacunal con ooquistes de *Eimeria acervulina*, *máxima* y *tenella*.

Para el primer experimento se empleó una variable que implicaba el uso de diferentes soluciones con una densidad similar. Para el control se hizo uso de la solución salina saturada de cloruro de sodio (densidad de 1.2 g/mL), la cual se comparó contra la solución de sulfato de zinc (densidad de 1.2 g/mL) y la solución de sulfato de magnesio (densidad aproximada de 1.28 g/mL). El segundo experimento consistió en el análisis de los resultados obtenidos del primer experimento, correspondientes al conteo de ooquistes de la mitad o cámara de McMaster completa, sometiéndolos a una prueba T de Student. Asimismo, para el tercer experimento se analizó la variable del filtrado, en donde se hizo uso de dos diferentes tipos de colador y dos diferentes gasas, las cuales, se dividieron en el grupo 1, compuesto por: colador genérico de plástico de 20 cm de largo, con celdas de 1x1 mm y gasas estériles de algodón de la marca Aurax de 10x10 cm, con celdas de 1x2 mm; y el grupo 2, compuesto por: colador genérico de plástico de 20 cm de largo, con celdas de 0.5x0.5mm y gasas estériles de algodón de la marca Dr.Simi de 10x10 cm, con celdas de 2x3mm.

Finalmente se analizaron los resultados de cada variable mediante un diseño completamente al azar, haciendo una comparación de las medias mediante la prueba de Tukey con un valor  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Primer análisis: Uso de tres soluciones diferentes con densidades similares



**Figura 1.** Promedio de ooquistes contados por cámara por la técnica de McMaster utilizando tres diferentes soluciones.

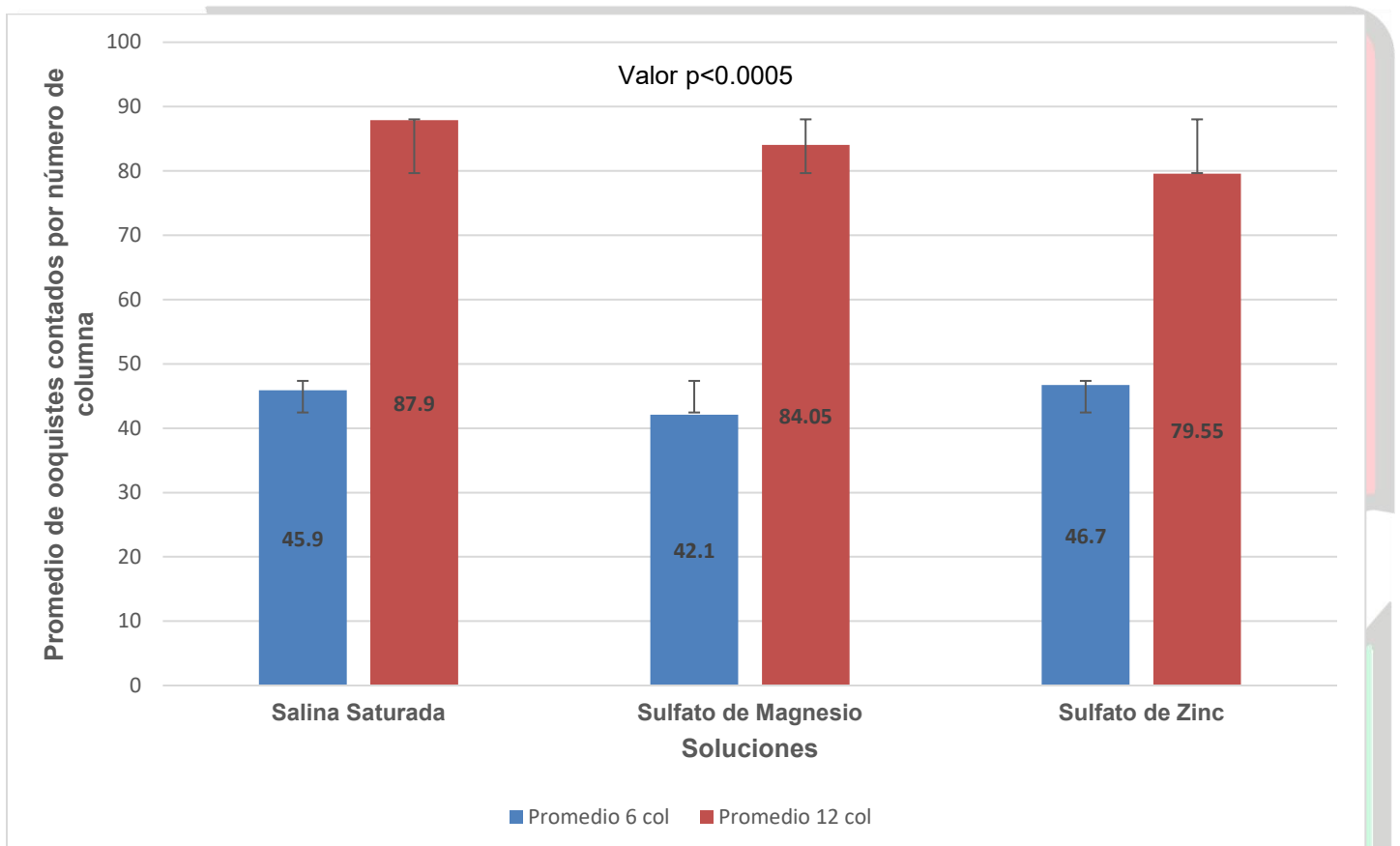
La solución salina saturada de cloruro de sodio represento en este experimento el control, y las soluciones de sulfato de zinc y sulfato de magnesio, las variables. El promedio de ooquistes contados utilizando la solución salina saturada fue de 87.9 ooquistes/cámara (4,395 ooquistes/g de heces).

El promedio de ooquistes contados empleando la solución de sulfato de magnesio fue de 79.55 ooquistes/cámara (3,977 ooquistes/g de heces), correspondiente a una tasa de recuperación del 90.5%. Por otro lado, el promedio de ooquistes contados al usar la solución de sulfato de zinc fue de 84.05 ooquistes/cámara (4,202 ooquistes/g de heces), obteniendo un 95.62% de recuperación.

De acuerdo con las condiciones experimentales empleadas para este experimento, el uso de una solución diferente a la solución salina saturada no mostró una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), por lo cual el uso de cualquier solución que sea igual o similar en densidad puede ser empleada para el conteo de ooquistes de *Eimerias* de pollos y gallinas.

## Segundo análisis: Conteo por parcela y cámara completa

Con base en los resultados obtenidos del experimento anterior, se procedió a hacer el análisis del conteo de media cámara (6 columnas) y cámara completa (12 columnas), exponiéndolo como el segundo experimento.



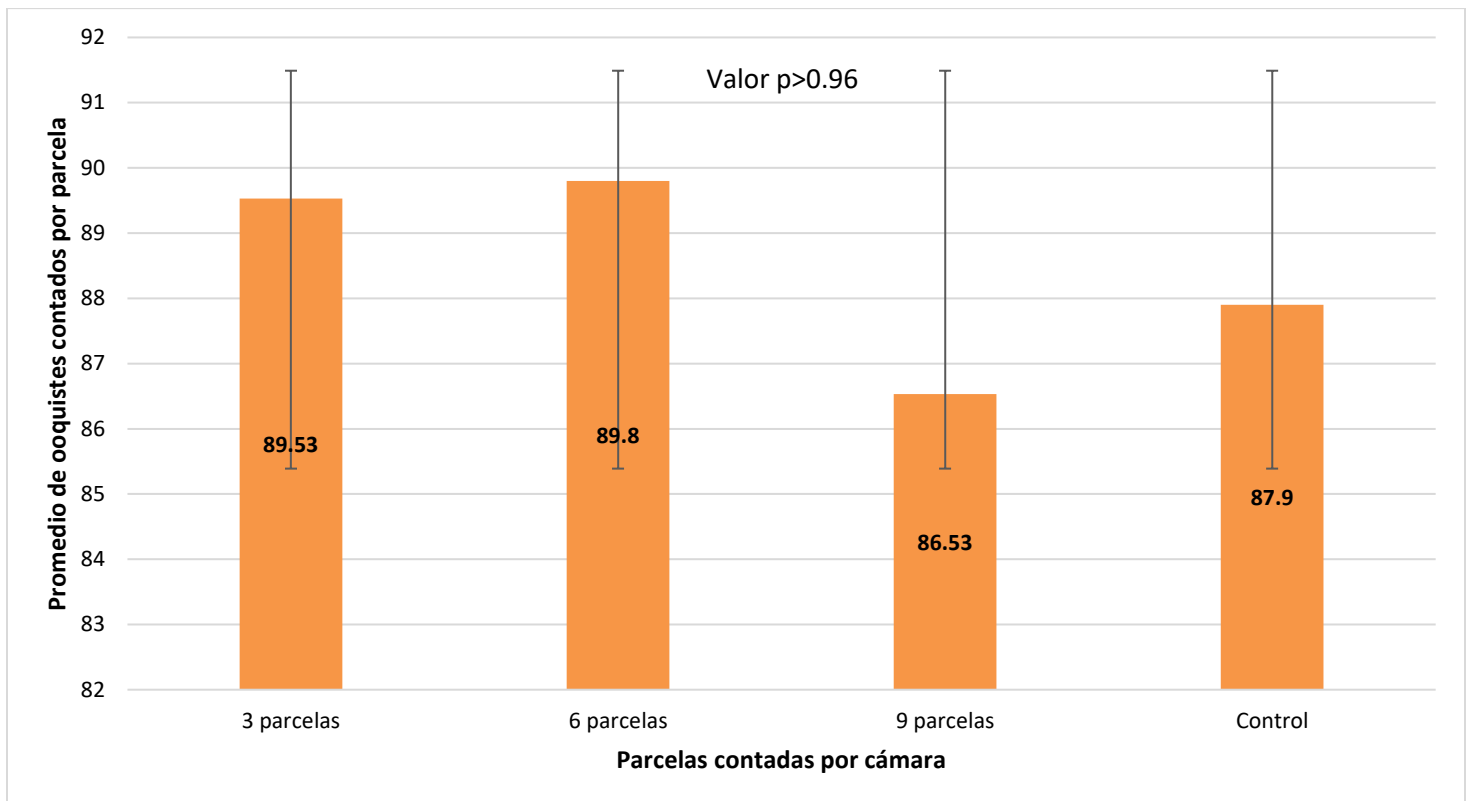
**Figura 2.** Promedio de ooquistes contados en la cámara completa y la mitad de la cámara de McMaster utilizando tres soluciones diferentes por la técnica estándar.

Solución salina saturada de cloruro de sodio, conteo de media cámara (4,395 ooquistes/ g de heces) y cámara completa (4,590 ooquistes/ g de heces), con un porcentaje de pérdida del 4.24%.

Solución de sulfato de magnesio, conteo de media cámara (3,789 ooquistes/g de heces) y cámara completa (3,977 ooquistes/ g de heces) con una disminución del 4.5%

Solución de sulfato de zinc, conteo de media cámara (4,203 ooquistes/g de heces) y cámara completa (4,203 ooquistes/ g de heces), sin un decremento aparente.

Además de ello se realizó un análisis en donde se pone a prueba la precisión al contar un cierto número de parcelas y multiplicar el resultado para contar con resultados más rápidos. Para esta parte del experimento se hicieron uso de los datos del total de ooquistes obtenidos al contar 3, 6, 9 y 12 parcelas



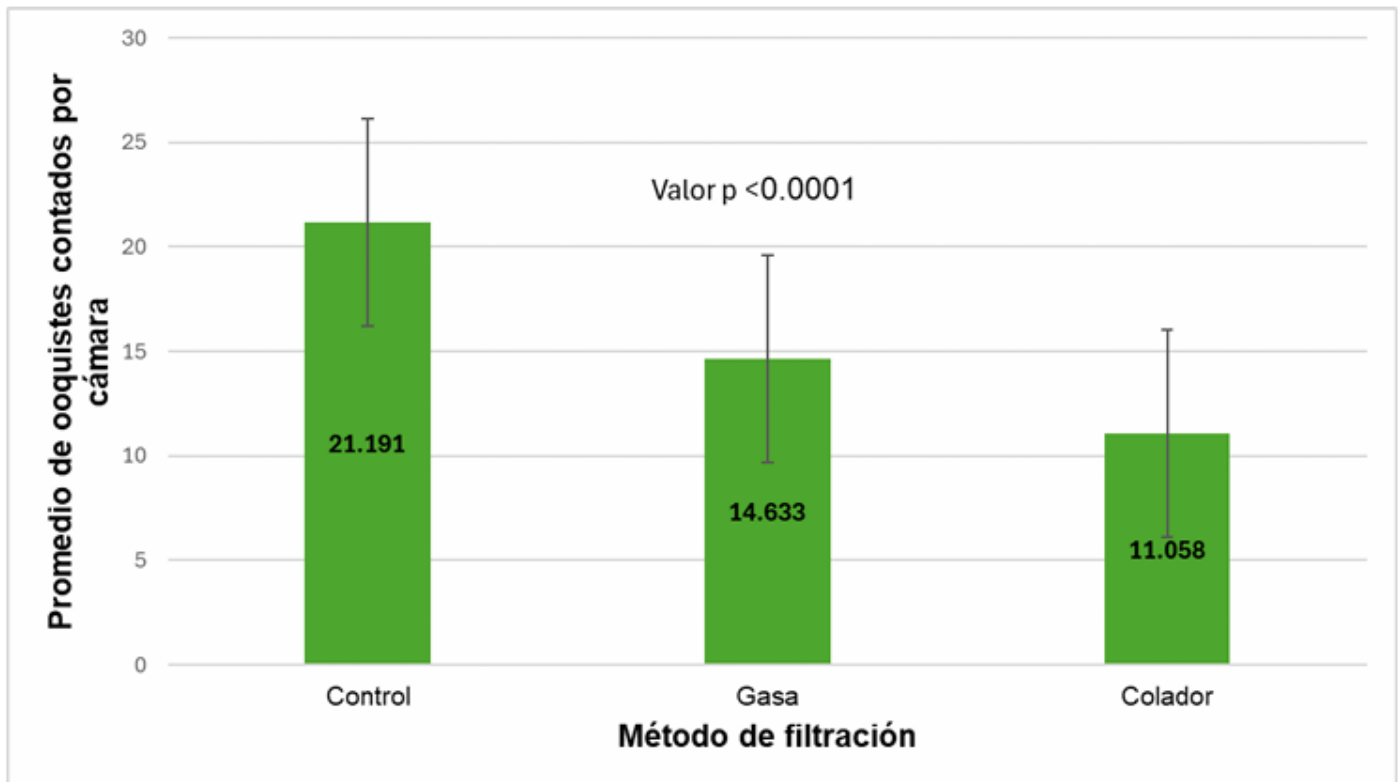
**Figura 3.** Promedio de ooquistes contados por parcela de la cámara de McMaster utilizando la solución salina saturada de cloruro de sodio.

Los resultados presentados, bajo las condiciones experimentales empleadas, no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre el conteo del total de parcelas (12 celdas), presentes en la cámara de McMaster o el uso de un conteo significativo que pueda multiplicarse al total de celdas.

### **Tercer análisis: Uso de un método físico de filtrado.**

Los métodos físicos de filtrado fueron seleccionados de aquellos que son comúnmente utilizados en laboratorio. Para evaluar la variable de respuesta en un mayor número de datos y tipos de materiales en este experimento se establecieron dos métodos de filtrado con dos diferentes materiales cada uno.

Por lo cual se usaron dos tipos diferente de gases estériles, previamente estandarizadas para este experimento y dos coladores de plástico genéricos con características similares. Ambos materiales se asignaron a fin de contar con un tipo de colador, y un tipo de gasa y para cada réplica del grupo testigo y tratamientos (por grupo y repetición).

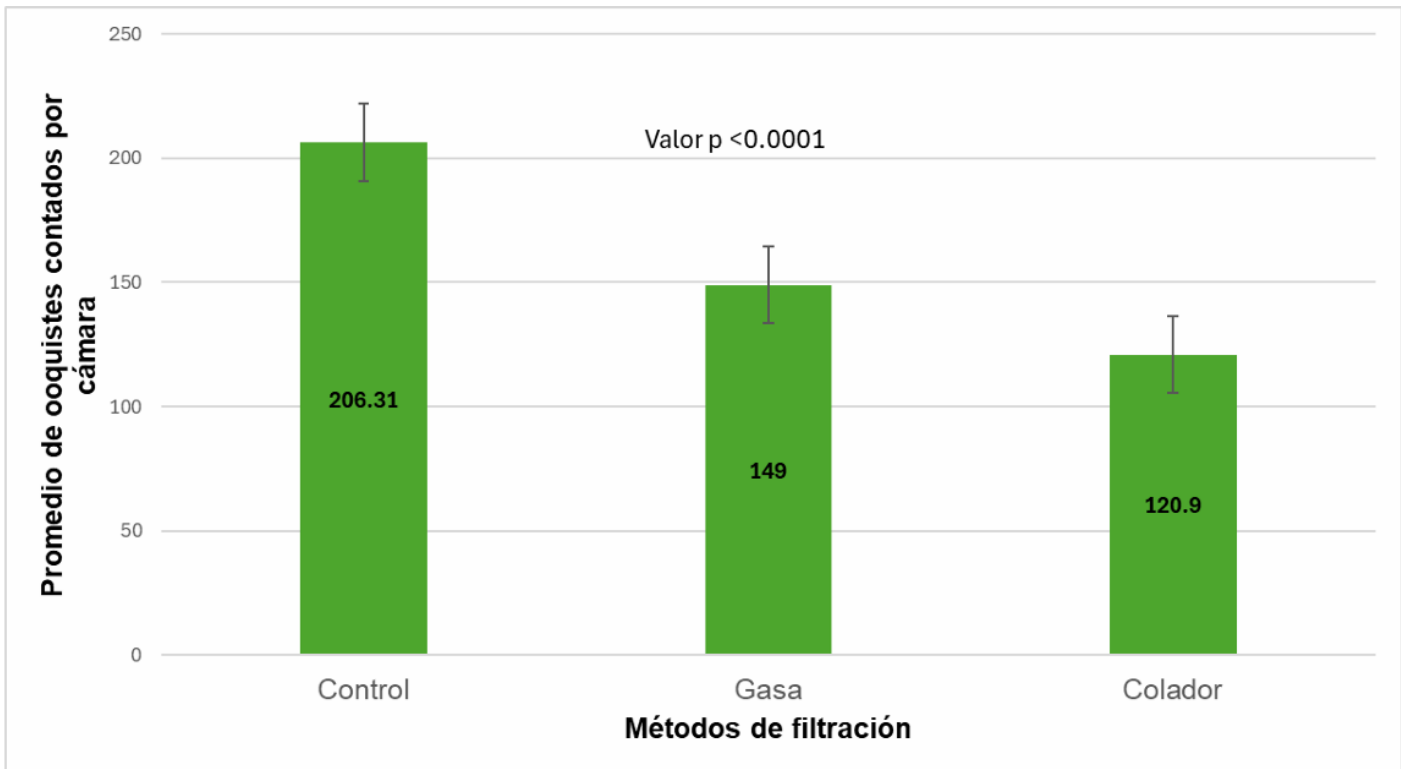


**Figura 4.** Promedio de ooquistes contados por cámara por la técnica de McMaster estándar utilizando dos diferentes métodos de filtrado (grupo 1).

Al usar la gasa el promedio de ooquistes contados por cámara fue de 175.6 ooquistes/cámara (8,780 ooquistes/g de heces), representándose en un 31.02% de reducción contra el control ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, el uso del colador dio como resultado un promedio de 132.7 ooquistes/cámara (6,635 ooquistes/g de heces), equivalente a un 47.87% en comparación con los resultados obtenidos del control.

Para el segundo análisis se hizo uso de los objetos pertenecientes al grupo 2.



**Figura 5.** Promedio de ooquistes contados por cámara por la técnica de McMaster estándar utilizando dos diferentes métodos de filtrado (grupo2).

Al emplear la gasa se obtuvo como resultado el promedio de 149 ooquistes/cámara (7,450 ooquistes/g de heces), la reducción se ve reflejada en un 27.77% comparado con el promedio de ooquistes del control.

El resultado del promedio de ooquistes contados al usar el colador es de 120.9 ooquistes/cámara (6,045 ooquistes/g de heces). El porcentaje de disminución fue del 41.39% en relación con el control.

## Discusión

Bajo las condiciones experimentales empleadas observamos lo siguiente:

Experimento 1: Uso de tres tipos diferentes de soluciones con densidades similares. El principio de la técnica de McMaster se basa en el principio de flotabilidad de Arquímedes, en donde la densidad de un objeto debe ser menor al del líquido contenido en un recipiente para flotar. (4)

En el caso del ooquiste de *Eimeria* la densidad es de aproximadamente 1.1 g/mL por lo que el uso de una solución con una densidad mayor a esto permitirá que flote. Es así, que el uso de una solución diferente a la solución salina saturada de cloruro de sodio, como lo es la solución de sulfato de zinc y la solución de sulfato de magnesio no mostró un efecto significativamente beneficio o perjudicial sobre los resultados del conteo de ooquistes de *Eimeria* spp. (5)

En el caso de la solución de sulfato de zinc y sulfato de magnesio es comúnmente usada para huevos de parásitos que requieran una menor variación homeostática, sin embargo, la solución salina saturada de cloruro de magnesio resulta ser el estándar debido a su accesibilidad y naturaleza de los elementos necesarios para su creación. (6)

Experimento 2: Conteo de cámara completa, media cámara y parcelas. Es comúnmente usado en la práctica en campo el conteo de la mitad de cámara de McMaster. Para este experimento el conteo parcial de la cámara de McMaster y el conteo de la cámara completa no mostró una diferencia significativa, aunque resulta de suma importancia contar con un

manejo adecuado de la muestra que se empleará y del factor de corrección para proporcionar resultados confiables. El resultado de conteo de ooquistes por gramo de heces puede ser parte determinante en el diagnóstico para dar un tratamiento de control en campo y prevenir pérdidas económicas importantes en la pigmentación cutánea o conversión de las parvadas.(7)

Experimento 3: Método de filtrado. La base de esta modificación es el concepto de filtración que se define como la separación de un líquido y un sólido que se encuentran previamente mezclados en una suspensión. (8)

La gasa resulta ser un método de contención muy accesible debido a la naturaleza de sus ingredientes. El algodón de la gasa provoca una doble barrera de contención en donde su estructura porosa impide el paso de impurezas grandes, el segundo efecto que actúa como barrera es la capilaridad ya que parte del líquido de la suspensión es absorbido por la matriz lo que impide que los ooquistes sean desplazados con mayor agilidad.

El colador crea un doble filtrado, ya que, al momento de filtrar el líquido las partículas de mayor tamaño quedan suspendidas en la parte superior del colador, en donde pueden crear una doble filtración ya que pueden generar micro celdas que impidan el paso de los ooquistes. Con esto, podemos observar que la capacidad de retención de la materia orgánica fue mayor, comprobado por los resultados microscópicos como el conteo y los macroscópicos como la apariencia y turbidez del filtrado de la muestra posterior al filtrado.

Este proyecto demostró que los métodos físicos de filtrado son variables que puede ser un factor de subestimación de los datos ya que el promedio de reducción del conteo de ooquistes usando un colador fue del 41.39%, mientras que el uso de la gasa represento el 27.77%

#### Referencias

1. Ibarra F, Vera Y. Diagnóstico de laboratorio en las enfermedades en medicina veterinaria. Capítulo 8: Diagnóstico de enfermedades sanguíneas, gastrointestinales y de la piel de las aves. Vol. 1. Comité Editorial de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México; 2023. 133-138 p.
2. Swayne D. Diseases of Poultry 14th: Chapter 28 Protozoal Infections: Coccidiosis. Vol. 1. Wiley Blackwell; 2020. 1193-1200 p.
3. Chandrawathani P. McMaster method of worm egg count from faecal samples of goats: a comparison of single and double chamber enumeration of worm egg. Malaysian Journal of Veterinary Research. 2015;6(1):81-7.
4. Vite T. Principio de Arquímedes. Resúmenes, mapas o diagramas de aplicación del conocimiento. 2025.
5. Rodríguez RI. Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en la salud pública y veterinaria. Examen microscópico: Técnica de McMaster. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2015. 101-103 p.
6. Bowman D. Georgis Parasitology for Veterinarians. 7. Diagnostic parasitology. Elsevier eBooks; 2021. 105-115 p.
7. Vadlejch J. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? Parasitol Res. 2011;109(5):1387-94.
8. Degremont S. Manual técnico del agua. Capítulo 8: Filtración del agua. 4.a ed. España; 1979. 245 p.

AVEM  
Aviespecialistas de México

# DETERMINACIÓN DE LA SERIE BLANCA EN EL HEMOGRAMA DEL “PATO REAL” CAIRINA MOSCHATA, LINNAEUS, 1758 (*anseriformes: anatidae*)

José Henry Osorio, Yocner Quenan, Silvio Jaramillo  
Laboratorio de Investigación Bioquímica Clínica. Universidad de Caldas.  
Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD.  
jose.osorio\_o@ucaldas.edu.co

## Resumen

La determinación del cuadro hemático en aves es una herramienta diagnóstica clave para valorar el estado de salud, aunque resultados normales no descartan enfermedades asintomáticas. La serie blanca incluye heterófilos, eosinófilos y basófilos, además de linfocitos y monocitos; su interpretación permite identificar infecciones, estrés e inflamación. Este estudio evaluó el diferencial leucocitario en pato criollo (*Cairina moschata*) y comparó los valores según el sexo para aportar rangos de referencia. Se analizaron 46 patos (33 hembras, 13 machos) criados en Manizales, con toma sanguínea yugular y procesamiento en laboratorio. El hemograma se realizó con el analizador Mindray BC-3600, que usa impedancia eléctrica. No hubo diferencias por sexo en WBC, heterófilos o linfocitos; solo monocitos fueron mayores en hembras.

**Palabras Claves:** pato real, leucograma, glóbulos blancos, metabolismo.

## Introducción

La determinación del cuadro hemático en aves es una ayuda diagnóstica que aporta información sobre el estado de salud, facilitando la valoración y conducta en determinadas patologías, lo anterior, porque el hemograma es considerado uno de los exámenes clínicos de rutina de mayor uso para la evaluación de aves [1]. Los parámetros normales en un hemograma por lo general indican un buen estado de salud del animal, aunque resultados dentro de rangos normales no excluyen la presencia de patologías que cursan de manera asintomática [2].

Dentro del hemograma, la serie blanca (leucocitos) tiene cinco tipos principales de leucocitos: heterófilos, eosinófilos y basófilos (leucocitos granulocíticos), junto a linfocitos y monocitos (agranulocíticos). Los heterófilos son generalmente los leucocitos más abundantes en la sangre de las aves y cumplen una función análoga a los neutrófilos de los mamíferos como primera línea de defensa frente a infecciones bacterianas [3]. Por otro lado, los linfocitos son células relacionadas con la inmunidad adaptativa, y suelen disminuir en situaciones de estrés intenso o inmunosupresión, fenómeno que acompañado de heterofilia (aumento de heterófilos) se interpreta como un indicador de estrés fisiológico en el ave. El resto de leucocitos también aporta información clínica valiosa: los eosinófilos y basófilos suelen relacionarse con procesos parasitarios, alérgicos o inflamatorios, mientras que los monocitos tienden a elevarse en procesos infecciosos crónicos o inflamaciones de curso prolongado. Por ello, realizar el diferencial leucocitario (conteo relativo de cada tipo de glóbulo blanco) permite interpretar con mayor precisión el hemograma en las aves, facilitando la detección de alteraciones específicas como infecciones agudas, estados de estrés crónico o inflamación [4]. Estudios comparativos han demostrado, además, que las variables hematológicas pueden modificarse según diversos factores biológicos y ambientales, tales como la especie, la edad, el sexo, la dieta, la época reproductiva o las condiciones de manejo, encontrándose falta de consensos en la definición de parámetros sanguíneos en algunas especies de aves.

En el presente trabajo se estudia los valores de la línea blanca del hemograma en el pato criollo (*Cairina moschata domestica*), el cual es una especie de pato de la familia Anatidae originaria de América tropical, se puede encontrar en Latinoamérica en especial en zonas de clima tropical y subtropical [5]. Existen dos variedades una silvestre y la doméstica, por sus características este pato es idóneo para sistemas de bioproducción, donde se puede integrar con otras especialidades de interés productivo, tales como la piscicultura, porcinos, cultivos frutícolas y otros [6]. El objetivo del trabajo es comparar los valores de la serie blanca del hemograma de acuerdo al sexo en el “pato real” *Cairina moschata* (Linnaeus, 1758), con el fin de profundizar en estudios para aportar a los diferentes consensos orientados a definir rangos de referencia hematológicos específicos para el pato criollo, considerando sus condiciones ecológicas y zootécnicas particulares.

## Materiales y métodos

La cría de los animales, se realizó en la Vereda Morrogordo, Finca el Remanso, ubicada en el Municipio de Manizales (Colombia), a 1800 m.s.n.m. y con una temperatura promedio de 23°C. Las determinaciones por laboratorio se hicieron en el laboratorio de metabolismo de la Universidad de Manizales. Un total de 46 patos criollos (33 hembras y 13 machos), fueron criados durante 6 meses y se mantuvieron a régimen de 12 horas de luz. Se les suministró una dieta comercial estándar para gallina ponedora. El agua fue administrada ad libitum. Antes de la toma de muestras, las aves fueron ayunadas durante 12 horas, se tomaron 5 ml de sangre directamente de la vena yugular en tubos de ensayo. La sangre se centrifugó en una centrifuga Hettich zentrifugen, EBA 20. Tuttlingen, Germany, a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente, el suero obtenido se congeló a -30°C hasta su posterior análisis. Al momento de procesar las muestras, los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente, luego, fueron depositados en baño maría a una temperatura de 37°C por 10 minutos.

**Análisis hematológicos:** Se uso el analizador Mindray BC-3600, usando el principio de Impedancia Eléctrica para contar y clasificar células sanguíneas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) mediante la medición de cambios en la resistencia eléctrica al pasar por una apertura, además de métodos ópticos para diferenciar los leucocitos en 3 poblaciones (neutrófilos, linfocitos, monocitos) [7].

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados usando pruebas paramétricas o no paramétricas de acuerdo a las pruebas de normalidad, para el análisis estadístico se utilizó IBM SPSS Statistics 25. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con el  $P < 0,05$ .

**Consideraciones éticas:** El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Manizales

## Resultados

Al comparar hembras (n=33) y machos (n=13), no se observaron diferencias significativas en WBC, heterófilos (%) ni linfocitos (%) ( $p > 0.05$ ). Para eosinófilos (%), monocitos (%) y basófilos (%), al presentar distribución no normal, se aplicó la prueba U de Mann–Whitney para las otras con distribución normal t student; únicamente monocitos (%) mostró diferencias entre sexos, siendo mayor en hembras ( $p = 0.001$ )

Tabla 1. Niveles de globulos blancos, heterófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos en *Cairina moschata*.

Parámetro	Hembras		Machos		P-valor
	Media±SD (mg/dL)	Estadística	Media±SD (mg/dL)	Estadística	
Globulos blancos-WBC, 103/mm <sup>3</sup>	34,8±11,7	Mínimo 13	37,3±10,5	Mínimo 21	0,514
		Máximo 66		Máximo 60	
Heterófilos %	68,3±10,9	Mínimo 41	65,1±10,8	Mínimo 42	0,376
		Máximo 88		Máximo 83	
Linfocitos %	28,7±9,9	Mínimo 11	32,6±10,7	Mínimo 16	0,236
		Máximo 55		Máximo 58	
Eosinófilos %	0,12±0,4	Mínimo 0	0±0	Mínimo 0	0,103
		Máximo 2		Máximo 0	
Monocitos %	0,48±0,7	Mínimo 0	0±0	Mínimo 0	0,001
		Máximo 3		Máximo 0	
Basófilos %	2,3±2,2	Mínimo 0	2,1±1,9	Mínimo 0	0,803
		Máximo 9		Máximo 7	

## Discusión

En la serie blanca, nuestros resultados muestran que el total de leucocitos en pato real se encuentra dentro del rango esperado para aves y no presentó diferencias significativas entre sexos. Esta ausencia de dimorfismo sexual en el leucograma concuerda con lo reportado por Igwe et al. [8,11], quienes no hallaron variaciones entre machos y hembras ni en el conteo total de leucocitos ni en las proporciones de heterófilos y linfocitos en el pato real. Del mismo modo, Sánchez-Torres et al. [9] observaron que, para varias especies avícolas evaluadas (incluyendo pato criollo), los parámetros hematológicos fueron similares en hembras y machos de una misma especie. Al comparar la leucocitosis absoluta con otros estudios, se aprecia que los patos del presente estudio tienen un recuento leucocitario total relativamente elevado, aunque acorde con la literatura sobre esta especie. Sulaiman et al. [10] señalaron que el pato criollo posee conteos de leucocitos mayores que los documentados para patos de clima templado (p. ej., Pekín) e incluso superiores a los de la gallina criolla. Sulaiman et al. [10] encontraron que en patos criollos los linfocitos constituyen alrededor del 61–73% de los leucocitos diferenciales (mayor proporción en machos), mientras que los heterófilos comprenden gran parte del resto, este patrón linfocito-dominante es común en muchas aves acuáticas y se alinea con lo informado por investigaciones previas. Los eosinófilos y basófilos fueron escasos en este trabajo, constituyendo cada uno una fracción baja (<5%) del total de leucocitos. Igwe et al. [8] reportaron una proporción de eosinófilos relativamente mayor en patos nigerianos comparada con el presente estudio [11]. En el presente estudio el índice heterófilo/linfocito se mantuvo dentro de límites considerados normales, sugiriendo que las aves muestreadas se encontraban clínicamente estables.

## Conclusión

De acuerdo a los resultados presentados a diferencia de los eritrocitos, la cantidad de células blancas circulantes no parece estar fuertemente influenciada por factores hormonales en esta especie, además se sugiere una respuesta inmune basal más vigorosa o una adaptación a entornos donde la carga de patógenos puede ser distinta.

## Referencias

- [1] C. F. Gálvez Martínez, G. F. Ramírez Benavides, J. H. Osorio, "El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas," *Biosalud*, vol. 8, pp. 178–188, 2009.
- [2] E. Mitchell, J. Johns, "Avian hematology and related disorders," *Vet. Clin. Exot. Anim.*, vol. 11, n.º 3, pp. 501–522, 2008.
- [3] S. Garbus, J. Christensen, K. Buchmann, et al., "Hematology, blood biochemistry, parasites and pathology of common eider (*Somateria mollissima*) males during a mortality event in the Baltic," *Sci. Total Environ.*, vol. 683, pp. 559–567, 2019.
- [4] L. Lashev, S. Atanasova, T. Dinev, "Interspecies and gender-related variations of some haematological parameters in galliformes bird species," *Bulgarian J. Vet. Med.*, vol. 18, n.º 4, pp. 325–337, 2015.
- [5] Donkin RA.. *The Muscovy Duck, Cairina moschata domestica. Origins, dispersal and associated aspects of the geography of domestication.* A. A. Balkema, 1989. Rotterdam. 186 pp.
- [6] American Poultry Association. *The American Standard of Perfection: A complete description of all recognized breeds and varieties of domestic poultry.* 1998. Mendon, Massachusetts, USA. 367 pp.
- [7] Mindray, BC-3600: *Analizador de Hematología Automático—Experiencia Agradable en Prueba de Hematología*, Shenzhen, China, 2011.
- [8] N. J. Okeudo, I. C. Okoli, and G. O. I. Igwe, "Hematological characteristics of ducks (*Cairina moschata*) of Southeastern Nigeria," *Tropicultura*, vol. 21, no. 2, pp. 61–65, 2003.
- [9] L. S. Sánchez-Torres, M. Arredondo-Castro, G. Orozco-Benítez, D. Gutiérrez-Arenas, J. Carrillo-Beltrán, R. Lepe-Aguilar, and F. Ávila-Ramos, "Variables hematológicas en aves deportivas, ganso común, pato doméstico, pato azteca, guajolote y pollo de engorda," *Abanico Agroforestal*, vol. 3, pp. 1–10, 2021.

[10] M. H. Sulaiman, D. M. Aduta, and S. O. Salami, "The comparative study of the blood cellular composition in Muscovy ducks in Nigeria," *International Journal of Poultry Science*, vol. 9, no. 9, pp. 836–841, 2010.

[11] F. O. Olayemi and R. O. A. Arowolo, "Seasonal variations in the haematological values of the Nigerian duck (*Anas platyrhynchos*)," *International Journal of Poultry Science*, vol. 8, no. 8, pp. 813–815, 2009.



## EVALUATION AND CONTROL OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CHICKS IN THE INCUBATOR

Lisa R. Bielke, Nivedita Pareek, Muhammad Wajeeh Ul Hassan  
Prestage Department of Poultry Science, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA  
School of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

The gut microbiome is essential to poultry health, influencing digestion, immunity, and disease resistance. As artificial incubation limits maternal microbial transfer, chicks often develop microbiomes shaped by their environment rather than their hens. Previous work has shown that early exposure to bacteria in hatching cabinets shapes immune function and resistance to opportunistic pathogens. A more recent study characterized the microbiome of broiler breeder hens and day-of-hatch chicks to assess the potential for bacterial transmission between them. Samples from five 69-week-old hens including ceca, crop, small intestine, cloaca, and eggs, day-of-hatch chicks, and hatchery fluff were processed for whole-genome shotgun sequencing. DNA was processed for whole genome sequencing. Reads were quality-filtered, trimmed, and taxonomically classified with Kraken2/Bracken. Results showed that alpha diversity, measured by Pielou's evenness, ranged from 0.72 to 0.89, indicating generally balanced microbial communities across sample types. The ceca and small intestine were the most stable, while the crop and day-of-hatch GIT showed greater variability. Although some site pairs showed minor differences ( $p < 0.05$ ), none remained significant after correction ( $q > 0.05$ ), indicating overall similar evenness across groups. Bray–Curtis PERMANOVA showed that the cloaca and small intestine were the hen sites most similar to the day-of-hatch GIT, with only marginal or non-significant differences ( $q = 0.05–0.17$ ), suggesting limited maternal contribution and some continuity along the intestinal axis. Eggs and hatchery fluff showed similar microbial profiles ( $q = 0.21$ ) and were not significantly different from the small intestine or day-of-hatch GIT ( $q = 0.05–0.21$ ). In contrast, the ceca and crop formed distinct communities ( $q \leq 0.03$ ) and are unlikely contributors to initial chick microbiota. Our findings suggest that the cloaca and small intestine are the most likely maternal contributors to early chick microbiota, while the hatchery environment also exerting a significant influence. The cloaca and small intestine were most comparable to day-of-hatch GIT communities, while eggs and fluff only moderately and non-significantly overlapped. Overall, these patterns imply that rather than direct egg-based transmission, initial colonization is a result of both hatchery exposure and limited maternal cloacal input. Overall, current research has demonstrated a significant role of hatching environment for promoting favorable microbial exposure and coloniza.



AVEM  
Aviespecialistas de México

## **ACTUALIZACIÓN EN LAS CURVAS DE CRECIMIENTO POR ESTIRPE DE POLLO Y SU RELACIÓN CON LOS NUEVOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LAS PRINCIPALES ESTIRPES DE POLLO DE ENGORDA**

Everton Luis Krabbe – Eng Agr, D.Sc., Nutrólogo – Embrapa Suínos e Aves – Brazil.

La avicultura de engorde ha experimentado en las últimas décadas una evolución genética sin precedentes. Las principales casas genéticas han logrado avances continuos en la velocidad de crecimiento, la eficiencia de conversión alimenticia, el rendimiento de pechuga, la uniformidad de los lotes y la viabilidad de las aves. Como resultado, las curvas de crecimiento actuales difieren significativamente de aquellas utilizadas como referencia hace pocos años, incluso dentro de una misma estirpe.

Las tres principales estirpes comerciales de pollo de engorda presentan hoy perfiles de crecimiento más acelerados, mayor capacidad de deposición proteica y una utilización más eficiente de los nutrientes. Estos cambios implican modificaciones importantes en los requerimientos nutricionales a lo largo de las diferentes fases productivas. Sin embargo, la velocidad con la que estas nuevas estirpes son introducidas en el mercado supera, en muchos casos, la capacidad de la investigación científica para generar resultados consolidados y aplicables en el mismo período.

Existe, por lo tanto, un hiato entre las exigencias nutricionales reales de las nuevas generaciones genéticas y la información disponible proveniente de investigaciones en curso o recientemente concluidas. Mientras las empresas genéticas emplean tecnologías avanzadas de selección genómica y herramientas de análisis de datos a gran escala para acelerar el progreso genético, la lógica tradicional de construcción de proyectos de investigación —que requiere planificación, ejecución experimental, análisis estadístico y publicación— demanda tiempos considerablemente más largos.

Esta diferencia de ritmos genera una brecha creciente. Cuando los resultados de muchos estudios llegan al sector productivo, las aves para las cuales fueron diseñados ya han sido reemplazadas por nuevas generaciones con características metabólicas y productivas diferentes. En consecuencia, parte del conocimiento generado puede no reflejar con precisión las necesidades actuales de las estirpes en uso.

Las nuevas curvas de crecimiento muestran que las aves alcanzan pesos corporales superiores en menor tiempo, con mayor proporción de tejido magro y menor depósito relativo de grasa. Esto indica una mayor demanda de aminoácidos digestibles, energía metabolizable adecuadamente balanceada y una sincronización más precisa entre el aporte de nutrientes y la capacidad fisiológica de deposición tisular.

Además, la precocidad metabólica observada en estas estirpes exige una revisión de los programas nutricionales por fases. Las transiciones entre preiniciador, iniciador, crecimiento y finalización requieren ajustes más finos, considerando que pequeños desbalances nutricionales en etapas tempranas pueden tener efectos acumulativos sobre el desempeño final, la uniformidad y el rendimiento de canal.

Otro aspecto relevante es la capacidad digestiva y metabólica de las aves modernas. La mayor eficiencia en la conversión alimenticia no solo es resultado de la genética, sino también de una mejor capacidad para utilizar los nutrientes ofrecidos. Esto obliga a revisar conceptos tradicionales sobre densidad nutricional, niveles de proteína cruda, relación energía:aminoácidos y uso de aditivos funcionales.

Frente a este escenario, se evidencia una oportunidad clara para un mejor alineamiento entre las casas genéticas y las instituciones de investigación. Una colaboración más estrecha permitiría que los programas de investigación sean diseñados considerando las tendencias genéticas futuras y no únicamente las condiciones actuales. De esta manera, los resultados obtenidos tendrían mayor aplicabilidad práctica en el momento de su publicación.

Asimismo, el intercambio de información sobre las características fisiológicas y metabólicas de las nuevas estirpes permitiría a los investigadores formular hipótesis y diseños experimentales más ajustados a la realidad productiva. La integración de datos genómicos, productivos y nutricionales podría acelerar la generación de conocimiento útil para el sector.

Las tecnologías actuales de selección genómica han reducido significativamente el tiempo necesario para obtener progreso genético. Sin embargo, los modelos tradicionales de investigación aún operan bajo cronogramas extensos que no acompañan esta velocidad. Esta diferencia tiende a ampliarse si no se adoptan nuevas estrategias de cooperación, uso de datos en tiempo real y metodologías de investigación más dinámicas.

Investigaciones recientes demuestran que los pollos de engorde tienen un potencial sorprendente, ya que superan el peso indicado por sus genéticas y, en ocasiones, alcanzan su peso vivo objetivo entre 3 y 4 días antes. Estos datos demuestran un inmenso potencial para ajustar la nutrición (densidad de nutrientes) y la tasa de ganancia de peso para lograr la máxima eficiencia económica. Con la incorporación de conceptos de nutrición de precisión, se espera que en el futuro se pueda lograr la optimización económica de los sistemas de producción, adaptándolos a las necesidades específicas de cada granja.

En conclusión, la actualización de las curvas de crecimiento por estirpe es fundamental para comprender los nuevos requerimientos nutricionales de las principales líneas de pollo de engorde. La rápida evolución genética ha creado una brecha entre las necesidades actuales de las aves y el conocimiento científico disponible. Reducir este hiato requiere un mayor acercamiento entre casas genéticas e instituciones de investigación, así como la adopción de enfoques más ágiles y colaborativos que permitan que la nutrición acompañe el ritmo del progreso genético en la avicultura moderna.



## GLOBAL CONTROL STRATEGIES FOR HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA

David E Swayne

Birdflu Veterinarian LLC, Watkinsville, Georgia, USA

Avian influenza and other viral diseases have a significant global impact on poultry production, animal welfare, and food security. A century ago, following the 1923–1924 fowl plague outbreak in the United States, Dr. E.L. Stubbs (1926) observed that “(fowl plague) is capable of causing such destruction of the poultry population as to be of economic importance in diminishing the food supply” and noted that the “dangerous character of the disease warranted radical methods for complete eradication within a few months.” For the next 100 years, fowl plague—today recognized as high pathogenicity avian influenza (HPAI)—has been approached as a transboundary disease requiring rapid detection and eradication. Global HPAI control strategies have traditionally centered on three pillars: 1) biosecurity, to prevent introduction into naïve flocks and limit lateral spread from affected flocks; 2) surveillance, to determine the HPAI virus status of flocks, herds, or wild animal populations; and 3) stamping-out, a comprehensive approach that integrates diagnosis, quarantine with movement controls, rapid depopulation and disposal, cleaning and disinfection, and repopulation.

Biosecurity is the primary preventive measure against HPAI and other poultry diseases, aimed at preventing the introduction of pathogens into farms or production systems. The National Poultry Improvement Plan outlines 14 core principles of biosecurity: 1) appoint a biosecurity coordinator to organize and implement programs; 2) implement staff biosecurity training; 3) maintain a line of separation to isolate poultry from external pathogens; 4) establish a perimeter buffer area; 5) enforce site-specific personnel procedures and personal protective equipment; 6) control wild birds, rodents, and insects; 7) disinfect equipment and vehicles before entry and limit sharing; 8) implement on-site daily mortality disposal; 9) manage manure and litter safely; 10) source replacement poultry from health-monitored flocks; 11) ensure pathogen-free or treated water; 12) control feed and replacement litter; 13) report elevated morbidity and mortality promptly; and 14) conduct biannual audits of the biosecurity plan. When properly implemented, biosecurity can prevent or significantly mitigate the impact of infectious diseases in poultry.

Surveillance identifies where infectious agents are present, informing risk assessments for farms, regions, or countries and confirming disease freedom. For HPAI, wild bird surveillance helps identify periods and regions of elevated risk for backyard and commercial poultry. Backyard and village poultry act as environmental sentinels for HPAI virus presence. In commercial poultry, clinical observation can serve as a screening tool to trigger official investigation and sample collection, provided thresholds for action are set low—for example, a doubling of daily mortality or 0.1% of the flock—rather than high thresholds such as 10%, to enable sampling, diagnostics and early detection of HPAI virus for action. Samples typically include oral and cloacal swabs collected from daily mortalities and tested by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RRT-PCR). In the United States, active avian influenza surveillance includes monthly testing of all layers and breeders and pre-processing testing of broiler flocks. This program is supported by the National Animal Health Laboratory Network (NAHLN), with positive HPAI samples confirmed by the National HPAI Laboratory. Because HPAI viruses spread rapidly, early detection and swift culling are essential to prevent farm-to-farm transmission, with depopulation typically initiated within 24 hours of preliminary diagnosis.

Stamping-out encompasses more than depopulation; it includes establishing containment zones, implementing quarantine measures, testing poultry within infected and buffer zones, rapid humane depopulation, environmentally safe disposal, and thorough cleaning and disinfection. Continuity of business operations in non-infected farms within containment zones is also critical, allowing unaffected poultry to be safely processed and marketed.

Vaccination provides an additional layer of protection for HPAI, complementing biosecurity, surveillance, and stamping-out measures. Vaccines support safe food production and can reduce susceptibility, viral replication, shedding, and environmental contamination.

A new global strategy for the prevention and control of HPAI, developed by FAO and WOA, emphasizes building robust systems for early detection and rapid response, responsible vaccination with increased uptake for prevention and control, implementation of practical and affordable biosecurity measures, greater use of HPAI-free zoning and compartmentalization, private-public partnerships for program development and implementation, and applied research into improved vaccines and diagnostic tools. Together, these measures provide a comprehensive framework to mitigate the global impact of HPAI on poultry production, food security, and animal welfare.

## CHANGES IN THE ECOLOGY AND EPIDEMIOLOGY OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA

David E Swayne

Birdflu Veterinarian LLC, Watkinsville, Georgia, USA

High pathogenicity avian influenza (HPAI) was first described in northern Italy in 1878, where it was known as fowl plague or fowl pest (Geflügelpest, peste aviar, gripe aviar). This disease is now recognized as H7 HPAI. From Italy, the virus spread to neighboring countries through the movement of infected poultry and, in 1901, disseminated widely across Europe following a poultry exhibition in Brunswick, Germany. In response, Germany implemented quarantine and hygiene measures to limit further spread. The first documented HPAI outbreak in the United States occurred during 1924–1925 in the live poultry markets of New York City, with spread along railroad networks as far west as Missouri. This outbreak established a federal role in disease control and eradication and marked the first use of indemnification for affected farmers, notably in Indiana. Subsequently, Schaefer identified the causative agent of fowl plague as an influenza A virus. All HPAI viruses arise from mutations at the hemagglutinin proteolytic cleavage site of H5 or H7 low pathogenicity avian influenza viruses (LPAIVs) following their introduction from wild aquatic bird reservoirs into gallinaceous poultry. Historically, most HPAI outbreaks have been controlled through stamping-out programs. Between 1959 and 2025, 52 unique HPAI events or epizootics were recorded, of which 49 involved newly emergent HPAI viruses that were eradicated within weeks to a few years. In contrast, three HPAI viruses have become endemic in poultry in specific regions: the H5Nx goose/Guangdong (Gs/GD) lineage (>124 countries across Africa, Asia, Europe, and North and South America; 1996–present), the H7N3 North American lineage virus in Mexico (2012–present), and the H7N9 Eurasian lineage virus in China (2017–present). During 2023–2025, eight independent HPAI mutation events were documented, including outbreaks in South Africa (H7N6), Australia (H7N3, H7N8 [two events], and H7N9), Germany (H7N5), New Zealand (H7N6), and the United States (H7N9). Typically, HPAI viruses are not maintained in wild birds and spread primarily through farm-to-farm transmission via fomites and the movement of infected poultry.

Since 1996, however, the emergence and persistence of H5N1 Gs/GD-related HPAI have fundamentally altered the ecology and epidemiology of the disease. Extensive antigenic drift of the hemagglutinin gene has produced ten major clades and numerous higher-order subclades, while reassortment with LPAIVs across the remaining seven gene segments has generated a wide diversity of genotypes, culminating in a global panzootic. Since 2020, H5N1 clade 2.3.4.4b has driven a fifth wave of transcontinental spread from Asia to Europe, Africa, North and South America, and Antarctica. This clade has caused widespread infections in wild, domestic, and captive birds; multiple mammalian species, including pets and livestock; and sporadic human cases. Unlike earlier HPAI viruses, clade 2.3.4.4b is maintained in several species of aquatic wild birds, expanding sources of infection beyond poultry value chains to include repeated primary introductions from infected wild birds and contaminated environments. In the United States, three clade 2.3.4.4b viruses (one B3.13 genotype and two D1.1 genotype viruses) have infected dairy cattle, creating an additional reservoir and source of infection for poultry operations. Infections in cats have occurred following consumption of infected wild birds, contaminated milk, or infected raw pet food. Introduction into poultry farms occurs through direct contact with infected wild birds, indirect transmission via fomites, and airborne dissemination.

Aviespecialistas de México

## EPIDEMIOLOGIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE FADV(ADENOVIRUS AVIAR) EN COLOMBIA (2025)

John Jairo Salazar

Pablo Saavedra, Jairo Araque, Aura María Torres, Andrés Faura, Andrea Castaño

Director Avicultura Latam InmunoPatología Amerivet SAS

Servicio Técnico Avicultura Colombia.

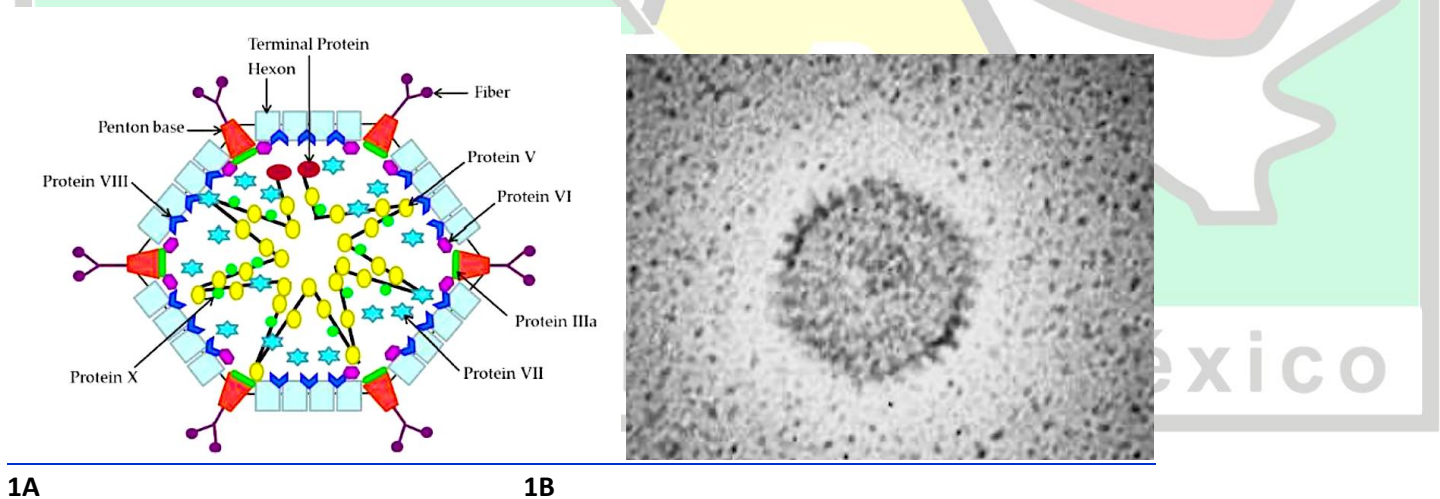
Jsalazar@amerivet.co johnjairo.salazar@gmail.com

Amerivet@amerivet.com

### Introducción

El primer caso de **Hepatitis Por Cuerpos de Inclusión(HPCI)** se reporto en EE UU en 1963 esta **Patología Inmunosupresora** se ha vuelto mas frecuente en todo el mundo y se caracteriza por afectar de manera devastadora la productividad de la industria avícola mundial [1].La HPCI es causada por el virus de Adenovirus Aviares que presenta una característica de patogenicidad muy diversa, la mayoría de las infecciones se presentan de manera subclínica que conducen a una infección sistémica[2]. Las Infecciones por **FadV(Adenovirus Aviar)** pueden producir disminución del crecimiento y una mortalidad entre el 10-80% (Dependiendo del serotipo)[3]. El FadV puede causar el síndrome de hidropericardio (HPS), Erosión de molleja (AGE), disminución en la producción de huevos y una fuerte inmunosupresión [4;5].

El Virus de FAdV pertenece al genero Adenovirus de la familia Adenoviridae caracterizado por presentar una estructura icosaedrica que contiene un nucleocapside el cual contiene hexones, Pentones y fibras[6].El hexones la proteína principal de la capsida y es la principal estructura que funge como determinante antigénico del grupo y subgrupo del virus y la secuencia de sus nucleótidos son un marcador muy confiable para la genotificación filogenética[7].Varios estudios han ilustrado las estructuras de FAdV-4 mediante criomicroscopía electrónica (CM) [8]. La cápside de FAdV está compuesta por 240 capsómeros de hexón (proteína II), 12 bases de pentón (proteína III) y 1 o 2 proteínas de fibra (proteína IV) por vértice[7].



**Figura 1. Figura 1A** estructura esquemática del FAdv compuesta por 10 proteínas (Adaptado de Areayi *et al.*,2021[7]). **Figura 1B** Micrografías electrónicas con tinción negativa de partículas virales presentes en sobrenadantes de cultivo de virus purificado en placa, aislado de una muestra de hígado patológico. La simetría icosaédrica y las estructuras capsoméricas resueltas indican la presencia de adenovirus.(Adatado de Arshud Dar *et al.*,2012[9]).

El FAdV Se pueden clasificar cinco especies según las características estructurales moleculares del virus: A (FAdV-1), B (FAdV-5), C (FAdV-4 y FAdV-10), D (FAdV-2, FAdV-3, FAdV-9 y FAdV-11) y E (FAdV-6, FAdV-7, FAdV-8a y FAdV-8b)[10;11].

Imagen 1. Clasificación del Virus de FAdV Según las Estructuras Moleculares(*hexon*)

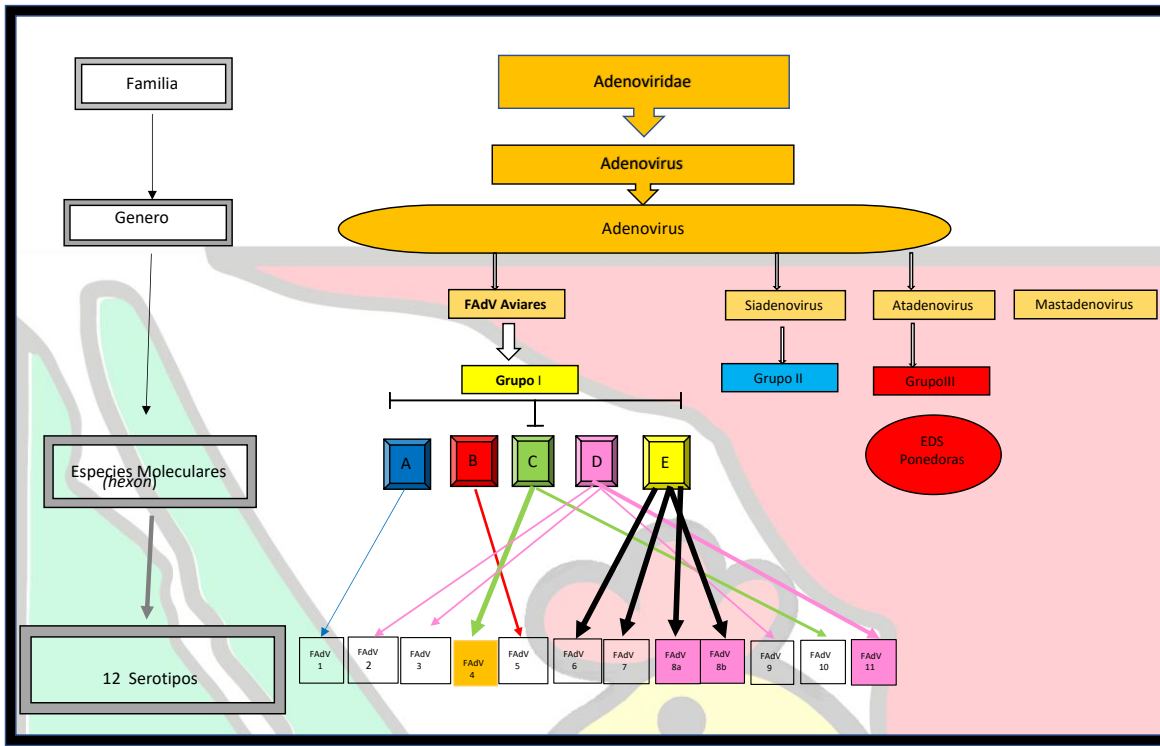


Figura 2: John Jairo Salazar. MVZ. MSc. Esp

Debido a la alta variabilidad del virus generado por la expresión de la mutación de el gen *hexon* del FAdV; la expresión de la sintomatología clínica y el impacto sobre la inmunidad para generar inmunosupresión es muy variable[12]; basados en esta característica viral generalmente el FAdV-1 expresa **Erosión en la Molleja (AGE)**, pancreatitis necrótica focal; el reporte histológico demuestra cuerpos de inclusión intranucleares en las células acinares pancreáticas[13]. FAdV-4 particularmente causa una apoptosis intrínseca primaria y un daño estructural en los órganos inmunes linfoides bazo, bolsa de Fabricio y timo, Además, se observó una mayor expresión de interleucina (IL)-6, IL-8 y ARNm del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  lo que condujo a una severa inflamación en órganos inmunes en pleno desarrollo entre los día 3-5 post infección[14]. Niu Yujin *et al.*,(2019)[15] Reporto que aves afectadas con FAdV-4 **presentaron Síndrome de Hidropericardio (HSI)**, Caracterizado por presentar derrame pericárdico grave e insuficiencia cardíaca aguda con daño miocárdico leve, respuesta inflamatoria grave y apoptosis. La formación de derrame pericárdico se debió a la exudación plasmática, más que a la degeneración de las células cardiacas. Los Serotipos de FAdV-8a y FAdV-8b son los causantes de el síndrome denominado **Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (IBH)** Este serotipo se caracteriza por presentar una mortalidad aguda entre 2-30% que se prolonga entre los 3-5 post-infección con una morbilidad alta entre el 70-80%, caracterizada por una alteración hepática, **Hepatitis Necrótica (HN)** acompañada de una severa inflamación, y la formación de **Inclusiones Intranucleares Basofílas (Foto-falta)**, estas lesiones también pueden ser causadas por el serotipo FAdV- D11 y FAdV-D2 [16], Además, los resultados confirman que este virus podría inducir fuertes respuestas inmunes innatas y respuestas inflamatorias intensas en los pollos que pueden asociarse con la patogénesis viral[16]. El Adenovirus tipo D-11 presenta palidez hepática con focos necróticos, hemorragia subcapsular, fuerte inflamación y congestión del timo entre 3-7 días post infección, además una gran cantidad de liquido seroso amarillento que llenaba el saco pericardiaco[17]. En una confección de FAdV-D11 y FAdV-E 8a se observó una fuerte depleción linfoide, una infiltración leucocítica entre los días 5-28 post infección con ambos virus[17].

Colombia es un país muy importante para la producción avícola en la región, según Fenavi, (2025) se produjeron en 2025 un total de 976.310.308 pollitos con un consumo percapita de 37.3 kg y 58.262.230 pollitas ponedoras con una producción de 19.500 millones de huevos y un consumo percapita de 365 huevos. Se han detectado varios serotipos de FAdV, en este

estudio realizaremos la caracterización molecular y la secuenciación de los serotipos predominantes por región ya que se han hecho pocos estudios patológicos comparativos de las cepas prevalentes de FadV en Colombia.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Muestras de Tejidos

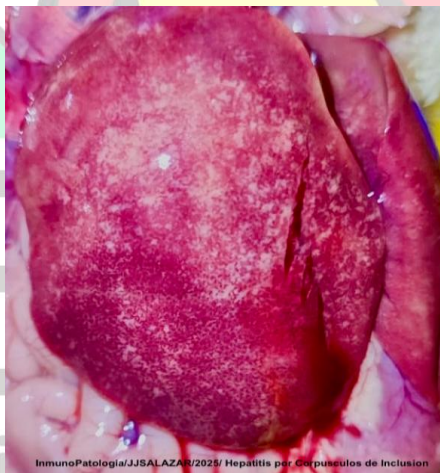
Se tomaron muestras con tarjetas **FTA** de hígado, bazo, riñón sospechosos de estar infectados con serotipos de FadV (*Adenovirus aviar*) y *Salmonella* spp entre enero y diciembre del 2025 en Colombia (Sur América) que se dividió en 3 zonas; Zona Norte (Santander (Bucaramanga), Norte de Santander y Costa Atlántica), Zona Centro (Cundinamarca, Boyacá, Tolima), Zona Sur Occidente (Valle del Cauca, Cauca, Risaralda y Quindío).

### 2.2 Extracción del Serotipo de FAdV Por PCR-Laboratorio Farvet Perú

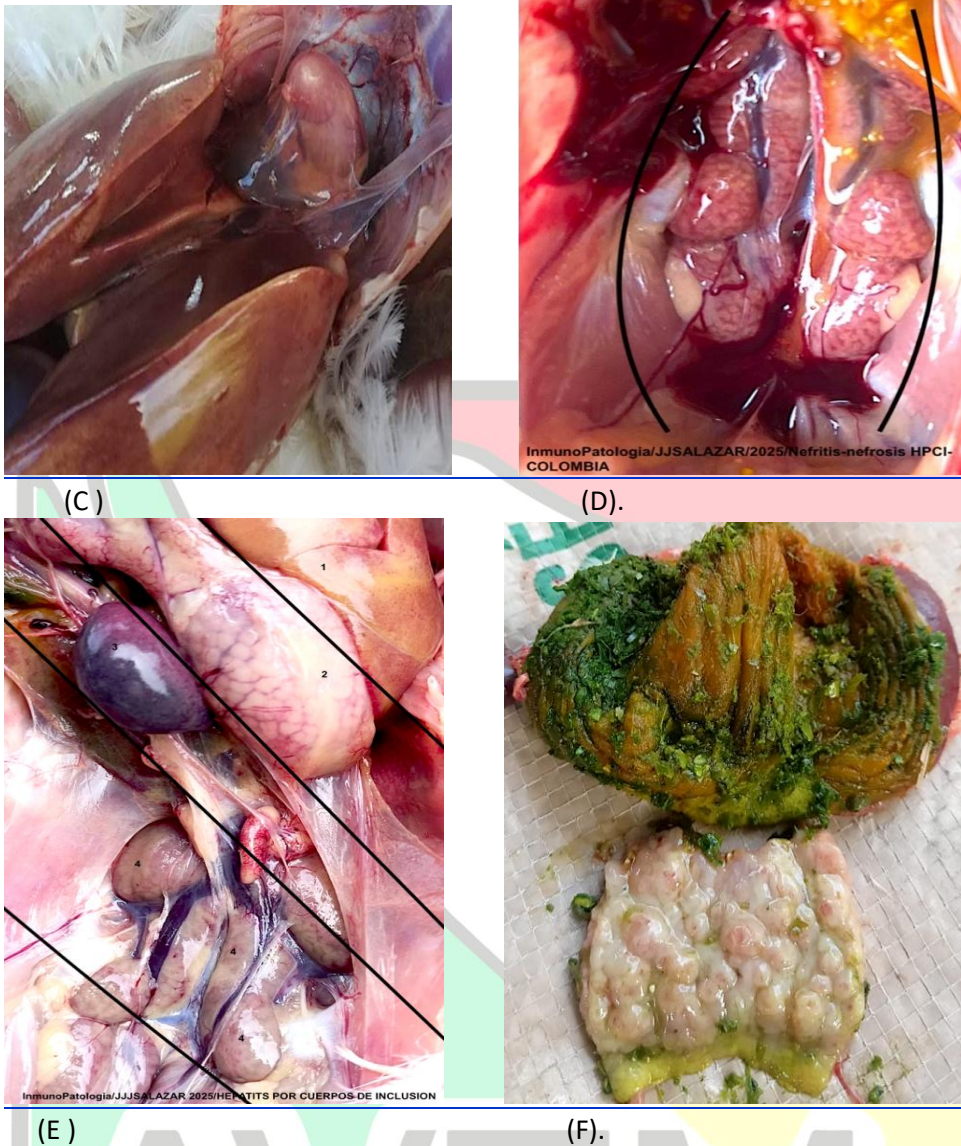
Las muestras de tejido se trituraron hasta homogeneizarse con un triturador de tejidos de alto rendimiento, seguido de una centrifugación a 12 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se congeló y descongeló tres veces. Los ácidos nucleicos genómicos del virus se extrajeron con un kit de extracción de ADN/ARN del virus Simply P. La mezcla de PCR de 25 µl incluyó 12,5 µl de 2xTaq PCR Master Mix (AG, AG11112), 1,25 µl de cebador directo e inverso 1 µM cada uno, 3 µl de ADN y 7 µl de ddH<sub>2</sub>O. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: 94 °C durante 30 s, seguido de 32 ciclos de 98 °C durante 10 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 2 min. La mezcla de RT-PCR de 25 µl incluía 12,5 µl de 2xOne Step Mix, 1,5 µl de One Step Enzyme Mix, 1 µl de cebador directo e inverso de 10 µM, cada uno, 3 µl de ARN y 6 µl de ddH<sub>2</sub>O. Se utilizaron las siguientes condiciones de RT-PCR: transcripción inversa a 50 °C durante 30 min y predesnaturalización a 94 °C durante 3 min; 32 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min y un paso final a 72 °C durante 7 min. A continuación, se añadieron 10 µl de los productos de PCR a geles de agarosa al 1 % y los amplicones se visualizaron con un dispositivo de imágenes en gel.



(A)



(B)



**Imagen 2.** Fotografías (A,B) FadV- 8 a y 8b(Colombia-Santander), (C) FadV-4 Ecuador,(D) FadV-D11, (E) FadV-8 a, FadV-8b y FadV-D11(Santander), (F) FadV-D11 Colombia.

**Secuencias de Cebadores para la Amplificación de los Genes *hexónicos* de longitud Completa de varios FAdV.(Farvet-Perú)**

ESPECIE	NOMBRE	SECUENCIACION DE PRIMER(5'3')	LONGITUD(bp)	SEROTIPO
FAdV-A	FAdV-A-F	AGGCTCTCATTTCAGGCC	3,492	1
	FAdV-A-R	GCGAACCCGATCCAGTGC		
FAdV-B	FAdV-A-F	CCACCAGACGCACCAACA	3,311	5
	FAdV-A-R	TCCGAACGGGTGCAACAT		
FAdV-C	FAdV-A-F	GAGATGGTGACGGAGGTG	3,139	4,10
	FAdV-A-R	AAGCGGTGACGAGGATGC		
FAdV-D	FAdV-A-F	GAGATGGTGACGGAGGTG	3,286	2,3,9,11
	FAdV-A-R	TTGGGATCGAGGAACCCG		
FAdV-E	FAdV-A-F	GCGAAGAGGAGACGAAAGC	3,185	6,7,8 a,8b
	FAdV-A-R	CGAACACGCCCAAGAACC		

**Cuadro 1.** Secuenciación de los virus de FAdV.

### 2.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico “ Estadística descriptiva con R”

## 3. Resultados

### 3.1 Análisis total de las muestras

Entre enero 20 y diciembre 22 del 2025 se recolectaron 24 Tarjetas FTA (96 impresiones) pertenecientes a 5 empresas de pollos de engorde sospechoso de sufrir hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH) en las 3 zonas clasificadas para el estudio, se detectaron un total de 13 muestras positivas (54.2%) y negativas el 45.8% 8(ver cuadro 2).

EMPRESA	FECHA	TARJETA	PCR-HPI(52K)	SEROTIPO FAdV
EMPRESA 1	4/04/25	FTA1	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 2	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 3	Detectado 1x10(6)/mL	E8a
		FTA 4	Detectado 1x10(6)/mL	D11
EMPRESA 2	29/05/25	FTA1	No detectado	
		FTA 2	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 3	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 4	No detectado	
		FTA5	Detectado 1x10(6)/mL	E8b
		FTA 6	No detectado	
		FTA 7	No detectado	
		FTA 8	No detectado	
EMPRESA 3	4/07/25	FTA1	No detectado	
		FTA 2	No detectado	
		FTA 3	Detectado 1x10(6)/mL	E8b
		FTA 4	Detectado 1x10(6)/mL	E8a
EMPRESA 4	10/08/25	FTA1	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 2	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 3	Detectado 1x10(6)/mL	E8a
EMPRESA 5	11/12/25	FTA 1	No detectado	
		FTA 2	No detectado	
		FTA 3	Detectado 1x10(6)/mL	D11
		FTA 4	No detectado	
		FTA 5	No detectado	

Cuadro 2. Detección de Casos Virus de FAdV

### 3.2. Secuenciación y análisis del Gen *hexon*

Tras la secuenciación y el empalme, las secuencias de 13 FAdV se enviaron a GenBank (números de acceso: 910-25–142625 y 1482-25–1722-25). Se realizaron análisis filogenéticos con base en las secuencias obtenidas y las secuencias de referencia descargadas del NCBI. Los resultados se observan en la figura 3, 8 casos corresponden a FAdV-11, 3 casos a FAdV-E8a y 2 casos a FAdV-E8b.

Aviespecialistas de México

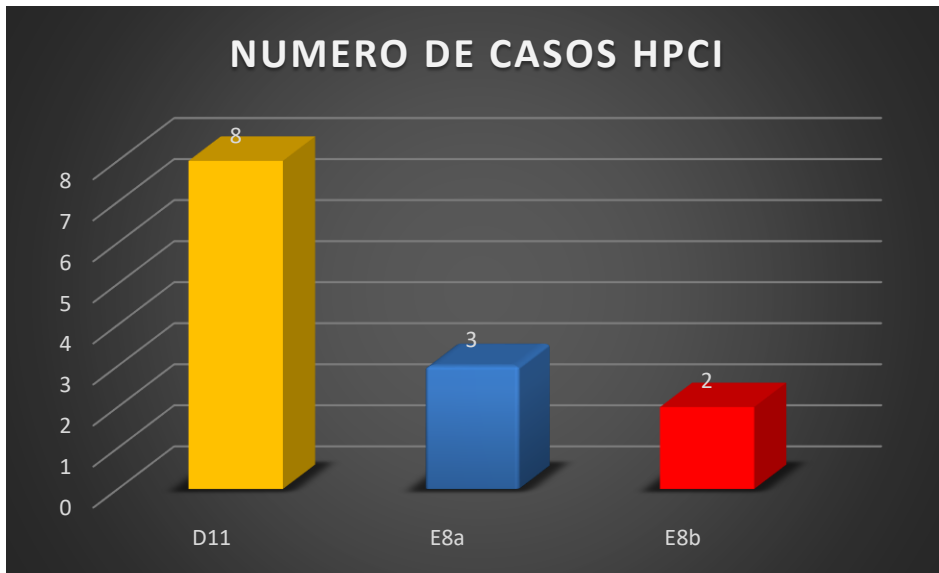
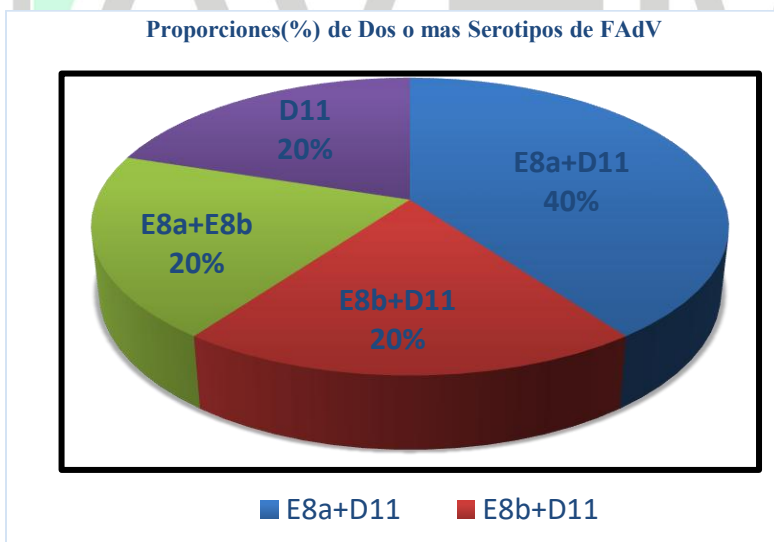


Figura 3. Distribución de Casos de FAdV en Colombia 2025

### 3.3 Patogenicidad Entre Dos o mas Serotipos

Los individuos infectados con FAdV-8b y FAdV-8a presentaron síntomas como depresión, cabeza encogida, plumas erizadas y heces blancas o heces sanguinolentas los síntomas clínicos disminuyeron gradualmente a los 9 dpi y desaparecieron a los 11 dpi. En promedio Los grupos infectados con FAdV-11 presentaron heces blancas, seguidas de una reducción significativa de los pesos promedio y una conversión alta, a la necropsia El hígado presentaba focos necróticos de color amarillo-marrón, fuerte inflamación, así como hemorragia puntiforme (ver Imagen-C). El bazo estaba agrandado y congestionado, En riñones se observó una severa inflamación con una nefritis muy marcada (ver Imagen).

Se reportó proporciones de empresas que presentaron positividad a dos serotipos de FAdV (Ver Imagen 4). Las proporciones de la investigación determinaron que 4 de las 5 empresas testeadas presentaban la positividad a 2 serotipos, **FAdV E8a+D11 (40%), FAdV-E8b+D11 (20%), E8a+E8b (20%)** y solo una con FAdV-D11.



#### 4. Discusión

El FAdV (*Adenovirus aviar*) se ha convertido en una de las enfermedades **Inmunosupresoras y Metabólicas**, especialmente cuando se afecta el hígado (**Metabolismo Energetico-Fosforilacion oxidativa**), Bolsa de Fabricio, timo y bazo; que causan mayor impacto en la industria avícola colombiana en la última década [2,14]. Numerosos estudios de investigación demuestran que las aves se afectan gravemente en su respuesta inmune cuando se infectan con FAdV porque los serotipos de los virus prevalentes son muy complejos debido a su alta variabilidad en los cambios naturales del gen *hexon* que los hace muy diversos [10,18].

En el estudio donde se tomaron 24 casos con 94 impresiones en tarjetas FTA en 3 zonas de Colombia, 13 casos fueron positivos a FAdV. La secuenciación del gen *hexon* de cada muestra testeada fue positiva en una dilución  $1 \times 10^6$ , indicando las altas cargas de las muestras referenciadas como lo reporta Penélope A., *et al* (2009) [10]. El FAdV-D11 fue el más prevalente con un 54.2%, Abdel-Alim G., *et al* (2023) [17] reportó una fuerte disminución en la **correlación respuesta de los linfocitos CD4:CD8**, que condujo a un agotamiento de los folículos linfoides del timo, Bazo y la bolsa de Fabricio con una leve infiltración de heterofilos intrafoliculares entre los días 3-28 post infección que pueden conducir a infecciones secundarias por *Salmonella* spp o *Escherichia coli* spp. Las prevalencias de los serotipos de FAdV-8a y FAdV-8b fueron alrededor del 21.1% que generó en los lotes de pollos evaluados (IBH) hepatitis por cuerpos de inclusión causando una hepatitis necrótica.

Lo relevante de nuestro reporte de investigación fue que el 80% de las empresas reveló la infección por dos serotipos **FAdV-D11+ FAdV-8<sup>a</sup> en un 40%**. Esta asociación es la causante más fuerte de la presentación clínica de hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH), que se caracteriza por fuerte inflamación del hígado, congestión hepática, atrofia de Timo y Bursa con predominio de **Cuerpos de Inclusión Basófilos en hígado** [18].

#### Conclusiones

Los serotipos de FAdV son diversos. Los serotipos menos patógenos suelen ser subclínicos; sin embargo, pueden presentarse signos clínicos tras la estimulación por otros factores, especialmente durante **confecciones entre FAdV-D-11 o FAdV- 8a en 2025 en Colombia fue de 40%** y las tasas de mortalidad pueden aumentar considerablemente. Los pollos infectados presentaron IBH e **Inmunosupresión**. Igualmente se presentaron **confecciones FAdV-D-11 + FAdV- 8b y FAdV- 8b + FAdV- 8a en un 20%**.

#### Declaración de Ética

Los conjuntos de datos presentados en este estudio se encuentran en la base de datos de **Farvet-Perú, Laboratorio de Diagnostico de Biología Molecular**. Los nombres de los repositorios y sus números de acceso se encuentran en el artículo.

AVEM  
Aviespecialistas de México

## Referencias Bibliográficas

- [1] Guan, R., Tian, Y., Han, X., Yang, X., and Wang, H. (2018). Complete genome sequence and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 involved in hydropericardium syndrome in Southwest China. *Microbial Pathogenesis*. 117, 290–298. Doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.012
- [2] Schachner, A., Matos, M., Grafl, B., and Hess, M. (2018). Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for the control—a review on the current global situation. *Avian Pathol. J. W.V.P.A.* 47, 111–126. doi: 10.1080/03079457.2017.1385724
- [3] Ganesh, K., and Raghavan, R. (2000). Hydropericardium hepatitis syndrome of broiler poultry: current status of research. *Research in veterinary science*, 68, 201–206. Doi: 10.1053/rvsc.1999.0365
- [4] Schachner A., Matos, M., Grafl, and Michael Hess.(2017). Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation *AVIAN PATHOLOGY*, 2018VOL. 47, NO. 2, 111–126 <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1385724>
- [5] El-Shall, N. A., El-Hamid, H. S. A., Elkady, M. F., Ellakany, H. F., Elbestawy, A. R., Gado, A. R., et al. (2022). Epidemiology, pathology, prevention, and control strategies of inclusion body hepatitis and hepatitis-hydropericardium syndrome in poultry: a comprehensive review. *Front. Vet. Sci.* 9, 963199. doi: 10.3389/fvets.2022.963199
- [6] Bertran, K., Blanco, A., Antilles, N., Nofrarías, M., Valle, R. M., Cobos, À., et al. (2021). A 10-year retrospective study of inclusion body hepatitis in meat-type chickens in Spain (2011–2021). *Viruses*. 13, 2170. doi: 10.3390/v13112170
- [7] Areayi, Haiyilati, Xiaoqi Li, Shijun J Zheng. (2021) Fowl Adenovirus: Pathogenesis and Control. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 11: 566-589. DOI: 10.26502/ijpaes.202122
- [8] Choi, K. S., Kye, S. J., Kim, J. Y., Jeon, W. J., Lee, E. K., Park, K. Y., et al. (2012). Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea. *Poultry Sci.* 91, 2502–2506. doi: 10.3382/ps.2012-02296
- [9] Arshud Dar, Susantha Gomis, Ian Shirley, George Mutwiri, Robert Brownlie, Andrew Potter, Volker Gerdts, and Suresh K. (2011) Pathotypic and Molecular Characterization of a Fowl Adenovirus Associated with Inclusion Body Hepatitis in Saskatchewan Chickens *AVIAN DISEASES* 56:73–81 DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/9764-041911-Reg.1> URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/9764-041911-Reg.1>
- [10] Li, H., Wang, J., Qiu, L., Han, Z., and Liu, S. (2016a). Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis-hydropericardium syndrome in chickens in China. *Infect. Genet. Evol.* 45, 230–241. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.006
- [11] Mirzazadeh, A., Asasi, K., Mosleh, N., Abbasnia, M., and Abdi Hachesoo, B. (2020). A primary occurrence of inclusion body hepatitis in absence of predisposing agents in commercial broilers in Iran: a case report. *Iranian J. Vet. Res.* 21, 314–318.
- [12] Penélope A. Steer, Naomi C. Kirkpatrick, Denise O'Rourke, and Amir H. Noormohammadi (2009) Classification of Fowl Adenovirus Serotypes by Use of High-Resolution Melting-Curve Analysis of the Hexon Gene Region *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* p. 311–321 0095-1137/09/\$08.00 doi:10.1128/JCM.01567-08.
- [13] Tanimura, N., Nakamura, K., Imai, K., Maeda, M., Gobo, T., Nitta, S., Ishihara, T. & Amano, H. (1993). Necrotizing pancreatitis and gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. *Avian Diseases*, 37, 606–611.
- [14] Yujuan Niu, Qinqin Sun, Yongyong Shi, Yonghe Ding, Zhiqiang Li, Yuanhao Sun, Meihang Li, and Sidang Li.(2019) Immunosuppressive potential of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) *Poultry Science* 98:3514–3522 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez179>.
- [15] Yujuan Niu, Qinqin Sun, Xingpo Liu, and Sidang Li.(2019). Mechanism of fowl adenovirus serotype 4-induced heart damage and formation of pericardial effusion. *Poultry Science* 98:1134–1145. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey485>
- [16] Zhang May, Liangliang Liu, Fangfang Wang, Huixin Li, Jiahui Fan, Jingjing Xie, Yaru Jiao, Zongxi Han, and Deying May (2023). Pathogenicity and innate immune responses induced by fowl adenovirus serotype 8b in specific pathogen-free chicken. *Poultry Science* 102:102846. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102846>.
- [17] Abdel-Alim G, S. M. Aly, M. S. Khattab, A. M. Badawy, M. G. Naguib, T. M. Abdelhamid, H. A. Hussein & E. A. Morsy (2023) Adenovirus type D and type E infection in broiler chickens: the effect on CD4 and CD8 T cell response, cytokines expression and their immunopathology, *British Poultry Science*, 64:6, 688-696, DOI: 10.1080/00071668.2023.2248586
- [18] Steer, P. A., Sandy, J. R., O'Rourke, D., Scott, P. C., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., et al. (2015). Chronological analysis of gross and histological lesions induced by field strains of fowl adenovirus serotypes 1, 8b and 11 in one-day-old chickens. *Avian Pathol. J. W.V.P.A.* 44, 106–113. doi: 10.1080/03079457.2015.1007919

# MEJORAS EN EL RENDIMIENTO DE LOS POLLOS DE ENGORDE Y LA SALUD INTESTINAL DEPENDIENTES DE LA DOSIS CON UNA SOLUCIÓN BIOACTIVA DOBLEMENTE ENCAPSULADA

Muñoz CVM, Ladirat S, Lara HA  
NUQO S.A.S - 28 avenue du Parmelan – 74000 Annecy – France.  
munoz.victor@nuqo.eu

**Palabras clave:** doble encapsulado, fitogénicos, ficogénicos, bioactiva, pollo.

## Resumen

La industria avícola enfrenta una creciente presión para reducir el uso de antibióticos promotores de crecimiento (AGP) mientras se mantiene el rendimiento de los pollos de engorda bajo estrés ambiental y patógenos. Este estudio evaluó los efectos dosis-respuesta de una solución bioactiva de doble encapsulación (NUQO©SAFE - NQ), diseñada para liberación dirigida a lo largo del tracto gastrointestinal, sobre el rendimiento de los pollos de engorda, la calidad de la cama y el contenido de nitrógeno fecal en comparación con un AGP y un control negativo. Un total de 520 pollos de engorde de un día de edad fueron asignados a cuatro tratamientos dietéticos durante 42 días: una dieta basal (NC), la dieta basal suplementada con NQ a 300 o 600 g/t, o la dieta basal suplementada con avilamicina (AGP). Se evaluaron el rendimiento del crecimiento, la consistencia y el nitrógeno fecales. En el día 42, el aumento de los niveles de inclusión de NQ resultó en mejoras lineales en el peso corporal y la tasa de conversión alimenticia en comparación con la NC ( $P < 0,05$ ). Las aves alimentadas con 600 g/t de NQ alcanzaron un rendimiento comparable al del grupo AGP, mientras que la inclusión de 300 g/t mostró respuestas intermedias. La consistencia fecal mejoró en las aves que recibieron 600 g/t de NQ, observándose la mayor proporción de heces normales, mientras que solo se detectaron heces acuosas en el grupo AGP. El contenido de nitrógeno fecal disminuyó linealmente con el aumento de la inclusión de NQ ( $P < 0,05$ ), lo que indica una mejor digestibilidad proteica. En conclusión, la suplementación dietética con la solución de doble encapsulación mejoró, de forma dosis-dependiente, el rendimiento de los pollos de engorde, la digestibilidad proteica y la calidad de la cama, lo que respalda su potencial como alternativa eficaz a los antibióticos promotores del crecimiento.

## Introducción

La producción de pollos de engorda se enfrenta a retos como el cambio climático y la presión de patógenos, lo que impulsa la demanda de soluciones naturales para aumentar la resiliencia de las aves y reducir el uso de antibióticos [1]. Si bien la selección de compuestos bioactivos eficaces es crucial para mejorar el rendimiento y la resiliencia de las aves, es igualmente importante asegurar su liberación dirigida dentro del tracto digestivo para optimizar la dosificación y maximizar la eficacia [2]. Recientemente, se ha desarrollado una solución bioactiva de doble encapsulación. La doble encapsulación permite una liberación secuencial de ingredientes activos a lo largo del tracto digestivo: (1) una capa externa de extractos de plantas y polvo de algas se libera primero en el duodeno y el yeyuno para favorecer la digestión y modular la respuesta inmunitaria, y (2) un núcleo de ácidos encapsulados se libera posteriormente más cerca del ciego, donde ayuda a regular la composición de la microbiota y a reducir las bacterias patógenas. El objetivo de este ensayo fue estudiar la relación dosis-respuesta de esta solución bioactiva de doble encapsulación (NUQO©SAFE) sobre el rendimiento de los pollos de engorde, la calidad de la cama y el contenido de nitrógeno fecal, en comparación con un promotor de crecimiento antibiótico y una dieta control.

## Material y métodos

Se utilizaron 520 pollos de la estirpe Vencobb 430Y de un día de edad (al nacer) en el ensayo, los cuales se asignaron aleatoriamente a cuatro tratamientos dietéticos, con 13 corrales replicados por tratamiento y 10 aves por corral. El experimento se llevó a cabo durante un período de 42 días. Los tratamientos dietéticos consistieron en: (1) una dieta basal utilizada como control negativo (NC); (2) la dieta basal suplementada con NUQO©SAFE a 300 g/t (NQ 300); (3) la dieta basal suplementada con NUQO©SAFE a 600 g/t (NQ 600); y (4) la dieta basal suplementada con Avilamicina a 100 g/t como control positivo (AGP). Todos los pollos de engorda fueron alimentados con una dieta basal a base de harina de maíz y soya formulada para satisfacer o superar los requerimientos nutricionales de las aves. Los parámetros de desempeño

zootécnico se registraron a nivel de corral los días 14, 28 y 42. La puntuación fecal visual se realizó los mismos días utilizando cinco excrementos fecales seleccionados al azar por corral, evaluados durante tres días consecutivos en cada período de muestreo. La consistencia fecal se evaluó mediante una escala de cuatro puntos, donde 4 puntos indicaban heces normales y 1 punto, heces acuosas. Las muestras fecales recolectadas se analizaron posteriormente para determinar el contenido de materia seca y nitrógeno. Todos los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional con el procedimiento PROC GLM en SAS (OnDemand for Academics). Los corrales replicados se consideraron las unidades experimentales para los análisis de rendimiento y de parámetros fecales. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

## Resultados

En el día 42, el aumento de los niveles de inclusión en la dieta de NQ resultó en mejoras lineales en el peso corporal (PC) y la tasa de conversión alimenticia (ICA) en comparación con el control negativo ( $P < 0,05$ ). Las aves que recibieron NQ a 300 mg/kg mostraron un rendimiento menor que las alimentadas con NQ a 600 mg/kg, mientras que el rendimiento del grupo NQ 600 fue comparable al del control AGP ( $P < 0,05$ ). La puntuación fecal respaldó aún más estos hallazgos, ya que las aves alimentadas con NQ 600 exhibieron la mayor proporción de heces normales (Puntuación 4) entre todos los tratamientos. Por el contrario, el control AGP fue el único tratamiento en el que se observaron heces acuosas (Puntuación 1). El contenido de nitrógeno fecal disminuyó linealmente con el aumento de las dosis de NQ ( $P < 0,05$ ).

## Discusión

Los presentes resultados demuestran un efecto dosis-dependiente de la suplementación con NQ sobre el rendimiento de los pollos de engorda y los parámetros de salud intestinal. Las mejoras lineales en el peso corporal y el índice de conversión (IC) observadas al día 42 con el aumento de la inclusión de NQ sugieren una mejor utilización de los nutrientes, ya que la dosis de 600 mg/kg logró un rendimiento comparable al del grupo control con AGP. El rendimiento inferior con 300 mg/kg indica que niveles más bajos de inclusión podrían ser insuficientes para obtener plenamente los efectos promotores del crecimiento del NQ. Las mejoras en la consistencia fecal, en particular la mayor proporción de heces normales en las aves alimentadas con NQ a 600 mg/kg, respaldan aún más el impacto positivo del NQ en la función intestinal. Por el contrario, la presencia de heces acuosas exclusivamente en el grupo control con AGP sugiere que, si bien los antibióticos promotores del crecimiento pueden mejorar el rendimiento, también pueden alterar el equilibrio microbiano y contribuir a la disbiosis [3]. La reducción lineal del nitrógeno fecal con el aumento de los niveles de NQ indica una mejor digestibilidad de las proteínas, lo que probablemente contribuyó a las mejoras observadas en el IC y la calidad de la cama.

## Conclusión

El aumento de dosis de la solución de NQ doblemente encapsulada mejoró linealmente el rendimiento de los pollos de engorde, la digestibilidad de las proteínas y la calidad de la cama. En conjunto, estos hallazgos sugieren que esta solución es una estrategia prometedora para mantener el rendimiento de la parvada y, al mismo tiempo, reducir la dependencia de los antibióticos promotores del crecimiento. Se requieren más investigaciones para dilucidar mejor los mecanismos de acción de la solución.

## Referencias

- Rahman MRT, Fliss I, Biron E. Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production. *Antibiotics* (Basel). (2022) 11:766. doi: 10.3390/antibiotics11060766
- Abdelli, N., J. F. Pérez, E. Vilarrasa, I. Cabeza Luna, D. Melo-Duran, M. D'Angelo, and D. Solà-Oriol. 2020. Targeted-release organic acids and essential oils improve performance and digestive function in broilers under a necrotic enteritis challenge. *Animals* (Basel). 10:259. doi:10.3390/ani10020259
- Kalia VC, Shim WY, Patel SKS, Gong C, Lee JK. Recent developments in antimicrobial growth promoters in chicken health: Opportunities and challenges. *Sci Total Environ.* (2022) 834:155300. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155300

## RELACIÓN DE LAS INSTALACIONES TRADICIONALES Y EL AMBIENTE EN LA ALIMENTACIÓN DE GALLINAS DE POSTURA

Everton Luis Krabbe – Eng Agr, D.Sc., Nutrologo – Embrapa Suinos e Aves – Brazil.

La nutrición de gallinas ponedoras es uno de los aspectos más estudiados y comprendidos de la producción avícola moderna. Los requerimientos nutricionales para sostener la producción de huevos, mantener la calidad de la cáscara, preservar la salud intestinal y garantizar la longevidad productiva de las aves están bien establecidos por la ciencia. Sin embargo, una parte significativa de estos requerimientos no está directamente asociada a la producción de huevos, sino al mantenimiento de las funciones orgánicas básicas del metabolismo.

El metabolismo de las gallinas está profundamente influenciado por el ambiente en el que viven. Factores como la temperatura, la humedad relativa del aire, la velocidad del viento, la ventilación, la calidad del aire, la radiación térmica y la altitud afectan directamente el consumo de alimento, el gasto energético de mantenimiento y, en consecuencia, la eficiencia nutricional. Por ello, la relación entre las instalaciones tradicionales, el ambiente interno de los galpones y la nutrición de las aves debe ser comprendida de manera integrada.

En condiciones ambientales ideales, las gallinas destinan una mayor proporción de los nutrientes consumidos a la producción de huevos. Sin embargo, cuando el ambiente se aleja de la zona de confort térmico, el ave necesita movilizar más energía para mantener su homeotermia. Esto implica un aumento de los requerimientos de mantenimiento y una reducción de la eficiencia productiva. Así, una fracción del alimento que podría convertirse en huevo pasa a ser utilizada para sostener funciones vitales.

La temperatura ambiental es uno de los factores más críticos. En ambientes cálidos, las aves reducen el consumo de alimento para disminuir la producción de calor metabólico. Como resultado, disminuye la ingesta de nutrientes esenciales como calcio, fósforo, aminoácidos y energía, afectando la producción y la calidad de la cáscara. En ambientes fríos, ocurre el fenómeno inverso: el consumo aumenta, pero gran parte de la energía es desviada para mantener la temperatura corporal, elevando el costo alimenticio sin un retorno proporcional en producción.

La humedad relativa del aire también ejerce un papel relevante. Altos niveles de humedad dificultan la disipación del calor corporal por evaporación, agravando el estrés térmico. Por otro lado, ambientes excesivamente secos favorecen la formación de polvo, impactando negativamente la calidad del aire y la salud respiratoria de las aves. La calidad del aire, influenciada por la ventilación y el manejo de deyecciones, afecta directamente el bienestar y la inmunocompetencia.

La altitud, frecuentemente subestimada, modifica la disponibilidad de oxígeno y puede influir en el metabolismo basal y en la eficiencia respiratoria. En regiones de mayor altitud, las aves pueden presentar ajustes fisiológicos que impactan su desempeño productivo y su utilización de nutrientes.

Históricamente, muchas instalaciones avícolas fueron diseñadas bajo criterios estructurales y económicos, sin una comprensión profunda de la interacción entre ambiente y nutrición. Galpones abiertos, con ventilación natural y escaso control ambiental, aún son comunes en diversas regiones productoras. Si bien estos sistemas pueden ser funcionales, exponen a las aves a variaciones ambientales significativas, lo que incrementa el gasto energético de mantenimiento y reduce la eficiencia del alimento.

Este escenario tiene implicaciones directas en el costo de producción. Cuando el ambiente no es adecuado, el productor necesita formular dietas más densas, incrementar el uso de aditivos o aceptar pérdidas productivas. En todos los casos, el impacto económico es evidente.

A partir del entendimiento de esta relación entre ambiente, metabolismo y nutrición, nuevas tecnologías constructivas han sido propuestas y ya se encuentran en implementación. Estas tecnologías buscan proporcionar un mayor control del microclima interno de los galpones, reduciendo la variabilidad ambiental y favoreciendo la zona de confort térmico de las aves.

Entre estas innovaciones se destacan los galpones climatizados con ventilación túnel, sistemas de enfriamiento evaporativo, control automatizado de ventiladores y cortinas, aislamiento térmico en techos y paredes, uso de materiales reflectivos, manejo optimizado de la densidad de alojamiento y sistemas de monitoreo ambiental en tiempo real. Estas herramientas permiten ajustar de forma precisa las condiciones internas del galpón a las necesidades fisiológicas de las gallinas.

El propósito de estas tecnologías no es únicamente mejorar el confort, sino también optimizar el uso de los nutrientes ingeridos. En un ambiente estable, las aves presentan menor estrés, mejor consumo de alimento, mayor eficiencia alimenticia y una respuesta inmunológica más robusta. Aves menos estresadas son aves más inmunocompetentes, más productivas y más longevas.

La reducción del estrés térmico también se traduce en una mejor calidad del huevo. Se observa una mejora en la uniformidad del tamaño, en la resistencia de la cáscara y en la calidad interna del huevo. Además, la longevidad productiva se incrementa, permitiendo ciclos de postura más extensos y rentables.

Desde el punto de vista del bienestar animal, estas tecnologías representan un avance significativo. El control ambiental reduce la incidencia de comportamientos anormales, disminuye la mortalidad y favorece un estado fisiológico más equilibrado. El bienestar no solo es un requisito ético y regulatorio creciente, sino también un factor productivo clave.

En este contexto, la nutrición ya no puede ser considerada de forma aislada. La formulación de dietas debe contemplar las condiciones ambientales en las que las aves están alojadas. De igual forma, el diseño de las instalaciones debe considerar los requerimientos nutricionales y fisiológicos de las gallinas.

Uno de los principales desafíos que enfrenta la avicultura moderna de producción de huevos es el manejo del estiércol, especialmente cuando se asocia con una alta excreción de agua. Por lo tanto, es fundamental contar con un buen ambiente y ajustes nutricionales, ya que inciden directamente en el consumo y la excreción de agua.

En conclusión, aunque los requerimientos nutricionales de las gallinas ponedoras están bien definidos, su expresión productiva depende en gran medida del ambiente en el que viven. Las instalaciones tradicionales, con bajo control ambiental, pueden comprometer la eficiencia del uso de los nutrientes y elevar los costos de producción. Las nuevas tecnologías constructivas permiten mejorar el microclima, favorecer el bienestar de las aves y optimizar la conversión del alimento en huevos. La integración entre nutrición, ambiente e infraestructura es, por lo tanto, un pilar fundamental para la producción avícola moderna, sostenible y económicamente viable.



AVEM  
Aviespecialistas de México

## NUTRICIÓN DE PRECISIÓN PARA GALLINAS PONEDORAS

Fernando Guilherme Perazzo Costa, Adiel Vieira de Lima, Apolônio Gomes Ribeiro

Universidad Federal de Paraíba (UFPB)

perazzo63@gmail.com

### Resumen

La nutrición de precisión se ha consolidado como uno de los pilares de la avicultura moderna, especialmente en la producción de gallinas ponedoras, al responder de manera simultánea a los desafíos de sostenibilidad, eficiencia productiva, longevidad de los planteles y bienestar animal. En contraste con los sistemas nutricionales convencionales, basados en dietas únicas formuladas a partir de valores medios de requerimientos, la nutrición de precisión propone el ajuste dinámico del suministro de nutrientes a las reales demandas fisiológicas de las aves, considerando variaciones a lo largo del ciclo productivo, del día, del ambiente e incluso entre individuos dentro de un mismo lote. La fisiología de la formación del huevo impone una elevada y continua demanda metabólica, particularmente de nutrientes como energía, aminoácidos, calcio y fósforo. Mientras que la síntesis del albúmen ocurre mayoritariamente durante el período diurno, la deposición de la cáscara se produce predominantemente durante la noche, fase en la que el consumo voluntario de alimento es reducido. Este desajuste entre la ingestión alimentaria y la exigencia metabólica evidencia la necesidad de estrategias nutricionales más refinadas. En este contexto, enfoques como el *split feeding*, el uso estratégico de fuentes de calcio con diferentes solubilidades, la modulación del balance electrolítico y el ajuste fino de aminoácidos digestibles representan ejemplos prácticos de nutrición de precisión aplicados a gallinas ponedoras. Otras estrategias ampliamente asociadas a la nutrición de precisión incluyen la utilización de enzimas exógenas, como las fitasas en dosis ajustadas o elevado, que mejoran el aprovechamiento del fósforo y del calcio, reducen la excreción de minerales y contribuyen a la salud ósea y a la calidad de la cáscara de los huevos. La adopción de programas nutricionales faseados, aliados al monitoreo continuo del desempeño productivo, del consumo de alimento y de la calidad de los huevos, permite realizar ajustes más precisos en las formulaciones, evitando excesos o deficiencias nutricionales. El avance de herramientas de monitoreo zootécnico, análisis rápidos de ingredientes, modelización nutricional y sistemas de automatización ha ampliado significativamente la capacidad de aplicación práctica de la nutrición de precisión. Estos recursos posibilitan una mayor eficiencia alimentaria, la reducción de los costos de producción y un menor impacto ambiental, especialmente mediante la disminución de la excreción de nitrógeno y fósforo al ambiente. Además de los beneficios productivos y económicos, la nutrición de precisión desempeña un papel fundamental en la preservación de la integridad ósea de las gallinas ponedoras a lo largo de ciclos productivos prolongados, al reducir la movilización excesiva de minerales del esqueleto y la incidencia de trastornos locomotores. De este modo, este enfoque nutricional contribuye al mantenimiento de la calidad de los huevos en edades avanzadas, al mismo tiempo que promueve sistemas de producción más sostenibles, eficientes y alineados con las exigencias actuales de la avicultura de postura.

AVEM  
Aviespecialistas de México

## ALIMENTACIÓN DIVIDIDA (*SPLIT FEEDING*) PARA GALLINAS PONEDORAS

Fernando Guilherme Perazzo Costa, Adiel Vieira de Lima, Apolônio Gomes Ribeiro  
Universidad Federal de Paraíba (UFPB)  
perazzo63@gmail.com

### Resumen

La alimentación de las gallinas ponedoras es uno de los principales factores que determinan la productividad, la calidad de los huevos y la sostenibilidad de los sistemas de producción. Tradicionalmente, las aves reciben una única dieta a lo largo de todo el día; sin embargo, esta práctica no siempre satisface de manera eficiente los requerimientos nutricionales de las ponedoras, los cuales varían de acuerdo con el ritmo fisiológico del ciclo de formación del huevo. La formación del albúmen ocurre principalmente durante el período diurno, mientras que la deposición de la cáscara se produce mayoritariamente durante la noche, cuando la demanda de calcio es significativamente mayor. En este contexto, el *split feeding* surge como una estrategia nutricional basada en el suministro de dietas con diferentes composiciones a lo largo del día, ajustando el aporte de nutrientes a las reales necesidades metabólicas de las aves. De manera general, esta estrategia consiste en ofrecer una dieta con mayor contenido de energía y proteína y menor concentración de calcio durante la mañana, seguida de una dieta con menor densidad energética y proteica, pero más rica en calcio, durante la tarde o al inicio de la noche. Este manejo permite una mejor sincronización entre el consumo de nutrientes y las etapas del desarrollo del huevo. La adopción del *split feeding* contribuye a un uso más eficiente de los nutrientes, reduciendo desperdicios y evitando excesos, especialmente de calcio, en períodos en los que su demanda es menor. Además, esta estrategia favorece la mejora de la calidad de la cáscara de los huevos, particularmente en gallinas en fases más avanzadas del ciclo productivo, cuando la resistencia de la cáscara tiende a disminuir. Otro aspecto relevante es la posibilidad de reducir la excreción de nutrientes, como nitrógeno y fósforo, lo que representa un avance significativo en términos de sostenibilidad ambiental de la producción avícola. Por lo tanto, el *split feeding* representa una alternativa prometedora al manejo alimentario convencional, ya que combina mejoras en el desempeño productivo y en la calidad de los huevos con la optimización del uso de nutrientes y la reducción de los impactos ambientales, configurándose como una estrategia alineada con las demandas actuales de la avicultura moderna.



# ACTUALIZACIÓN SOBRE EL IMPACTO DE LOS MACROMINERALES EN EL DESEMPEÑO DE LAS AVES

Roberto Téllez

## 1. Definición

En nutrición animal se entiende como macrominerales, aquellos cuyo requerimiento es mayor que 250 mg por kg de alimento balanceado y su concentración en el organismo es 0.4 – 15 g por kg de masa corporal. Son vitales para las aves y deben ser suministrados a través del alimento, evitando falta o exceso de estos. A diferencia de los minerales traza, el requerimiento se expresa en % de la dieta o en g/ton. Los macrominerales considerados en nutrición avícola son Calcio (40), Fósforo (31), Sodio (23), Cloro (35.5), Potasio (39.1), Magnesio (24) y Azufre (32). Los valores entre paréntesis indican el peso molecular del elemento correspondiente. En pollo se observan concentraciones de Ca de 1,5%, P 0.8%, K 0.2%, Na 0.12%, Cl 0.06%, Mg 0.04% y S 0.15%, ya sea en esqueleto o como iones libres. Ni el nivel de requerimiento ni la concentración en el organismo hacen a un mineral más o menos importante que el otro.

En el análisis proximal o de Weende los minerales se encuentran en las cenizas, que son el residuo inorgánico después de la incineración de una muestra de alimento o ingrediente a 550 grados C durante 6 horas. Las cenizas contienen los elementos como óxidos y no contienen azufre, por lo que las cenizas son el resultado de la suma de los compuestos minerales formados después de la incineración. Las cenizas verdaderas, donde se encuentran los minerales arriba mencionados, se obtienen mediante cocción con ácido clorhídrico para eliminar los componentes insolubles (silicatos).

De los macrominerales cuatro son metales (Na, K, Ca, Mg) y tres no metales (Cl, P, S).

Cationes: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

Aniones: Cl<sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

El contenido promedio de macrominerales en el organismo completo, plasma sanguíneo y su proporción en esqueleto se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Contenido promedio de macrominerales en el organismo completo, plasma sanguíneo y su proporción en esqueleto

	g/100 g MLG	Plasma sang. mg/100 ml	Proporción en esqueleto (%)	% en cenizas de hueso
Calcio	1-2	9-12	99	36
Fósforo	0.7-1	4-9	80	17
Magnesio	0.04-0.05	2-3	65	0.8
Sodio	0.1-0.15	330	40	0.8
Potasio	0.2-0.3	20	<10	
Cloro	0.1-0.15	370		
Azufre	0.15			

S contenido principalmente en plumas, músculo, SAA  
MLG = Masa libre de grasa

## 2. Metabolismo

Como comenté arriba, los macrominerales esenciales deben ser y suplementados y consumidos con el alimento de forma óptima. Una parte es absorbida en el tracto digestivo y otra excretada en heces. La cantidad absorbida es incorporada en los distintos compartimentos corporales (Sangre y líquidos extracelulares, tejidos blandos y esqueleto), también es utilizada para la síntesis de sustancias.

Una parte endógena es eliminada a través del tracto intestinal (heces) y en orina.

De esta manera tenemos los tres procesos metabólicos: absorción, retención y excreción.

Existe un proceso de homeostasis para el mantenimiento de un estado de equilibrio (Nivel constante en sangre) mediante mecanismos de regulación o control de los procesos metabólicos, de tal manera que bajo situaciones de un aprovisionamiento deficiente o en exceso, al principio no se observan síntomas y con frecuencia pasan desapercibidos.

Dicha regulación se realiza principalmente a través del esqueleto (Ca, P) y a través de los riñones (Na, K, Cl).

No obstante, existen desviaciones del contenido de minerales en suero sanguíneo que son debidas principalmente a daños nutricionales o enfermedades.

En la regulación (PTH) del nivel de Ca intervienen la calcitonina de la glándula tiroides, la parathormona de la glándula paratiroides y la vitamina D-hormona.

En mantener el nivel de  $PO_4$  se involucran la hormona del crecimiento que lo aumentan y los estrógenos que lo disminuyen.

La PTH moviliza fosfato del hueso e incrementa la excreción renal.

Na, K y Cl: Los niveles son regulados a través del riñón por las hormonas de la corteza suprarrenal, así como por la hormona antidiurética (ADH) y otras.

La absorción de los minerales se realiza principalmente en el intestino delgado y depende del tipo de unión química del elemento en el alimento, interacciones con otros componentes del alimento y factores relacionados con el animal.

Elevados niveles de por ejemplo grasa, afectan la absorción del Ca (formación de jabones de Ca que son insolubles).

La absorción depende también del estado fisiológico del ave y del suministro de minerales

Con alto suministro se reduce la absorción y con bajo aumenta.

El fósforo se absorbe prácticamente solo en forma de ortofosfato. Por lo tanto, realmente se trata de una absorción de  $PO_4^{3-}$

Inhiben la absorción de P una amplia relación de Ca y Mg con respecto a P en el tracto digestivo, la presencia de P-fítico, así como un elevado suministro de Fe.

Na y Cl se encuentran principalmente en el espacio extracelular; K intracelular. Estos tres elementos sirven para mantener la presión osmótica, siempre en forma monovalente como iones libres (electrolitos). El Cl es cofactor de la  $\alpha$ -amilasa pancreática y parte del HCl. Se absorben casi completamente. El intercambio a través de la pared intestinal es rápida y simple. Existe reabsorción en la parte distal del intestino grueso.

Al contrario de los elementos polivalentes, no forma complejos con componentes orgánicos del alimento. La excreción principal es vía renal, que es un proceso regulado por hormonas suprarrenales.

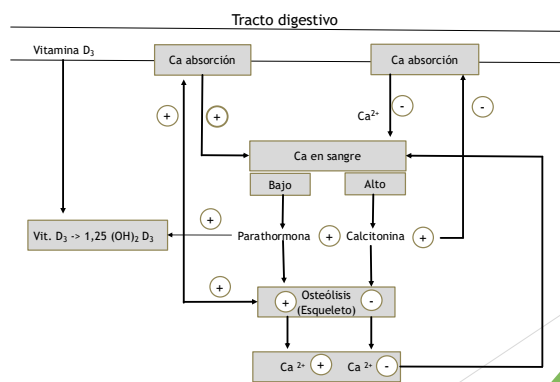
Algunos aspectos prácticos sobre cada uno de los elementos se presentan a continuación:

## Calcio

La mayor parte del calcio del alimento en aves en crecimiento es utilizada para la formación ósea como cristales de hidroxapatita,  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ . La resistencia y soporte de una alta carga mecánica del esqueleto dependen del grado de mineralización del mismo.

El exceso de Ca en el alimento de aves en crecimiento causa nefrosis y deposición visceral de uratos. En pollos > 5 semanas 1.1% de Ca ocasiona depresión del crecimiento. Elevados niveles de grasa (esp. AG saturados) en alimento, afectan la absorción de Ca y viceversa. Bajos niveles de P en el alimento exacerban los efectos por exceso de Ca.

Homeostasis del calcio (+ efecto aumentado - efecto reducido)



La PTH estimula en los riñones la conversión de la ya formado en el hígado vitamina D<sub>3</sub> mono hidroxilada (25 OH D<sub>3</sub>) a la vitamina D<sub>3</sub> di hidroxilada (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>).

Este último compuesto también denominado Vitamina D-Hormona (Calcitriol), fomenta el transporte activo del Ca<sup>2+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> a través de la pared intestinal, así como la acumulación de Ca y P en huesos. Un suministro adecuado de vitamina D<sub>3</sub> puede ajustar la absorción de Ca de acuerdo con su requerimiento.

También fomentan la absorción de Ca bajas cantidades de grasa en el alimento, así como también una deficiencia de Ca. Por otro lado, inhiben la absorción de Ca un elevado contenido de proteína y un exceso de P.

La calcitonina fomenta la mineralización de huesos y actúa reduciendo el nivel de Ca en sangre. La parathormona estimula todos los procesos que elevan el nivel de Ca en sangre como son la liberación de Ca de los huesos, así como la absorción del tracto digestivo mediante activación de la vitamina D<sub>3</sub>.

Una deficiencia de Ca y P se manifiesta como raquitismo que puede conducir a malformaciones óseas en la fase de crecimiento.

Relación Ca: P no fítico => 2:1

Es común utilizar carbonato de calcio como vehículo o excipiente en múltiples diluciones, por lo que es importante este aporte de Ca y considerarlo en la formulación.

Revisar valores de matriz en fitasas.

Fitasa: Contribución de Ca, P, Na y MT (1,000 FTU) en pollo de engorda

Contribución		
Fósforo digestible	1.65	kg/ton
Calcio	2.06	kg/ton
Sodio*	436	g/ton
Manganeso	10	ppm
Zinc	24	ppm
Hierro	33	ppm
Cobre	13	ppm

\*Equivalente a 1.09 kg de sal común

Confirmar posible inactivación de la fitasa por altas temperaturas durante el peletizado.

## Fósforo

Se encuentra en el organismo solo en forma de compuestos del ácido orto fosfórico (ácidos nucleicos, fosfoproteínas, fosfolípidos, ATP, etc.).

Es un importante amortiguador en sangre en forma PO<sub>4</sub>.

Elevados niveles de hierro afectan la absorción del fósforo, ya que el Fe se une al ácido fosfórico y forma fosfatos insolubles.

## Sodio

El contenido de sodio del alimento proviene principalmente de compuestos minerales: Sal común (>95% NaCl), bicarbonato de sodio, sesquicarbonato de sodio, etc.

Es recomendable revisar el contenido de Na en ingredientes de origen animal ya que puede ser elevado y variable.

Desde mi punto de vista es importante tomar en cuenta los valores de matriz en fitasas

Ejemplo: Fitasa comercial 1,000 FTU/kg = 33.33 ppm

% de sodio en matriz: 1,321%; sodio equivalente en el alimento = 440 g/ton que corresponde a 1.1 kg de sal común por tonelada.

Considerar en la base de datos nutricional sodio total, sodio analizable y sodio equivalente aportado por la fitasa.

Otras aportaciones de minerales por tonelada de alimento balanceado son: 10 g de Mn, 24 g Zn, 33 g Fe, 13 g Cu.

Otras fuentes potenciales de sodio son:

Sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) como mínimo 32% sodio y 22% azufre y es una fuente de sodio libre de cloro. Como fuente de azufre teóricamente podría ahorrar metionina en alimentos para aves deficientes en este elemento.

Propionato de sodio (23.4% Na)

Fosfato disódico, anhidro (32.3% Na), 2, 7 o 12  $\text{H}_2\text{O}$  con 25.8, 17.2 o 12.8% de Na, soluble en agua, excelente biodisponibilidad y es un compuesto libre de calcio.

Exceso de sodio ocasiona:

Sed excesiva, ascitis, hidro pericardio, hipertrofia ventricular derecha, falla ventricular derecha, heces acuosas (camas húmedas).

Cloro

El requerimiento mínimo para ganancia de peso es 0.13%. Estrés por calor ocasiona acidosis metabólica que resulta en hipocloremia. La sal común es más nociva en el agua de bebida que en el alimento.

La relación cloro: sodio para comportamiento óptimo debe ser 1:1.

De hecho, en gallinas ponedoras el nivel de Cl no debe rebasar el nivel de Na, caso contrario se afecta la estabilidad de la cascara del huevo.

La fuente u origen del cloro en la dieta son sal común, sal común en algunas diluciones, así como también L-Lisina HCl (19.7% Cl), cloruro de colina (15.2% Cl en CC60%), Betaina HCl sintética (22.5% Cl).

Se puede observar pollo tirado de lado con concentraciones de Cl < 0.1%.

Ascitis => Elevados niveles de NaCl

Exceso de cloro: arriba de 2 g/kg de alimento balanceado => Acidosis metabólica

Deficiencia o exceso de sal común => Canibalismo.

Potasio

Nivel adecuado en la dieta: 0.35-0.60. Niveles elevados de K aumentan la incidencia de ascitis (>0.99%). El requerimiento aumenta en época de calor. Raro observar deficiencias, ya que el alimento balanceado comúnmente contiene niveles adecuados.

Los alimentos para pollo comúnmente contienen más K del necesario. Exceso de potasio reducen la absorción de Mg. El contenido de K del alimento proviene prácticamente de los ingredientes. La pasta de soya (2,2%), canola (1.5%), melaza (2.88%), cloruro de potasio (50%) y la harina de pescado (0.3%).

Magnesio

Como vimos, una parte del Mg se encuentra en el esqueleto y es activador o componente de más de 300 enzimas.

El contenido necesario de Mg en alimentos para aves varía de 0.03-0.06%, sin embargo, raciones normalmente balanceadas contienen entre 0.1 y 0.2% por lo que difícilmente podemos esperar una deficiencia.

Exceso de Mg en el alimento afecta la tasa de ganancia en pollo de engorda. Causa una reducción del tamaño del huevo y se asocia con cáscara delgada y diarrea. El límite máximo en alimento para pollo es de 0.4%. Sin embargo, regularmente no observamos exceso de Mg bajo condiciones prácticas.

Azufre

A diferencia del resto de los macrominerales el azufre no se encuentra en forma iónica en el organismo. Los compuestos de S orgánico en forma de thio-aminoácidos (plumas) o vitaminas (tiamina y biotina) son nutrientes esenciales para las aves.

Además del S orgánico podemos encontrar sulfatos en los fluidos corporales en forma de aniones. Sulfato inorgánico se puede convertir de cualquier órgano, según se requiera, en la forma activa y ser incorporado en compuestos con esteres de sulfato.

El azufre es componente de la insulina, Coenzima A, PTH, etc. Para la síntesis de dichas sustancias se utilizan en parte metionina y cisteína.

El requerimiento de azufre en aves y mamíferos es de 0.1-0.2%. Exceso de azufre ocasiona además de bajo desempeño, camas húmedas. Efectos negativos en el comportamiento productivo con valores >0.35% y afecta la mineralización ósea en pollos de 3 semanas.

En el caso del azufre debiéramos tener en nuestra base de datos para la formulación S-orgánico e inorgánico y evitar excesos de este último.

El contenido de sulfatos en el agua de bebida debe ser < 250 ppm.

### Balance electrolítico (BE)

No solamente los contenidos absolutos de Na, K y Cl son de importancia, sino también la relación entre aniones y cationes, siendo estos los más relevantes.

Un DEB apropiado es necesario para el crecimiento, desarrollo óseo (calidad de la cascara de huevo) y utilización de aminoácidos. Los electrolitos son macrominerales que se encuentran en forma iónica en el organismo.

La fórmula más simple y comúnmente utilizada es  $BE = Na + K - Cl$  y el rango óptimo en pollo de engorda es de 200 – 250 mEq/kg de alimento siendo valores extremos < 150 >300 mEq/kg.

¿Cómo se calcula?

$$mEq = PM \text{ (g/kg)} \div 1,000 = mg/kg$$

$$PM: Na = 23.0, K = 39.1, Cl = 35.5$$

Por cada 0.1% (1,000 mg/kg) de Na, K y Cl

$$Na = 43.5; K = 25.6 \text{ y } Cl = 28.2 \text{ mEq/kg}$$

Ejemplo: Alimento con Na 0.17%, K 0.80%, Cl 0.21

$$74.0 + 204.8 - 59.2 = 219.6 \text{ mEq/kg}$$

Dietas ricas en aniones, especialmente Cl, causan acidosis metabólica, que afecta el metabolismo del calcio (TD). Exceso de Ca y al mismo tiempo deficiencia de P en el alimento ocasiona orina alcalina lo cual aumenta el riesgo de urolitiasis. Elevados niveles de electrolitos incrementan el consumo de agua y producen heces acuosas y por ende camas húmedas. Exceso de bicarbonato de sodio en el alimento promueve la deposición visceral de uratos.

### Requerimientos de macrominerales en pollo de engorda

Respecto al suministro de minerales podemos diferenciar deficiencia, nivel subóptimo, óptimo, subtóxico y tóxico. Síntomas clínicos pueden ser evidentes solo en un estado de deficiencia o toxicidad. Una deficiencia de desarrolla con frecuencia lentamente y no de manera uniforme.

#### Requerimientos de macrominerales en pollo de engorda (%)

Mineral	Recom. propia	NRC, 1994	Ross	Cobb	Hubbard
Fosforo	dP 0.46-0.30	NPP 0.45->0.30	aP 0.50-0.34	aP 0.58->0.34	aP 0.48-0.36
Calcio	0.9->>0.6	1.0->>0.8	0.96->>0.60	0.96->>0.68	0.98->0.73
Sodio	0.15->>0.14	0.2->>0.12	0.18-0.23	0.16-0.23	Mín. 0.16-0.15
Cloro	0.15->>0.14	0.2->>0.12	0.18-0.23	0.16-0.30	Mín. 0.16
Potasio	Mín. 0.60	0.30	0.60-0.90	0.60-0.95	
Magnesio	0.05	0.06	0.05-0.30		
Azufre	El suministro de S en aves es principalmente en forma de M+C; cuidar exceso				

A continuación, se presenta nuestra recomendación de los valores máximos de macrominerales en alimentos para pollo de engorda.

### Niveles máximos de macrominerales en alimentos para pollo de engorda

Mineral	Iniciación	CreCIMIENTO	Final 1	Final 2
Calcio	1.0	0.8	0.70	0.6
Sodio	0.2	0.2	0.2	0.2
Cloro	0.2	0.2	0.2	0.2
Potasio	0.9	0.9	0.85	0.8
Magnesio	0.4	0.4	0.4	0.4
Azufre	0.35	0.35	0.35	0.35

### Contenido de macrominerales en algunos ingredientes

#### Contenido de macrominerales en algunos ingredientes Valores orientativos (%)

Ingrediente	Ca	P	Mg	K	S	Na	Cl
Maíz amarillo	0.01	0.25	0.09	0.30	0.11	0.01	0.06
Pasta de soya	0.26	0.65	0.27	2.20	0.37	0.03	0.05
Harina de carne 50%	10.30	4.60	0.21	0.46	0.45	0.87	0.65
DDGS, maíz	0.04	0.79	0.31	1.32	0.65	0.24	0.16
Sulfato de L-Lisina 62.4					6.60		
Canola	0.70	1.03	0.39	1.22	0.70	0.02	0.04
Bicarbonato de sodio						27.00	
Sal común						38.75	59.75
L-Lisina HCl 98.5%							19.70
Cloruro de Colina 60%							15.20
Sulfato de cobre 25% Cu					12.70		

### Contenido de S en los aminoácidos azufrados

Aminoácido	Formula cond.	PM	S	
Metionina (Met)	$C_5H_{11}NO_2S$	149.21	21.5	%
Cisteína (Cys)	$C_3H_7NO_2S$	121.16	26.5	%
Cistina (Cys-Cys)	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	240.30	26.7	%

PM del Azufre: 32.07

### Algunas enfermedades relacionadas con macrominerales en aves

Como posible causa de ascitis se discuten niveles elevados de NaCl; canibalismo por falta o exceso de NaCl. Problemas en patas y deformaciones óseas

- Estatus ácido-base inadecuado
- Falta de Ca y P
- inactivación de fitasa

Excesos de Na, Cl y K ocasiona camas húmedas (> 35% de humedad) y finalmente inflamación del cojinete plantar (FPD)  
Pollos tirados: Cl < 0.1% p. ej. por mantener el Cl bajo, posible sobredosificación o falta de homogenización de ionóforos.

>0.2% Cl acidosis metabólica

### Camas húmedas

Exceso de nutrientes que son excretados vía renal Na, Cl, Mg, K, N.

Debido a posibles efectos aditivos los siguientes contenidos en el alimento balanceado no deben excederse: Na 0.15%, K 0.8%, Cl 0.15%, Mg 0.2%

Grasa cruda < 8%; Sacarosa < 5%; Lactosa <2%

Substancias laxantes como sulfatos.

Otras posibles causas son: Micotoxinas (p. ej. Ocratoxina) -> alteraciones de la función renal, *coccidiosis*, *E. coli*, *Clostridium*, BI, Gu, material para la cama inadecuado o insuficiente, elevada densidad, pánico, fugas de agua, agua con elevado contenido de sulfatos.

Calidad del agua para aves mg/L

	Valores orient.
Cloruro	150
Sodio	150
Potasio	250
Magnesio	125
Sulfato	200
Hierro	0.3
SDT	1,000-3,000*

\*Sería satisfactoria para todas las clases de aves. Podría causar heces acuosas (esp. en los niveles más elevados), pero no debería afectar la salud ni el comportamiento (NRC,1994)

Aviespecialistas de México