



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

EFFECTO DEL ENILCONAZOL EN BACTERIAS Y HONGOS
AISLADOS A PARTIR DE INSTALACIONES DE AVES DE
PRODUCCIÓN Y COMPAÑÍA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

NADIA PRADO RAMÍREZ

ASESORES

DRA. CECILIA ROSARIO CORTÉS

DR. GARY GARCÍA ESPINOSA



Cd. Mx.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, por apoyarme, enseñarme, guiarme y acompañarme a lo largo de este proceso y de toda la vida, por su amor incondicional, por su esfuerzo y su ejemplo, sin ustedes no habría llegado tan lejos, gracias por continuar conmigo, los quiero y agradezco tenerlos en mi vida.

A mi hermana, siempre a mi lado sin importar la situación, por apoyarme en todos los aspectos y enseñarme que siempre se puede ir por más, por su compañía en cada aventura (ésta no es la excepción) y su cariño, gracias por todo, te quiero.

A mi familia, por su apoyo constante y su compañía, gracias por estar ante cualquier situación a nuestro lado

A mis amigos, compañeros y colegas, por acompañarme a lo largo de esta aventura y compartir una de las etapas más bonitas. Especialmente a mis amigos del laboratorio por darme la oportunidad de trabajar, convivir y divertirme con ellos, muchas gracias por este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por formarme no sólo profesionalmente, sino por darme tantas enseñanzas y oportunidades de vida, por brindarme tanto a través de los profesores, compañeros y amigos de esta etapa profesional.

A la FMVZ por darme la oportunidad de formarme dentro de esta maravillosa carrera.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, por ayudarme en la formación de esta última etapa y el principio de lo que viene, a cada miembro del mismo por enseñarme y dedicarme parte de su tiempo, gracias.

Al Dr. Manuel Banegas y a Impexvet, sin su ayuda este proyecto no hubiese sido posible, muchísimas gracias.

A mi asesora la Dra. Cecilia, por su apoyo, enseñanzas, tiempo y confianza, por darme la oportunidad de trabajar a su lado muchísimas gracias. Al Dr. Gary García y los miembros de mi jurado por apoyar este trabajo y formar parte del mismo. Al Dr. Roberto Cervantes por su tiempo, paciencia y enseñanzas, gracias por darme la oportunidad de conocer más sobre el mundo de los hongos, muchísimas gracias. Al equipo del laboratorio de Micología por ayudarme y compartir su conocimiento muchísimas gracias

CONTENIDO

| | |
|-------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| RESUMEN | 8 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 9 |
| RESULTADOS..... | 14 |
| DISCUSIÓN | 17 |
| CONCLUSIONES | 20 |
| CUADROS | 21 |
| FIGURAS | 27 |
| REFERENCIAS..... | 29 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Conteo realizado a partir de la exposición ambiental en el CEIEPAv, FMVZ, UNAM. Los resultados corresponden a un promedio realizado a partir del conteo de las UFC/caja. | 21 |
| Cuadro 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de bacterias aisladas a partir de la exposición ambiental en CEIEPAv y el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM. | 22 |
| Cuadro 3. Bacterias y hongos aislados a partir de la exposición ambiental en CEIEPAv FMVZ UNAM. | 23 |
| Cuadro 4. Conteo realizado a partir de la exposición ambiental en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM. Los resultados corresponden a un promedio realizado a partir del conteo de las UFC/caja. | 24 |
| Cuadro 5. Bacterias y hongos aislados a partir de la exposición ambiental en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM. | 25 |
| Cuadro 6. Especies de <i>Aspergillus</i> aislados a partir de la exposición ambiental en el CEIEPAv y en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM. | 26 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Resultados de la exposición de bacterias aisladas a partir del CEIEPAv y el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM ante el efecto del enilconazol.27
- Figura 2. Resultados de la exposición de hongos aislados del CEIEPAv y el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM ante el efecto del enilconazol.28

RESUMEN

PRADO RAMÍREZ NADIA. Efecto del enilconazol en bacterias y hongos aislados a partir de instalaciones de aves de producción y compañía (bajo la dirección de: Dra. Cecilia Rosario Cortés y Dr. Gary García Espinosa).

La contaminación bacteriana y fúngica tiene un efecto importante tanto en la producción avícola, como en la clínica de aves de compañía, debido a que las enfermedades infecciosas ocasionan severas pérdidas económicas. El enilconazol, un antimicótico, es utilizado por los buenos resultados que tiene y por su amplia versatilidad de aplicación en la clínica de equinos y caninos, sin embargo, se ha llegado a reportar (Vargas, AC 2011 y Rostom, *et.al.* 2009) un efecto antibacteriano no evaluado en microorganismos de importancia en la avicultura. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del enilconazol en bacterias y hongos de importancia en aves. Para ello, se aislaron cepas de *Staphylococcus* sp. y *Escherichia coli* a partir de instalaciones de aves de producción, así como de ornato, silvestres y compañía, además de que se incluyeron cepas de *Pseudomonas* sp. y *Salmonella* sp.; así como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. aislados de las mismas instalaciones. Tanto bacterias como hongos fueron

enfrentados al enilconazol para evaluar su efecto inhibitorio en el crecimiento de estos microorganismos. Se encontró que, en el caso de los hongos, el efecto inhibitorio fue del 100%, sin embargo, las bacterias tuvieron un comportamiento diferente. *Staphylococcus* sp. se redujo un 99.61%, *Escherichia coli* dependiendo del área de donde fue aislada (producción o el hospital) presentó resultados diferentes. *E. coli* aislada de pollo de engorda no tuvo inhibición por efecto del enilconazol, mientras que la que fue aislada de producción de huevo para plato se redujo su crecimiento un 64.11% y la aislada de cocina, un 95.57%. El efecto del enilconazol en *Salmonella* sp fue nulo, mientras que en *Pseudomonas* sp. se redujo un 11.19%.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la producción avícola se encuentra en segundo lugar, sólo después de la porcina¹, sin embargo, la carne de ave sigue siendo la fuente de proteína de mayor accesibilidad, en comparación a la carne de cerdo y de res². México se encuentra dentro de los principales países de América Latina como productor de aves de corral³. De hecho, en los últimos años la industria avícola nacional ha mantenido un crecimiento constante, consolidándose como una actividad estratégica para el país⁴. Datos del 2013 sitúan a la avicultura con el 63% de participación en la producción pecuaria nacional⁵. Sin embargo, no solo las aves de corral son importantes en nuestro país, ya que México cuenta con cerca del 11% del total mundial en cuanto a la diversidad de aves, colocándolo en el décimo primer lugar de acuerdo a su riqueza avifaunística entre los países megadiversos del mundo, además de contar con un alto porcentaje de aves endémicas. Sin embargo, del 43 al 44% de la avifauna mexicana se encuentra en alguna categoría de amenaza, de acuerdo a autoridades nacionales e internacionales⁶. Además de su diversidad, las aves son inteligentes y pueden ser excelentes animales de compañía⁷; de hecho, actualmente los loros representan la mayor parte este tipo de aves⁸.

En la avicultura, las enfermedades infecciosas se encuentran entre los principales problemas que ocasionan pérdidas millonarias para los productores^{9,10} y en el caso de las aves de ornato y compañía, cuando no se diagnostican a tiempo, representan tratamientos costosos y prolongados o incluso la muerte del animal o la transmisión

de algunas enfermedades a los dueños. Es por ello que la contaminación, ya sea bacteriana o fúngica, representa un punto crítico en la presentación de enfermedades infecciosas. En consecuencia, la limpieza y desinfección del ambiente en donde se alojan las aves se vuelve una parte esencial del manejo en cualquier producción avícola o alojamiento para un ave de compañía¹¹. Entre los principales patógenos en la avicultura, se encuentran bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., mientras que las aves de ornato y compañía son susceptibles a varios tipos de bacterias, como *Escherichia coli*, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., por mencionar algunas¹². Por otro lado, *Aspergillus fumigatus* es considerado entre los principales hongos asociados a enfermedades del tracto respiratorio en aves, tanto de producción como de compañía¹³.

El enilconazol, también conocido como imazalil, es un antimicótico de amplio espectro que pertenece al grupo de los imidazoles, los cuales inhiben la síntesis de la pared celular al interferir con la enzima citocromo P450, la cual es responsable de convertir lanosterol a ergosterol^{13,14,15,16,17}. Éste último es un componente esencial de la membrana plasmática de los hongos, regula la permeabilidad y la actividad de enzimas de membrana. Además, tiene un papel importante en la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa, por lo que al alterar la formación de este componente se alteran varias vías metabólicas del hongo, que dan como resultado la inhibición de su replicación¹⁸. Debido a su baja presión de vapor y su fácil evaporación en ambientes cerrados, así como su actividad en estado gaseoso, tiene diversos usos, como su utilización en el control y la eliminación de hongos

sobre momias del museo de “El Carmen de la Ciudad de México”. En solución acuosa se utilizó sobre los guerreros de terracota descubiertos en la provincia de Xian, China que habían sido invadidos por hongos¹⁹ y en medicina humana fue utilizado como tratamiento en un caso de alternariosis humana para contrarrestar la infección²⁰. Sin embargo, es más conocido por ser ampliamente utilizado en la producción de frutas, vegetales e incluso algunos granos, gracias a su actividad contra hongos fitopatógenos y a su efecto antiesporulante^{18, 21, 22}. En medicina veterinaria ha tenido un amplio uso en el tratamiento de enfermedades micóticas en perros y equinos^{17,18}, tanto por vía tópica como en forma de humo o aspersión^{18, 25, 26}. En el área avícola solamente se ha utilizado como tratamiento de aspergilosis experimental en pavos²³, pero al poseer una potente actividad fungicida, se ha desarrollado como un desinfectante antimicótico tanto de instalaciones como de equipo^{18, 24}. Por otro lado, se sugiere que también tiene un efecto antibacteriano, debido a que algunos estudios muestran que en general los azoles presentan inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas, con mayor actividad sobre las primeras, como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*²⁷.

Justificación

Dada la importancia de la contaminación bacteriana y fungal en las casetas avícolas e incubadoras, así como en el hospital de aves de compañía y ornato, es relevante determinar el efecto de este producto sobre los principales hongos y bacterias de importancia en la avicultura, ya que existe información sobre la inhibición micótica y óptimos resultados a nivel terapéutico en el caso de caninos y equinos¹², mientras

que se ha reportado la actividad antibacteriana (Vargas, AC 2011 y Rostom, *et.al.* 2009), pero existe poca información disponible en el área avícola.

Objetivos

Determinar el efecto antimicótico del enilconazol en *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. de importancia en la avicultura comercial y en el hospital de aves.

Determinar el efecto antibacteriano del enilconazol en *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. aisladas a partir de aves de producción, de ornato, silvestres y compañía, además de *Salmonella* sp. y *Pseudomonas* sp. pertenecientes al cepario del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ, de la UNAM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y de hongos. Las cepas fueron aisladas a partir de la exposición ambiental de cajas de Petri con agar Tripticasa de Soya (TSA), agar MacConkey (McC) y agar Sabouraud Dextrosa (SDA) para el aislamiento de microorganismos Gram positivos, Gram negativos y hongos, respectivamente. Las cajas fueron abiertas y expuestas al ambiente en diferentes áreas del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la FMVZ de la UNAM, como son: producción de pollo de engorda, producción de huevo para plato, producción de alimento balanceado (planta de alimento y silo), almacén de huevo e incubadora. En cada una de las cinco áreas se expusieron dos cajas de petri de TSA, dos de McC y dos de SDA, durante treinta minutos.

El mismo procedimiento se realizó en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ de la UNAM. La distribución de cajas fue la siguiente: en las áreas de recepción de pacientes, hospitalización, terapia, terapia intensiva, consultorio, quirófano, pasillo y cocina. En cada uno de estos sitios se colocaron tres cajas de TSA, tres de McC y tres de SDA, mientras que, en el consultorio y el pasillo, se colocaron dos cajas de TSA, dos de McC y dos de SDA por área. Finalmente, en el quirófano se expuso una caja de TSA, una de McC y una de SDA.

Identificación de los microorganismos. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas y observación del crecimiento bacteriano y fungal, se realizó el conteo de

colonias por caja. En TSA el conteo realizado correspondió a mesófilos aerobios, en McC a enterobacterias y en SDA a hongos y levaduras. Para la identificación de los primeros, se realizó cultivo puro en Agar Chapman de las diferentes colonias observadas, con el objetivo de aislar cocos Gram positivos. Posteriormente a las colonias se les realizó una tinción de Gram y mediante la prueba de KOH al 3%²⁸ se corroboró la tinción. Finalmente, se les realizó una prueba de catalasa para determinar si se trataban de *Streptococcus* sp. o *Staphylococcus* sp.²⁹

De los microorganismos obtenidos de agar McC, se realizó cultivo puro de las diferentes colonias observadas y posteriormente, mediante una bioquímica corta que comprende los siguientes medios: TSI (Triple azúcar hierro), Urea, Citrato, LIA (Agar Hierro Lisina), y SIM (Ácido sulfhídrico, Indol y Movilidad) se determinó su identidad de acuerdo a Jang, SS, *et.al.* (1978)³⁰. En aquellos aislamientos para los cuales se requerían pruebas bioquímicas complementarias para determinar su identidad, éstas se llevaron a cabo.

Los hongos fueron aislados a partir de los medios SDA, posteriormente su identificación se realizó mediante la observación de su morfología macroscópica y microscópica, de acuerdo a Beneke, ES. (1957)³¹ y Funder, S. (1968)³². En el caso de los hongos del género *Aspergillus* se realizó una identificación de especie, por lo cual se sembró en agar Czapek Dox para la observación de su morfología macroscópica³³ y para la microscópica se realizaron microcultivos seriados de 24, 48, 72 y 96 horas, para la observación del desarrollo fungal y su posterior

identificación de acuerdo a St. Germain, G, Summerbell, R. (2010) y Larone, DH (2013)^{33, 34}.

Selección de bacterias y hongos. La bacteria seleccionada a partir de la exposición ambiental en el CEIEPAV fue *Escherichia coli* aislada de pollo de engorda. Del Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres se seleccionó una *Escherichia coli* aislada a partir de la cocina y un *Staphylococcus* sp. aislado de quirófano. Adicionalmente, se decidió incluir cepas de *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., y *Escherichia coli* aisladas de aves comerciales, pertenecientes al cepario del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ de la UNAM, con el objetivo de evaluar la efectividad del enilconazol.

Los hongos seleccionados del muestreo ambiental del CEIEPAV fueron una cepa de *Aspergillus* sp. aislado a partir de la producción de alimento balanceado y otro de incubadora, mientras que del Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres se seleccionó un *Aspergillus* sp. aislado de hospitalización, así como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. aislados de cocina.

Obtención de inóculos y sembrado. Para la preparación de los inóculos, las bacterias fueron sembradas en cultivo puro en TSA y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se sembraron de dos a tres colonias (a partir del cultivo puro en TSA) en 30mL de caldo infusión cerebro corazón (CICC) y se incubaron a 37°C durante 18 h con agitación a 200 rpm. Después, se realizaron dos lavados con PBS 1x para obtener la bacteria purificada, a partir de ésta, con un espectrofotómetro Beckman ® DU640B se ajustó a una concentración bacteriana de 1×10^9 UFC/mL, a partir de

la cual, se realizaron diluciones décuples seriadas. Una vez realizadas las diluciones, se sembraron 100 μL en tres cajas de agar TSA para obtener aproximadamente 1×10^2 UFC/ placa, esta siembra se realizó con un asa bacteriológica de vidrio para distribuir el inóculo sobre la superficie del agar. De igual forma se sembraron una serie de cajas testigo que no serían expuestas al enilconazol³⁵

En el caso de los hongos, éstos se sembraron en SDA y una vez desarrollados, se utilizó una solución de trabajo que permite dispersar homogéneamente las esporas del hongo³⁶. La concentración a la que se ajustó fue igual a la descrita en el caso de bacterias y se sembraron 100 μL por caja de SDA, realizándose un triplicado de la dilución 1×10^3 UFC/mL. Además, se incluyó un triplicado de cajas testigo. Dicha concentración correspondió a 100 conidias por caja.

Exposición al enilconazol. Las cajas fueron expuestas durante 18 horas a un generador de humo de enilconazol por cada 50m^3 , se distribuyeron sobre la superficie de una mesa dentro de una de las unidades de aislamiento del Departamento de Medicina y Zootecnia Avícola de la FMVZ de la UNAM y se aseguró que la unidad estuviera herméticamente cerrada para evitar la salida del enilconazol. Se realizaron dos exposiciones, en la primera se incluyó un grupo correspondiente a bacterias aisladas tanto del CEIEPAv como del Hospital de Aves de Ornato Compañía y Silvestres y en la segunda exposición, el grupo de hongos. Una vez concluido el periodo de exposición, tanto las cajas del grupo tratado como las del grupo testigo se incubaron durante 24 horas a 37°C . Concluido el periodo de

incubación, se realizó el conteo de las colonias que correspondió a las unidades formadoras de colonias por caja. Posteriormente, se obtuvieron promedios para la elaboración de gráficas con barras de error que permitieran observar el comportamiento de las bacterias y hongos ante el efecto del enilconazol.

RESULTADOS

Aislamientos e identificación de hongos y bacterias. A partir de la exposición ambiental realizada en el CEIEPAv de la FMVZ de la UNAM se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia por caja de mesófilos aerobios, enterobacterias, hongos y levaduras. Los promedios de los valores obtenidos se expresaron como logaritmo en base diez, como se observa en el **Cuadro 1**. En él se muestra que, tanto el área de pollo de engorda como el almacén de huevo fueron los más contaminados por mesófilos aerobios, comparado con otros sitios. En el caso de las enterobacterias, el área de pollo de engorda presentó mayor cantidad, mientras que en almacén de huevo e incubadora no existió crecimiento. En el caso de hongos y levaduras, hay mayor cantidad de estos microorganismos en el área de pollo de engorda y producción de alimento balanceado.

En el **Cuadro 2** se presentan las diferentes pruebas bioquímicas realizadas para identificar las bacterias aisladas, de acuerdo a Jang, SS, *et.al.* (1978)³⁰.

En el **Cuadro 3** se observan los resultados de la identidad de los microorganismos aislados. Sólo en pollo de engorda se aisló *Escherichia coli* y en almacén de huevo se aislaron tres especies diferentes de hongos. Además, en incubadora se aislaron dos especies de hongos, uno de ellos de importancia clínica (*Aspergillus* sp.).

En el caso del Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres de la FMVZ de la UNAM los conteos realizados se presentan en el **Cuadro 4**. En él se puede observar que en el área de hospitalización se encontró la mayor contaminación por

mesófilos aerobios (622 UFC/caja), al igual que de enterobacterias (49UFC/caja). El pasillo y la cocina son las otras dos áreas, después de hospitalización, que presentan una gran cantidad de mesófilos aerobios (75 y 64 UFC/caja, respectivamente), sin embargo, en el caso de las enterobacterias (2 y 1 UFC/caja, respectivamente) encontradas en esas mismas áreas, la concentración fue menor con respecto a hospitalización. El área de quirófano presentó la menor cantidad de mesófilos aerobios y como observamos, de éstos ninguno corresponde a enterobacterias.

En cuanto a hongos y levaduras, se puede observar en el mismo **Cuadro 4**, que la mayor cantidad la encontramos en hospitalización (486 UFC/caja), seguida de pasillo y cocina (41 y 28 UFC/caja, respectivamente). Hay que destacar que en el área de quirófano existió el menor crecimiento (1 UFC/caja).

En el **Cuadro 5** se muestra la identidad de los aislamientos realizados en el hospital. Se puede observar que *Staphylococcus* sp. fue aislado en todas las áreas, mientras que *Escherichia coli* sólo se encontró en el área de cocina y pasillo. En cuanto a los hongos, podemos observar que existen varias especies diferentes, como *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp. y *Fusarium* sp. En el área de cocina fue donde se encontró mayor variedad de los mismos; cuatro géneros de los seis que se identificaron. En el caso del área de quirófano fue donde se encontró el menor conteo de hongos y levaduras. Podemos observar que no se aislaron hongos, por lo que el crecimiento correspondió a levaduras.

En el **Cuadro 6** se muestran las diferentes especies de *Aspergillus* aislados, en donde se observa que *Aspergillus flavus* se aisló en la mayoría de las áreas, excepto en hospitalización. Almacén de huevo, fue el área donde se aislaron tres especies diferentes de *Aspergillus*, correspondientes a *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. terreus*.

Exposición al enilconazol. Los resultados obtenidos de las bacterias expuestas al enilconazol se muestran en la **Figura 1**. Donde se puede observar que en el caso de *E. coli*, dependiendo del área de donde fue aislada, presentó resultados diferentes, ya que el enilconazol tuvo mejor efecto de inhibición en *E. coli* aislada a partir de cocina, en donde se inhibió en un 95.57% el crecimiento, mientras que la que fue aislada de producción de huevo para plato la reducción del crecimiento fue del 64.11%, a diferencia de lo observado con la *Escherichia coli* aislada de pollo de engorda, donde el enilconazol no tuvo efecto inhibitorio.

En el caso de *Salmonella* sp. no existió inhibición por efecto del enilconazol, mientras que en *Pseudomonas* sp. hubo una ligera inhibición (11.19%), contrario a lo que se encontró en el caso de *Staphylococcus* sp. de quirófano, donde el porcentaje de reducción del enilconazol fue de 99.61%.

El efecto del enilconazol sobre los hongos se muestra en la **Figura 2**, en la cual se muestra que el producto fue capaz de eliminar al 100% de los hongos evaluados, independientemente de donde fueron aislados.

DISCUSIÓN

El enilconazol, también conocido como imazalil, es un antifúngico perteneciente al grupo de los imidazoles¹⁸, estos compuestos sintéticos a su vez forman parte de una familia heterogénea de fármacos conocidos como azoles, cuya característica principal es que comparten la presencia de un anillo azólico central³⁷. Los imidazoles presentan actividad antibacteriana, aunque rara vez son utilizados con ese propósito, por ello se decidió evaluar el enilconazol en bacterias aisladas, tanto de bacterias de aves comerciales como de compañía, ya que este producto se emplea ampliamente en la industria avícola para controlar el crecimiento microbiano.

En este trabajo se utilizaron tanto hongos como bacterias aislados a partir de aves de producción y aves de ornato. Los resultados de la exposición de los hongos al efecto del enilconazol mostraron, que independientemente del origen del hongo, ya sea aves de ornato, compañía y silvestres, o de producción, la reducción del crecimiento fue de 100%, probablemente por el efecto inhibitorio del enilconazol sobre la síntesis del ergosterol, componente clave en la estructura de los hongos^{13, 14, 15, 16, 17}. Incluso se puede atribuir a que no existe resistencia de las cepas empleadas frente al enilconazol, lo que concuerda con estudios previos en donde cepas de *Aspergillus fumigatus* aislados a partir de gansos domésticos en Polonia, presentan el 100% de susceptibilidad frente al enilconazol y voriconazol, a diferencia de la resistencia desarrollada frente a otros antimicóticos como clotrimazol, miconazol, y anfotericina B (Ziółkowska, *et.al.* 2014)¹³. Sin embargo, debido a que las bacterias tienen una estructura química diferente a la de los hongos, el efecto

es distinto, más aún, se plantea que el efecto sobre bacterias Gram positivas es mejor que sobre las Gram negativas, como pudo observarse en el presente trabajo, en el cual se observaron resultados variables, no solo dependiendo del género y la especie, sino también relacionado con el lugar de aislamiento. Rostom, *et.al.* (2009) señalan que el efecto inhibitorio se atribuye a diferentes compuestos de los azoles, pero principalmente a la inhibición de la proteína transportadora enoil-acil reductasa, también conocida como ENRs por sus siglas en inglés²⁷, que cataliza el último paso del ciclo de elongación en la síntesis de los ácidos grasos y que se encuentra presente en una gran diversidad de microorganismos³⁸. Posiblemente, a ello se deba el efecto que se encontró en las bacterias, ya que, en el caso de éstas, la biosíntesis resulta crucial, ya que los ácidos grasos son componentes importantes en las diversas rutas metabólicas celulares y además son componentes estructurales de la membrana celular³⁹.

Los resultados obtenidos con la cepa de *Staphylococcus* sp. proveniente de quirófano, que mostró una reducción del 100%, concuerda con lo reportado anteriormente por Rostom, *et.al.* (2009) y Vargas AC (2011). Este último autor probó el efecto del enilconazol en el acervo de una biblioteca y cuyos resultados demostraron efectividad del antimicótico frente a bacterias Gram positivas⁴⁰.

El efecto inhibitorio del enilconazol en las cepas de *E. coli* dependió del área de la cual fue aislada, ya que *E. coli* de cocina presentó una inhibición cercana al 100% (95.57%), comparada con aquella aislada en el área dedicada a producción de huevo para plato y pollo de engorda, las cuales mostraron un menor porcentaje de

reducción, (64.11% y 0% respectivamente). Esto se puede atribuir a cierta resistencia debido a la selección de cepas según su lugar de procedencia, ya que como mencionan Massengo-Tiassé, *et.al.* (2009), existe una gran diversidad de ENRs y al ser inhibidas por diferentes antimicrobianos tanto de origen sintético como de origen natural, existe una presión evolutiva en donde se van seleccionando dichas proteínas³⁸, lo que explicaría la mayor inhibición del enilconazol en la cepa de *E. coli* aislada de cocina, comparado con las provenientes de producción de huevo para plato y pollo de engorda, en cuyas áreas existe mayor selección por el uso de diversos desinfectantes.

En el caso de *Pseudomonas* sp. el efecto inhibitorio del enilconazol fue mínimo (11.19%), sin embargo, no puede descartarse que aquellas células que lograron sobrevivir no hayan tenido algún daño, ya que, en un estudio previo de Yang, *et.al.* (2010), ya habían probado compuestos que inhibían la proteína transportadora enoil-acil reductasa y con ello atenuaban la producción de factores de virulencia y la formación de biofilms, dos características que determinan la patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*⁴¹, sin embargo, en el presente estudio no se determinó la integridad de las células bacterianas que no fueron inhibidas, por lo que sería interesante evaluar si hubo algún daño o posible atenuación de éstas. Finalmente, en el caso de *Salmonella* sp. no existió un efecto inhibitorio del enilconazol, similar a lo que se encontró en el caso de *Pseudomonas* sp. Posiblemente se requiere de diferentes cepas de *Salmonella* sp. para realizar comparaciones con respecto a su comportamiento frente al enilconazol.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente experimento se puede concluir que el efecto antimicótico del enilconazol fue excelente ya que todos los hongos evaluados mostraron una reducción del 100%. En el caso de las bacterias, el efecto reductor sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus* sp. fue bueno, no así en el caso de las Gram negativas, las cuales mostraron una resistencia variable al enilconazol, como en el caso de *Pseudomonas* sp. y *Salmonella* sp., mientras que en el caso de *Escherichia coli*, la sensibilidad al antimicótico varió dependiendo de su procedencia. Aparentemente, las cepas aisladas de aves de producción son más resistentes que su contraparte de aves de compañía, sin embargo, se requieren más estudios para comprobar que esta observación es cierta.

CUADROS

Cuadro 1. Conteo realizado a partir de la exposición ambiental en el CEIEPAV, FMVZ, UNAM. Los resultados corresponden a un promedio realizado a partir del conteo de las UFC/caja.

| Área | Mesófilos aerobios \bar{x} UFC/caja (\log_{10}) | Enterobacterias \bar{x} UFC/caja (\log_{10}) | Hongos y levaduras \bar{x} UFC/caja (\log_{10}) |
|--|---|---|---|
| Pollo de engorda | 4029 (3.605) | 25 (1.397) | 4511(3.654) |
| Producción de huevo para plato | 1163 (3.065) | 4 (0.602) | 183 (2.262) |
| Producción de alimento balanceado | 1291 (3.110) | 2 (0.301) | 1504 (3.177) |
| Almacén de huevo | 3249 (3.511) | 0 | 15 (1.176) |
| Incubadora | 31 (1.491) | 0 | 6 (0.778) |

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de bacterias aisladas a partir de la exposición ambiental en CEIEPAv y el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM.

| | <i>Citrobacter</i> sp. | <i>Enterobacter</i> sp. | <i>Escherichia coli</i> | | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Streptococcus</i> sp. |
|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----|---------------------------|--------------------------|
| TSI (Triple azúcar hierro) | 2 | 1 | 1 | 3 | | |
| Urea | - | + | - | | | |
| Citrato | + | + | - | | | |
| LIA (Agar hierro lisina) | M/A | M/M | M/N | M/M | | |
| SIM (Ácido sulfhídrico, Indol, Movilidad) | +/-/+ | -/-/+ | -/+/+ | | | |
| Catalasa | | | | | + | - |
| Oxidasa | - | | - | | | |
| Hemólisis | | | | | | |
| Lisina descarboxilasa | - | | | | | |
| Ornitina descarboxilasa | | + | | | | |
| Gelatina | | - | | | | |
| Arabinosa | | + | | | | |
| Dulcitol | | - | | | | |
| Lactosa | | + | | | | |
| Maltosa | | + | | | | |
| Ramnosa | | + | | | | |

De acuerdo a Jang, SS, *et.al.* (1978).

Cuadro 3. Bacterias y hongos aislados a partir de la exposición ambiental en CEIEPAv FMVZ UNAM.

| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Enterobacter</i> sp. | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Streptococcus</i> sp. | <i>Rhizopus</i> sp. | <i>Aspergillus</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Alternaria</i> sp. |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| Pollo de engorda | + | + | | + | + | | | |
| Producción huevo para plato | | + | + | + | + | + | | |
| Producción alimento balanceado | | + | + | + | + | + | | |
| Almacén de huevo | | | | + | | + | + | + |
| Incubadora | | | | + | + | + | + | |

Cuadro 4. Conteo realizado a partir de la exposición ambiental en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM. Los resultados corresponden a un promedio realizado a partir del conteo de las UFC/caja.

| Área | Mesófilos aerobios \bar{x} UFC/caja (\log_{10}) | Enterobacterias \bar{x} UFC/caja (\log_{10}) | Hongos y levaduras \bar{x} UFC/caja (\log_{10}) |
|-------------------------------|---|--|---|
| Recepción de pacientes | 18 (1.255) | 1 (0) | 4 (0.602) |
| Terapia | 33 (1.518) | 0 | 16 (1.204) |
| Terapia intensiva | 38 (1.579) | 0 | 20 (1.301) |
| Hospitalización | 622 (2.793) | 49 (1.609) | 486 (2.686) |
| Cocina | 64 (1.806) | 1 (0) | 28 (1.447) |
| Pasillo | 75 (1.875) | 2 (0.301) | 41 (1.612) |
| Quirófano | 9 (0.954) | 0 | 1 (0) |
| Consultorio | 12 (1.079) | 0 | 6 (0.778) |

Cuadro 5. Bacterias y hongos aislados a partir de la exposición ambiental en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM.

| | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Escherichia coli</i> | <i>Enterobacter</i> sp. | <i>Citrobacter</i> sp. | <i>Rhizopus</i> sp. | <i>Aspergillus</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Scopulariopsis</i> sp. | <i>Cladosporium</i> sp. | <i>Fusarium</i> sp. |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Recepción de pacientes | + | | | | + | | + | | | |
| Hospitalización | + | | + | | + | + | | | + | |
| Terapia | + | | | | | | | | | |
| Terapia intensiva | + | | | | | | | + | | |
| Cocina | + | + | + | | + | + | + | | + | |
| Consultorio | + | | | | | | + | | | |
| Pasillo | + | + | | + | | | | | | + |
| Quirófano | + | | | | | | | | | |

Cuadro 6. Especies de *Aspergillus* identificados a partir de la exposición ambiental en el CEIEPAv y en el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM.

| | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus terreus</i> |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Producción de huevo para plato | + | | + | |
| Producción de alimento balanceado | + | | | |
| Almacén de huevo | + | + | | + |
| Incubadora | + | | | |
| Cocina | + | | | |
| Hospitalización | | | | |

FIGURAS

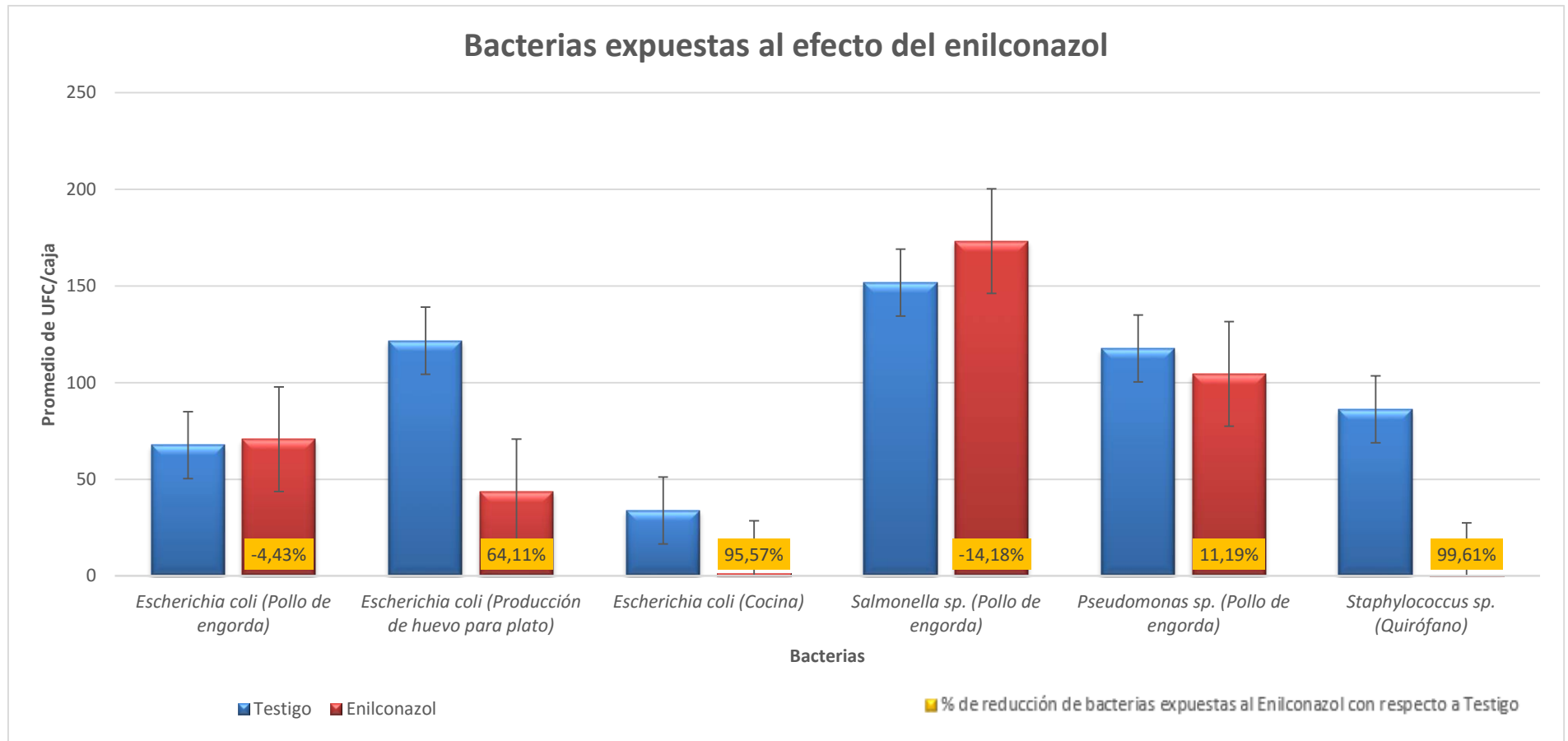


Figura 1. Resultados de la exposición de bacterias aisladas a partir del CEIEPAV y el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM ante el efecto del enilconazol.

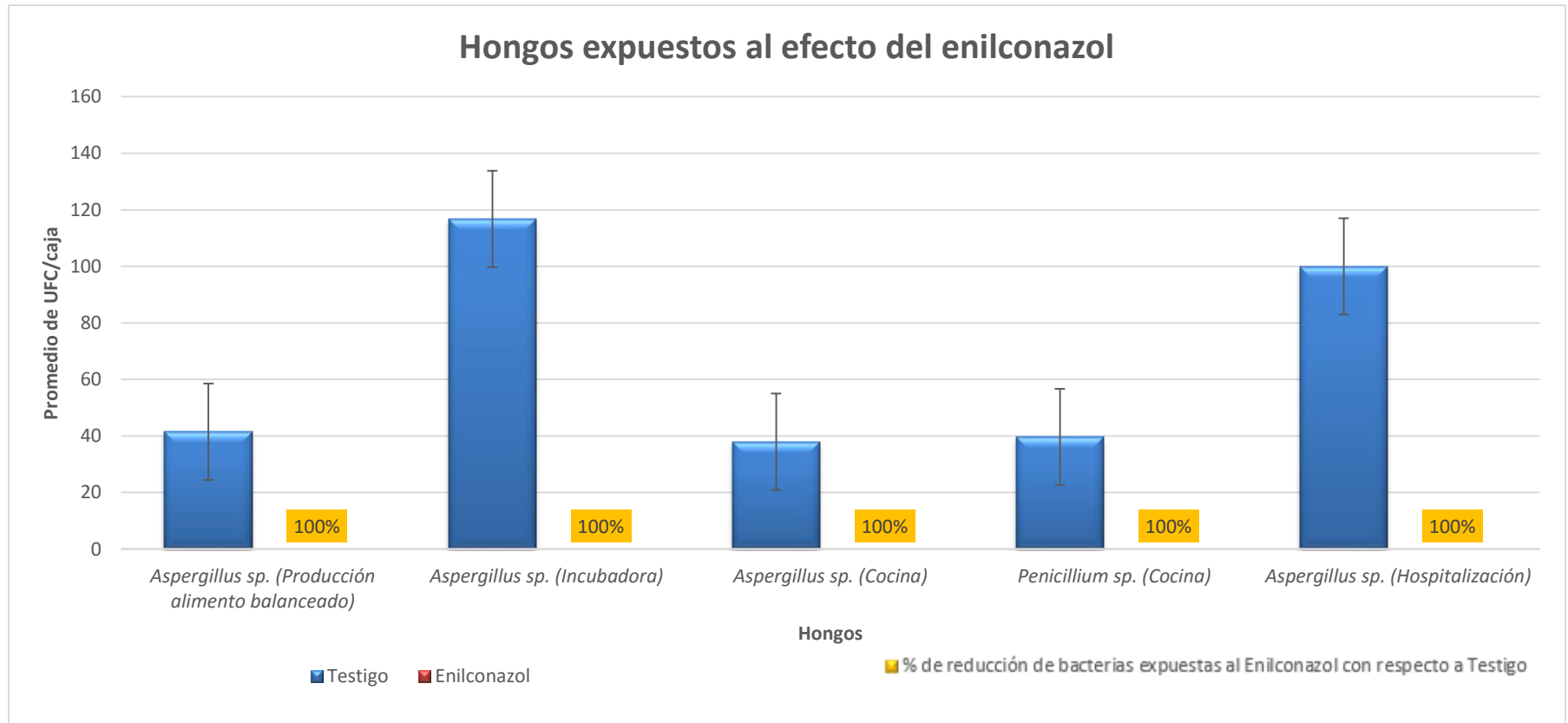


Figura 2. Resultados de la exposición de hongos aislados del CEIEPAv y el Hospital de Aves de Ornato, Compañía y Silvestres, FMVZ, UNAM ante el efecto del enilconazol.

REFERENCIAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [actualización: 15 junio 2015] Roma, Italia: Producción y salud animal <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html> [citada: 29 marzo 2015].
2. El Sitio Avícola [actualización: 2014] Chicago, USA: El sitio avícola, Artículos <http://www.elsitioavicola.com/articles/2629/sector-de-pollo-mexicano-expectativas-para-el-2015/> [citada: 1 abril 2015].
3. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [actualización: 15 junio 2015]. Roma, Italia: Producción y salud animal. <http://www.fao.org/docs/eims/upload/241498/ai308es.00.pdf> [consulta: 19 marzo 2015].
4. Unión Nacional de Avicultores [actualización: 10 junio 2015]. Distrito Federal, México: Panorama. <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/crecera-2-5-la-avicultura-mexicana-en-2015> [consulta: 19 marzo 2015].
5. Unión Nacional de Avicultores [actualización: 10 junio 2015]. Distrito Federal, México: Indicadores económicos <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos> [consulta: 19 marzo 2015].
6. Navarro-Sigüenza A, Rebón-Gallardo M F, Gordillo-Martínez A, Townsend A, Berlanga-García H, Sánchez-González LA. 2014. Biodiversidad de aves en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S476-S495.

- <http://www.ib.unam.mx/m/revista/pdfs/56.-1577.pdf> [consulta: 13 junio 2015].
7. CDC Centers for Disease Control and Prevention [actualización: 2015] Georgia, USA: Healthy Pets Healthy People <http://www.cdc.gov/healthypets/pets/birds.html> [citada: 4 junio 2015].
 8. Merck Manual, The Merck Veterinary Manual [actualización: 2014] NJ, EE.UU: Merck Manual, Pet birds http://www.merckvetmanual.com/mvm/exotic_and_laboratory_animals/pet_birds/overview_of_pet_birds.html [citada: 4 junio 2015].
 9. Comité Nacional Sistema Producto Aves [actualización: 2014]. Distrito Federal, México: Comité Nacional Sistema Producto Aves. http://sistemaproductoaves.org.mx/noticias/img/Taller_Buenas_Practicas_carne_ave_Fines_Certificacion/Manual_Pollo.pdf [consulta: 19 marzo 2015].
 10. Calderon NL. 2009. Situación económica actual de la tecnificación y los aspectos sanitarios de la avicultura nacional y mundial. En: Hernández X (Editor). *Zootecnia Avícola*. 1º Edición. Distrito Federal, México: UNAM. FMVZ. Departamento de producción animal: Aves. pp. 61-74.
 11. Luyckx K, Dewulf J, Van Weyenberg S, Herman L, Zoons J, Vervaeke E, Heyndrickx M, De Reu, K. 2015. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poultry Science*, 94 (4): 740-749.

- <http://ps.oxfordjournals.org/content/94/4/740.full.pdf+html> [consulta: 19 marzo 2015].
12. PETMED [actualización: 2015] USA: Pet Med Vet Authored Vet approved, Bacterial diseases
http://www.petmd.com/bird/conditions/parasitic/c_bd_Bacterial_Diseases
[citada: 5 junio 2015].
13. Ziólkowska G, Tokarzewski S, Nowakiewicz A. 2014. Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. *Poultry Science*, 93:1106-1112.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/93/5/1106.full.pdf+html> [consulta: 29 marzo 2015].
14. The Extension Toxicology Network [actualización: 2014]. Oregon, California, Estados Unidos: Extoxnet, Pesticide Information Profiles
15. CERTIS Solutions for Crop protection [actualización: 2014]. Europa: News
<http://www.certiseurope.com/our-products/imazalil.html> [citada: 29 marzo 2015].
16. Zega G, De Bernardi F, Gropelli S, Pennati R. 2009. Effects of the azole fungicide Imazalil on the development of the ascidian *Ciona intestinalis* (Chordata, Tunicata): Morphological and molecular characterization of the induced phenotype. *Elsevier, Aquatic Toxicology*, 91: 255-261.
http://ac.els-cdn.com/S0166445X08003871/1-s2.0-S0166445X08003871-main.pdf?_tid=36ceddc2-1900-11e5-812b-

0000aacb362&acdnat=1434992621_be0962c918d9127a825eb79223dd67f4 [consulta: 29 marzo 2015].

17. Kendall A, Brojer J, Karlstam E, Pringle J. 2008. Enilcolazole treatment of horses with superficial *Aspergillus* spp. rhinitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 1239-1242. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0173.x/epdf> [consulta: 29 marzo 2015].
18. Vanden H, Engelen M, Rochette F. 2003. Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J. vet. Pharmacol Therap*, 26: 5-29. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2885.2003.00456.x/epdf> [consulta: 29 marzo 2015].
19. López-Martínez R, Hernández FH, Millán BC, Manzano PG, Méndez LT. 2007. Efectividad del imazalil en el control del deterioro por hongos de momias del museo de El Carmen, Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 283-288. <http://www.reviberoammicol.com/2007-24/283288.pdf> [Consulta: 17 diciembre 2015].
20. Stiller RL, Stevens DA. 1986. Studies with a plant fungicide, imazalil, with vapor-phase activity, in the therapy of human alternariosis. *Mycopathologia*, 93 (3): 169-172. <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00443520> [Consulta: 17 diciembre 2015].

21. Tanaka T, Ogata A, Inomata A, Nakae D. 2008. Effects of maternal exposure to Imazalil on behavioral development in F₁-Generation mice. *Wiley Periodicals, Inc. Birth Defects Research (Part B)* 98: 334-342. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdrb.21070/epdf> [consulta: 29 marzo 2015].
22. Dore A, Molinu MG, Venditti T, D'Hallewin G. 2009. Immersion of lemons into Imazalil mistures heated at 50°C alters the cuticle and promotes permeation of imazalil into rind wounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 623-631. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf803085c> [consulta: 29 marzo 2015].
23. Perelman B, Smith B, Bronstein D, Gur-Lavie A, Kuttin ES. 1992. Use of azole compounds for the treatment of experimental aspergillosis in turkeys. *Avian Pathology*, 21: 591-599. <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03079459208418880> [Consulta: 17 diciembre 2015].
24. Shang N, Zhang J, Shao B. 2013. Simultaneous determination of Azoles antifungal drugs in chicken tissues by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The Japan Society for Analytical Chemistry, *Analytical Sciences*, 29: 1183-1188. https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/29/12/29_1183/pdf [consulta: 29 marzo 2015].
25. Zonderland JL, Stork CK, Saunders JH, Hamaide AJ, Balligand MH, Clercx CM. 2002. Intranasal infusion of enilconazole for treatment of sinonasal

aspergillosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221 (10): 1421-1425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458610> [Consulta: 17 diciembre 2015].

26. Nicholas JH, Sullivan M, Harvey CE, Webb T. 1993. Treatment of canine nasal Aspergillosis with Enilconazole. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7 (1): 40-43. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1993.tb03167.x/epdf> [Consulta: 17 diciembre 2015].

27. Rostom S, Ashour H, El Razik H, El Fattah H, El-Din N. 2009. Azole antimicrobial pharmacophore-based tetrazoles: Synthesis and biological evaluation as potential antimicrobial and anticonvulsant agents. *Elsevier, Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 2410-2422. http://ac.els-cdn.com/S0968089609001412/1-s2.0-S0968089609001412-main.pdf?_tid=1f03591c-1904-11e5-8318-0000aacb360&acdnat=1434994299_399df273d83f16ee23573b308a846c7e [consulta: 29 marzo 2015].

28. Buck, JD. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (4): 992-993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242128/pdf/aem00179-0234.pdf> [consulta: 14 septiembre 2015].

29. MacFaddin JF. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3° edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España: 73-79.
30. Jang SS, Bibertein EL, Hirsh DC. 1978. A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and mycology. Microbiological Diagnostic Laboratory at the Veterinary Medical Teaching Hospital, University of California, USA, California: 27-56.
31. Beneke, E.S. 1957. *Medical Mycology Laboratory Manual*. 2° ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, USA.
32. Funder S. 1968. *Practical mycology manual for identification of fungi*. 3° edition. Hafner Publishing Company. New York, USA: 47, 62, 69, 71, 79, 83, 106, 114, 116.
33. St. Germain G, Summerbell R. 2010. *Identifying fungi. A clinical laboratory handbook*. 2° edition. Star Publishing Company. Belmont, California, USA.
34. Larone DH. 2013. *Medically important fungus. A guide to identification*. 5° edition. ASM Press. Washington, USA.
35. Rosario C. 2005. Caracterización genotípica de cepas de *Escherichia coli* aisladas en aves con infección del saco vitelino [tesis de doctorado]. D.F., México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
36. Ávila, GE. 1988. Evaluación cuantitativa del desarrollo de hongos en el alimento y en los granos. *Avicultura profesional*. Volumen 6 No.2.
37. Azanza JR, García E, Sádaba B. 2007. Farmacología de los azoles, *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 223-227.

<http://www.reviberoammicol.com/2007-24/223227.pdf> [Consulta: 20 diciembre 2015].

38. Massengo-Tiassé RP, Cronan JE. 2009. Diversity in Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (9): 1507. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819910/pdf/nihms110635.pdf> [Consulta: 20 septiembre 2015].
39. Kwon YJ, Kim Hj, Kim WG. 2015. Complestatin exerts antibacterial activity by inhibition of fatty acid synthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38 (5): 715-721. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/38/5/38_b14-00824/article [Consulta: 21 septiembre 2015].
40. Vargas AC. 2011. *Evaluación y selección de productos para el control de biodeterioro en los fondos históricos de la Biblioteca Nacional de Colombia* [tesis de licenciatura]. Bogotá, Colombia: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
41. Yang L, Liu Y, Sternberg C, Moli S. 2010. Evaluation of Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Inhibitors as *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Quenching Reagents. *Molecules*, 15: 780-792. <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/2/780> [Consulta: 20 diciembre 2015].