Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología

Informe Escrito final

Determinación y caracterización de los efectos de las micotoxinas en la cadena productiva avícola: elaboración de alimentos balanceados y utilización en granja de engorde.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biotecnología

B.Sc. Kimberlyn Villavicencio Monge

Campus Omar Dengo
Heredia, 2021

Agradecimientos

Mi gratitud a Dios, quien con su bendición completa mi vida. A mi familia quienes son mi motor, mi mayor inspiración, mi madre la mujer más fuerte y determinada que conozco. Mi padre quien decidió adoptarme como su hija dándome todo su amor a través de los años. A mis hermanos por ayudar a trazar mi camino, por siempre estar disponibles para mí a cualquier hora y lugar en donde me encuentre, a mis sobrinos, mis cuñados, mi familia, son mi luz, mi todo.

A la Corporación Multiinversiones (CMI) por abrir sus instalaciones a mi proyecto de investigación, por los recursos y financiamiento. Especialmente a Giancarlo Ioli Goubaud, Gerente Comercial de Alimentos Balanceados Guatemala (ABA), a mi Asesor el Lic. Daniel Benavides Varela por su guía y disponibilidad, a los colaboradores de mi departamento de calidad y los colaboradores de otros departamentos de Alimentos del Norte (ADN), responsables de realizar un pequeño aporte que de forma directa o indirecta apoyaron en la culminación de mi proyecto.

Por su aporte invaluable, por la confianza en mi trabajo, la orientación, la rigurosidad, trasparencia y su forma de liderar, quiero agradecer de manera personal al M.Sc. Pio Selime Nassar, Gerente de Operaciones de Alimentos Balanceados Costa Rica, por aceptar ser mi tutor, ha sido todo un honor trabajar bajo su dirección. Gracias por ser parte muy importante no solo en el desarrollo de esta investigación, sino en mi formación como profesional. Toda mi gratitud por siempre estar anuente a facilitarme los medios para llevar a cabo el desarrollo de esta investigación y cada propuesta que he dirigido al laboratorio de microbiología.

A mi asesor y uno de los profesores que más admiro y cariño le tengo de la universidad, gracias M.Sc. Luis Adrián Vega Corrales por destacar tanto a nivel científico como personal, por sus aportes y participación, por la disponibilidad, la paciencia y el trato amable que siempre recibí de usted, lo admiro profundamente, ha dejado una huella imborrable en mi vida.

Gracias a mi queridísima Universidad Nacional, uno de los procesos más importantes en mi vida en una institución que admiro por su grandeza, profesionalismo, ética y calor humano. Quiero agradecer muy especialmente a los académicos M.Sc. Luis Adrián Vega Corrales, M.Sc. Carola Scholz, M.Sc. Oscar Ramírez q.e.p.d., M.Sc. Abad Rodríguez, Dr. Javier Alvarado Mesen, Dr. Silvia Mau Inchaustegui, Dr. Shirley Camacho, de la Escuela de Ciencias Biológicas, quienes fueron parte de mi proceso de formación, profesores que admiré desde el instante que los conocí por esa pasión que les caracteriza, todos en algún momento impactaron en mi vida positivamente.

Al Dr. Oscar Alpízar gerente de Seguridad Alimentaria S.A por el apoyo económico al donar un set de 12 kits de NEOGEN para el análisis de micotoxinas, a Alltech por facilitarnos las herramientas estadísticas para complementar la investigación. Gracias por ser empresas que creen en la investigación y apoyan el desarrollo de estas.

A las personas que han estado en el plano personal, amigos que han compartido mi camino, extendiendo una palabra de aliento. A Don William Vargas q.e.p.d., amante de la ciencia, quien motivó aún más la pasión que siento por esta área. Personas cercanas, Dyla, Moni, Dani, Jenni, Esleyder, Mariam, Juanjo y Jei quienes vivieron el proceso conmigo en algunas de las etapas, dándole sentido a todo lo vivido.

Por último, mi gratitud a una persona que ha sido forjadora de mi carácter, M.Sc. Yenci Villavicencio, conocerla le da sentido a la frase “Honor a quien honor merece”. Gracias por ser mi gran ejemplo, agradezco el privilegio de llamarte hermana.

Dedicatoria

A mi familia: mis padres, Cristina y Rodolfo por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, es un orgullo y privilegio ser su hija. A mis hermanas y hermanos por estar siempre presentes, acompañándome de forma incondicional.

Índice

Agradecimientos II

Dedicatoria IV

Índice V

Índice de figuras VII

Abreviaturas VIII

Resumen IX

Introducción 1

1.1. Antecedentes 1
1.2. Justificación 5
1.3. Planteamiento del problema 8
1.4. Objetivos 8
1.4.1. Objetivo general 8
1.4.2. Objetivos específicos 8

2.Marco Teórico 9

2.1. Micotoxinas en ingredientes para alimentos balanceados 9
2.1.1. Micotoxinas de importancia avícola 9
2.2. Co ocurrencia, micotoxinas enmascaradas y emergentes. 16
2.3. Métodos analíticos para micotoxinas 16
2.4. Micotoxinas en fábricas de alimentos balanceados 18
2.4.1. Exposición de los alimentos balanceados en granjas 18
2.5. Normativa regulatoria de micotoxinas 19
2.6. Control de micotoxinas 20
2.7. Las micotoxinas en alimentos balanceados como riesgo para la salud humana 22

3.Marco Metodológico 23

3.1. Determinación de mohos y levaduras y micotoxinas 25
3.1.1. Muestreo en fábrica de producción de alimentos balanceados 25
3.1.2. Muestreo en granja de producción avícola 25

3.2. Procesamiento de muestras 26
3.3. Determinación de mohos y levaduras en materias primas y alimentos balanceados. 26
3.4. Determinación de micotoxinas en materias primas y producto terminado del alimento balanceado. 26
3.5. Cantidad equivalente de riesgo (REQ) 28
3.6. Caracterización de los efectos de las micotoxinas en la cadena productiva avícola. 29
3.6.1. Muestreo y diagnóstico en fábrica de procesamiento de pollos 29
4.Resultados 29
5.Discusión 38
6.Conclusiones 45
7.Recomendacione 46
8.Referencias 47

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras químicas de las principales micotoxinas. Fuente: Kovalsky *et al.*, (2016). 10

Figura 2. Principales micotoxinas que afectan a los animales de granja. Fuente: C. Yang et al., (2020)..... 19

Figura 3. Sitios de muestreo, a) Fábrica de alimentos balanceados, b) Granja de producción avícola y c) Fábrica de procesamiento. 25

Figura 4. Recuento de mohos y levaduras en materias primas de alimentos balanceados para pollos de engorde..... 30

Figura 5. Recuento de mohos y levaduras en los alimentos balanceados para pollos de engorde en su producción en fabrica y almacenamiento en granja avícola..... 31

Figura 6. Recuento de mohos y levaduras en los alimentos balanceados, Fase I, Fase II. Y Fase III, suministrados en granja a los pollos de engorde. 32

Figura 7. Determinación de micotoxinas en las materias primas utilizadas durante la producción en fábrica de alimento balanceado para pollos de engorde. 33

Figura 8. Concentración de micotoxinas en los alimentos balanceados en fábrica y granja de producción avícola..... 34

Figura 9. Cantidad equivalente de riesgo (REQ) de la interacción de las micotoxinas determinadas en maíz y harina de soya durante las 5 semanas evaluadas. 35

Figura 10. Cantidad equivalente de riesgo (REQ) de la interacción de las micotoxinas determinadas en los alimentos balanceados durante las 5 semanas evaluadas..... 35

Figura 11. Prevalencia de lesiones en diferentes órganos de los pollos de engorde en planta de procesamiento. 36

Figura 12. Cambios morfológicos o lesiones en órganos del pollo..... 37

Abreviaturas

UNA	Universidad Nacional de Costa Rica
ELISA (Siglas en inglés)	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
DON	Deoxinivalenol
UFC	Unidades formadoras de colonia
OTA A	Ocratoxina A
FAO (Siglas en inglés)	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
USFDA	United States Food and Drug Administration
EUC	Comisión de la Unión Europea
LAMIC	Laboratorios de análisis micotoxicológicos
ISO	Organización Internacional para la Normalización
CEN	Comité Europeo de Normalización
AOAC	Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
TLC	Cromatografía de capa delgada
GC	Cromatografía de gases
ECD	Detección de captura de electrones
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
RIA	Ensayos de radioinmunoanálisis
EGM	Glucomananos esterificados
MM	Multimodular
HSCAS	alúmino silicatos hidratados de calcio y sodio
APT	Agua peptonada tamponada
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal
REQ (Siglas en inglés)	Cantidad de riesgo equivalente

Resumen

Los hongos filamentosos son productores de metabolitos secundarios conocidos como micotoxinas, presentes en los alimentos balanceados que consumen los pollos de engorde, generan lesiones en los animales dependiendo de la cantidad presente en sus dietas, etapa de desarrollo y fisiología. El alimento se ve expuesto a diversos procesos, el manejo que se le dé en la fábrica de producción y el almacenamiento que tiene en granjas son dos procesos que se deben monitorear. Para lograr un mejor control de calidad en los alimentos balanceados y asegurar la integridad de los pollos de engorde, se monitorearon los procesos utilizando técnicas biotecnológicas. Sé cuantificó la presencia de hongos en alimentos para pollos mediante el recuento de mohos y levaduras utilizando la técnica Petrifilm Rapid, se determinó la concentración y prevalencia de aflatoxina, zearalenona, ocratoxina, fumonisina, T-2 y DON en alimentos para pollos mediante la técnica de enzimoinmunoanálisis de absorción (ELISA), por último, se evaluó la relación entre la ocurrencia de lesiones en pollos y la presencia de micotoxinas en su alimento. En total, se realizaron 684 análisis, 528 para producto terminado y 156 para las materias primas. Los resultados mostraron un 99% de las muestras analizadas con concentraciones detectadas, la determinación de micotoxinas mostró en los alimentos analizados medias más elevadas en granja que en fábrica, sin embargo, no hay niveles registrados como representantes de mortalidad en pollos. La cantidad de riesgo equivalente (REQ) para la interacción de las micotoxinas determinadas en producto terminado y materias primas a través del software Alltech® Total Diet Mycotoxin Estimator indicó tendencias de interacción menores y leves. Se determinó lesiones en diferentes órganos de los pollos cualitativamente, siendo el muslo el órgano en el que se encontró mayor cambio morfológico. Enfocarse en la prevención de afectaciones en pollos de engorde buscando la eficiencia en la producción y la optimización del proceso desde fabrica, enfatiza la importancia de las investigaciones biotecnológicas en la cadena de producción, desde las materias primas con las que se elaboran los alimentos balanceados, hasta los productos finales y su almacenamiento en granjas.

Introducción

1.1. Antecedentes

Las micotoxinas han sido el foco de estudio desde 1960, año en que se descubrieron las primeras toxinas en el mundo; conforme el tiempo avanza los estudios son más intensos y profundos debido a su impacto económico, en la salud humana y animal (FAO, 2003). Humanos y animales se encuentran expuestos a micotoxinas a través del consumo directo o indirecto de alimentos contaminados (Abdallah *et al*., 2017; Molina *et al.*, 2017).

Existen muchas enfermedades asociadas al consumo de alimento contaminado con micotoxinas; se han visto los efectos toxicológicos en diferentes especies, entre los que se incluyen equinos, cerdos, ratas de laboratorio y aves; del mismo modo, se ha tratado de caracterizar los posibles efectos en los seres humanos (Weibking *et al*., 1993; Duarte-Vogel & Villamil-Jiménez, 2006).

Organismos internacionales han establecido límites permitidos de micotoxinas en los alimentos balanceados y alimentos de consumo humano entre los que se encuentran la Organización Mundial de la Salud (OMS), y Food and Agriculture Organization. (FAO) (Denli & Pérez, 2006). En el año 2003, la FAO realizó el estudio: "Reglamento mundial para micotoxinas en los alimentos", donde se describe que al menos 99 países tenían reglamentos para las micotoxinas, comparado con el último estudio realizado en 1995, por ende, en el 2003, se tenía un aumento del 30% en reglamentaciones a nivel mundial. La población de estos países representaba un 87% de los habitantes del mundo en ese mismo año (FAO, 2003).

En el año 2003, en México, se describió la presencia de micotoxinas en alimentos balanceados y granos empleados para la producción de aves, cerdos y ganado, este estudio reveló muestras contaminadas con niveles por arriba de las normas de regulación para cada micotoxina, se estima que cerca de un 25% de granos se encuentran contaminados con micotoxinas a nivel mundial (Ortiz *et al.*, 2006).

Los cereales, principalmente el maíz, son utilizados como fuente de energía en la dieta animal para diferentes especies, estas materias primas representan el 50-80% de la dieta

animal en América y Europa. En el 2014, la producción mundial de alimento balanceado para animales alcanzó 964 millones de toneladas, siendo Estados Unidos y Brasil los principales países exportadores de maíz. En Costa Rica, el alimento balanceado para animales producido contiene una base de productos de maíz, en el 2015 se importaron más de 764 254 toneladas de productos de maíz (Molina *et al*., 2017).

Un estudio realizado, en el 2017, en Argentina, analizó aflatoxinas en alimentos comerciales y manufacturados por productores para gallinas ponedoras, por el método de ELISA. Los resultados reflejaron niveles tóxicos de aflatoxinas en el 77,8% de las muestras analizada (Toso *et al*., 2015). En Perú, se cuantifico en maíz y soya la presencia de Ocratoxina A (OTA) y T-2 por ser materias primas utilizadas como ingredientes principales en la dieta de aves producidas para el mercado, los resultados mostraron porcentajes mayores al 60% del total de muestras analizadas con presencia de las micotoxinas mencionadas (Castro *et al*., 2015a).

Los resultados de un estudio realizado en el 2009-2011, donde se analizaron materias primas como maíz, soya, harina de soya, trigo, granos secos, cereales de América, Europa y Asia, mostraron que el 81% de estos productos estaban contaminados por lo menos de un tipo de micotoxinas, siendo el maíz el que mostró el mayor porcentaje de contaminación (Peng *et al*., 2018). Estos estudios demuestran la contaminación tan alta que existen a nivel mundial, y manifiesta la importancia de tener controlados los procesos para evitar la aparición y producción de micotoxinas.

La susceptibilidad humana y animal se puede ver afectada por micotoxinas, esto se debe a que los alimentos balanceados y sus ingredientes se encuentran al principio la cadena alimentaria lo cual puede provocar , un impacto adverso en el resto de la red alimentaria, la calidad de los alimentos afecta directamente la productividad animal, la salud y puede tener efectos drásticos en la alimentación humana como productos finales afectando la salud intestinal y el sistema inmune innato y adaptativo (Berek et al., 2001; A. Molina et al., 2017). La salud animal y el impacto de las micotoxinas adquiere relevancia presente y futura, lo que conlleva trabajar en la producción de alimentos inocuos para toda la población humana. Es necesario, realizar investigaciones que permitan desarrollar soluciones prácticas

y económicamente justificadas para contrarrestar la contaminación por micotoxinas en los alimentos y los efectos que estos generan sobre la salud humana y animal (Berek *et al*., 2001).

Los tricotecenos (principalmente deoxinivalenol o DON) y ocratoxinas (principalmente Ocratoxina A u OTA) poseen las actividades enteropatógenos mejor caracterizadas en humanos, son conocidos los efectos de alteración en las funciones del intestino, lo que conduce a diarreas, vómitos, mala absorción, inflamación intestinal *in vivo* (Maresca *et al.*, 2008).

Se efectuó un estudio con el objetivo de determinar aflatoxinas en las materias primas utilizadas para alimentos balanceados para animales y en los productos terminados de empresas manufactureras en Guyana. Para los análisis utilizaron metodologías mixtas, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA), los resultados determinaron que cinco muestras de las 27 analizadas para producto terminado se encontraban sobre el límite permitido según la Comisión de la Unión Europea (EUC) y la United States Food and Drug Administration (USFDA). Mientras que solo 3 de 30 muestras de las materias primas analizadas se encontraban sobre el límite permitido. El estudio revelo que la mayoría de muestras mantuvieron la calidad hasta el punto de venta, sin embargo la presencia de las muestras contaminadas generan la necesidad de investigar la cadena de producción y su mercadeo para garantizar la calidad de los productos terminados (D. M. Morrison et al., 2017).

En el 2019, Wang, en forma conjunta a otros colaboradores, investigaron sobre la preferencia que tienen los pollos de engorde, el rendimiento y comportamiento hacia dietas con alimento contaminado con micotoxinas producidas por Fusarium en especial deoxinivalenol. Los resultados demostraron como las dietas contaminadas moderadamente con DON pasaban más tiempo en los comederos que las dietas control. Concluyendo que los pollos de engorde se ven afectados negativamente en su rendimiento al crecer, distinguiendo dietas con bajas cuantificaciones de las micotoxinas en estudio (Wang *et al.*, 2019).

Otra investigación, liderada por Anhoa Wang, presenta los pollos de engorde que consumieron alimentos balanceados con cargas de micotoxinas producidas por Fusarium, demostró de igual forma que bajos rendimientos en crecimiento conllevaría a pérdidas

económicas en la producción. Además, se realizó análisis histopatológicos de la región de íleon, los cuales revelaron cambios en la morfología intestinal relacionándose con el bajo crecimiento de los pollos de engorde (Wang & Hogan, 2019).

Eugenia Quintana y otras investigadoras, en el año 2007 reportaron ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA; sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa entre los consumidores de café y la presencia de la ocratoxina A en plasma; además, el valor promedio de la micotoxina entre los tomadores y no tomadores de café tampoco fue significativo. Los investigadores concluyeron que esto se debe a que se consumen muchos productos en Costa Rica que tienen presencia de la ocratoxina A como granos y cereales de consumo diario tales como arroz, cebada, avena, maní, maíz, sorgo, almendra, frijoles, de algodón, girasol y soya, y subproductos como harinas, además de frutos secos, frutas deshidratadas, leche y productos lácteos, hierbas, especias, café, cacao, piensos, aceites vegetales, cerveza y legumbres entre otros (Quintana *et al*., 2007)

En el 2009, en el estudio sobre la calidad microbiológica de alimento concentrado para perros adultos que se comercializa en Costa Rica, Arias y colaboradores describieron, en su análisis, que la mayoría de los recuentos de hongos y levaduras realizados a las muestras fueron superiores al umbral aceptado de 10^2 UFC/g, concluyendo que el alimento puede verse deteriorado por el metabolismo de los hongos y levaduras. Además, dependiendo de las condiciones en las que se almacene se podría ver el desarrollo de micotoxinas como ha sido descrito en otros trabajos a nivel mundial (Arias *et al.*, 2009).

En el año 2012, se realizó un estudio sobre la producción y distribución de alimentos para animales en una fábrica comercial integral; este estudio iba enfatizado en la aplicación de buenas prácticas de manufactura y el control de plagas (Miranda, 2012). Sin embargo, no hay estudios publicados respecto a la identificación de micotoxinas en alimentos balanceados para pollos de engorde en fábricas comerciales e integradas, ni estudios sobre el seguimiento de las condiciones de estos alimentos en las granjas, que permitan el mejoramiento de la calidad de éstos, y de los procesos involucrados.

En Costa Rica, se publicó el estudio sobre la presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes domésticos, donde se ha

identificado el crecimiento de hongos en los forrajes aptos para producir toxinas de importancia para la salud pública y animal. Los principales efectos descritos en rumiantes de las micotoxinas encontradas en los ensilajes se asocian a alteraciones del sistema digestivo, reproductivas y del sistema inmunológico (Alpízar Solís, 2016).

Los géneros identificados en los estudios revisados alrededor del mundo fueron *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp., además reportaron la contaminación de ensilajes principalmente con aflatoxinas (AFB1), fumonisinas (FB1), tricotecenos (DON, T2) y zearalenona. Los factores influyentes en el desarrollo de los hongos y producción de micotoxinas fueron la presencia de oxígeno durante el ensilaje, la temperatura ambiental, el embalado y el manejo postcosecha de los forrajes (Alpízar, 2015).

1.2. Justificación

Las micotoxinas se describen como metabolitos secundarios producidos por algunos hongos filamentosos que se ven expuestos a factores ambientales. Estas sustancias son encontradas a nivel mundial, a pesar de las diferencias geográficas y climáticas que existen (Alizar, 2015; Binder *et al*., 2007). Se conocen alrededor de 300 a 400 micotoxinas, sin embargo, las más importantes consideradas en la fabricación de piensos, debido a que se componen de los sustratos favoritos para el perfil final de las micotoxinas son las aflatoxinas, deoxinivalenol (DON), zearalenona, fumonisinas y ocratoxinas (Binder *et al*., 2007., Streit *et al.*, 2012).

Cuando las micotoxinas son ingeridas por animales o humanos se produce una respuesta del sistema conocida como micotoxicosis; el nivel de afectación que va a tener el organismo va a depender de la especie (Binder *et al*., 2007b). Los síntomas en los animales van desde niveles bajos de peso corporal, reducción de la fertilidad, susceptibilidad a enfermedades por la disminución de la respuesta inmunológica del organismo, hasta muerte. Los síntomas clínicos incluyen tumores, hemorragias, diarreas y daño hepático, entre otros (Peng *et al*., 2018).

Para la fabricación de alimentos procesados y la cría de animales las micotoxinas se presentan como una amenaza diaria. Esta problemática representa pérdidas económicas

estimadas en 140 millones de dólares solo por la disminución en peso de los pollos de engorde, que consumieron en 1986 niveles bajos de micotoxinas en los Estados Unidos (Ortiz, 2012). El mismo autor indica que se han reportado pérdidas económicas en amplias zonas de Sudamérica, Asia y Europa. Además, el consumo de animales, alimentados con alimento balanceado contaminado, afecta la cadena alimenticia humana, ya que las micotoxinas se acumulan en los diferentes órganos e ingresan a la población humana a través de productos como leche, huevos y carne (Kongkapan *et al.*, 2016).

Las metodologías utilizadas para prevenir las micotoxinas y combatirlas son una combinación de buenas prácticas agrícolas durante las cosechas y la remediación pos cosecha a las materias primas y productos terminados en procesos de producción (Binder *et al.*, 2007b). Los productos que utilizan para esto funcionan en su mayoría como materiales absorbentes dentro del tracto gastrointestinal en la alimentación, para la eliminación de ciertas toxinas (Zhu *et al.*, 2016). Sin embargo, no todos los tratamientos aplicados a productos contaminados con micotoxinas son provechosos ni altamente específicos, de ahí la importancia de valorar la eficacia de los métodos con los que se tratan los alimentos balanceados. Esto permitiría tomar decisiones con criterios válidos para cambiar y probar otras tecnologías para combatir las micotoxinas de una forma más adecuada, aunque esto genere un costo un poco más elevado (Zhu *et al*., 2016).

Las micotoxinas, al ser un grupo de toxinas naturales a diferencia de las toxinas artificiales como los pesticidas y aditivos alimentarios, presentan mayor dificultad para ser controladas, especialmente porque la contaminación en los alimentos balanceados para animales o humanos puede ocurrir desde los cultivos en el campo, producción, almacenamiento y logística de los productos terminados (Peng *et al*., 2018).

La fabricación y calidad de los alimentos proporcionados a los animales es transcendental en operaciones de producción animal (Lateef & Gueguin, 2014). En granjas lecheras se sugiere que la mala gestión de almacenamiento de alimentos balanceados, sumado a factores de temperatura y humedad origina la producción de micotoxinas (Chaisri *et al*., 2017). Al analizar, no solo la producción en una fábrica de los alimentos balanceados sino tomar en cuenta cómo se está manejando el concentrado en las granjas, permitirá a las

empresas tomar medidas en caso de que la contaminación de micotoxinas se esté dando más en granjas que a la hora de elaborar los alimentos balanceados en la fábrica.

Una empresa comercial integrada se define como aquella constituida a partir de otras empresas, la cuales prestan servicios especializados a sus contrapartes. Así, una empresa comercial puede poseer una fábrica de fabricación de alimentos balanceados y dar soporte a granjas dedicadas al engorde de animales. Los alimentos balanceados deben salir de la fábrica con concentraciones bajo el límite permitido para las micotoxinas. Sin embargo, las granjas almacenan estos alimentos en diferentes condiciones y si no tienen controles de inocuidad y limpieza se presentan circunstancias que favorezcan el desarrollo de hongos y producción de estos metabolitos secundarios, lo cual podría generar en este proceso, lesiones al animal que consuma el alimento balanceado (D. M. Morrison et al., 2017).

Un aspecto de suma relevancia se refiere a conocer si el proceso de fabricación resulta eficiente en la producción de un alimento balanceado bajo los límites permitidos para micotoxinas. Así mismo, monitorear si en las granjas se presentan problemas con la producción y presencia de estos metalitos secundarios (Anhao Wang & Hogan, 2019). Esto permite identificar si existe un problema en estos procesos y así tomar las medidas necesarias para dar un seguimiento y control

Por los motivos antes citados, en este trabajo se identificará la etapa del proceso de fabricación y almacenamiento de tres alimentos balanceados para engorde de pollos en la que se presenta la mayor concentración de micotoxinas producidas por mohos, mediante la técnica ELISA, para determinar cuál proceso podría estar afectando de forma significa al consumidor final.

1.3. Planteamiento del problema

Conocer el comportamiento de las micotoxinas en los diferentes eslabones de la cadena primaria avícola es fundamental para el control de calidad. ¿El almacenamiento del alimento en granja es un factor de aumento en hongos, levaduras y micotoxinas, influencia directamente en la calidad de lo que consume el animal, o es producto del proceso de producción en fabrica?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar mediante técnicas biotecnológicas la prevalencia de seis micotoxinas durante la producción en fábrica y el uso en granja de alimentos balanceados para pollos de engorde para la caracterización de sus efectos en la cadena productiva avícola.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Analizar la presencia de mohos y levaduras durante la producción en fábrica y el uso en granja de alimentos balanceados para pollos de engorde utilizando la técnica de placas 3M® Petrifilm®
2. Determinar la concentración y prevalencia de seis micotoxinas durante la producción en fábrica y el uso en granja de alimentos balanceados para pollos de engorde mediante la técnica de enzimoinmunoanálisis de absorción (ELISA).
3. Evaluar las lesiones asociadas a la ingesta de micotoxinas en pollos de engorde, como posible evidencia de los efectos de la micotoxinas en la industria avícola.

2. Marco Teórico

2.1. Micotoxinas en ingredientes para alimentos balanceados

En 1960, se establece por primera vez el término micotoxina, tras la muerte masiva de más de 100.000 pavos que consumieron alimento balanceado contaminado con aflatoxina. Las micotoxinas son sustancias tóxicas provenientes del metabolismo secundario de algunos hongos filamentosos que crecen en diferentes sustratos, se producen en mayor cantidad en el periodo final de crecimiento exponencial del hongo y durante la fase estacionaria. Se caracterizan por ser compuestos orgánicos de bajo peso molecular y por no poseer inmunogenicidad (Bennett & Klich, 2003; Mallmann, Hummes, *et al*., 2007; Sánchez-Montero, 2017).

Las micotoxinas poseen estructuras pequeñas que se componen desde anillos heterocíclicos simples, con pesos moleculares de hasta 50 Da y grupos con 6-8 anillos heterocíclicos con un peso molecular mayor a 500 Da. El tamaño pequeño de estas moléculas tiene implicaciones de riesgo en la respuesta obtenida del sistema inmune, y existe incapacidad biológica en el organismo para detectar las micotoxinas presentes en los alimentos (Bezerra da Rocha *et al*., 2014; Pitt, 2000).

2.1.1. Micotoxinas de importancia avícola

Uno de los campos agrícolas más importantes a nivel mundial se refiere al sector avícola, este produce la mayor parte de proteína animal que se consume (Wyatt, 1988). Por esto, las empresas especializadas se han apoyado en la tecnología para mejorar sus producciones, la selección genética, la nutrición y la sanidad. En estos aspectos, se invierte cada vez más dinero e investigaciones para su desarrollo y calidad (Sorrentino & Sabrina, 2013).

La presencia de micotoxinas se ha convertido en uno de los principales problemas a los que se enfrenta el sector avícola; sus efectos impactan aspectos a nivel económico, en la salud animal y el riesgo para la salud pública (Abdallah *et al.*, 2017; B Grenier *et al.*, 2017; Wyatt, 1988). Se han descrito más de 300 micotoxinas; sin embargo, las que han sido de interés científico son pocas y se caracterizan por ser las que más afectan a nivel económico,

en la salud humana y animal, además de ser las que se encuentran con mayor frecuencia en la contaminación de los alimentos (Castro *et al.*, 2015b). Las micotoxinas más importantes (Figura 1) son; las aflatoxinas, producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus;* fumonisinas, zearalenona, tricotecenos (toxina T-2, deoxinivalenol (DON) son sintetizadas por *Fusarium;* ocratoxinas son producidas por géneros como *Aspergillus; Penicillium* y los alcaloides ergóticos, son derivados de *Claviceps* (Denli & Pérez, 2006).

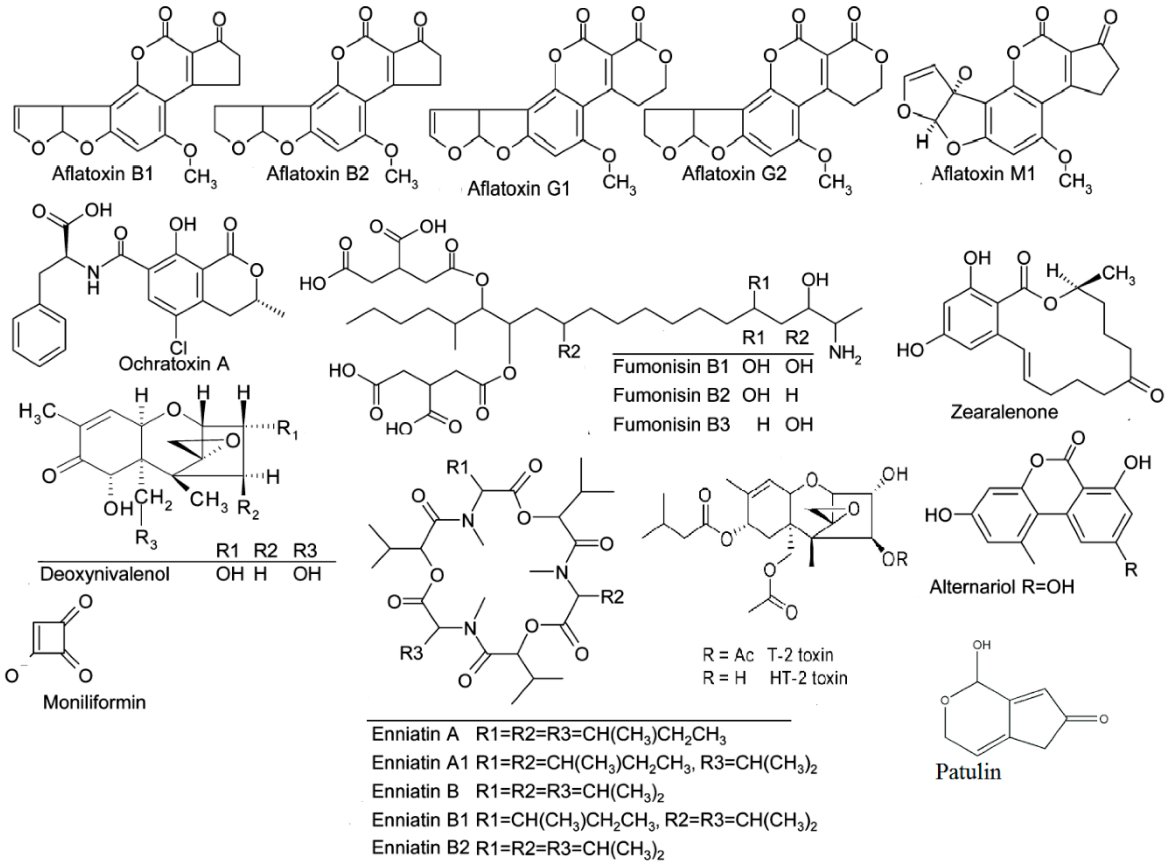


Figura 1. Estructuras químicas de las principales micotoxinas. Fuente: Kovalsky *et al.*, (2016)**.**

2.1.1.1. Aflatoxinas

Son micotoxinas de gran importancia por su alta peligrosidad en alimentos balanceados por su resistencia a los tratamientos, producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, sin embargo, en los últimos años se han descubierto otras especies que sintetizan estas toxinas como *A. nonius, A. bombycis, A. pseudotamari* y *A. ochraceorosus* (Denli & Pérez, 2006; Varga *et al.*, 2011).

Se conocen cuatro aflatoxinas principales, la B_1, B_2, G_1 y G_2, su nomenclatura se debe a los colores fluorescentes verdes y azules que se observan bajo la luz UV en cromatografía de capa fina. También, existen las aflatoxinas M1 y M2, son metabolitos derivados de B_1, B_2 que se encuentran en la leche o productos lácteos que han sido ingeridos con alimento balanceado contaminado por el animal, los cuales metabolizan las toxinas y las excretan en la leche. (Denli & Pérez, 2006; Sánchez-Montero, 2017).

Las aflatoxinas se pueden encontrar alrededor de todo el mundo en una variedad de alimentos balanceados, la contaminación que generan lo hongos productores de aflatoxinas puede ocurrir en casi todas las etapas: producción en cadena; el campo; el proceso de almacenamiento; y el transporte. (Molina *et al.*, 2017).

La presencia de los hongos productores de aflatoxinas puede darse antes y después de la cosecha de frutos secos, cereales, oleaginosas (Coker, 1997). Se han presentado estas toxinas en cereales, avellanas, higos, especias, crecimientos que se dan eventualmente por un inadecuado almacenamiento o secado de los productos. Son toxinas que prefieren los climas templados, tropicales y subtropicales (Denli & Pérez, 2006), su peligrosidad radica en que son resistentes a los procesos de producción de alimentos balanceados; termoestables por lo que los alimentos que son peletilizados; puede destruirse el hongo, sin embargo, la toxina queda en el alimento (Mendoza *et al.*, 2006).

Las aves en general son muy sensibles a estas micotoxinas, se presenta reducción en el crecimiento, alteración en procesos de coagulación sanguínea, en pollos de engorde se producen problema en la patas (Castro *et al.*, 2015b), se pueden absorber residuos en el hígado lo que provoca riesgo en la salud publica aún con la ingesta de cantidades mínimas en la dieta (Chen *et al.*, 1992; Mendoza *et al.*, 2006).

En 1998, se comprobó la susceptibilidad existente en pollos de engorde según la edad de las aves, se indicó que las aves más jóvenes presentan daños más severos en su desarrollo en comparación con las aves adultas. La aflatoxicosis en el campo se puede observar claramente en las excretas de las aves, las cuales presentarán partículas mal digeridas, eso ocurre por la excreción aumentada de lípidos o esteatorrea. Las aves fallan en la absorción y se ve perjudicada la conversión alimenticia, lo que provoca altos costos en la producción. En pollos de engorde, la excreción aumentada de lípidos se origina por la no función de la lipasa pancrática, enzima digestiva de grasas; y por la disminución de sales biliares cuya función es la absorción de grasa; ocasionando esteatosis hepática o hígado graso. (Mallmann, Dilkin, *et al., 2007; Mallmann, Hummes, et al., 2007).*

También, en brotes de aflatoxicosis es normal encontrarse con el síndrome del ave pálida, esta afectación se da cuando los pollos presentan palidez en las mucosas y patas, la pigmentación deficiente va de la mano con la reducción en el transporte y la disminución de la deposición residual que tienen los carotenoides consumidos en el alimento balanceado contaminado. (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007; Mallmann, Hummes, *et al*., 2007).

2.1.1.2. Fumonisinas

Las fumonisinas fueron descritas por primera vez en 1988 en Sudáfrica, son producidas por hongos del género fusarium, de las principales especies sintetizadoras de estas toxinas se tienen *F. moniliforme y F. proliferatum*. El grupo de las fumonisinas es amplio, sin embargo las más importantes por su toxicidad son la B_1 y la B_2 (Mallmann, Dilkin, *et al.*, 2007; Marasas, 2001), desde 1993 se clasifica como una posible toxina del carcinoma humano según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), especialmente su grupo B_1 que corresponde a la más tóxica de todo el grupo de fumonisinas, representando el 70% del grupo en su totalidad (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007; Marasas, 2001; Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008).

Se deben prevenir la aparición de las fumonisinas en toda la cadena alimentaria, desde la producción de las cosechas hasta la etapa de consumo, especialmente porque estas toxinas se encuentran en la mayoría de las materias primas utilizadas en la industria pecuaria como el maíz, sorgo, soya, pasta de algodón, ensilados e incluso la leche (Chavarri *et al*., 2017). Un estudio realizado en los laboratorios de análisis micotoxicológicos (LAMIC) de 1996 al

2007comprobaron la presencia de fumonisinas en un 41% de maíz y 44% de muestras de alimentos balanceados (Mallmann, Dilkin, *et al.*, 2007).

Las fumonisinas afectan a las aves provocándoles un incremento en el peso del hígado, molleja y riñón, necrosis hepática, hay un decrecimiento en la ganancia del peso por la disminución del consumo del alimento, diarrea, se da elevada actividad enzimática en suero, el animal se vuelve débil y escuálido (Landeros *et al*., 2008; Lee *et al.*, 2018; Mallmann, Dilkin, *et al.*, 2007). Es importante considerar que los hongos capaces de sintetizar fumonisinas también pueden producir otros compuestos tóxicos, los cuales junto con las fumonisinas agravan más la situación del pollo de engorde, ocasionando pérdidas de rendimiento más significativas (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007).

Una forma de evaluar la intoxicación por Fumonisinas se realiza por medio de parámetros sanguíneos o con biomarcadores presentes en orina, suero y tejidos, ya que cuando los órganos están expuestos a fumonisinas, la toxicidad y carcinogenicidad se da por la interferencia que causa en la enzima del metabolismo de los esfingolípidos, la naciltransferasa de esfiganina, esta alteración incrementa la relación esfinganina (SA) y esfingosina (SO), estos precursores pueden ser detectados (Mallmann, Dilkin, *et al.*, 2007; Swamy *et al*., 2003).

2.1.1.3. Zearalenona

Zearalenona se refiere al grupo de micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium*, entre las principales especies productores de esta toxina las cuales son ampliamente distribuidas a nivel mundial se tiene a *F. graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. equiseti y F. semitectum.* Estas toxinas son químicamente estables por lo que prevenirlas es una de las mejores opciones para tratarlas, persisten en procesos de almacenamiento, molienda, procesamiento de alimentos y cocina, lo que aumenta su peligrosidad para animales y humanos (Bottalic, 1998; Sforza *et al.*, 2006).

Zearalenona está presente en todos los cultivos del mundo, afectando el trigo, maíz, avena, cebada, arroz, maíz, sorgo, entre otros (Bottalico & Perrone, 2002). Esta toxina se metaboliza en el hígado, rapidez de absorción desde el tubo digestivo, considerada como un disruptor endocrino por su facilidad de unión directa a los receptores de estrógeno. En

general, afecta a diferentes especies de animales provocándoles infertilidad, reducción de fertilidad, alterando niveles de progesterona (Čonková *et al*., 2001; Shier *et al*., 2001).

Estas toxinas tienen un mecanismo de acción que afecta la reproducción, es más sencillo comparado a otras micotoxinas que tienen efecto sobre la inmunidad. En pollos no se registran tantos síntomas como por ejemplo en cerdos, que son la especie más sensible produciéndoles descenso de la fertilidad, mortalidad de embriones y reducción en el tamaño de las camada (Denli & Pérez, 2006).

A pesar de que las aves de corral han sido consideradas relativamente resistentes a estas toxinas, se ha demostrado en investigaciones muy recientes que las concentraciones de micotoxinas por debajo de los límites de la Unión Europea y Estados Unidos o concentraciones inferiores a las que causarían micotoxicosis clínica, pueden afectar de forma el rendimiento productivo y la salud de las aves. (B Grenier *et al*., 2017).

Los nuevos hallazgos se pueden explicar tomando en cuenta que antes de la década de 1990, los ensayos de alimentación se realizaron en diferentes variedades de aves, además, se ha evidenciado una sensibilidad diferencial a las micotoxinas entre la producción avícola tradicional y la moderna. (Yunus *et al*., 2011). La causa se deber a la selección genética a la que se ha visto expuesta la producción avícola moderna, una consecuencia debido al crecimiento rápido que puede haber alterado el metabolismo y la partición de nutrientes lo cual puede reducir la inmunidad (Cheema *et al*., 2003). Sumado a que las investigaciones actuales se enfocan en el campo de la salud intestinal, y los reportes descritos recientemente sobre micotoxinas se han centrado principalmente en sus efectos en el tracto gastrointestinal (Bertrand Grenier *et al.*, 2016)

2.1.1.4. Ocratoxinas

Las ocratoxinas son producidas por hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus*, son toxinas nefrotóxicas que producen acido oxálico y otras sustancias que pueden generar daños tubulares y ocasionar nefrosis tóxica tubular (Ravelo *et al*., 2011). En presencia de una ocratoxicosis se puede observar el riñón con un aumento de tamaño y pérdida de coloración debido a la acumulación de ácido úrico (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007).

Las ocratoxinas son 7 amidas isocumarinas de β-fenilalanina, se conocen como A, B, C, D, siendo el metabolito secundario más peligroso de este grupo la ocratoxina A (OTA) (Monaci & Palmisano, 2004). Estas toxinas son producidas por *Penicillium* y *Aspergillus*, es sintetizada por dos especies de *Penicillium, P. nordicum* y *P. verrucosum.* En las especies de *Aspergillus* encontramos a *A. ochraceus, A. niger, A. carbonarius, A. stynii* y *A. westerdijkiae* (Sánchez-Montero, 2017). Su estructura química se compone de un anillo de dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. Estas toxinas se encuentran en alimentos como cereales, café, vino (Duarte *et al*., 2010; Franco *et al.*, 2014; Ravelo *et al*., 2011).

La ocratoxina A en aves se conoce por ser de las más tóxicas que existen, en alimentos balanceados su crecimiento es rápido cuando se encuentra en condiciones de alta humedad y temperatura (Bellí *et al*., 2004). Entre las lesiones que se observan cuando las aves se encuentran frente a estas toxinas son, disminución de la pigmentación, problemas de patas en el caso de pollos de engorde, inmunosupresión, reducción en el crecimiento, alteración en los procesos de coagulación sanguínea (Castro *et al.*, 2015b).

2.1.1.5. Deoxinivalenol (DON) y T-2

Deoxinivalenol (DON) y T-2 son micotoxinas pertenecientes a los tricotecenos producidas por hongos del género *Fusarium*, como *Fusarium graminearum* y *Fusarium roseum*. Estos hongos provocan pérdidas económicas grandes y a nivel de producción, esto porque estos hongos tienen capacidades de producir altas cantidades de micotoxinas (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007; Scaglioni *et al*., 2012).

Estas micotoxinas afectan a la mayoría de los animales, en el caso de la T-2 especialmente a las aves, en pollos de engorde cuando son alimentados con niveles de 1 ppm de T-2 en su alimento balanceado se producen lesiones orales. La T-2 también provoca, necrosis de los tejidos linfoide, disminución del consumo de alimento balanceado, alteraciones en el cuadro sanguíneo y neurotoxicidad (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007; Scaglioni *et al.*, 2012).

Por otro lado DON tiene un comportamiento diferente en aves, las concentraciones toleradas de DON son mayores en comparación con T-2, estudios han evidenciado que su

toxicidad en aves no causan tantos lesiones como las demás micotoxinas, las lesiones encontradas son la reducción en los niveles de hemoglobina (Mallmann, Dilkin, *et al*., 2007).

2.2. Co ocurrencia, micotoxinas enmascaradas y emergentes.

La co ocurrencia de las micotoxinas puede darse al estar en presencia múltiple en los alimentos, esto sucede con frecuencia por la posibilidad de los hongos de producir diferentes micotoxinas. Para la elaboración de alimentos balanceados es necesario la combinación variada de materias primas, lo que aumenta la diversidad de micotoxinas que pueden estar presentes en la dieta animal (Kovalsky *et al*., 2016; Smith *et al.*, 2016).

Existen también las micotoxinas a las que se le une una proteína o carbohidrato a su estructura, conocidas como enmascaradas, logrando no ser identificadas en los análisis(Kovalsky *et al.*, 2016). DON-3-glucósido y ZEN-14-sulfato son ejemplos que se encuentran en este grupo, se conoce que el sulfato de ZEN-14-sulfato se hidroliza al ser consumido en los alimentos balanceados por los animales, dejando libre la zearalenona la cual tiene afectaciones negativas en los animales por ejemplo la repuesta estrogénica en cerdos. Este grupo se encuentra en constante investigación sobre la toxicidad que representa para la salud animal (Dall'Erta *et al*., 2013; Gareis *et al.*, 1990; Kovalsky *et al.*, 2016).

Las micotoxinas emergentes son metabolitos fúngicos que tienen estructuras químicas incomparables a las conocidas (Kovalsky *et al.*, 2016). Los metabolitos más conocidos producidos por *Fusarium* son enniatinas, moniliformina y beauvericina, *Aspergillus* produce, esterigmatocistina y emodina, *Penicillium*, ácido micofenólico y Alternaria, alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico*(Gruber-Dorninger et al.*, 2017; Kovalsky *et al.*, 2016). Existen estudios respecto a su toxicidad en su mayoría in vitro, los resultados obtenidos in vivo no han logrado llegar a sugerir efectos negativos por falta de evidencia(Dall'Erta *et al*., 2013; Fornelli *et al.*, 2004; Gruber-Dorninger *et al.*, 2017; Ivanova *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2007).

2.3. Métodos analíticos para micotoxinas

Conforme han pasado los años y se han generado requerimientos de calidad y límites reglamentarios para las micotoxinas se ha impulsado el desarrollo de métodos analíticos para la identificación y cuantificación de micotoxinas en alimentos, alimento balanceado para animales y matrices biológicas (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

Lo análisis requieren alto grado de exactitud, por lo que se usan métodos recomendados, como los métodos normalizados propuestos por la Organización Internacional para la Normalización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN) o los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) donde existen más de cincuenta métodos validados para la determinación de diversas micotoxinas en gran variedad de alimentos (Arroyo-Manzanares *et al*., 2014).

Existen actualmente muchos procedimientos analíticos diferentes, se tienen los métodos cromatográficos (cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía de gases (GC) con detección de captura de electrones (ECD) o detección selectiva masiva (MS), así como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con UV, detección de fluorescencia y espectrometría de masas, este método e ventajoso por su sensibilidad y selectividad, ya que ciertas micotoxinas (OTA, aflatoxinas) presentan fluorescencia nativa) (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014; Berger *et al.*, 1999). Todos estos análisis dependen de la validez de preparación de la muestra, extracción y tratamiento del extracto, y también tienen ventajas de velocidad, simplicidad y eficiencia (Krska, 1998).

La tecnología va avanzado estableciendo métodos que permitan la confirmación de los analitos que abarquen micotoxinas de diferentes familias, es decir métodos multi-micotoxinas (Latorre Fernández, 2017). Se han propuesto recientemente métodos para la determinación simultánea de 27 micotoxinas y otros metabolitos secundarios en maíz, 49 micotoxinas diferentes en una variedad de alimentos y 21 micotoxinas en alimentos infantiles utilizando HPLC-MS/MS (Arroyo-Manzanares *et al*., 2014).

Existen alternativas a las metodologías tradiciones, las metodologías moleculares como la PCR que amplifica a la vez el número de genes específicos de la especie y los genes estructurales o reguladores implicados en la biosíntesis de las micotoxinas han funcionado para detectar hongos micotoxigénicos en una diversidad de alimentos balanceados para animales (Ramana *et al*., 2011; Rashmi *et al.*, 2013).

Las micotoxinas pueden interactuar de forma simultánea en un mismo producto por lo que se han desarrollado métodos que permiten la determinación múltiple de micotoxinas. Normalmente el método mediante cromatografía liquida de alto rendimiento permiten el análisis de micotoxinas individuales, lo cual hace que se aumente el costo y el tiempo que se

debe invertir en la determinación de cada clase de micotoxina. La técnica HPLC-MS/MS se ha vuelto muy utilizada, sin embargo requiere de cuidado la preparación de una muestra multitoxina, la razón principal es la diversidad química de los analitos de la matriz que vaya ser analizada (Biselli & Hummert, 2005).

Existen otras pruebas de métodos de detección y cuantificación inmunológica, como ensayos de inmunoabsorbente (ELISA) o ensayos de radioinmunoanálisis (RIA), usualmente no requieren purificación de la muestra y son altamente específicos debido a los anticuerpos y su sensibilidad con las moléculas de micotoxinas, pero tienen la desventaja de determinar una sola toxina por prueba (Zheng *et al*., 2004). El ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas conocido como ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbed Assay) es una técnica basada en la formación específica de los complejos antígeno-anticuerpo, que concluye midiéndose a través de una reacción colorimétrica (Valderrama, 2017).

2.4. Micotoxinas en fábricas de alimentos balanceados

La producción mundial de alimentos balanceados en el 2014 fue de 964 millones de toneladas, el impacto de las micotoxinas en sectores industriales productores de alimentos balanceados es alto debido a lo agresivo de estas toxinas en la salud animal (Kovalsky *et al.*, 2016). Se ha descrito una variedad de materias primas y productos que son sensibles a micotoxinas. Los alimentos balanceados formulados actualmente contienen ingredientes como subproductos de animales, grasas vegetales y animales, antibióticos entre otros. La mayoría de estos productos antes mencionados son un buen sustrato para el desarrollo de hongos y producción de micotoxinas. Durante el proceso de fabricación, los cuidados establecidos para este problema son los almacenajes correctos de las materias primas, controlar las temperaturas dentro de los silos, monitoreo de actividad del agua, limpieza de los equipos para evitar el desarrollo de hongos filamentosos (Sapkota *et al.*, 2007).

2.4.1. Exposición de los alimentos balanceados en granjas

La mayoría de las granjas se han desarrollado en los últimos 60 años significativamente, adoptaron sistemas de operaciones a gran escala. Así mismo la formulación de los alimentos para animales se ha visto modificada para aportar alimentos definidos para aumentar las tasas de crecimiento y eficiencias de la conversión alimenticia (Sapkota *et al.*, 2007). Los sistemas de alimentación en las granjas, el manejo inadecuado a

granel, el almacenamiento que se le da a los alimentos balanceados pueden contribuir a la producción de hongos que en condiciones de estrés originen micotoxinas (Bryden, 2012).

Los principales metabólicos encontrados en el alimento que consumen los animales de granja son las fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona y deoxinivalenol. Los efectos de la micotoxinas en animales de granjas como cerdos o pollos son severos, la citotóxica y el amento de apoptosis son inducciones de estas toxinas (Figura 2) (C. Yang et al., 2020). Es por esta razón que el control microbiológico, la limpieza y desinfección en las granjas es fundamental para garantizar la protección de la salud animal, de los trabajadores y del consumir (BURBARELLI *et al.*, 2020; Cafarchia *et al*., 2014)

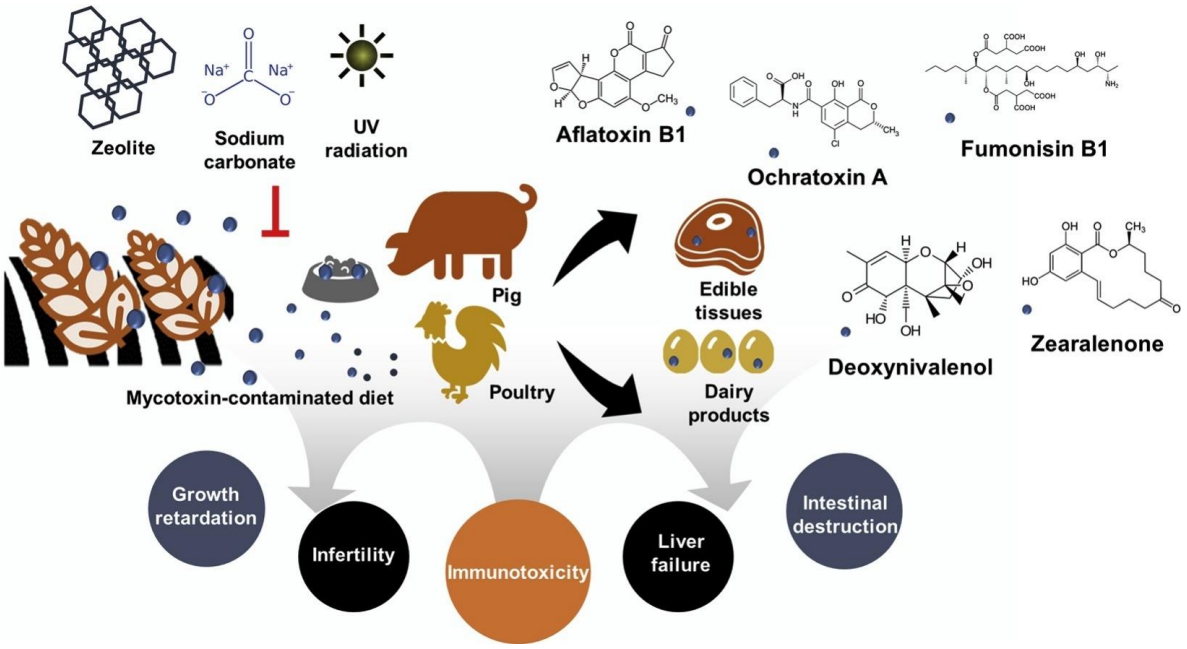


Figura 2. Principales micotoxinas que afectan a los animales de granja. Fuente: C. Yang et al., (2020)

2.5. Normativa regulatoria de micotoxinas

Según el estudio realizado por la FAO en el 2003, donde se describieron 99 países que tenía reglamentos para micotoxinas, en África, aunque no se desconoce del problema, la mayoría de los países no cuentan con reglamentos específicos para las micotoxinas, y reconocen tener inconvenientes que corresponden a estas toxinas. Asia y Oceanía cuentan con veintiséis países que tienen reglamentos específicos para micotoxinas, un 88% de la población, Europa posee 39 países, es decir un 99% de la población del continente que

contaban con reglamentos específicos para micotoxinas. En América del norte (Estados Unidos y Canadá), contaban con reglamentos desde hacía muchos años y se han implementado técnicas de muestreo y análisis avanzados (FAO, 2003).

Aflatoxina, ocratoxina a, zearalenona, fumonisina y deoxinivalenol están regulados por la Comisión Europea para alimentos balanceados para animales, mientras que para alimentos humanos además de las micotoxinas antes mencionadas, tiene niveles máximos permitidos para patulina y citrina. La FDA cuenta con regulaciones para alimentos animales, pero solamente para aflatoxina, fumonisina, deoxinivalenol (Smith *et al.*, 2016).

En América Latina y América del Sur, se cultivan productos agrícolas muy susceptibles a las micotoxinas (maíz, trigo, café, algodón, soya, cebada, girasol, maníes y nueces de árbol, cocoa y lácteos), 19 países de ambos sectores tenían reglamentos en el 2003 para micotoxinas, lo que representa el 91 por ciento de la población de la región. Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay son de los países perteneciente a MERCOSUR, una integración regional que cuenta con reglamentaciones específicas sobre micotoxinas, otros países indicaron seguir este reglamento (FAO, 2003).

Costa Rica tiene una legislación respecto al manejo, fabricación, venta y distribución de los alimentos balanceados, esta legislación comprende la Ley General del Servicio Nacional de Salud Animal No 8495, Ley para el Control de la Elaboración y Expendio de Alimentos para Animales No 6883, el Decreto ejecutivo 16899 del MAG junto con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) (Miranda, 2012). Sin embargo, la única excepción entre los niveles máximos permitidos de micotoxinas es para Aflatoxina M (Whitaker, 2006).

2.6. Control de micotoxinas

Las micotoxinas al ser un grupo de metabolitos secundarios con alta toxicidad son un riesgo para la salud humana y animal, por ello se han desarrollado métodos para controlar la contaminación que provocan. Existe el control pre recolección, el cual trata de mitigar las condiciones de estrés en la fábrica, también se da control de insectos por medio de pesticidas para evitar que por su casusa se facilite el crecimiento de hongos (Sanchis *et al*., 2000).

El control post recolección es la prevención efectuada en el almacenamiento para evitar que factores como temperatura, actividad del agua, atmosfera, favorezcan el desarrollo de hongos que produzcan micotoxinas. En este control se aplican métodos físicos y químicos para descontaminar los alimentos, la FAO estipula las siguientes condiciones que debe cumplir un proceso como estos; debe destruir, inactivar o eliminar las micotoxinas, no producir residuos tóxicos, retener el valor nutritivo y aceptabilidad del producto, no alterar las propiedades tecnológicas del producto, destruir el micelio y esporas fúngicas, ser respetuoso con el medio ambiente (Sanchis *et al.*, 2000; Widstrom *et al.*, 1995).

La biotecnología es una de las herramientas más utilizadas en la actualidad para controlar micotoxinas, se trabaja con la modificación a fábricas huésped para el incremento de la resistencia contra la contaminación generada por micotoxinas. Otra de las aplicaciones biotecnológicas son los mecanismos moleculares y bioquímicos que intervienen al hongo para que no produzca micotoxinas. También se aplican los agentes biocompetitivos, esto quiere decir que se hace una modificación a los microrganismos que son competidores de hongos micotoxigénicos (Sanchis *et al*., 2000).

Existen métodos biológicos, químicos, físicos y la aplicación de secuestrante para limitar los efectos de las micotoxinas. Los secuestrantes son polímeros de gran peso molecular orgánicos u inorgánicos, funcionan cuando se añaden al alimento formando complejos irreversibles con las micotoxinas, disminuyendo su absorción en el intestino para luego ser excretados en las heces. El resultado final que se espera utilizando secuestrante es una reducción del nivel de micotoxina en la sangre, logrando disminuir los efectos que estas provocan en el animal cuando recibe un alimento contaminado (Pan *et al.*, 2016).

Los secuestrantes se activan al ponerse en contacto con los jugos gastricos, forman complejos insolubles y estables con las micotoxinas, permitiendo que no haya absorcion en el tracto gastrointestinal. Entre los secuestrantes organicos se encuentran los glucomananos esterificados (EGM) y un segundo tipo denominado multimodular (MM) y entre los inorgánicos se encuentran los alúmino silicatos hidratados de calcio y sodio (HSCAS), estos son básicamente arcillas de aluminio y silicato. Los HSCAS contienen además otros minerales en arreglos tridimensionales, formando estructuras con alta

porosidad y superficie de contacto, designadas aluminosilicatos (González, Martínez, Morales, & Ordónez, 2009; Pan *et al*., 2016).

Los glucomananos esterificados (EGM) son obtenidos a partir de la esterilización de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Funcionan atrapando las micotoxinas atrapadas en la matriz del glucomannano en el tracto gastrointestinal, lo que impediría su posterior absorción. El multimodulador (MM) es un secuestrante compuesto por minerales que actúan en la absorción selectiva y estable de aflatoxinas y fumonisinas cuando se dan condiciones de pH ácido. Mientras que la fracción biológica se compone de enzimas con la capacidad de inactivación de micotoxinas poco polares (toxinas producidas por Fusarium), funcionan degradando grupos funcionales e hidrolizando enlaces éster, lo cual inactiva los metabolitos y los hace no toxico por biotransformación (Pan *et al*., 2016; Raju & Devegowda, 2000; Yiannikouris *et al.*, 2004).

Además de los métodos antes mencionados, existen herramientas que nos ayudan a llevar un control para aminorar los efectos que las micotoxinas causan en los animales, Alltech es una empresa que ha desarrollado Alltech® PROTECT ™ Calculator, software que estima la cantidad de riesgo equivalente RQE (siglas en ingles) según la interacción de las micotoxinas en un alimento, permitiendo a sus clientes crear y mantener un efectivo programa de gestion (Alltech, 2016).

2.7. Las micotoxinas en alimentos balanceados como riesgo para la salud humana

La manifestación humana a micotoxinas se identifica por el consumo de cereales y granos contaminados los cuales son ingeridos de forma directa, esto provoca efectos nefrotóxicos en la salud, efectos cancerígenos e inmunosupresores. Desde 1999, se reconocía por los investigadores de la División de Epidemiología y Vigilancia del USDA la inquietud sobre la ingestión de productos alimenticios a base de animales contaminados por micotoxinas. Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen los efectos en la salud por consumo de leche, carne y huevos, originarios de alimentos balanceados expuestos a micotoxinas en la producción animal que hayan sido analizados directamente de las personas. La evaluación generada para ver la exposición a micotoxinas usualmente se basa en análisis a los datos de población sobre el consumo de alimentos (Heyndrickx *et al*., 2015; Orriss, 1997; Sapkota *et al*., 2007).

Los efectos inmunológicos de las micotoxinas (deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon-X, toxina T-2, zearalenona, α-zearalenol, β-zearalenol y nivalenol) producidas por Fusarium se probaron en células mononucleares de sangre periférica humana de diferentes donantes de sangre. Entre las ocho micotoxinas analizadas, la toxina T-2, fusarenon X, nivalenol y deoxinivalenol ejercen el mayor efecto inmunosupresor en células mononucleares de sangre periférica humana in vitro. Se manifestó la inmunosupresión inducida por micotoxinas como actividad deprimida de linfocitos T o B (Berek *et al*., 2001).

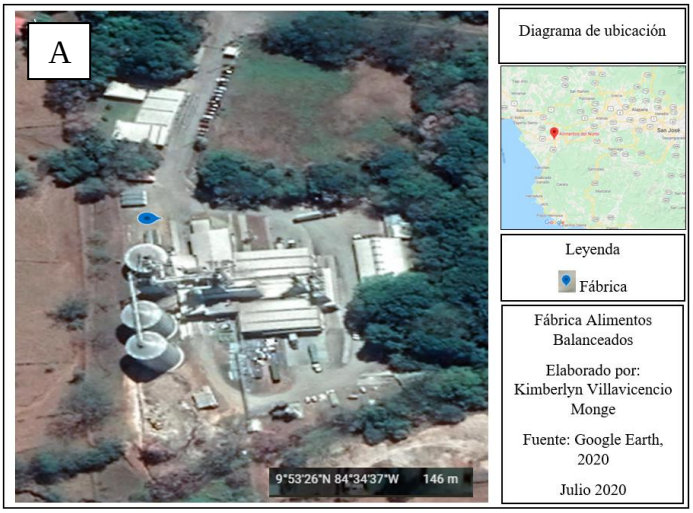
Los efectos de las micotoxinas producidas por Fusarium son diferentes según la edad del huésped y la dosis y duración de exposición, afectando el sistema inmune atravesando el epitelio intestinal y alcanzando el compartimiento sistémico. Además estas micotoxinas logran alterar el metabolismo de los patógenos, lo que puede resultar en la alteración de la enfermedad infecciosa (Antonissen *et al.*, 2014).

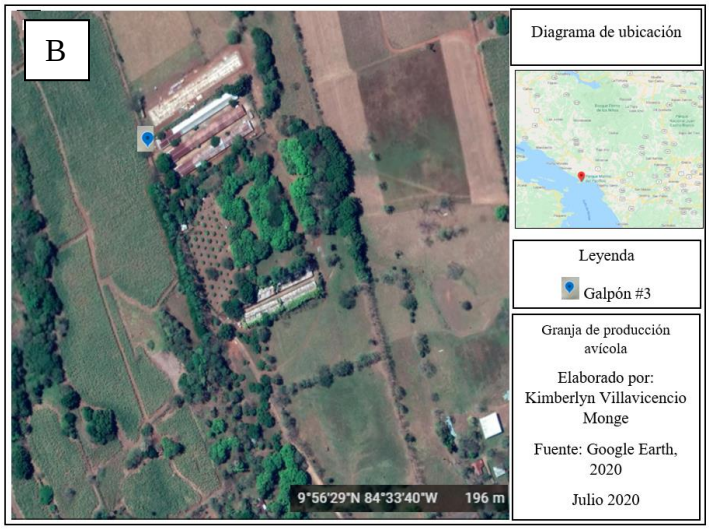
Los tricotecenos (principalmente deoxinivalenol o DON) y ocratoxinas (principalmente ocratoxina A u OTA) poseen las actividades enteropatógenas mejor caracterizadas en humanos, son conocidos los efectos de alteración en las funciones del intestino, lo que conduce a diarreas, vómitos, mala absorción, inflamación intestinal in vivo (Maresca *et al.*, 2008).

3. Marco Metodológico

El estudio se realizó en: una fábrica comercial e integrada de alimentos balanceados para animales localizada en Orotina, Alajuela, Costa Rica (Figura 3.a), una granja de producción avícola localizada en Higuito, San Mateo, Costa Rica y una fábrica de procesamiento en Ciruelas, Alajuela, Costa Rica (Figura 3.b). El recuento de mohos y levaduras y la determinación de las micotoxinas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad Industrial Pecuaria de la Corporación Multi Inversiones,

encargada de elaborar los alimentos para animales y comercializarlos bajo la marca ALIANSA®. La determinación de las lesiones en pollos se realizó *in situ* en la fábrica de procesamiento (Figura 3.c).





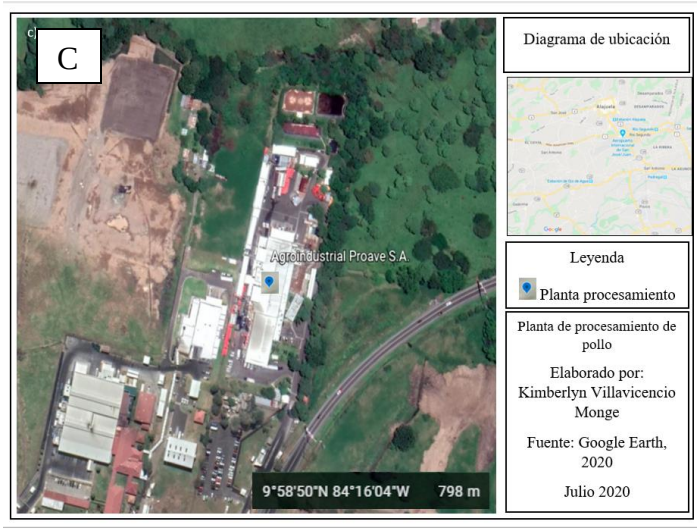


Figura 3. Sitios de muestreo, a) Fábrica de alimentos balanceados, b) Granja de producción avícola y c) Fábrica de procesamiento.

3.1. Determinación de mohos y levaduras y micotoxinas

3.1.1. Muestreo en fábrica de producción de alimentos balanceados

De las principales materias primas utilizadas para la elaboración de los alimentos balanceados se recolectaron 7 muestras de maíz y 6 de harina de soya. Las muestras de los diferentes alimentos balanceados se recolectaron antes de ser despachados a la granja de producción avícola: 1 muestra del alimento Fase I, 4 del alimento Fase II y 8 del alimento Fase III. Las muestras para la determinación de mohos y levaduras se recolectaron de forma aséptica y aleatoria para obtener una muestra compuesta de 1 kg (10-20 submuestras). Para la determinación de micotoxinas se recolectaron entre 20-30 submuestras, obteniendo una muestra compuesta de 5 kg.

3.1.2. Muestreo en granja de producción avícola

Se recolectaron muestras diarias de los alimentos balanceados durante los 31 días del uso en granja, directamente de los comederos ubicados en los galpones. Los alimentos balanceados, Fase I, Fase II y Fase III, se suministraron de forma sucesiva durante 7, 8 y 16 días, respectivamente. Para el recuento de mohos y levaduras se recolectaron entre 10 y 20 sub muestras de forma aséptica y aleatoria en diferentes sitios de los galpones para generar una muestra compuesta de 2.5 kg, aproximadamente. Para la determinación de micotoxinas se recolectaron aleatoriamente 180 sub muestras de 50 g c/u del 50% de los comederos, obteniendo una muestra compuesta de 9 kg.

3.2. Procesamiento de muestras

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio y se almacenaron a 21 °C protegidas de la luz solar hasta ser procesadas (menos de 24 h para la determinación de mohos y levaduras y de 1-6 días para la determinación de las micotoxinas). Las muestras para mohos y levaduras recolectadas en la fábrica y en la granja fueron homogenizadas manualmente y divididas en dos sub muestras de 25 g. Las muestras compuestas para determinación de micotoxinas se homogenizaron mediante un divisor de muestras de ranuras múltiples tipo Rifle para obtener una muestra de 3 kg la cual fue molida para el proceso de extracción y detección de los metabolitos.

3.3. Determinación de mohos y levaduras en materias primas y alimentos balanceados.

El recuento de mohos y levaduras se determinó con base en la metodología descrita en AOA AOAC Official Method 2014.05 (Bird et al., 2015), utilizando el sistema de Placa 3M® Petrifilm® (3M, 2006). Veinticinco gramos de cada una de las muestras se disolvieron en 225 mL de agua peptonada (APE 0.1%) y se homogenizó por 30 s con un Smasher®. A partir de esta solución se prepararon diluciones seriadas en APE (FD= 10) hasta 10^{-9}. De cada dilución se inoculó por separado 1 mL en Placas 3M® Petrifilm® rápida para recuento de mohos y levaduras.

Las placas se incubaron a 28 °C ± 1.0 °C por 48 h ± 2 h. Luego del periodo de incubación, se realizó el recuento de mohos y levaduras. La diferenciación entre las colonias se realizó de acuerdo a las siguientes características: colonias pequeñas con bordes definidos de color canela rosado a verde azulado, con apariencia tridimensional y color uniforme correspondieron a levaduras, colonias grandes centro oscuro con bordes difusos de color verde correspondieron a mohos. El límite establecido por la fábrica para mohos y levaduras en las materias primas y los productos terminados (alimentos balanceados) fue de 1.0×10^5 UFC/mL.

3.4. Determinación de micotoxinas en materias primas y producto terminado del alimento balanceado.

La cuantificación de las micotoxinas: aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina, T-2 y zearalenona, en las muestras de materias primas y alimentos balanceados,

se realizó con base en la metodología descrita por el fabricante del kit Veratox® (Neogen® Corporation, 2008, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2015c), muestreo conforme a las especificaciones de Washington (2016) y (Whitaker, 2006).

Para cada determinación se realizó la preparación, molido (solo para maíz entero) y extracción de la muestra utilizando un divisor de muestras de ranuras múltiples tipo Rifle y el molino Stein Mill M2. La extracción de las muestras se realizó de la siguiente manera: para ocratoxina se utilizó 10 g con 40 mL de metanol al 50%, para aflatoxina, fumonisina, T-2 y zearalenona se utilizó 5 g con 25 mL de metanol al 70% y para deoxinivalenol se utilizó 50 g con 250 mL de agua destilada y se homogeneizó con un agitador magnético por 5 min para ocratoxina y 3 min para aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, T-2 y zearalenona. El extracto se filtró a través de un papel filtro Whatman® #1 y se ajustó el pH en el ámbito de 6-8.

Después de obtener el extracto de la muestra, se procedió a realizar el ensayo de enzimoinmunoanálisis de absorción (ELISA) utilizando los kits Veratox® de la marca Neogen®. El ensayo permitió obtener concentraciones de las micotoxinas en partes por billón (ppb).

En cada pozo mezclador, se dispensaron 100 µL del conjugado y, seguidamente, 100 µL de controles y muestras en los pozos mezcladores correspondientes. El líquido en los pozos se mezcló tres veces utilizando una micropipeta multicanal.

Posteriormente, se transfirió 100 µL de cada muestra a los pozos con anticuerpos, se mezcló deslizando el porta pozos rápidamente en una superficie plana y se incubó a temperatura ambiente por 2 min para aflatoxina, 10 min para ocratoxina y 5 min para fumonisina, deoxinivalenol, T-2 y zearalenona. Luego del período de incubación, se removió el líquido de los pozos y se les realizó 5 lavados con agua destilada. Una vez secos los pozos, se les transfirió 100 µL del reactivo sustrato, se mezcló deslizándolos sutilmente en una superficie plana y se incubó por 3 min para aflatoxina, 10 min para fumonisina y ocratoxina y 5 min para deoxinivalenol, T-2 y zearalenona.

Seguidamente, se transfirió 100 µL de la solución interruptora en cada pozo y se mezcló sobre una superficie plana. La lectura de las densidades ópticas se realizó a 650 nm

en un lector de microplacas ELx800 marca Bio-Tek®. La concentración de cada micotoxina se calculó a partir de las densidades ópticas registradas utilizando el software de Veratox® (Versión 2.3.3).

Los niveles máximos de micotoxinas permitidos en materias primas y alimentos balanceados establecidos por la fábrica se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Niveles máximos de micotoxinas permitidos en materias primas y productos terminados establecidos por la fábrica de alimentos balanceados.

Micotoxina	Límite materia prima (ppb)	Límite producto terminado (ppb)
Aflatoxina	20	15
Deoxinivalenol	5 000	4 000
Fumonisina	50 000	50 000
Ocratoxina	10	10
T-2	60	20
Zearalenona	200	150

3.5. Cantidad equivalente de riesgo (REQ)

Con los resultados de micotoxinas obtenidos en materias primas y alimentos balanceados se calculó mediante el software Alltech® DIET™ Estimator, la cantidad equivalente de riesgo (REQ) por semana durante los 31 días de investigación, con el fin de estimar el riesgo potencial resultante de la combinación de todas las micotoxinas determinadas (Alltech®, 2020). Para la interacción de las materias primas analizadas en fabrica (maíz, harina de soya) se tomaron los resultados de las seis micotoxinas analizadas (ocratoxina, aflatoxina, fumonisina, zearalenona T-2 y deoxinivalenol) de ambas materias primas y se generó un análisis de cantidad equivalente de riesgo (REQ) por semana. Lo

mismo se realizó con los alimentos balanceados, según el lugar (fabrica, granja avícola) y el tipo de alimento (fase I, fase II y fase III).

3.6. Caracterización de los efectos de las micotoxinas en la cadena productiva avícola.

3.6.1. Muestreo y diagnóstico en fábrica de procesamiento de pollos

Se muestrearon aleatoriamente 400 pollos de un lote de 21 000 aves. A cada pollo se le analizó visualmente la cavidad oral, hígado, molleja, pechuga y el muslo con base en Moran *et al*., (1982), con algunas modificaciones, y la colaboración de un especialista ingeniero en zootecnia, para realizar un diagnóstico cualitativo de lesiones presentes en estos órganos que podrían estar asociados al consumo de micotoxinas en el alimento balanceado. Para cada órgano o estructura, se registró la cantidad de pollos que presentaron lesiones asociadas al consumo de micotoxinas, utilizando la siguiente escala: 0, sin lesión y 1, lesionado.

4. Resultados

Los recuentos de mohos y levaduras realizados a las materias primas con las que se producen los alimentos balanceados mostraron concentraciones menores a los límites establecidos en la fábrica, exceptuando dos determinaciones en maíz, sin embargo, el promedio se encontró por debajo del límite (Figura 4).

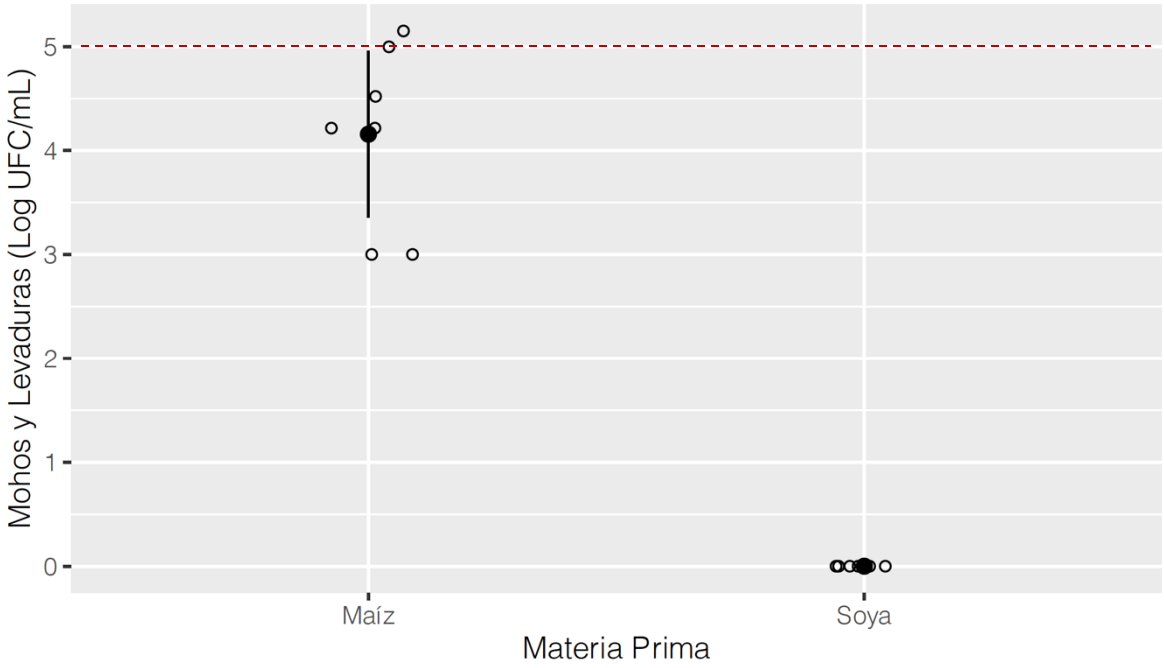


Figura 4. Recuento de mohos y levaduras en materias primas de alimentos balanceados para pollos de engorde.

El promedio de las determinaciones de mohos y levaduras para cada tipo de alimento balanceado fue mayor, en un orden de magnitud, durante el almacenamiento y uso en granja que durante su producción en fábrica. Los promedios de las concentraciones de mohos y levaduras en los 3 tipos de alimentos balanceados en fábrica no superaron el límite establecido por la empresa, mientras que en granja, los 3 tipos de alimentos balanceados sobrepasaron la concentración de 1.0×10^5 UFC/mL (Figura 5).

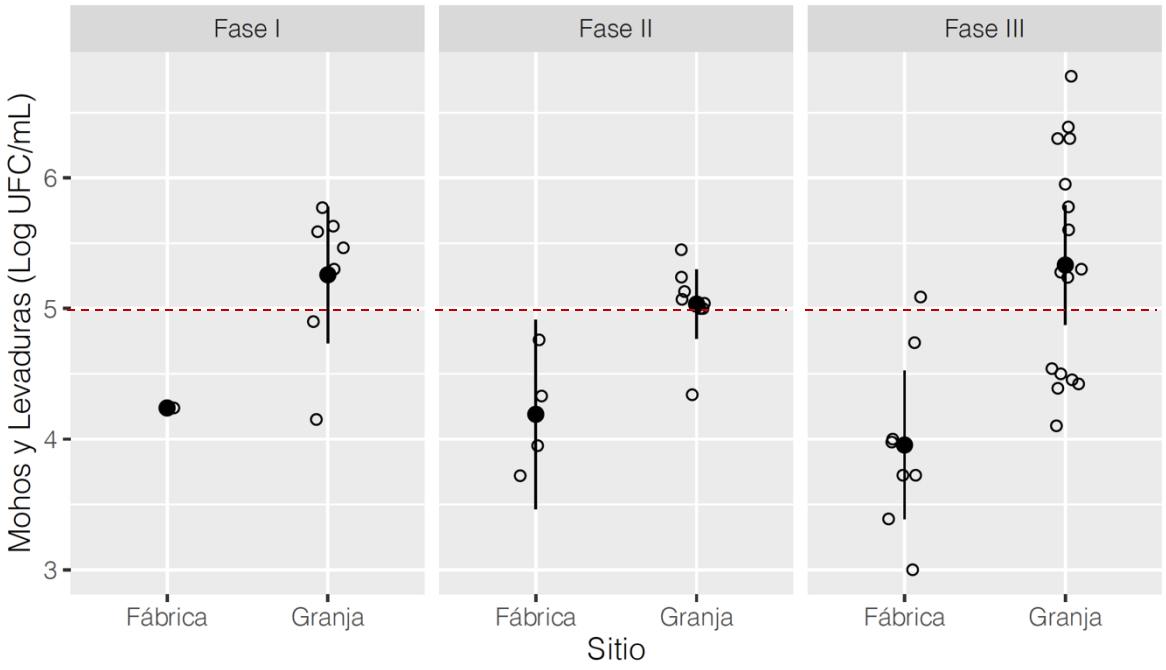


Figura 5. Recuento de mohos y levaduras en los alimentos balanceados para pollos de engorde en su producción en fabrica y almacenamiento en granja avícola.

En la figura 6 se muestra el recuento diario de mohos y levaduras de los alimentos balanceados suministrados durante el periodo de vida de los pollos en granja. La mayoría de las determinaciones de los alimentos balanceados, fase I, fase II y fase III, superaron el límite establecido por la fábrica. Los mayores recuentos se registraron durante los últimos 6 días, evidenciando alta prevalencia e incremento de mohos y levaduras durante el almacenaje y uso del alimento balanceado en granja

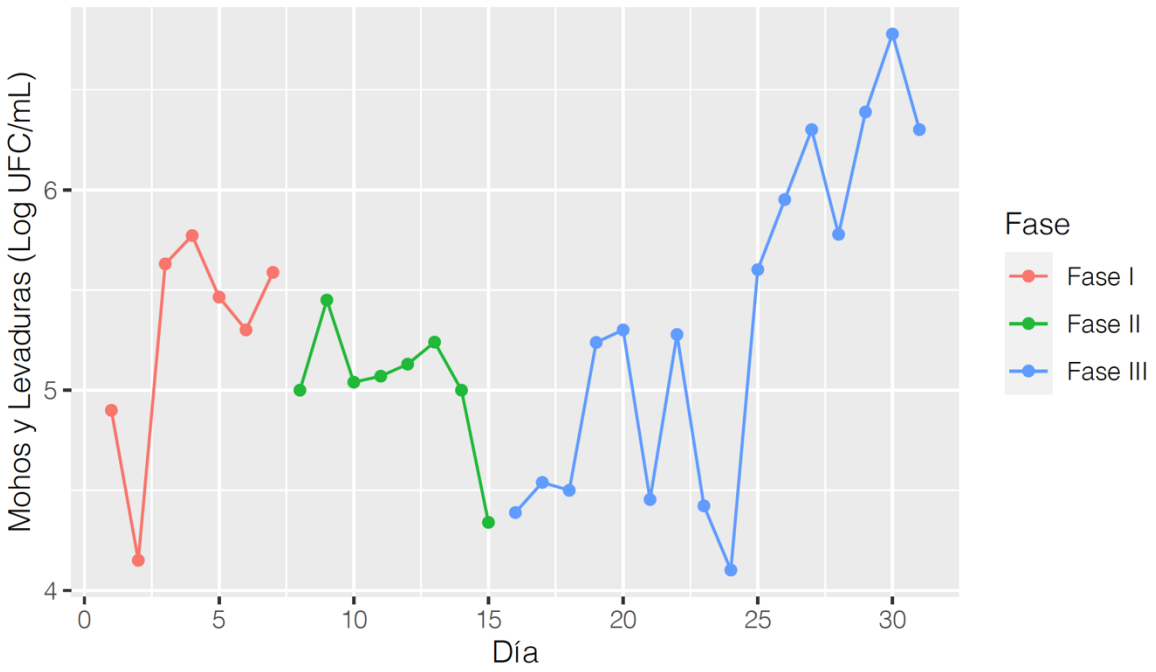


Figura 6. Recuento de mohos y levaduras en los alimentos balanceados, Fase I, Fase II. Y Fase III, suministrados en granja a los pollos de engorde.

Las determinaciones de las micotoxinas analizadas en maíz y harina de soya presentaron, para todos los casos, valores por debajo de los límites establecidos para materias primas en la fábrica de alimentos balanceados (Figura 7).

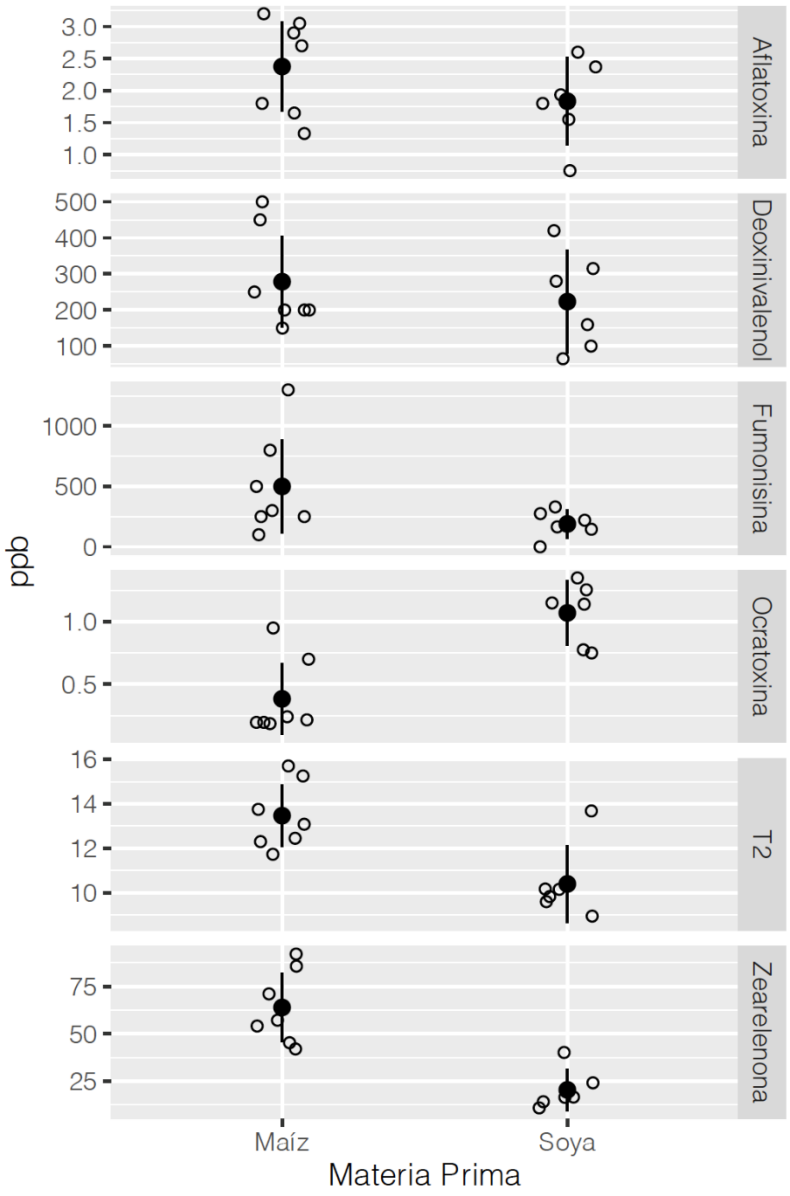


Figura 7. Determinación de micotoxinas en las materias primas utilizadas durante la producción en fábrica de alimento balanceado para pollos de engorde.

Las determinaciones de aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina y zearalenona realizadas durante la producción de los alimentos balanceados, mostraron valores por debajo de los límites establecidos en la empresa. Solo el 37.5% de las muestras determinadas durante la producción del alimento balanceado Fase III, presentaron valores de T-2 sobre el límite permitido, con máximos de 27.91 ppb. Las determinaciones realizadas en granja, mostraron el mismo comportamiento, siendo T-2 la única micotoxina con concentraciones mayores a los límites establecidos. En granja, los tres alimentos balanceados

presentaron valores de T-2 superiores a los 20 ppb. El 28.5% de las muestras recolectadas en granja del alimento Fase I, 13% del alimento Fase II y 81% del alimento Fase III, presentaron valores de T-2 sobre el límite establecido, con máximos promedio de 26.6, 21.9 y 29.3 ppb, respectivamente (Figura 8).

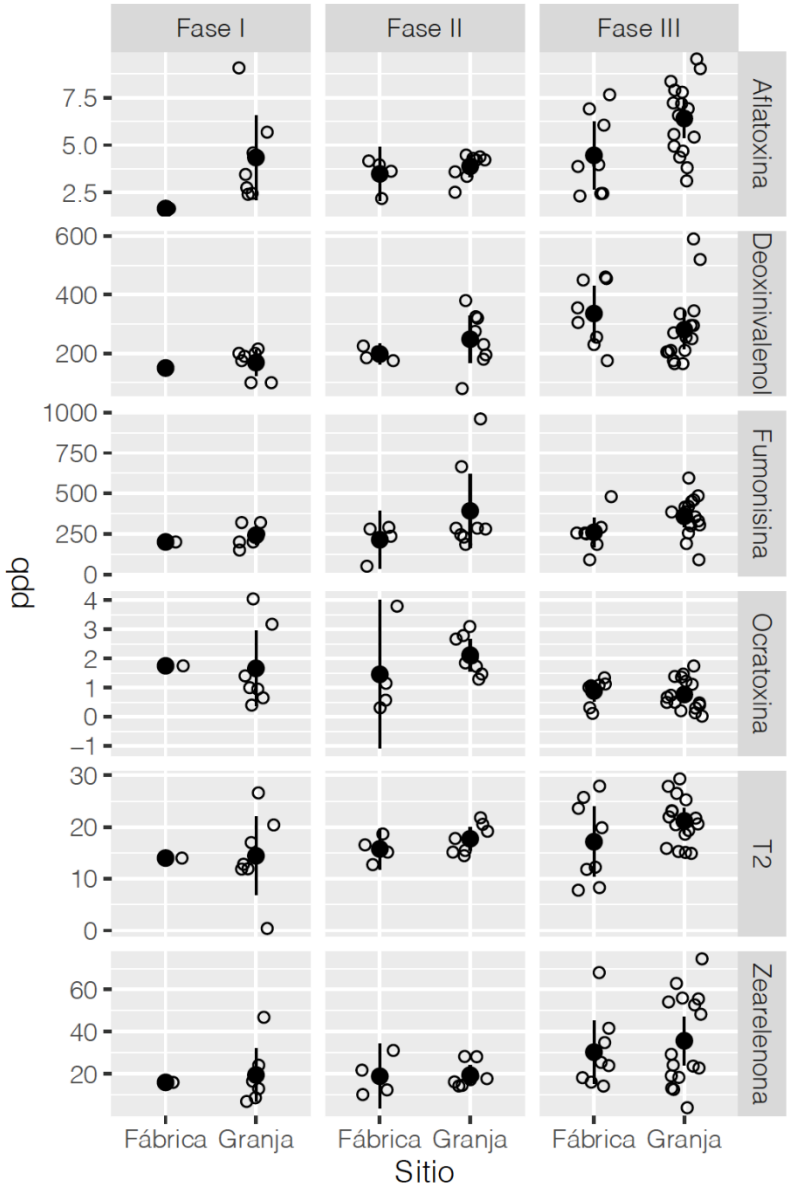


Figura 8. Concentración de micotoxinas en los alimentos balanceados en fábrica y granja de producción avícola.

Respecto a la cantidad de riesgo equivalente (REQ) para la interacción de las micotoxinas en maíz y harina de soya determinado a través del software Alltech® Total Diet

Mycotoxin Estimator indicó un REQ menor para las semanas 1, 2, 3 y 5. Mientras que para la semana 4 se presenta una advertencia leve en su interacción (Figura 9).

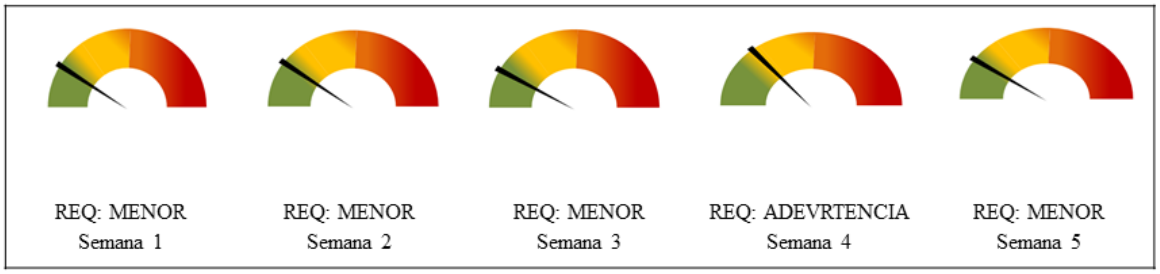


Figura 9. Cantidad equivalente de riesgo (REQ) de la interacción de las micotoxinas determinadas en maíz y harina de soya durante las 5 semanas evaluadas.

Para el alimento balanceado Fase 1, el Total Diet Mycotoxin Estimator muestra un REQ menor para la semana 1 en fábrica, mientras que en granja para la semana 1 y 2 reveló un RQE de advertencia. Para los alimentos balanceados Fase II y Fase III, la cantidad equivalente de riesgo calculada mostró advertencia tanto en fábrica como en granja a partir de la semana 2 hasta la 5. Sin embargo, en los REQ en granja el indicador se desplazó más hacia la zona de riesgo (Figura 10).

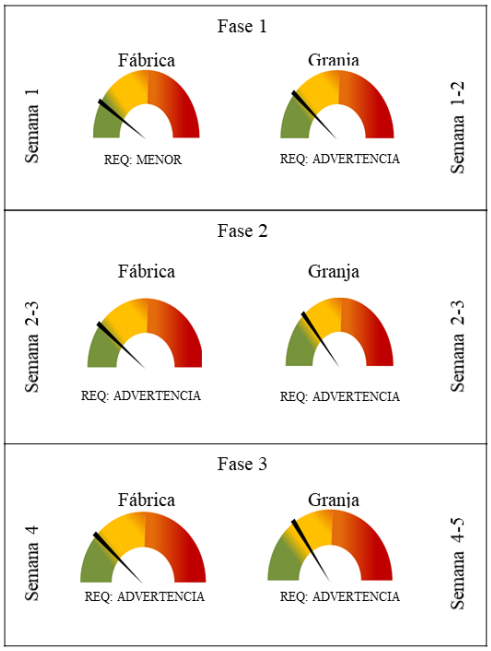


Figura 10. Cantidad equivalente de riesgo (REQ) de la interacción de las micotoxinas determinadas en los alimentos balanceados durante las 5 semanas evaluadas.

La caracterización de los efectos de las micotoxinas en la cadena de producción avícola, con base en la determinación cualitativa de lesiones en diferentes órganos de los pollos demostró que el muslo fue el órgano en el que se encontró mayor cambio morfológico (Figura 11), mostrando derrames vasculares epidérmicos, conocidos como petequias (Figura 12).

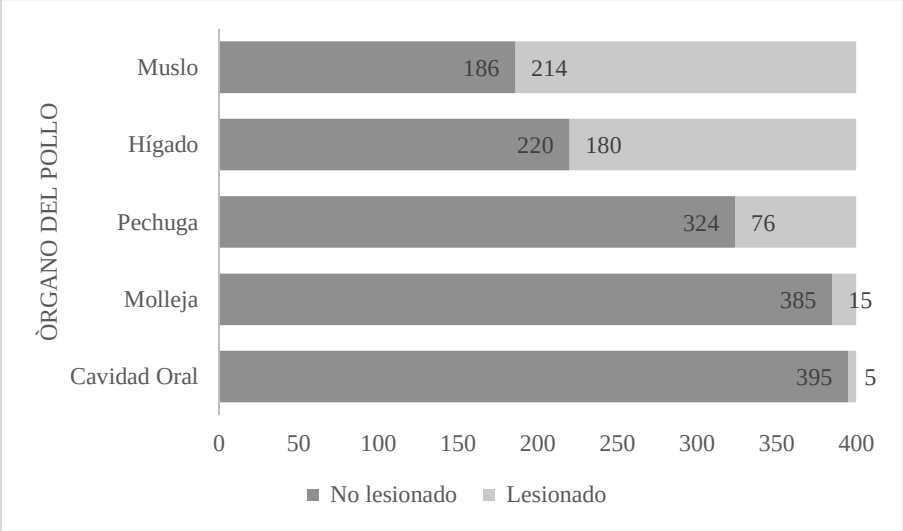


Figura 11. Prevalencia de lesiones en diferentes órganos de los pollos de engorde en planta de procesamiento.

El muslo y la pechuga mostraron daño epidérmico. En hígado se presentó cambio en la coloración, se encontraron hígados pálidos, amarillentos, con hematomas difundidos por todo el órgano. La cavidad oral mostró ulceraciones en lengua, mientras que las mollejas lesionadas mostraron erosiones en la cutícula e hiperpigmentación leve en cutícula (Figura 12).

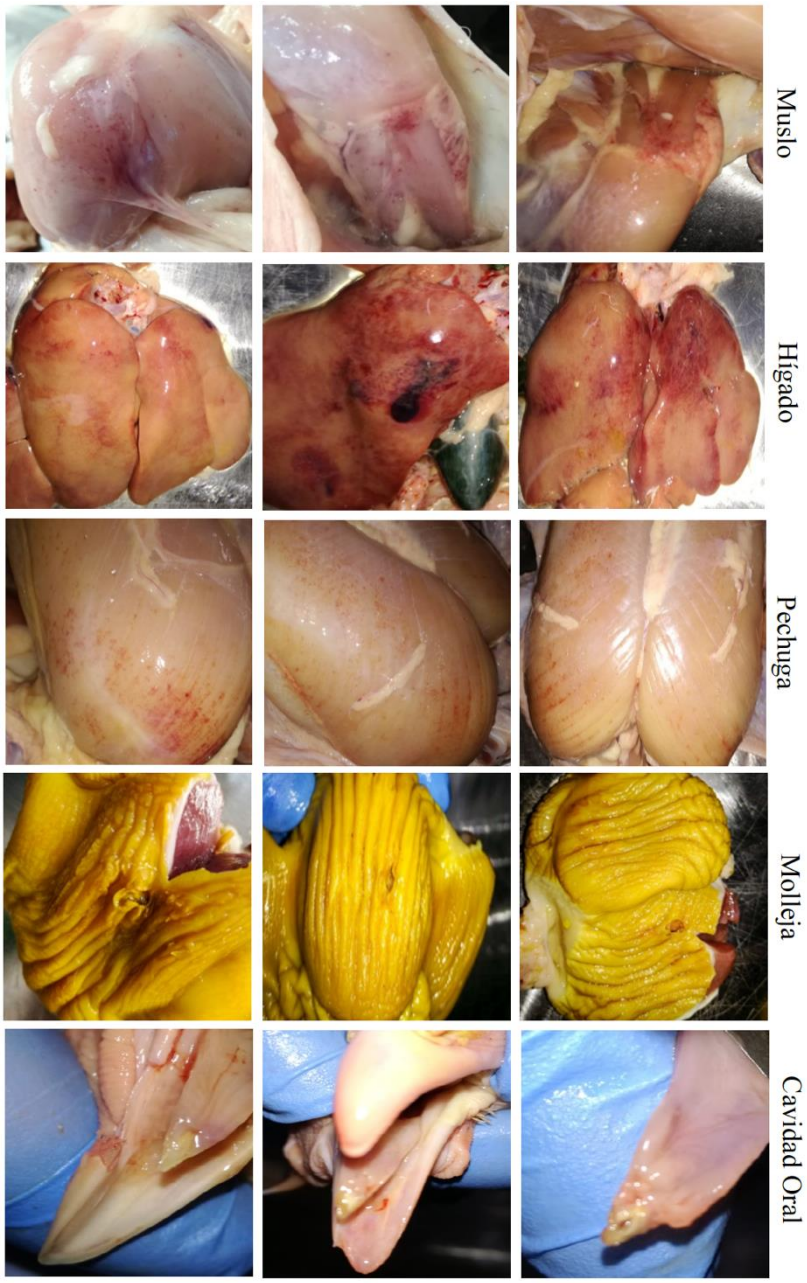


Figura 12. Cambios morfológicos o lesiones en órganos del pollo.

5. Discusión

La industria avícola tiene una extensión al mercado nacional e internacional de suma importancia. Actualmente, los mercados son cada vez más competitivos y las industrias deben adaptarse a altos estándares. Por esta razón, la industria avícola debe implementar el aseguramiento de la calidad desde la compra de granos como el maíz y la harina de soya hasta el nivel nutricional de los alimentos balanceados fabricados para pollos de engorde (De Oliveira *et al*., 2018; Leinonen & Kyriazakis, 2016)

La presencia de hongos en el alimento balanceado aumenta la probabilidad de que se encuentren micotoxinas representando un riesgo para la calidad del producto y para la salud humana y animal, considerándose un obstáculo significativo en la economía avícola (De Oliveira *et al.*, 2018; Drastig *et al.*, 2016). Con base en los resultados obtenidos, las materias primas y los alimentos balanceados analizados en fabrica, presentaron concentraciones de mohos y levaduras menores a los límites establecidos. Las determinaciones son consistentes con los valores reportados por otros autores en diferentes alimentos balanceados, quienes han registrado que estos microorganismos están presentes en la dietas para aves con un nivel promedio entre 10^1-10^4 UFC / g (Greco *et al*., 2014; Jamroz D & Kubizna, 2011; Labuda & Tancinová, 2006; Pavlovic *et al*., 2019).

Los programas de limpieza y desinfección son claves en el control de enfermedades en granjas avícolas y contribuyen a la reducción en la prevalencia de infecciones (Gosling, 2018). Los resultados mostraron un incremento en el recuento de mohos y levaduras en los alimentos balanceados durante su uso en granja, respecto a su producción en fábrica. Además, se registró el aumento de mohos y levaduras en los alimentos balanceados conforme avanza su tiempo en granja, especialmente en el alimento Fase III, administrado a los pollos en los últimos días del ciclo de engorde. (Cegielska-Radziejewska, Stuper, et al., 2013; Ghaemmaghami et al., 2018) reportaron resultados similares, donde los alimentos finalizadores para pollos de engorde mostraron mayores recuentos de mohos y levaduras (Cegielska-Radziejewska, Stuper, *et al.*, 2013; Ghaemmaghami *et al.*, 2018).

El aumento en la concentración de mohos y levaduras en el alimento Fase III, podría corresponder a su composición nutricional, ya que su contenido de harina de soya disminuye y aumenta el porcentaje de otros ingredientes como el maíz, materia prima que, generalmente, presenta mayor contenido de mohos y levaduras respecto a la harina de soya (Khodaei *et al.,* 2021). Los recuentos de mohos y levaduras determinados en granja son similares a los reportados por otros estudios (Dalcero *et al*., 1998; Shareef, 2010).

Con base en los resultados obtenidos y considerando que algunos hongos son agentes de riesgo por la capacidad de producir micotoxinas en cualquier etapa de la cadena de producción de alimentos balanceados para animales, desde las cosechas de los granos utilizados como materia prima hasta el almacenamiento en las granjas avícolas, se genera una necesidad de vigilancia para prevenir la aparición de mohos en los alimentos balanceados y, posteriormente, la producción de metabolitos secundarios mediante planes de bioseguridad y monitoreo (Lopes *et al.*, 2006; Thie Iamanaka *et al.,* 2013).

El crecimiento de mohos en alimentos balanceados durante su almacenamiento en granjas podría aumentar el riesgo potencial de micotoxicosis (Shareef, 2010). Un análisis realizado en los años 90, concluyó que alrededor de la mitad de los productos que se elaboraban a nivel mundial estaban contaminados por micotoxinas y que en los países en desarrollo la problemática era aún más grave, ya que son productores que exportan la mejor calidad y son consumidores de productos de calidad inferior. Lo cual generaba un riesgo para la salud humana y animal de los consumidores (De Oliveira *et al.*, 2018).

La prevalencia de las micotoxinas estudiadas en el maíz y la harina de soya fue del 98%, sin embargo, las concentraciones toxicológicas fueron bajas. El control de calidad en las importaciones de las materias primas consignadas para alimentos de consumo humano y animal, la certificación de análisis de micotoxinas en su mayoría valoradas en este estudio y las auditorías a nivel nacional realizadas para el monitoreo de las buenas prácticas de manufactura en fábricas de alimento balanceado para animales, podría corresponder con los resultados obtenidos en nuestro estudio para las materias primas (Codex Alimentarius, 2014; Andrea Molina *et al*., 2019). Además, existe asociación con los resultados del REQ, los cuales mostraron riesgo menor para la mayoría de las semanas respecto a la interacción de las micotoxinas determinadas en las materias primas.

El maíz y la harina de soya se utilizan en altos porcentajes en las formulaciones nutricionales de los alimentos balanceados para pollos de engorde (Erdaw *et al*., 2016; Frempong *et al*., 2019; Islam *et al.*, 2015; Saki *et al.*, 2012; Sun *et al*., 2012). El maíz importado en Costa Rica tiene una calidad específica para su función como consumo animal, clasificado como maíz de grado 2 o 3, con características como granos agrietados que potencialmente puede generar una mayor propagación de hongos, lo cual implica que con otros agentes externos como la humedad y la actividad de agua, así como el incumplimiento de las buenas prácticas de manufactura, podrían llegar a generar problemas toxicológicos en el producto final (Islam *et al*., 2015; Molina *et al.*, 2019).

Un estudio sobre el contenido natural de las micotoxinas en el alimento balanceado para una granja avícola en Brasil reportó concentraciones de aflatoxinas <6 ppb (Rossi *et al.*, 2013), valores similares a las determinaciones obtenidas en el alimento balanceado producido en la fábrica de alimentos balanceados en Costa Rica. Así mismo se encuentran cerca del rango detectado de <3.43 ppb de aflatoxinas en alimento balanceado para aves determinado mediante metodologías de HPLC y ELISA en Guyana *(*Morrison *et al.*, 2017).

La presencia de aflatoxinas provoca susceptibilidad de las poblaciones de aves jóvenes implicando problemas en parámetros de producción (Doerr *et al*., 1983; Nakavuma *et al.*, 2020; Nasaruddin *et al.*, 2021). Concentraciones elevadas de entre 1 000 a 5 000 ppb afectan principalmente al hígado, sin embargo, se han realizado pocas investigaciones sobre el comportamiento de las micotoxinas en pollos de engorde cuando las concentraciones son bajas como las determinadas en este estudio (Bai *et al*., 2014; Liu *et al*., 2020; Miazzo *et al*., 2000; J. Yang *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos de aflatoxinas de alimentos balanceados en la fábrica y en la granja se encontraron bajo los niveles de La Unión Europea y de los Estados Unidos, quienes trabajan con niveles máximos permitidos de 100 ppb de esta micotoxina para productos destinados a la dieta de aves de corral maduras. Brasil tiene límites de 50 ppb para los productos destinados a alimentación animal (FAO, 2004; Rossi *et al*., 2013). Con base en los resultados obtenidos y las concentraciones de aflatoxinas reportadas por otros estudios, los productos terminados analizados presentan altos estándares de calidad.

Las muestras analizadas para deoxinivalenol presentan valores dentro del promedio de los datos reportados en un estudio donde se determinó la incidencia de tricotecenos en

alimentos balanceados para aves en Eslovaquia (Labuda *et al.*, 2005). En Polonia en un estudio similar al anterior, reportaron muestras contaminadas con un nivel promedio de 38.58 ppb, valores inferiores a los reportados en este estudio. Sin embargo las concentraciones determinadas no sobrepasaron los límites permisibles por Estados Unidos de 5 000 ppb (Cegielska-Radziejewska, Stuper-Szablewska, et al., 2013). Investigaciones han determinado que los pollos de engorde se ven afectados por la ingesta de alimentos con deoxinivalenol en concentraciones entre 1 000 y 5 000 ppb, provocando consecuencias en los rendimientos del peso corporal de los pollos, debido a que reduce el área de absorción de nutrientes al influir en el crecimiento de vellosidades en el yeyuno (Awad *et al*., 2011; Lucke *et al.*, 2017).

La toxina T-2 mostró presencia en la totalidad de las muestras analizadas, a diferencia de un estudio realizado en Argentina donde analizaron materias primas y alimento balanceado listo para ser entregado en granjas avícolas, donde no hubo presencia de T-2 (Del Pilar Monge *et al.*, 2012). Sin embargo, otras investigaciones han mostrado presencia en los alimentos balanceados >18.2 ppb , acercándose a las medias obtenidas en este estudio (Greco *et al.*, 2014; Pleadin *et al*., 2012). Los resultados de estas toxinas son preocupantes y se deben controlar debido a que se ha relacionado con pérdida de peso según dosis recibida de T-2 por inhibición nutricional y síntesis proteica, inclusive con dosis bajas de 4 ppb se ha determinado la toxicidad en los pollos de engorde (Pande et al., 2006; Singh et al., 2020; R. D. Wyatt et al., 1975)

(Streit et al., 2012a) reportaron presencia de ocratoxina con concentraciones de 0.04 a 6.50 ppb en muestras tomadas de alimentos para aves, determinaciones similares a las obtenidas en este estudio. En materias primas y alimentos balanceados para animales han detectado altos porcentajes de incidencia de zearalenona y fumonisina (Krnjaja et al., 2013; Pleadin et al., 2012; Rodrigues & Naehrer, 2012; Streit et al., 2012a; Yalçin et al., 2017), resultados congruentes con los mostrados en el presente estudio. En alimento para pollos de engorde utilizando HPLC, determinaron concentraciones de zearalenona menores a 20.87 ppb (Bilal *et al.*, 2014), y 2.348 ppb (Binder et al., 2007a), siendo estos promedios inferiores a los resultados obtenidos en este estudio. Mientras que una investigación realizada a

alimentos para aves mediante ELISA halló concentraciones de fumonisina de 188 ppb (Sonal & HH, 2000), resultados por debajo de las medias obtenidas en este estudio.

Los resultados obtenidos muestran divergencias con otras investigaciones, lo cual se podría deber a las metodologías que se utilizaron, las diferentes materias primas usadas para los alimentos balanceados, las regiones y las estaciones del año en que fueron realizadas. Se ha demostrado que las bajas concentraciones de micotoxinas no se pueden relacionar directamente con una condición clínica, sin embargo, producen en el animal rendimientos bajos en productividad y reproducción, al afectar el sistema inmune y provocar vulnerabilidad a patógenos (Lopes *et al*., 2006). Varios estudios han visualizado que dietas en aves de corral con concentraciones individuales de toxinas podrían no causar efectos negativos en el rendimiento, sin embargo, con base en los resultados obtenidos se debe considerar las interacciones entre las micotoxinas tomando en cuenta que el REQ reflejado para la interacción de las micotoxinas en los productos terminados generó advertencia. (B. Grenier & Oswald, 2011).

La presencia de más de una micotoxina en materias primas y alimentos balanceados presenta una situación de riesgo toxicológico que terminan en interacciones sinérgicas o aditivas (Del Pilar Monge *et al*., 2012). Los diagnósticos de micotoxicosis son complejos, y por lo tanto, es necesaria la cuantificación de las micotoxinas en los alimentos balanceados con que se alimentan los pollos de engorde, procedimiento que normalmente esto se dificulta por la rapidez del consumo de los alimentos en las granjas avícolas. Otro diagnóstico importante con los estudios patológicos de aves fallecidas (Puvača, Ljubojević, *et al.*, 2018).

Investigadores han suministrado alimentos balanceados con 2 500 ppb de T-2 y observaron que los pollos toleraron durante 21 días estas concentraciones y presentaron efectos adversos en su salud a los 28 días, mostrando lesiones en la cavidad oral como inflamación y ulceración en lengua asociadas al consumo de la dieta. Se ha evaluado que las heridas orales producen la reducción en la ingesta de alimento y por ende reducción en el peso corporal, estas lesiones han sido asociadas a dietas cargadas con tricotecenos (Diaz *et al.*, 2016; Vaccari *et al.*, 2017). Otras investigaciones han determinado que dietas con 10 000 ppb de T-2 causan lesiones orales graves como necrosis (Damu Patil *et al.*, 2014). Además, se han evidenciado efectos en peso corporal asociado al consumo de alimento con niveles de

150 ppb de esta micotoxina (Liu *et al.*, 2020). En el presente estudio las medias de T-2 en el alimento balanceado consumido en granja están por debajo de las concentraciones mencionadas anteriormente, lo cual se podría relacionar con las pocas lesiones encontradas en la cavidad oral de los pollos de engorde en esta investigación.

Varios autores han identificado que las ocratoxinas provocan erosiones en la molleja, y que el hígado presente cambios de coloración pálida, condición disgregable y podría presentar hemorragias. El daño hepático inducido por micotoxinas se debe a que son causantes de estrés oxidativo en el hígado, aumentando la formación de peroxinitrito, un agente oxidante que puede dañar moléculas causando aductos con ADN, concluyendo en el daño hepatológico (Gowda *et al.,* 2008). Las aflatoxinas muestran principalmente daños en el hígado por la acumulación de lípidos, morfológicamente hay un cambio de coloración pálido y amarillento, la estructura del hígado se daña presentando hemorragias (Dwivedi & Burns, 1985; Hussain *et al*., 2008; Puvača, Dragana, *et al.*, 2018; Yildirim *et al*., 2011). Estas lesiones fueron observadas en los órganos evaluados en este estudio. La falta de diferencias significativas entre los órganos lesionados podría deberse a que las concentraciones de micotoxinas detectadas en la dieta de los pollos de engorde no eran suficientes para causar diferencias en estas variables (Valchev *et al.*, 2014).

El nivel de las lesiones se ve inferido por la edad del pollo y la dosis ingerida. En los músculos de la pierna y la pechuga se forman hemorragias petequiales siendo asociadas a la ingesta de aflatoxinas en un rango de 400-800 ppb en la dieta de pollos de engorde (Biró *et al.*, 2002; Hussain *et al.*, 2016). Las determinaciones realizadas en los alimentos balanceados en este estudio fueron menores a 20 ppb en aflatoxinas, sin embargo, hubo aves que mostraron todas las lesiones antes mencionadas que podría deberse a que aún con las dosis bajas en sus dietas, su sistema inmunológico fue afectado por la interacción de multi toxinas lo cual genera el riesgo en las aves de ser susceptibles a infecciones y enfermedades (Damu Patil et al., 2014). La mucosa intestinal de los pollos de engorde posee componentes de la inmunidad específica e inespecífica, los cuales pueden estar expuestos cuando el animal consume alimentos balanceados contaminados con micotoxinas (De Oliveira *et al*., 2018). Las toxinas interfieren en la barrera física del epitelio intestinal, lo cual provoca afectaciones en funciones como la resistencia eléctrica transepitelial que existe en la monocapa celular,

debido a la disminución de las proteínas en las uniones celulares (Bouhet & Oswald, 2005; De Oliveira et al., 2018).

Existen varias metodologías para tratar las micotoxinas. Visualizar los niveles de contaminación presentes en las fábricas de alimento balanceado y en las granjas avícolas se debe considerar entre los procedimientos más adecuados y convenientes para cada escenario. Esto permitirá un mejor uso de las herramientas para mitigar con el crecimiento fúngico y las micotoxinas en los alimentos balanceados que consumen los pollos de engorde (Cristina De Pinho Carão *et al.*, 2014). Con base en los resultados obtenidos se deja en evidencia las buenas prácticas de elaboración presentes en la fábrica de alimento balanceado y la recomendación para mejorar en granja con la finalidad de evitar la propagación fúngica y problemas toxicológicos posteriores(Codex Alimentarius, 2014).

Se ha comprobado que el uso de captadores de micotoxinas magnifican las ganancias económicas, los pollos tienen mejores pesos corporales, la carne es de calidad superior y, además, ayudan a compensar los efectos nocivos en los órganos viscerales de los pollos de engorde, (Nabi *et al*., 2018). Las bajas determinaciones encontradas en este estudio para las diferentes micotoxinas analizadas y las pocas lesiones se pueden relacionar a que el alimento balanceado consumido por los pollos de engorde fueron dosificados con captadores de micotoxinas, aglutinantes de alta calidad y de los más populares a nivel internacional (Hussain *et al.*, 2016). Las micotoxinas son un problema mundial que debe ser constantemente monitoreado para mitigar impactos nocivos en la salud animal y humana, y reducir las pérdidas económicas para los productores. Se debe efectuar el uso de herramientas tecnológicas para evidenciar riesgos emergentes debido a la interacción de las micotoxinas, así como la implementación de análisis de alta calidad y seguimiento de buenas prácticas de manufactura de los procesos en fabrica y granja (Streit *et al.*, 2012b).

6. Conclusiones

1. La incidencia de mohos en la totalidad de la muestras y las altas concentraciones presentes en el alimento en las granjas justifica un continuo monitoreo durante toda la cadena integrada suministrada a los pollos de engorde.
2. Enfocarse en la prevención de afectaciones en el sistema inmunológico de los pollos de engorde, con el objetivo de buscar la eficiencia en la producción y la optimización del proceso, enfatiza la importancia de las investigaciones sobre los hongos y su producción de toxinas en la cadena de producción, desde las materias primas con las que se elaboran los alimentos balanceados, hasta los productos finales y su almacenamiento en granjas.
3. La producción avícola se ve gravemente afectada por las micotoxinas, por esto, se debe tomar medidas de prevención en fábricas y granjas para el control de hongos y la producción de micotoxinas, visualizando puntos críticos que favorecen la aparición de hongos y toxinas.
4. Utilizar metodologías para evaluar y monitorear la producción de alimentos balanceados se convierte en un aspecto esencial para mantener altos estándares de calidad y evitar intoxicaciones por micotoxinas.
5. Otro elemento indispensable producto de la investigación se centra en mantener la calidad en los productos secuestrantes de micotoxinas para reducir el riesgo inminente de estas toxinas, tanto en materias primas como productos terminados que ayudan a prevenir y reducir los daños que causan.
6. La calidad de los alimentos balanceados se reconoce que no es suficiente monitorear los hongos, se deben realizar evaluaciones simultáneas de micotoxinas.

7. Recomendaciones

1. Analizar hongos y bacterias mesófilos aerobios de los sistemas de ventilación de las granjas, para monitorear la concentración microbiana que funciona como indicadores de inocuidad y calidad.
2. Aislar e identificar los géneros de hongos encontrados en los sistemas de ventilación y los alimentos balanceados cuando se producen en la empresa y durante su almacenamiento en granja, considerando los efectos patogénicos que estos pueden tener en los pollos de engorde y el personal de la granja.
3. Promover la investigación de biotecnologías que implementen buenas prácticas en el manejo de granjas avícolas, producción de alimentos balanceados en función del mejoramiento de las áreas.
4. Considerar el equipo y la metodología utilizada para el análisis de micotoxinas, con el fin de obtener mejores resultados y mayor cantidad e interacciones sinérgicas entre las micotoxinas.
5. Utilizar metodologías como exámenes histológicos y enzimáticos para evaluar los órganos lesionados y las afectaciones que tienen las micotoxinas en pollos de engorde.

8. Referencias

3M. (2006). Placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento rápido de Mohos y Levaduras. In *3M Ciencia Aplicada a la Vida*. https://multimedia.3m.com/mws/media/1409680O/guia-interpretacion-petrifilm-hongos-y-levaduras-rapida.pdf

Abdallah, M. F., Girgin, G., Baydar, T., Krska, R., & Sulyok, M. (2017). Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(13), 4419–4428. https://doi.org/10.1002/jsfa.8293

Alltech®. (2020). *Estudio Europeo de la contaminación por micotoxinas en la cosecha de verano 2020*. Alltech. https://www.alltech.com/es-es/blog/el-estudio-europeo-de-la-contaminacion-por-micotoxinas-en-la-cosecha-de-verano-de-alltechr

Alltech. (2016). *Informes de Cosechas | Alltech Mycotoxin Management*. Alltech Mycotoxin Management. https://www2.knowmycotoxins.com/es/recursos/informes-de-cosechas

Alpízar, C. (2015). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. Artículo de Revisión. *Ciencias Veterinarias*, *Vol. 33*, *N*(January 2015). https://doi.org/10.15359/rcv.33-1.1

Alpízar Solís, C. (2016). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. Artículo de Revisión. *Revista Ciencias Veterinarias*, *33*(1), 7. https://doi.org/10.15359/rcv.33-1.1

Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Verbrugghe, E., Vandenbroucke, V., Li, S., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2014). The Impact of Fusarium Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. *Toxins*, *6*(2), 430–452. https://doi.org/10.3390/toxins6020430

Arias, M., Herrera, M., Mena, E., Rojas, C., Rodríguez, E., Chaves, C., & Arias, M. (2009). Calidad microbiológica de alimento concentrado para perros adultos que se expende en Costa Ric. *Analecta Veterinaria*, *29*(2), 10–15. http://163.10.34.134/bitstream/handle/10915/11249/Documento_completo__.pdf?sequence=1

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *BOLETÍN GRASEQA, N° 7*, 31. www.ugr.es/~fqm302/

Awad, W. A., Hess, M., Twaruzek, M., Grajewski, J., Kosicki, R., Böhm, J., & Zentek, J. (2011). The impact of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on the health and performance of broiler chickens. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(11), 7996–8012. https://doi.org/10.3390/ijms12117996

Bai, S., Wang, L., Luo, Y., Ding, X., Yang, J., Bai, J., Zhang, K., & Wang, J. (2014). Effects of corn naturally contaminated with aflatoxins on performance, calcium and phosphorus metabolism, and bone mineralization of broiler chicks. *Journal of Poultry Science*, *51*(2), 157–164. https://doi.org/10.2141/jpsa.0130053

Bellí, N., Marín, S., Duaigües, A., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2004). Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(6), 591–594. https://doi.org/10.1002/jsfa.1702

Bennett, J., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(3), 497–516. https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497

Berek, L., Petri, I., Mesterházy, Á., Téren, J., & Molnár, J. (2001). Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology in Vitro*, *15*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00055-2

Berger, U., Oehme, M., & Kuhn, F. (1999). Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B- trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(10), 4240–4245. https://doi.org/10.1021/jf9904012

Bezerra da Rocha, M., Freire da Chagas, F., Erlan, F., Florindo, M., & Davide, R. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. In *Food Control* (Vol. 36, Issue 1, pp. 159–165). https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021

Bilal, T., Aksakal, D. H., Sünnetci, S., Keser, O., & Eseceli, H. (2014). Detection of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol in some feed and feedstuffs in Turkey. *Pakistan*

Veterinary Journal, *34*(4), 459–463. www.pvj.com.pk

Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J., & Richard, J. (2007a). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, *137*(3–4), 265–282. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.005

Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J., & Richard, J. (2007b). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, *137*(3–4), 265–282. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.005

Bird, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., & Jechorek, R. (2015). Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ rapid yeast and mold count plate for the enumeration of yeast and mold in food: Collaborative study, first action 2014.05. *Journal of AOAC International*, *98*(3), 767–783. https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-006

Biró, K., Solti, L., Barna-Vetró, I., Bagó, G., Glávits, R., Szabó, E., & Fink-Gremmels, J. (2002). Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathology*, *31*(2), 141–148. https://doi.org/10.1080/03079450120118621

Biselli, S., & Hummert, C. (2005). Development of a multicomponent method for Fusarium toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Additives and Contaminants*, *22*(8), 752–760. https://doi.org/10.1080/02652030500158617

Bottalic, A. (1998). FUSARIUM DISEASES OF CEREALS: SPECIES COMPLEX AND RELATED MYCOTOXIN PROFILES, IN EUROPE. *Journal of Plant Pathology Società Italiana Di Patologia Vegetale*, *80*(2), 85–103. http://www.jstor.org

Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *108*(7), 611–624. https://doi.org/10.1023/A:1020635214971

Bouhet, S., & Oswald, I. P. (2005). The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *108*(1-2 SPEC. ISS.), 199–209.

https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.010

Bryden, W. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, *173*(1–2), 134–158. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014

BURBARELLI, M. F. de C., LELIS, K. D., GODOY, S. H. S. de, MORO, M. E. G., BORDIN, R. de A., FERNANDES, A. M., & ALBUQUERQUE, R. de. (2020). Reduction in the frequency of Aspergillus spp. in broiler facilities subjected to cleaning and disinfection. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, *21*. https://doi.org/10.1590/s1519-99402121012020

Cafarchia, C., Camarda, A., Iatta, R., Danesi, P., Favuzzi, V., Di Paola, G., Pugliese, N., Caroli, A., Montagna, M. T., & Otranto, D. (2014). Environmental contamination by Aspergillus spp. in laying hen farms and associated health risks for farm workers. *Journal of Medical Microbiology*, *63*(PART 3), 464–470. https://doi.org/10.1099/jmm.0.065946-0

Castro, J., Alvarado, A., Koga, Y., & Tinoco, R. (2015a). Cuantificación de Micotoxinas en Ingredientes Alimenticios Utilizados en la Dieta de Aves Comerciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *26*(4), 558–564. https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11209

Castro, J., Alvarado, A., Koga, Y., & Tinoco, R. (2015b). Cuantificación de Micotoxinas en Ingredientes Alimenticios Utilizados en la Dieta de Aves Comerciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *26*. https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11209

Cegielska-Radziejewska, R., Stuper-Szablewska, K., & Szablewski, T. (2013). Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*, *20*(1), 30–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540209

Cegielska-Radziejewska, R., Stuper, K., & Szablewski, T. (2013). Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *20*(1), 30–35. https://www.researchgate.net/publication/236091578_Micoflora_and_mycotoxin_cont

amination_in_poultry_feed_mixtures_from_western_Poland

Chaisri, W., Mongkon, W., Sugita-konishi, Y., Dam, D., Huntley, I., & Suriyasathaporn, W. (2017). Feed and feed storage factors in relation to aflatoxin M 1 contamination in bulk milk of smallholder dairy farms. *JSM Mycotoxins*, *67*, 85–88.

Chavarri, M., Barroyeta, J., Ochoa, Y., Rumbos, N., & Alezones, J. (2017). Detección de fusarium verticillioides y fumonisinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados Yaracuy y Guárico , Venezuela Fusarium verticillioides and fumonisins in white corn grains from the Yaracuy and Guar. *Revista Electrónica Nova Scientia*, *9*.

Cheema, M., Qureshi, M., & Havenstein, G. (2003). A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, *82*(10), 1519–1529. https://doi.org/10.1093/ps/82.10.1519

Chen, C.-J., Zhang, Y.-J., Lu, S.-N., & Santella, R. M. (1992). Matoxin B, DNA Adducts in Smeared Tumor Tissue from Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, *Vol.16*.

Codex Alimentarius. (2014). *Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por micotoxinas en los cereales ; CAC / RCP 51-2003*. 9. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BRCP%2B78-2017%252FCXC_078s.pdf

Coker, R. (1997). Mycotoxins and Their Control: Constraints and Opportunities. *NRI Bulletin*, *73*, 73. http://gala.gre.ac.uk/11098

Čonková, E., Laciaková, A., Pástorová, B., Seidel, H., & Kováč, G. (2001). The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicology Letters*, *121*(3), 145–149. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00312-5

Cristina De Pinho Carão, Á., Fernanda De Castro Burbarelli, M., Gustavo, I., Polycarpo, V., Ramos, A., Ricardo De Albuquerque, S. I., Carlos, I., Fernandes, A., & Ii, O. (2014). Métodos físicos e químicos de detoxifi cação de afl atoxinas e redução da contaminação

fúngica na cadeia produtiva avícola Physical and chemical methods of detoxifi cation of afl atoxins and reduction of fungal contamina-tion on poultry productive chain. *Ciência Rural*, *abr*, 699–705. http://www.scielo.br/pdf/cr/v44n4/a10914cr2013-0801.pdf

Dalcero, A., Magnoli, C., Luna, M., Ancasi, G., Reynoso, M. M., Chiacchiera, S., Miazzo, R., & Palacio, G. (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, *141*(1), 37–43. https://doi.org/10.1023/A:1006868002985

Dall'Erta, A., Cirlini, M., Dall'Asta, M., Del Rio, D., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2013). Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. *Chemical Research in Toxicology*, *26*(3), 305–312. https://doi.org/10.1021/tx300438c

Damu Patil, R., Sharma, R., Kumar Asrani, R., & Patil, R. D. (2014). Mycotoxicosis and its control in poultry: A review. In *Journal of Poultry Science and Technology*. www.jakraya.com/journal/jpst

De Oliveira, H. F., Souto, C. N., Martins, P. C., Di Castro, I. C., & Mascarenhas, A. G. (2018). Mycotoxins in broiler production. *Revista de Ciencias Agroveterinarias*, *17*(2), 292–299. https://doi.org/10.5965/223811711722018292

Del Pilar Monge, M., Magnoli, C. E., & Chiacchiera, S. M. (2012). Survey of Aspergillus and Fusarium species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina. In *Mycotoxin Research* (Vol. 28, Issue 2, pp. 111–122). https://doi.org/10.1007/s12550-011-0121-8

Denli, M., & Pérez, J. (2006). Contaminación Por Micotoxinas En Los Piensos: Efectos, Tratamiento Y Prevención. *XXII Curso de Especialización FEDNA*, 1–18. http://www.produccionbovina.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/31-intoxicacion_por_micotoxinas.pdf

Diaz, G. J., Vargas, M. L., & Cortés, A. (2016). Evaluation of the supplementation of a feed additive as a potential protector against the adverse effects of 2.5 ppm T-2 toxin on growing broiler chickens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*,

68(3), 709–715. https://doi.org/10.1590/1678-4162-8416

Doerr, J. A., Huff, W. E., Wabeck, C. J., Chaloupka, G. W., May, J. D., & Merkley, J. W. (1983). Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, *62*(10), 1971–1977. https://doi.org/10.3382/ps.0621971

Drastig, K., Palhares, J. C. P., Karbach, K., & Prochnow, A. (2016). Farm water productivity in broiler production: case studies in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, *135*, 9–19. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.052

Duarte, S., Pena, A., & Lino, C. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. In *Food Microbiology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 187–198). https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.016

Dwivedi, P., & Burns, R. B. (1985). Immunosuppressive Effects of Ochratoxin a in Young Turkeys. *Avian Pathology*, *14*(2), 213–225. https://doi.org/10.1080/03079458508436223

Erdaw, M. M., Bhuiyan, M. M., & Iji, P. A. (2016). Enhancing the nutritional value of soybeans for poultry through supplementation with new-generation feed enzymes. In *World's Poultry Science Journal* (Vol. 72, Issue 2, pp. 307–322). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/S0043933916000271

FAO. (2003). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*.

FAO. (2004). Food and Nutrition Papers 81. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. A compendium. In *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Food and Agriculture Organisation of the United Nations.

Fornelli, F., Minervini, F., & Logrieco, A. (2004). Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (Spodoptera frugiperda) cell line (SF-9). *Journal of Invertebrate Pathology*, *85*(2), 74–79. https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.01.002

Franco, H., Vega, A., Reyes, S., De Len, J., & Bonilla, A. (2014). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafes de exportacion de Panama por un metodo de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *64*(1), 42–49.

Frempong, N. S., Nortey, T. N. N., Paulk, C., & Stark, C. R. (2019). Evaluating the Effect of replacing fish meal in broiler diets with either Soybean meal or poultry by-product Meal on Broiler Performance and total feed cost per kilogram of gain. *Journal of Applied Poultry Research*, *28*(4), 912–918. https://doi.org/10.3382/japr/pfz049

Gareis, M., Bauer, J., Thiem, J., Plank, G., Grabley, S., & Gedek, B. (1990). Cleavage of Zearalenone-Glycoside, a "Masked" Mycotoxin, during Digestion in Swine. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *37*(1–10), 236–240. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1990.tb01052.x

Ghaemmaghami, S. S., Nowroozi, H., & Tohidi, M. (2018). Toxigenic Fungal Contamination for Assessment of Poultry Feeds: Mashed vs. Pellet. In *Iranian Journal of Toxicology* (Vol. 12, Issue 5). http://www.ijt.ir

GONZÁLEZ, E., MARTÍNEZ, R., MORALES, A. R., & ORDÓNEZ, J. (2009). In vitro binding ability of ochratoxin A by commercial mycotoxin binders available in Mexico. *Veterinaria México OA*, *35*(004). http://veterinariamexico.unam.mx/index.php/vet/article/view/120

Gosling, R. (2018). A review of cleaning and disinfection studies in farming environments. *Livestock*, *23*(5), 232–237. https://doi.org/10.12968/live.2018.23.5.232

Gowda, N. K. S., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Bermudez, A. J., & Chen, Y. C. (2008). Efficacy of turmeric (Curcuma longa), containing a known level of curcumin, and a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, *87*(6), 1125–1130. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00313

Greco, M. V., Franchi, M. L., Rico Golba, S. L., Pardo, A. G., & Pose, G. N. (2014). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. *Scientific World Journal*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/968215

Grenier, B., & Oswald, I. P. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: Meta-analysis of publications describing toxicological interactions. In *World Mycotoxin Journal* (Vol. 4, Issue 3, pp. 285–313). Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1281

Grenier, B, Schwartz-Zimmermann, H. E., Gruber-Dorninger, C., Dohnal, I., Aleschko, M., Schatzmayr, G., Moll, W. D., & Applegate, T. J. (2017). Enzymatic hydrolysis of fumonisins in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Poultry Science*, *96*(12), 4342–4351. https://doi.org/10.3382/ps/pex280

Grenier, Bertrand, Dohnal, I., Shanmugasundaram, R., Eicher, S. D., Selvaraj, R. K., Schatzmayr, G., & Applegate, T. J. (2016). Susceptibility of broiler chickens to coccidiosis when fed subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins—special emphasis on the immunological response and themycotoxin interaction. *Toxins*, *8*(8), 231. https://doi.org/10.3390/toxins8080231

Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., & Berthiller, F. (2017). Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 65, Issue 33, pp. 7052–7070). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413

Heyndrickx, E., Sioen, I., Huybrechts, B., Callebaut, A., De Henauw, S., & De Saeger, S. (2015). Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environment International*, *84*, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.011

Hussain, Z., Khan, M. Z., Saleemi, M. K., Khan, A., & Rafique, S. (2016). Clinicopathological effects of prolonged intoxication of Aflatoxin B1 in broiler chicken. *Pakistan Veterinary Journal*, *36*(4), 477–481. www.pvj.com.pk

Hussain, Z., Zargham Khan, M., & ul Hassan, Z. (2008). PRODUCTION OF AFLATOXINS FROM Aspergillus flavus AND ACUTE AFLATOXICOSIS IN YOUNG BROILER CHICKS. *Pak. J. Agri. Sci*, *45*(1). https://www.researchgate.net/publication/267935392_Production_of_aflatoxins_from_Aspergillus_flavus_and_acute_aflatoxicosis_in_young_broiler_chicks

Islam, M. S., Haque, M. M., & Hossain, M. S. (2015). Effect of corn moisture on the quality of poultry feed. *Journal of Poultry Science and Technology*, *3*(2), 24–31. www.jakraya.com/journal/jpst

Ivanova, L., Skjerve, E., Eriksen, G. S., & Uhlig, S. (2006). Cytotoxicity of enniatins A, A1,

B, B1, B2 and B3 from Fusarium avenaceum. *Toxicon*, *47*(8), 868–876. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.012

Jamroz D, K. J., & Kubizna, J. K. (2011). Contamination of feed mixtures with mycoflora in South-Western Polanda. *EJPAU*, *14*(2), 8. http://www.ejpau.media.pl

Khodaei, D., Javanmardi, F., & Khaneghah, A. M. (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: a three-year survey. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 39, pp. 36–42). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.012

Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., & Krska, R. (2016). Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize–An extensive survey. *Toxins*, *8*(12), 363. https://doi.org/10.3390/toxins8120363

Krnjaja, V., Levic, J., Stankovic, S., Petrovic, T., Tomic, Z., Mandic, V., & Bijelic, Z. (2013). Moulds and mycotoxins in stored maize grains. *Biotechnology in Animal HusbandryBiotehnologija u Stocarstvu*, *29*(3), 527–536. https://doi.org/10.2298/bah1303527k

Krska, R. (1998). Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A*, *815*(1), 49–57. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00003-X

Labuda, R., Parich, A., Berthiller, F., & Tančinová, D. (2005). Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(1), 19–25. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.005

Labuda, R., & Tancinová, D. (2006). Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*, *13*(2), 193–200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195991

Landeros, P., Reyes, W., De Lucas, E., Albarrán, E., López, Y., & Quezada, T. (2008). EVALUACIÓN DE DOS ADSORBENTES (MANANO OLIGOSACÁRIDOS Y CLINOPTILOLITA) EN DIETAS DE POLLOS DE ENGORDE CONTAMINADAS CON FUMONISINA B 1. *Rev. Salud Anim*, *30*(1), 50–58.

Latorre Fernández, A. (2017). *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para evaluar la incidencia y la estabilidad de micotoxinas del género Fusarium en forrajes de maíz ensilados* [Universidad de Santiago de Compostela]. http://hdl.handle.net/10347/15456

Lee, S., Kim, D. H., Keum, M. C., Han, E., An, B. K., Chang, H. H., Choi, Y. H., Moon, B. H., & Lee, K. W. (2018). Effects of fumonisin B 1 and mycotoxin binders on growth performance, tibia characteristics, gut physiology, and stress indicators in broiler chickens raised in different stocking densities. *Poultry Science*, *97*(3), 845–854. https://doi.org/10.3382/ps/pex382

Leinonen, I., & Kyriazakis, I. (2016). How can we improve the environmental sustainability of poultry production? *Proceedings of the Nutrition Society*, *75*(3), 265–273. https://doi.org/10.1017/S0029665116000094

Liu, J. B., Yan, H. L., Cao, S. C., Hu, Y. D., & Zhang, H. F. (2020). Effects of absorbents on growth performance, blood profiles and liver gene expression in broilers fed diets naturally contaminated with aflatoxin. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *33*(2), 294–304. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0870

Lopes, J. M., Rutz, F., Mallmann, C. A., & De Toledo, G. S. P. (2006). Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. *Ciencia Rural*, *36*(5), 1594–1599. https://doi.org/10.1590/s0103-84782006000500040

Lucke, A., Doupovec, B., Paulsen, P., Zebeli, Q., & Böhm, J. (2017). Effects of low to moderate levels of deoxynivalenol on feed and water intake, weight gain, and slaughtering traits of broiler chickens. *Mycotoxin Research*, *33*(4), 261–271. https://doi.org/10.1007/s12550-017-0284-z

Mallmann, C., Dilkin, P., Giacomini, L., Rauber, R., & Pereira, C. (2007). Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. In *XX Congreso Latinoamericano de Avicultura*.

Mallmann, C., Hummes, R., & Giacomini, L. (2007). *CONTROL, MONITOREO Y MANEJO DE MICOTOXINAS EN EXPLOTACIONES AVÍCOLAS*.

Marasas, W. (2001). Discovery and Occurrence of the Fumonisins : A Historical Perspective

Events Leading to the Characterization of the Fumonisins in South Africa : Fumonisins : The First. *Environmental Health Perspectives*, *109*(May), 239–243. https://doi.org/Doi 10.2307/3435014

Maresca, M., Yahi, N., Younès-Sakr, L., Boyron, M., Caporiccio, B., & Fantini, J. (2008). Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: Stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1β effect and increase in the transepithelial. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *228*(1), 84–92. https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2007.11.013

Mendoza, D., Pérez-Arévalo, M., Gómez, C., Molero, G., Novoa, E., Rincón, H., & Ascanio, E. (2006). Efecto del alimento contaminado con aflatoxina b1 (0,07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (ast y alt) en pollos de engorde. *Revista Científica*, *16*(1), 39–47. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592006000100006&script=sci_arttext

Miazzo, R., Rosa, C. A. R., De Queiroz Carvalho, E. C., Magnoli, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., Saenz, M., Kikot, A., Basaldella, E., & Dalcero, A. (2000). Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, *79*(1), 1–6. https://doi.org/10.1093/ps/79.1.1

Miranda, M. (2012). *Práctica realizada en la planta dedicada a la producción y distribución de alimentos para animales del Grupo Agroindustrial ABA S.A, ubicada en Altamira, San Carlos, Alajuela*. Universidad De Costa Rica.

Molina, A., Zamora-Sanabria, R., & Granados-Chinchilla, F. (2017). A Focus on Aflatoxins in Feedstuffs: Levels of Contamination, Prevalence, Control Strategies, and Impacts on Animal Health. In *Aflatoxin-Control, Analysis, Detection and Health Risks*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.69468

Molina, Andrea, Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Leiva, A., & Granados-Chinchilla, F. (2019). Mycotoxins at the start of the food chain in Costa Rica: Analysis of six fusarium toxins and ochratoxin a between 2013 and 2017 in animal feed and aflatoxin M1in dairy products. *Toxins*, *11*(6), 312. https://doi.org/10.3390/toxins11060312

Monaci, L., & Palmisano, F. (2004). Determination of ochratoxin a in foods: State-of-the-art and analytical challenges. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 378, Issue 1, pp. 96–103). https://doi.org/10.1007/s00216-003-2364-5

Morrison, D., Ledoux, D., Chester, L., & Samuels, C. (2017). A Limited Survey of Aflatoxins in Poultry Feed and Feed Ingredients in Guyana. *Veterinary Sciences*, *4*(4), 60. https://doi.org/10.3390/vetsci4040060

Morrison, D. M., Ledoux, D. R., Chester, L. F. B., & Samuels, C. A. N. (2017). A limited survey of aflatoxins in poultry feed and feed ingredients in Guyana. *Veterinary Sciences*, *4*(4). https://doi.org/10.3390/vetsci4040060

Nabi, H., Hussain, I., Adil, M., Nasir, A., Sikandar, A., Khan, S., & Khan, N. (2018). Impact of Mycotoxin Binders on Humoral Immunity, Lymphoid Organs and Growth Performance of Broilers. *Pakistan Journal of Zoology*, *50*(5). https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.5.1611.1618

Nakavuma, J. L., Kirabo, A., Bogere, P., Nabulime, M. M., Kaaya, A. N., & Gnonlonfin, B. (2020). Awareness of mycotoxins and occurrence of aflatoxins in poultry feeds and feed ingredients in selected regions of Uganda. In *International Journal of Food Contamination* (Vol. 7, Issue 1). https://doi.org/10.1186/s40550-020-00079-2

Nasaruddin, N., Jinap, S., Samsudin, N. I. P., Kamarulzaman, N. H., & Sanny, M. (2021). Prevalence of mycotoxigenic fungi and assessment of aflatoxin contamination: a multiple case study along the integrated corn-based poultry feed supply chain in Malaysia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(5), 1812–1821. https://doi.org/10.1002/jsfa.10795

Neogen Corporation. (2008). *Procedure Veratox for DON 5/5*.

Neogen Corporation. (2014a). *Procedure Veratox For Ochratoxin* (Issue 0).

Neogen Corporation. (2014b). *Procedure Veratox for T-2 / HT-2*.

Neogen Corporation. (2015a). *Procedure Veratox for Aflatoxin* (Issue 0).

Neogen Corporation. (2015b). *Procedure veratox for Fumonisin*.

Neogen Corporation. (2015c). *Procedure Veratox for Zearalenone*.

Orriss, G. (1997). Animal diseases of public health importance. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(4), 497–502. https://doi.org/10.3201/eid0304.970413

Ortiz, C., Hernández, L., & Medrano, J. (2006). Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *44*(2), 247–256. http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/1744

Pan, D., García y Santos, C., & Bettucci, L. (2016). In vitro evaluation of sequestering agents for aflatoxins. *Veterinaria (Montevideo)*, *52*(201), 3–3. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-48092016000100003&script=sci_arttext&tlng=pt

Pande, V. V., Kurkure, N. V., & Bhandarkar, A. G. (2006). Effect of T-2 toxin on growth, performance and haematobiochemical alterations in broilers. *Indian Journal of Experimental Biology*, *44*(1), 86–88. http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/6360

Pavlovic, M., Pavlovic, I., Radovic, M., & Ivanovic, S. (2019). Nutritive and microbial quality of feed for laying hens from the Serbian market in 2018. *Veterinarski Glasnik*, *73*(1), 40–49. https://doi.org/10.2298/vetgl180221009p

Peng, W., Marchal, J., & van der Poel, A. (2018). Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Animal Feed Science and Technology*, *237*, 129–153. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.017

Pitt, J. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, *56*(1), 184–192.

Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., Zadravec, M., Jaki, V., & Vulić, A. (2012). Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, *28*(1), 94–98. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.047

Puvača, N., Dragana, L., Milica, Z., Olivera, D., Vojislava, B., Gorica, V., Radivoj, P., & Jelana, B. (2018). Occurance of Mycotoxins and Mycotoxicosis in Poultry. *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*. https://doi.org/10.32474/CDVS.2018.02.000130

Puvača, N., Ljubojević, D., Živkov Baloš, M., Đuragić, O., Bursić, V., Vuković, G., Prodanović, R., & Bošković, J. (2018). Occurance of Mycotoxins and Mycotoxicosis in Poultry. *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*, *2*(1). https://doi.org/10.32474/cdvs.2018.02.000130

Quintana, E., Antillón, F., & Azofeifa, J. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *57*(2), 168–172. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200010

Raju, M., & Devegowda, G. (2000). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science, 41*(5), 640–650. https://doi.org/10.1080/0007166002000919 9

Ramana, M. V., Balakrishna, K., Murali, H. C. S., & Batra, H. V. (2011). Multiplex PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic Fusarium species in rice and fingermillet collected from Southern India. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 91*(9), 1666–1673. https://doi.org/10.1002/jsfa.4365

Rashmi, R., Ramana, M. V., Shylaja, R., Uppalapati, S. R., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2013). Evaluation of a multiplex PCR assay for concurrent detection of four major mycotoxigenic fungi from foods. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(3), 819–827. https://doi.org/10.1111/jam.12100

Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., & Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina a en alimentos de consumo humano: Revisión. In *Nutricion Hospitalaria* (Vol. 26, Issue 6, pp. 1215–1226). https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5381

Rodrigues, I., & Naehrer, K. (2012). Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*(1), 175–192. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9693

Rossi, C. N., Takabayashi, C. R., Ono, M. A., Bordini, J. G., Kawamura, O., Vizoni, E., Hirooka, E. Y., & Ono, E. Y. S. (2013). Assessment of exposure of broiler chicken in

Brazil to mycotoxins through naturally contaminated feed. *Food Security*, *5*(4), 541–550. https://doi.org/10.1007/s12571-013-0278-4

Saki, A. A., Abbasinezhad, M., Ghazi, S., Tabatabai, M. M., Ahmadi, A., & Zaboli, K. (2012). A r c h i v e o f S I D Intestinal Characteristics, Alkaline Phosphatase and Broilers Performance in Response to Extracted and Mechanical Soybean Meal Replaced by Fish Meal. In *J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 14, Issue 1). JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (JAST). www.SID.ir

Sánchez-Montero, L. (2017). *INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN EL CONTROL DE MOHOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A Y AFLATOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS*. Universidad de extremadura.

Sanchis, V., Marín, S., & Ramos, A. J. (2000). Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Revista Iberoamericana*, *17*, 69–76.

Sapkota, A., Lefferts, L., McKenzie, S., & Walker, P. (2007). What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environmental Health Perspectives*, *115*, 663–669. https://doi.org/10.1289/ehp.9760

Scaglioni, R., Gonçalves, E., Rossi, P., Nichellelopes, C., Laurino, N., & Rutz, F. (2012). Efeitos dos tricotecenos na avicultura e métodos de controle. *Publicações Em Medicina Veterinária e Zootecnia*, *6*.

Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. In *Mass Spectrometry Reviews* (Vol. 25, Issue 1, pp. 54–76). https://doi.org/10.1002/mas.20052

Shareef, A. M. (2010). Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential mycotoxicosis. In *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* (Vol. 24, Issue 1). http://www.vetmedmosul.org/ijvs

Shier, W., Shier, A., Xie, W., & Mirocha, C. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, *39*(9), 1435–1438.

https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00259-2

Singh, R., Park, S., Koo, J. S., Kim, I. H., & Balasubramanian, B. (2020). Significance of varying concentrations of T-2 toxin on growth performance, serum biochemical and hematological parameters in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Technology*, *62*(4), 468–474. https://doi.org/10.5187/JAST.2020.62.4.468

Smith, M. C., Madec, S., Coton, E., & Hymery, N. (2016). Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. In *Toxins* (Vol. 8, Issue 4, p. 94). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/toxins8040094

Sonal, S., & HH, O. (2000). Natural mycotoxin levels in mixed feed taken from poultry farm in Bursa Province. *YYU Vet Fak Derg*, *11*, 1–6.

Sorrentino, S., & Sabrina. (2013). *Evaluación nutricional y sensorial de pollo de campo e Industrial*. http://redi.ufasta.edu.ar:8080/xmlui/handle/123456789/302

Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human and Experimental Toxicology*, *27*(11), 799–809. https://doi.org/10.1177/0960327108099525

Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I. P. (2012a). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed focus on Europe. In *Toxins* (Vol. 4, Issue 10, pp. 788–809). https://doi.org/10.3390/toxins4100788

Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I. P. (2012b). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed focus on Europe. In *Toxins* (Vol. 4, Issue 10, pp. 788–809). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/toxins4100788

Sun, T., Long, R. J., Liu, Z. Y., Ding, W. R., & Zhang, Y. (2012). Aspects of lipid oxidation of meat from free-range broilers consuming a diet containing grasshoppers on alpine steppe of the Tibetan Plateau. *Poultry Science*, *91*(1), 224–231. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01598

Swamy, H., Smith, T., MacDonald, E., Karrow, N., Woodward, B., & Boermans, H. (2003). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Journal of Animal Science*, *81*(11), 2792–2803.

Thie Iamanaka, B., Oliveira, S., & Hiromi Taniwaki, M. (2013). Micotoxinas em Alimentos. *Anais Da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, *7*, 138–161.

Toso, R., Ardoino, S., Toribio, M., & Diesser, M. (2015). Presencia de micotoxinas en alimentos balanceados para ponedoras . Relevamiento realizado en General Pico ,. *CIENCIA VETERINARIA*, *17*, 35–45.

Vaccari, I. C. M., Duarte, V., Rodrigues, D. R., dos Santos, F. R., & Minafra, C. S. (2017). Association of the severity of tongue lesions in broiler chickens with the quality of corn in feed. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *52*(10), 942–945. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017001000014

Valchev, I., Kanakov, D., Hristov, T. S., Lazarov, L., Binev, R., Grozeva, N., & Nikolov, Y. (2014). Investigations on the liver function of broiler chickens with experimental aflatoxicosis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, *17*(4), 302–313.

Valderrama, A. M. (2017). *Aflatoxinas B1 y M1: problemática y métodos de análisis para sus determinación en piensos y leche* (pp. 1–49). http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/6691/1/TFG_Moral_Valderrama_Ana.pdf

Varga, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of Aspergillus section Flavi. *Studies in Mycology*, *69*, 57–80. https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05

Wang, A., Schwean-Lardner, K., & Hogan, N. S. (2019). Feed preference and feeding behaviours in grower broilers fed diets containing wheat naturally contaminated with fusarium mycotoxins. *British Poultry Science*, *60*(3), 309–316. https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1596224

Wang, Anhao, & Hogan, N. S. (2019). Performance effects of feed-borne Fusarium

mycotoxins on broiler chickens: Influences of timing and duration of exposure. *Animal Nutrition*, *5*(1), 32–40. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.08.001

Washington, D. C. (2016). *INSPECTING GRAIN Practical Procedures for Grain Handlers Marketing and Regulatory Programs Agricultural Marketing Service Federal Grain Inspection Service*.

Whitaker, T. B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, *23*(1), 50–61. https://doi.org/10.1080/02652030500241587

Widstrom, N., Snook, M., Wilson, D., Cleveland, T., & McMillan, W. (1995). Silk maysin content and resistance of commercial corn [maize] hybrids to kernel contamination by aflatoxin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *67*(3), 317–321. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670307

Wyatt, R. (1988). Las micotoxinas en el pienso, un peligro para la salud de las aves. *Vineland Update*, *23*.

Wyatt, R. D., Hamilton, P. B., & Burmeister, H. R. (1975). Altered feathering of chicks caused by T-2 toxin. *Poultry Science*, *54*(4), 1042–1045. https://doi.org/10.3382/ps.0541042

Yalçin, N. F., Işik, M. K., Avci, T., Oğuz, H., & Yurduseven, T. (2017). LC MS/MS metodu ile kanatlı yemlerinde mikotoksin varlığının araştırılması. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *64*(2), 111–116. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002784

Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2020). Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 389, p. 122087). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122087

Yang, J., Bai, F., Zhang, K., Bai, S., Peng, X., Ding, X., Li, Y., Zhang, J., & Zhao, L. (2012). Effects of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin B1 and B2 on hepatic functions of broilers. *Poultry Science*, *91*(11), 2792–2801. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02544

Yiannikouris, A., André, G., Buléon, A., Jeminet, G., Canet, I., François, J., Bertin, G., &

Jouany, J.-P. (2004). Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with β- d -Glucans. *Biomacromolecules*, *5*(6), 2176–2185. https://doi.org/10.1021/bm049775g

Yildirim, E., Yalçinkaya, L., Kanbur, M., Çinar, M., & Oruç, E. (2011). Effects of yeast glucomannan on performance, some biochemical parameters and pathological changes in experimental aflatoxicosis in broiler chickens. *Revue de Medecine Veterinaire*, *162*(8–9), 413–420. https://www.researchgate.net/publication/267958797_Effects_of_yeast_glucomannan_on_performance_some_biochemical_parameters_and_pathological_changes_in_experimental_aflatoxicosis_in_broiler_chickens

Yunus, W., Razzazi-Fazeli, E., & Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues. *Toxins*, *3*(6), 566–590. https://doi.org/10.3390/toxins3060566

Zhan, J., Burns, A. M., Liu, M. X., Faeth, S. H., & Gunatilaka, A. A. L. (2007). Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of Fusarium oxysporum. *Journal of Natural Products*, *70*(2), 227–232. https://doi.org/10.1021/np060394t

Zheng, Z., Houchins, D., Ung, J., & Richard, J. L. (2004). Validation of an ELISA test kit for the detection of deoxynivalenol in several food commodities. *New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety*, 295–302.

Zhu, Y., Hassan, Y., Watts, C., & Zhou, T. (2016). Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology*, *216*, 19–29. https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2016.03.030

Este trabajo de graduación fue **Aprobado** por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología.

CAROLINA ALEXANDRA MARIN VINDAS (FIRMA)
PERSONA FISICA, CPF-04-0170-0575.
Fecha declarada: 25/10/2021 09:45:52 AM
Esta representación visual no es fuente de confianza. Valide siempre la firma.

Licda. Carolina Marín Vindas

Representante, Decano, quién preside

JORENGETH ABAD RODRIGUEZ RODRIGUEZ (FIRMA)
Firmado digitalmente por JORENGETH ABAD RODRIGUEZ RODRIGUEZ (FIRMA)
Fecha: 2021.10.25 15:30:54 -06'00'

M.PM. Abad Rodríguez Rodríguez

Representante, Unidad Académica

PIO SELIM NASSAR ZUÑIGA (FIRMA)
Firmado digitalmente por PIO SELIM NASSAR ZUÑIGA (FIRMA)
Fecha: 2021.10.26 17:16:49 -06'00'

M.Sc. Pio Selim Nassar

Tutor

LUIS ADRIAN VEGA CORRALES (FIRMA)
Firmado digitalmente por LUIS ADRIAN VEGA CORRALES (FIRMA)
Fecha: 2021.10.27 17:10:09 -06'00'

M.Sc. Luis Vega Corrales

Asesor

CARLOS ERNESTO ALPIZAR SOLIS (FIRMA)
Firmado digitalmente por CARLOS ERNESTO ALPIZAR SOLIS (FIRMA)
Fecha: 2021.10.26 15:35:03 -06'00'

M.Sc. Carlos Alpízar Solís

Invitado especial