



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

**PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINA A EN
PLANTAS MEDICINALES DE MERCADOS POPULARES Y
ESTABLECIMIENTOS COMERCIALES DE LIMA - 2016**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN MICROBIOLOGIA

AUTOR:

RODRIGO ROJAS, MARÍA ELENA

ASESOR:

MG. SALAS ASENCIOS, RAMSÉS

JURADO:

DR. MIRAVAL ROJAS, EDGAR JESÚS

DRA. BELLO VIDAL, CATALINA OLIMPIA

DR. ARCE RODRÍGUEZ, ELÍAS MELITÓN

LIMA-PERÚ

2019

Dedicatoria:

A mis amados hijos José María y Noah Alberto, quienes son mi orgullo y fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y así la vida nos depara un futuro mejor.

A mi madre por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A la memoria de mi padre por su amor y por haberme inculcado valores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi madre, quien me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A mi asesor y amigo, el profesor Ramsés Salas Asencios, por su valiosa guía y asesoramiento en la realización de la tesis, y porque ha sido un ejemplo y apoyo a lo largo de mi carrera.

RESUMEN

El objetivo de la tesis fue evaluar la presencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A (OTA) en plantas medicinales de mercados populares y establecimientos comerciales del distrito de Cercado de Lima (Peru) en el año 2016. El tipo de investigación fue descriptivo y retrospectivo, con un diseño no experimental y transversal. Como materiales y métodos, se colectaron plantas medicinales consumidas como infusión en mercados populares y tiendas comerciales de la ciudad de Lima. Se clasificaron las muestras como de procedencia tradicional e industrial y fueron trituradas, homogenizadas y sometidas a un proceso de extracción con metanol 70% antes de ser analizadas con los kits respectivos para cada una de las micotoxinas. Los resultados mostraron presencia de Aflatoxinas y OTA en todas las muestras analizadas. El nivel más alto de aflatoxinas (12.2 ppb) se encontró en muestras tradicionales de “manayupa” y el nivel más bajo (0.600 ppb) en muestras industriales de la misma planta. Así mismo, se encontró mayor dispersión en los resultados encontrados en “manayupa”, lo cual puede ser atribuido al origen diverso y a sus condiciones de cosecha, almacenamiento y expendio. La “cola de caballo” mostró un alto nivel de contaminación con OTA en muestras tradicionales, la cual estuvo en el orden de 13.833 ppb. Se concluyó que en el 71.4% de los casos, los niveles de aflatoxinas fueron superiores en plantas de procedencia tradicional que en las de procedencia industrial y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de contaminación de las plantas medicinales de procedencia tradicional e industrial, sugiriéndose la realización de futuros estudios de detección de micotoxinas y la implementación de estándares nacionales.

Palabras Clave: Aflatoxinas, Ocratoxina A, Planta medicinal, Infusión.

ABSTRACT

The goal of this thesis was to assess the presence of Aflatoxins and Ochratoxin A in medicinal herbs from popular markets and commercial facilities of the “Lima Cercado” district in 2016. This research was of descriptive and retrospective type, with a nonexperimental and transversal design. As material and methods, medicinal herbs consumed as infusions were collected. Samples were classified according to their provenance (traditional or industrial) and were crushed, homogenized and submitted to extraction of mycotoxins using 70% of methanol before their analysis with kits for both mycotoxins. Results showed presence of Aflatoxins and OTA in all the samples. The higher level of Aflatoxins was found in traditional samples of “manayupa” (12.2 ppb) and the lower level was in industrial samples of the same herb (0.600 ppb). Also, a greater dispersion was found in the results of “manayupa”, attributable maybe to the diversity of origin and the harvest, storage and sale conditions. “Cola de caballo” showed a higher level of contamination with OTA in traditional samples (13.833 ppb). It was concluded that in 71.4% of all the cases, aflatoxins levels were higher in traditional herbs than the industrial ones and statistically significant differences were found in the contamination levels of medicinal herbs, in both provenance groups. Finally, it was suggested to use this thesis as a guide to future surveys and to propose national standards about mycotoxins contamination.

Key Words: Aflatoxins, Ochratoxin A, Herbal medicine, Infusion.

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos	i
Resumen	ii
Abstract	iii
INTRODUCCIÓN	8
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.1. Descripción del problema	10
1.2. Formulación del problema	11
1.3. Justificación e importancia de la investigación	12
1.4. Limitaciones de la investigación	13
1.5. Objetivos	14
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Antecedentes	15
2.2. Marco Conceptual	17
2.3. Aspectos de responsabilidad social y medio ambiental	23
III. MÉTODO	24
3.1. Tipo de investigación	24
3.2. Población y Muestra	24
3.3. Hipótesis	25
3.4. Operacionalización de las variables	26
3.5. Instrumentos	28
3.6. Procedimientos	29
3.7. Análisis de Datos	31
IV. RESULTADOS	32
4.1. Contrastación de la Hipótesis	32
4.2. Análisis e interpretación	33
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
5.1. Discusión	40
5.2. Conclusiones	43
5.3. Recomendaciones	44
VI. REFERENCIAS	45
VII. ANEXOS	54
(poner cada anexo)	

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla N° 1. Diferencias entre los Mohos productores de Aflatoxinas	22
Tabla N° 2. Operacionalización de las variables	27
Tabla N° 3. Análisis estadísticos para comparación de medias	32
Tabla N° 4. Niveles promedio de Aflatoxinas y Ocratoxina A (OTA)	33
Tabla N° 5. Niveles de micotoxinas según el tipo de procesamiento	34
Tabla N° 6. Niveles de aflatoxinas según su procedencia	35
Tabla N° 7. Niveles de ocratoxina A según su procedencia	37
Tabla N° 8. Incidencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en diferentes plantas medicinales	38
Tabla N° 9. Incidencia y concentración de Aflatoxinas y OTA en plantas medicinales según su procedencia	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura N° 1. Pasos de extracción de micotoxinas	29
Figura N° 2. Niveles de Aflatoxinas según su procedencia	36
Figura N° 3. Niveles de Ocratoxina A (OTA) según su procedencia	37
Figura N° 4. Incidencia de contaminación con Aflatoxinas y OTA en las muestras evaluadas.	38

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos producen la descomposición de compuestos orgánicos a partir de su invasión y el desarrollo del micelio (Caravaca et al., 2002), pero en algunos casos producen además una gran variedad de agentes tóxicos (micotoxinas), como es el caso de diferentes especies de *Aspergillus*. En vista que *Aspergillus* y *Penicillium* son mohos que se encuentran en el ambiente y en zonas de cultivo, su presencia en estos productos es habitual, pero si estos hongos no son manejados dentro de parámetros que limiten su crecimiento, pueden propiciar la producción de compuestos tóxicos para los humanos, como las Aflatoxinas y la Ocratoxina A (OTA).

El uso de plantas medicinales como agentes terapéuticos es bastante difundido a nivel mundial. El 67% de estas plantas proviene de los países en vías de desarrollo, y su conocimiento es transmitido por vía oral a través de las generaciones. El mayor uso de las plantas terapéuticas es atribuido a personas mayores, pero en países en desarrollo se amplía a diferentes grupos de edad debido a su bajo costo de adquisición en relación a los productos farmacéuticos (Da Silva et al., 2012). En el Perú, alrededor del 30% de la población usa hierbas medicinales para tratar alguna enfermedad y no necesariamente son

administradas por profesionales competentes. La legislación relativa a las hierbas medicinales no es clara sobre el ente responsable que haga la fiscalización y la vigilancia, ni se tiene establecida una farmacopea herbolaria que permita definir especificaciones sobre calidad e inocuidad de estos productos, de tal manera que pueda garantizarse su comercialización. Las empresas que comercializan estas plantas medicinales en diversos preparados evitan en lo posible registrar su producto como recursos terapéuticos naturales ante la DIGEMID, dándole un enfoque de alimento, con lo cual realizan su registro en DIGESA, con un menor número de requerimientos.

Se ha demostrado que algunos extractos de plantas medicinales inhiben el crecimiento de la micoflora y la producción de aflatoxinas (Abd *et al.*, 2009), pero también se ha reportado presencia de hongos toxicogénicos en las plantas medicinales (Sánchez *et al.*, 2006) o se ha detectado presencia de micotoxinas en estas plantas (Ali *et al.*, 2005). Se asume que el consumo de plantas medicinales está en un constante ascenso, pero no se realizan estudios a nivel nacional sobre la presencia potencial de micrororganismos patógenos y toxinas emergentes. El consumo de plantas medicinales en forma fresca, deshidratada, en infusiones o con tratamientos previos de ebullición, no garantizan la ausencia de micotoxinas, por ser estas termoestables.

Por lo expuesto, el objetivo de la presente Tesis es evaluar la presencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en plantas medicinales de Mercados Populares y establecimientos comerciales de Lima en el año 2016.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA:

El consumo de plantas medicinales está en un constante ascenso. La Organización Mundial de la Salud considera que cerca del 80% de la población del planeta usan plantas medicinales, cifra que se incrementa hasta un 89% en países en desarrollo (Ashiq *et al.*, 2014). Se ha calculado que para el año 2020, la población mundial será de 7500 millones de personas, y de esta población el 75% corresponderán a países en desarrollo, en donde sólo se consumirá el 15% de los medicamentos convencionales, por lo que se deduce que la mayoría de habitantes de estas regiones utilizará plantas medicinales como alternativa de tratamiento (Vila, 2009). En Estados Unidos se calcula que el 50% de la población recurre a la medicina alternativa, en la cual el uso de plantas medicinales es de gran importancia, y en América Latina, Cuba es el país que ha incorporado más plantas medicinales a su sistema de salud (Córdova, 2009). En el Perú no se tienen estudios sistematizados del uso de plantas medicinales, pudiendo citar al Dr. Fernando Cabieses Molina como uno de los pocos investigadores preocupados al respecto, y quien en sus últimos años de vida siguió trabajando en plantas medicinales del país con el mismo interés y la

rigurosidad de Europa y Estados Unidos (Bussmann y Sharon, 2015). En el mercado mundial existe una gran diversidad de plantas y fitoterápicos en diferentes presentaciones comerciales, y que son vendidos en el mercado de manera indiscriminada. Esto genera una preocupación respecto de la higiene de estos productos con una especial atención a la carga microbiana y fúngica, sobre todo *Aspergillus* y *Penicillium*, mohos saprofitos que se encuentran en el ambiente y en zonas de cultivo, y cuya presencia en estos productos es habitual (Maffini, 2013) generando un riesgo de contaminación por las micotoxinas que producen.

Las hierbas medicinales en polvo, ya sea en forma de tableta, encapsuladas o envasadas en sobre de papel son una de las presentaciones comerciales comunes de las plantas medicinales. Es común que los medicamentos a base de hierbas en polvo estén compuestos de varias especies de plantas herbales (mezcla de hierbas, Razak *et al.*, 2009). La combinación de diversas plantas puede incrementar la variedad de hongos que podrían encontrarse en estas hierbas medicinales, y el crecimiento de estos hongos puede incrementar el contenido de micotoxinas en las hierbas, ya que estas pueden estar aún sometidas a un período de almacenamiento antes de ser consumidos. Es más, el consumo de plantas medicinales en forma fresca, deshidratada, en infusiones o con tratamientos previos de ebullición, no garantizan la ausencia de micotoxinas, por ser estas termoestables. Todo ello resalta la importancia de la presente investigación como estudio exploratorio, ya que, como se mencionó anteriormente, son muy pocas las investigaciones de este tipo en nuestro país.

1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema General:

¿Existe presencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en plantas medicinales de mercados populares y establecimientos comerciales del distrito de Cercado de Lima (Perú) durante el año 2016?

1.2.2 Problemas Especificos:

- ¿Cuáles son los niveles de aflatoxinas en plantas medicinales?
- ¿Cuál es la incidencia de aflatoxinas y OTA en diferentes plantas medicinales?
- ¿Cuáles son los niveles de aflatoxinas y OTA en plantas medicinales en función de su procedencia (tradicional e industrial)?

1.3 JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION

La trascendencia de la detección de micotoxinas en plantas medicinales para la salud del consumidor ya quedó expuesta en los acápite anteriores pero es recomendable incidir en algunos aspectos. En primer lugar, aún no se comprende por completo los diversos efectos negativos que tienen las micotoxinas sobre la salud humana y los riesgos de su consumo son mal comunicados a los responsables políticos en las regiones donde la contaminación es mayor. En segundo lugar, en comparación, por ejemplo, con los programas de vacunación y control de enfermedades infecciosas o con las mejoras de los servicios de saneamiento, el valor percibido de intervenciones para reducir la contaminación por micotoxinas en los países en desarrollo puede ser relativamente bajo. En tercer lugar, los criterios necesarios para el control

de la contaminación por micotoxinas, aunque potencialmente simples, son multifacéticos, ya que requieren considerar los numerosos puntos de producción, incluyendo la pre-cosecha y la post-cosecha. En cuarto lugar, las exposiciones más altas se producen en las comunidades que producen y consumen sus propios alimentos y por lo tanto las medidas de reglamentación para control de la exposición son poco efectivas. En quinto lugar, el problema de las micotoxinas se encuentra en la interfase de la agricultura, la salud y la economía (Cañigüeral, 2013).

Pese a todo lo expuesto, seguimos en la posición inusual y seguramente inaceptable de ser conscientes desde una perspectiva de investigación que una gran proporción de la población del mundo tiene su alimento básico contaminado por toxinas conocidas y que se realiza poca acción coordinada para combatir el problema en un nivel de salud pública (Wild y Gong, 2010). Todo esto resalta la importancia de la presente investigación como estudio exploratorio, ya que como se mencionó anteriormente, se carece de investigaciones de este tipo en nuestro país. Por tanto, se considera que el presente trabajo servirá como un indicador de los niveles de contaminación por micotoxinas de las plantas medicinales que una gran parte de nuestra población consume, la mayoría de las veces directamente, sin un paso previo de procesamiento industrial o de uso de preservantes. Por otro lado, la trascendencia de la presente tesis es que resalta la necesidad de que las oficinas regulatorias respectivas normen el límite permisible de presencia de hongos en este tipo de plantas.

1.4 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACION:

El presente estudio fue realizado sobre muestras de plantas medicinales obtenidas de mercados populares y establecimientos comerciales de Lima. Se buscó aportar datos actuales y nuevos sobre la problemática de aflatoxinas y OTA en plantas medicinales a nivel local y se buscó establecer una comparación de los niveles de aflatoxinas y OTA entre los productos con registro y sin registro sanitario, lo cual no ha sido evaluado en los niveles de sensibilidad y de remoción de interferentes con los que se cuenta actualmente. En el aspecto procedimental, el método ELISA y el empleo de columnas de inmovilización para la limpieza previa de las muestras herbales es una alternativa de screening rápida y relativamente de bajo costo que puede ser implementada en un laboratorio.

Se tendría que determinar para cada tipo de hierba medicinal la posible presencia de falsos positivos mediante su comparación con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que los valores límite de micotoxinas en alimentos están regulados sobre la base de resultados obtenidos por esta técnica. Otra limitación encontrada fue que el área geográfica de procedencia de las muestras no pudo ser trazada exactamente, y la composición exacta de las mezclas de hierbas muchas veces no está garantizada, por lo que se tuvo que confiar únicamente en lo descrito en la presentación comercial del producto analizado.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la presencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en plantas medicinales de mercados populares y establecimientos comerciales del distrito de Cercado de Lima (Peru) en el año 2016.

1.5.2 Objetivos Específicos:

- Determinar los niveles de aflatoxinas en plantas medicinales según la especie.
- Determinar los niveles de OTA en plantas medicinales según la especie.
- Determinar la incidencia de aflatoxinas y OTA en diferentes plantas medicinales.
- Comparar los niveles de aflatoxinas y OTA en plantas medicinales usadas como infusiones según origen Industrial y Tradicional).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES:

2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES:

Calvert *et al.* (2005) reportaron el contenido de micoflora en algunas plantas medicinales y su capacidad de crecimiento, así como la capacidad de las drogas herbales para inhibir el crecimiento de mohos aflatoxigénicos.

Johnston *et al.* (2005), a través del estudio microbiológico llevado a cabo en México sobre diversos tipos de alimentos, entre los cuales resaltaban hierbas y frutas frescas, demostraron la alta carga bacteriana sobre todo de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. que estos productos poseían al momento de ser expendidos, generando preocupación por el masivo brote de enfermedades causada sobre los consumidores de estos productos.

Sanchez *et al.* (2006) en la ciudad de Santa Fe, Argentina, realizaron análisis microbiológico en hierbas medicinales y establecieron la presencia de *Aspergillus* toxigénicos. Las muestras analizadas correspondieron a Malva, Poleo, Ruda, Estigma de maíz, Boldo, Manzanilla y Menta. Los recuentos

microbiológicos en superficie para las bacterias mesófilas totales oscilaron entre 2×10^3 UFC/g y $5,3 \times 10^6$ UFC/g de muestra y para hongos, los valores mínimos y máximos fueron 0 y $1,5 \times 10^6$ UFC/g.

Trucksess y Scott (2008) hicieron una revisión sobre la aparición de micotoxinas en productos botánicos y frutos secos, señalando que se tienen pocas publicaciones sobre contaminación de mohos y ocurrencia de micotoxinas en plantas utilizadas como alimento y como medicina tradicional a pesar de su larga historia.

Alwakeel (2009) en Arabia Saudita evaluó 25 muestras de hierbas medicinales y encontró una predominancia del género *Aspergillus* y dentro de este a las especies de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, además de la presencia de aflatoxina y la inducción de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad sobre los animales estudiados.

Bussmann *et al.* (2010) reportaron que el empleo de mezclas de plantas medicinales en el norte del Perú produjo un total de 974 preparaciones herbales usadas para tratar 164 diferentes afecciones. Del total, el 30 % de estas preparaciones eran dirigidas para desórdenes sicosomáticos.

Santos *et al.* (2013) reaizaron una revisión respecto a las condiciones habituales de producción y las formas inadecuadas de almacenamiento y transporte de plantas medicinales y sus derivados, evaluando el efecto del procesado sobre la contaminación final de estos productos.

Ahmad *et al.* (2014) evaluaron el estado de contaminación micológica y micotoxicológica de algunas plantas medicinales del Pakistán, encontrando que entre el 30% de las plantas analizadas estaban contaminadas con aflatoxinas, y el 26.7% estaban contaminadas con ocratoxina A. También encontraron que el hongo presente en mayor frecuencia en las muestras de plantas fue *Aspergillus flavus*, seguido por *A. niger*, *A. parasiticus* y *Penicillium spp.*, y que el 31% de los 47 hongos aislados fueron toxigénicos.

Chen *et al.* (2015) evaluaron la presencia de micotoxinas producidas por hongos contaminantes internos o de superficie en semillas medicinales usados como parte de bebidas o alimentos. De todos los hongos identificados, *Aspergillus niger* y *Penicillium polonicum* fueron los hongos de superficie predominantes. Se detectaron que las semillas de *Platycladus orientalis* estaban contaminadas con Aflatoxina B1 y B2, mientras que las semillas de mandarina estaban contaminadas con Ocratoxina A.

Nunes *et al.* (2016) determinaron la presencia de hongos y los niveles de aflatoxinas en 50 medicamentos fitoterápicos en forma de hojas y cápsulas, encontrando que el 82% de los medicamentos presentaron crecimiento fúngico encima de las 100 UFC/g. Se aislaron un total de 106 especies de 6 géneros diferentes, siendo *Aspergillus* y *Penicillium* los más frecuentes y se encontró que 13 de las 23 cepas de *A. flavus* aisladas produjeron aflatoxinas.

Migahed *et al.* (2017) analizaron 144 muestras de plantas medicinales secas colectadas de diferentes mercados de la ciudad de Mansoura (Egipto) y

analizadas para detectar micotoxinas y presencia de hongos. Detectaron presencia de hongos en un rango de 5 a 100 colonias por gramo. Se detectaron 36 especies de hongos, siendo el género *Aspergillus* el más registrado (91.7%) seguido de *Penicillium* (68.8%), y de 30 plantas medicinales analizadas, 19 estaban contaminadas con aflatoxinas.

2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES:

Existen muy pocos trabajos respecto a la contaminación de plantas medicinales por hongos micotoxigénicos en el Perú, de los cuales se mencionarán dos de los más recientes.

Orellana *et al.* (2005) realizaron una investigación sobre prevalencia de hongos en harina de *Lepidium peruvianum* “maca”, procesando un total de 60 muestras procedentes de los mercados de Andahuaylas (20), Ica (20) y Cañete (20); encontrándose que el 96,7% del total de muestras estaban contaminadas; identificándose 9 géneros y un total de 14 especies de mohos filamentosos. El recuento general de colonias iba desde 33×10^4 a 61×10^4 UFC/g., y los géneros con mayor incidencia fueron *Penicillium* y *Fusarium*.

Reyes y Quevedo (2006) realizaron un trabajo de investigación sobre la concentración de aflatoxinas y ocratoxinas, así como de los factores fisicoquímicos y microbiológicos que influyen en su producción, encontrando una concentración promedio de aflatoxinas de 0,8295 ppb y 8.703 ppb de ocratoxina en maca seca. Las muestras fueron recolectadas de 4 comunidades productoras y de 4 mercados principales.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

La llamada medicina tradicional tiene su fundamento en el conocimiento espacio-temporal del medio ambiente, conocimiento que ha tenido que ir desarrollándose a través de las generaciones, adaptándose a las condiciones del entorno, por lo que forma parte del acervo cultural de los pueblos y culturas desarrolladas en cada región (Chávez *et al.*, 2017). En ese saber tradicional se fue identificando el uso medicinal de diversas plantas, de las cuales el 67% de especies son originarias de países en desarrollo y son base de la llamada terapia complementaria o alternativa, aunque muchas veces se utiliza como automedicación, obteniendo directamente la planta de su huerto propio (Da Silva *et al.*, 2012).

El uso ancestral de estas plantas es de gran interés en cuanto a la investigación de su efectividad y, si la hay, de la búsqueda de los fundamentos químicos de estos efectos benéficos, con el fin de que sirvan como origen de nuevas drogas farmacéuticas, luego de aprobar los ensayos clínicos respecto a su efectividad (Villa-Ruano *et al.*, 2011).

Aún así existe una amplia literatura al respecto, no hay consenso en la aplicación de terapias basadas en plantas medicinales, tanto en el mundo académico y clínico como en las poblaciones. García (2011) realizó una encuesta en un Centro de Salud de Guatemala, consultando a los pacientes respecto al uso de plantas medicinales, encontrando que el 55.67% las preferían y que el 78.35% no tenían conocimiento de efectos adversos al consumir alguna de ellas. Sin embargo, cuando se les ofreció, el 81.4% aceptaron su uso.

2.2.1 MICROFLORA PRESENTE EN PLANTAS MEDICINALES

La contaminación fúngica de las plantas medicinales ocurre básicamente en dos momentos: primero directamente en el campo durante el crecimiento de la planta misma (contaminación pre-cosecha), durante su manipulación y colecta, y sobre todo durante su transporte y almacenamiento (post-cosecha) (Chen *et al.*, 2015). En Pakistán se ha reportado contaminación fúngica hasta en el 90% de las muestras analizadas, excediendo en un 70% los límites permisibles en Estados Unidos, siendo los géneros más importantes *Aspergillus* en primer lugar, seguido por *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Alternaria* (Ahmad *et al.*, 2014). En Brasil un estudio mostró que el 82% de un total de 41 plantas analizadas presentaban contaminación fúngica por encima de las 100 UFC/g, identificándose 106 especies de seis géneros diferentes de hongos, y que 13 de 23 cepas aisladas de *A. flavus* y dos de *A. parasiticus* produjeron aflatoxinas (Nunes *et al.*, 2016).

2.2.2 HONGOS RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por varios tipos de hongos, tales como los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Ahmad *et al.*, 2014), siendo las más importantes, según su capacidad toxigénica las aflatoxinas, con un total de 18 tipos y producidas principalmente por varias especies de *Aspergillus*; las ocratoxinas, de las cuales se han descrito 5 tipos y son producidas por especies de *Aspergillus* y *Penicillium*; los tricotecenos, con 200 tipos identificados y producidos por especies del género *Fusarium*; y las

fumonisinias, con 15 tipos diferentes y también producidas por hongos del género *Fusarium* (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

2.2.3 HISTORIA DE LOS ESTUDIOS EN MICOTOXINAS:

Desde la antigüedad ya se conocía de enfermedades producidas por la presencia de hongos en los alimentos y que afectaban no sólo a los seres humanos sino también a los animales. Por ejemplo, el ergotismo (cuadro isquémico producido por las toxinas liberadas por el cornezuelo del centeno en los alimentos contaminados) era conocido por los asirios como “pústula nociva en la espiga del centeno”, y desde la Edad Media como “fuego sagrado”, “fuego de San Antonio” o “mal del pan maldito”. Se usaba la palabra “fuego” debido al ennegrecimiento generado por la gangrena producida en las extremidades (Quesada y Ortega, 2011). En 1670 el médico francés Thuillier descubrió la causa del ergotismo y, desde ese momento, se pudo controlar la propagación de la enfermedad eliminando las esclerotias del cornezuelo presentes en los granos. En 1918 el químico suizo Stoll aisló la ergotamina, principal alcaloide de este hongo (Miedaner y Geiger, 2015).

A inicios de abril de 1960, en Inglaterra apareció una enfermedad en pavos (principalmente juveniles) que morían sin causa aparente. Para junio de ese año ya se reportaron miles de aves muertas por este cuadro que recibió el nombre inicial de “Enfermedad X de los Pavos”. La muerte del animal ocurría poco tiempo después de comenzar los síntomas: inapetencia, somnolencia, alas caídas, etc. A fines de ese año más de 100 mil aves habían muerto. Se observó una relación de esta enfermedad con los alimentos a base de granos locales,

mientras que la enfermedad no aparecía en zonas donde las aves ingerían granos importados. Esto llevó a descubrir en 1963 la presencia de un hongo en los granos almacenados en Inglaterra, el cual fue identificado como *Aspergillus flavus*, y en ese mismo año se pudo aislar un compuesto producido por este hongo, el cual producía experimentalmente el mismo tipo de daño principalmente hepático y que recibió como nombre “Aflatoxina” (Richard, 2008). En 1970 se demostró en animales de laboratorio la capacidad tóxica y carcinogénica de las aflatoxinas y en 1972 se las asoció al desarrollo de cáncer de hígado en humanos (Sánchez, 2002).

En 1965, se logró aislar e identificar químicamente la Ocratoxina A (OTA) en Sudáfrica a partir de la inoculación intencional de *Aspergillus ochraceus* en una comida a base de maíz. En 1993, la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer clasificó a la OTA como un posible carcinógeno de grupo 2B. En 1994, se pudo aislar en medio experimental OTA a partir de un cultivo de *Aspergillus niger* var. *niger* desarrollado en un medio con extracto de levadura y sacarosa y a partir de esa fecha se han publicado diversos trabajos relacionados a producción de OTA por diversas especies de *Aspergillus* (Malir et al., 2016).

2.2.4 BASES TEORICAS ESPECIALIZADAS SOBRE EL TEMA

2.2.4.1. AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son producidas por miembros del género *Aspergillus*, sección *Flavi*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*. De las cuatro aflatoxinas producidas de manera natural (B1, B2, G1 y G2), la aflatoxina B1 es el contaminante más potente, clasificado como carcinógeno de grupo I por la

Agencia Internacional para Investigación del Cáncer debido a su acción carcinogénica totalmente demostrada (Chen *et al.*, 2015). La diferencia entre estas dos especies es que *A. flavus* genera sólo aflatoxinas B1 y B2, mientras que *A. parasiticus* genera las cuatro aflatoxinas mencionadas. Una tercera especie productora de aflatoxinas es *A. nomius*, la cual presenta mucha similitud en morfología con *A. flavus* pero produciendo los cuatro tipos de aflatoxinas además de un metabolito exclusivo llamado nominicina (Abarca *et al.*, 2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencias entre los Mohos productores de Aflatoxinas (adaptado de Abarca *et al.*, 2000 y Santos *et al.*, 2013).

ESPECIE	CONIDIOS	ESCLEROCIOS	TOXINAS
<i>A. flavus</i>	Lisos o ligeramente rugosos, de tamaño variable	Grandes, rugosas.	Aflatoxinas B1 y B2, ácido ciclopiazónico.
<i>A. parasiticus</i>	Manifiestamente rugosos, varían poco en tamaño	Grandes, rugosas.	Aflatoxina B y G
<i>A. nomius</i>	Como <i>A. flavus</i>	Pequeñas, alargadas (con forma de bala).	Aflatoxina B y G

2.2.4.2 OCRATOXINAS

La ocratoxina A (OTA) es el miembro más tóxico del grupo de las ocratoxinas. Inicialmente se identificó a esta toxina como producida por *Aspergillus ochraceus*, pero poco tiempo después fue también detectada en *Penicillium viridicatum* (Abarca *et al.*, 2000). El grupo más importante de *Aspergillus* ocratoxigénicos son los miembros de la sección *Nigri* y la sección *Circumdati*. Dentro del género *Penicillium*, se consideran también a *P. nordicum* y *P. verrucosum* como los principales productores de OTA, seguidos de

P. chrysogenum, *P. glycyrrhizicola* y *P. polonicum*, sobre todos estos últimos en la raíz del regaliz (Chen *et al.*, 2015).

2.2.4.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS

En China, se ha considerado como máximo nivel permitido de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en varias plantas medicinales de 5 hasta 10 µg/kg. Con respecto a OTA, el máximo nivel permitido en China para la raíz del regaliz es de hasta 20 mg/kg según las normas europeas (Chen *et al.*, 2015). Para llegar a estos niveles, se deben tomar en cuenta ciertas condiciones ambientales que favorecerán el desarrollo fúngico y la producción de estas toxinas, como temperaturas entre 20-25° C, pH de entre 4 a 8 y humedad relativa de 80 a 90% (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

2.3 ASPECTOS DE RESPONSABILIDAD SOCIAL Y MEDIO AMBIENTAL

Se han identificado más de 400 micotoxinas, pero con respecto a su acción patogénica (debido a que pueden producir toxicidad o cáncer), las más importantes son las aflatoxinas, cuyas propiedades hepatotóxicas, teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas han sido ya descritas por la literatura; y la ocratoxina A, asociada directamente a una actividad teratogénica, embriotóxica, genotóxica, neurotóxica, inmunosupresora, carcinogénica y nefrotóxica (Chen *et al.*, 2015). Los tricotecenos generalmente han sido identificados como contaminantes de cereales y su capacidad toxigénica ha sido considerada tanto en animales como en humanos. Su acción patogénica está relacionada con inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, alteraciones en la

mitosis y la estructura de la membrana celular, aparte de daño tóxico mitocondrial. Hay un cuadro clínico llamado aleukia tóxica alimentaria en la cual se puede observar piel inflamada, cómitos y alteraciones hematopoyéticas. Las fumonicinas han sido consideradas como carcinógenos del grupo 2B (considerar que la aflatoxina B1 está en el grupo 1), y la fumonicina B1 ha sido asociada a casos de cáncer esofágico y defectos en el cierre del tubo neural (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

CAPÍTULO III

MÉTODO

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El Tipo de investigación es Descriptivo debido a que se presentarán las concentraciones de micotoxinas mediante Tablas y gráficos, y retrospectivo puesto que se trabajarán con datos tomados en un tiempo determinado (el año 2016).

El diseño es no experimental y transversal descriptivo puesto que se hará un único muestreo en el tiempo, midiéndose las variables en forma independiente.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población está constituida por las plantas medicinales de uso en infusión y como hierba cruda que se comercializaron durante el año 2016 en supermercados, tiendas naturistas y mercados populares del distrito de El Cercado, Lima – Perú. Como no se tiene información respecto al total de plantas medicinales que se expenden en la ciudad de Lima ni del total de especies a las que pertenecen, no se puede calcular el tamaño exacto de la población de plantas medicinales, y mucho menos el tamaño de muestra. Similares dificultades han sido descritas en la literatura en todo el mundo, por lo que lo que

se reportan en todos los trabajos citados en Antecedentes de manera descriptiva la presencia de hongos y micotoxinas de las muestras seleccionadas, sin señalar su significancia estadística. Por eso, en la presente tesis se realizó el muestreo de manera no probabilística y de tipo casual o accidental debido a que no hay continuidad en el expendio de estas plantas medicinales.

3.2.1. Establecimiento de las muestras

Se han considerado en el presente estudio dos tipos de categoría de muestras en base a la variable independiente "Planta Medicinal".

a. Infusiones de plantas medicinales Industrializadas (con Registro Sanitario):

Flor de Arena, Hercampuri, Manayupa, Boldo, Chancapiedra, Cola de Caballo, Muña.

b. Plantas medicinales (Hierbas crudas) Tradicionales (sin Registro Sanitario):

Flor de Arena, Hercampuri, Manayupa, Boldo, Chancapiedra, Cola de caballo, Muña.

3.2.2. Recolección de las muestras

Las muestras de plantas medicinales con registro sanitario se colectaron de supermercados y tiendas naturistas. Las muestras de plantas medicinales sin registro sanitario se colectaron de ferias y mercados populares. En todos los casos se obtuvieron 3 ejemplares de cada planta medicinal a fin de procesar y evaluar los resultados por triplicado y presentar las medias de cada medida con sus respectivas desviaciones estándar. Se utilizaron muestras por triplicado debido a que representa un número de repeticiones que permite realizar un análisis estadístico adecuado (Rustom, 2012).

3.3. HIPÓTESIS:

Existe presencia de aflatoxinas y Ocratoxina A en plantas medicinales de Mercados Populares y Establecimientos Comerciales de Lima. Evaluados en el año 2016.

3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

a) Variable Independiente

- Planta Medicinal

b) Variables Dependientes

- Presencia de aflatoxinas y OTA:
- Niveles de Aflatoxina y OTA:

TABLA 2: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
Planta Medicinal	Toda o alguna parte de una planta de la cual se tiene evidencia referenciada sobre su acción benéfica en la salud humana	Especie vegetal con uso terapéutico por parte de los humanos y que puede conseguirse en los Mercados Populares o establecimientos comerciales de Lima	Planta medicinal Presentación	Nombre de la planta Registro de DIGESA o de DIGEMID	Paquete o Unidad Unidad	Nominal Nominal	Infusiones comerciales Hierbas secas envasadas Tradicional Industrial
Presencia de Micotoxinas	Detección de micotoxinas en la superficie de las plantas medicinales o de sus extractos	Cuando existe en las muestras una concentración de estas toxinas por encima del límite de detección de la técnica	Micotoxinas	Presencia	Aflatoxina Ocratoxina A	Nominal	Presencia Ausencia
Niveles de Micotoxinas	Cuantificación de la cantidad de micotoxinas hallada en un alimento	Concentración de aflatoxinas y OTA en ppb determinado por el método de ELISA	Concentración	Concentración	ppb	Numérico	Cualquier valor numérico determinado por espectrofotometría superior al límite de cuantificación del método

3.5. INSTRUMENTOS

3.5.1. Equipos y Materiales:

- La información (concentración de micotoxinas) se obtuvo mediante un Lector espectrofotométrico para placas de ELISA con filtro de 650 nm.
- Balanza digital
- pHmetro
- Trituradora de vegetales
- Mezcladora de alta velocidad
- Tamiz malla 20
- Temporizador
- Micropipeta de 100 uL
- Tubos de vidrio con tapa de 16 x 150 mm
- Frascos de 125 mL
- Probeta graduada de 250 mL
- Kit ELISA para la determinación de Aflatoxinas: Veratox® HS. Cod: 8031
- Kit ELISA para la determinación de Ocratoxina A: Veratox Ochratoxin A. Cod: 8610
- Jeringas de 10, 20 y 50 mL
- Pipetas de 10 mL
- Bombilla de Jebe
- Algodón
- Papel Whatman N° 1
- Metanol de grado ACS
- Buffer fosfato de sodio (PBS)

3.6. PROCEDIMIENTOS

A. Extracción de la micotoxinas:

Se procesó mediante la siguiente metodología a cada una de las 3 plantas colectadas por especie. Se colocaron 25 g de la muestra herbal previamente triturada y homogeneizada dentro de un frasco de 125 mL. Se le agregó 25 mL de metanol al 70% (Fig. 1A). Luego se agitó vigorosamente durante 30 minutos (Fig. 1B), se filtró el extracto vertiéndolo a través de un papel whatman N°1 y algodón (Fig. 1C) para finalmente recolectar el filtrado en frascos de 125 mL, los cuales se almacenaron para la etapa de ELISA (Fig. 1D). El pH de las muestras debe encontrarse entre 6 a 8, caso contrario se ajustó con HCl o NaOH cuando fue necesario.

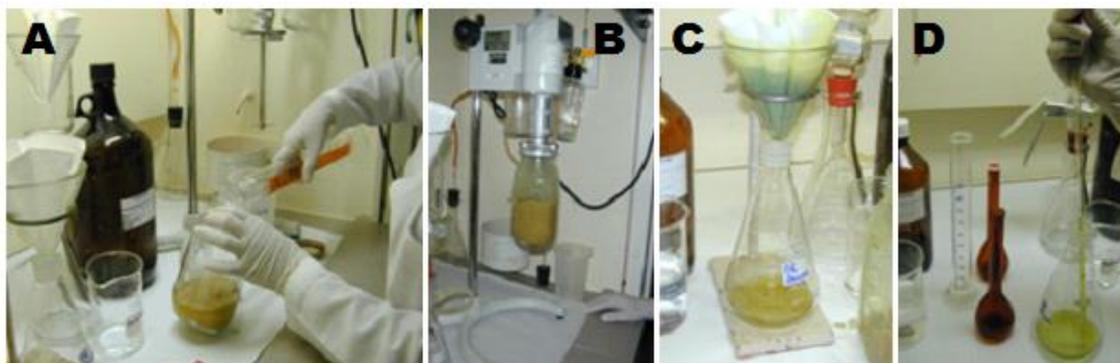


Fig. 1. Pasos de extracción de micotoxinas.

B. Análisis de micotoxinas (Inmunoensayos – ELISA)

- a) Los reactivos fueron dejados a temperatura ambiente (18-30 °C) por 15 minutos antes de realizar las determinaciones.
- b) Se emplearon pocillos de mezclado para cada muestra y para los controles de aflatoxinas y OTA.

- c) En cada pocillo de mezclado se colocaron 100 μ L del conjugado y 100 μ L de muestra o de cada uno de los estándares de aflatoxina o de OTA. Esta etapa se realizó con puntas individuales de micropipeta.
- d) Se mezcló cada pocillo succionando y expulsando por tres veces con la ayuda de la punta respectiva a la muestra o estándar.
- e) Se transfirieron 100 μ L de cada una de las mezclas a pocillos individuales recubiertos con anticuerpos. Luego se procedió a realizar una suave agitación de los pocillos por deslizamiento sobre una superficie plana durante 10 a 20 segundos.
- f) Se incubaron los pocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente (18 – 30°C).
- g) Una vez cumplido el tiempo de incubación se vació el contenido de los pocillos sacudiéndolos dentro de un recipiente. Luego se procedió a lavar cada pocillo por cinco veces empleando agua destilada, cada vez sacudiéndolo dentro de un recipiente de manera invertida para evitar posible transferencia cruzada de muestras y estándares entre pocillos contiguos. Al final los pocillos se golpearon suavemente sobre papel toalla hasta retirar todo el líquido remanente.
- h) Se colocaron 100 μ L del sustrato a cada uno de los pocillos, se agitó suavemente deslizando con movimiento de adelante hacia atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 segundos. Posteriormente, los pocillos fueron incubados durante 10 minutos.
- i) Una vez cumplido los 10 minutos de incubación se vertieron a cada pocillo 100 μ L de la solución de término de reacción. Luego se mezcló deslizando suavemente para adelante y para atrás sobre una superficie plana.

- j) Antes de colocar los pocillos en el lector de ELISA se limpió suavemente su base con un paño seco evitando la formación de burbujas.
- k) El lector de ELISA fue calibrado previamente usando un filtro de 650 nm y como blanco el aire.
- l) Los resultados fueron obtenidos por interpolación empleando la curva de calibración generada con los estándares de aflatoxinas y OTA y, el software de VERATOX para WINDOWS de Neogen.

3.7 ANALISIS DE DATOS

Las Tablas y gráficos se desarrollaron mediante el programa Excel del paquete Microsoft Office 2010. Los cálculos de media, desviación estándar y comparación de medias y ANOVA se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS v. 12.

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1 CONTRASTACION DE HIPOTESIS

Se utilizó el programa IBM SPSS v. 12 para determinar las pruebas de comparación de medias a un 95% de confianza para comparar si se presentaban diferencias estadísticamente significativas o no entre los dos tipos de procedencia (Industrial y Tradicional), el tipo de planta y el tipo de micotoxina. Las pruebas estadísticas utilizadas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis estadísticos para comparación de medias que se han utilizado en el presente trabajo.

Análisis	Método Estadístico	Intervalo de Confianza
Niveles de Aflatoxinas y OTA según el tipo de planta	ANOVA	
Niveles de micotoxinas según el tipo de procesamiento de las plantas medicinales	ANOVA	
Niveles de aflatoxinas en las muestras evaluadas según su procedencia (Industrial y tradicional)	T student	95%
Niveles de ocratoxinas en las muestras evaluadas según su procedencia (Industrial y tradicional)	T-student	

4.2 ANALISIS E INTERPRETACION

Los resultados presentados corresponden a los promedios obtenidos durante el análisis de 3 plantas por especie y por tipo de procesamiento.

4.2.1 Niveles de Aflatoxinas y OTA según el tipo de planta

La Tabla 4 muestra los niveles en partes por billón (ppb) de Aflatoxinas y Ocratoxina A (OTA) según el tipo de planta, observándose que la flor de arena presentó el mayor nivel de aflatoxina y el hercampuri el menor. Respecto a OTA, el mayor valor se encontró en la cola de caballo, y el menor en la muña.

Tabla 4. Niveles promedio de Aflatoxinas y Ocratoxina A (OTA) en ppb según la planta analizada.

Planta		Aflatoxina	OTA
Flor de arena	Media	7.250	6.967
	Desv. Típ.	2.244	1.855
Hercampuri	Media	1.683	3.267
	Desv. Típ.	0.407	1.431
Manayupa	Media	6.400	3.433
	Desv. Típ.	1.504	0.149
Boldo	Media	4.150	7.200
	Desv. Típ.	1.284	2.947
Chancapiedra	Media	4.567	3.933
	Desv. Típ.	1.997	0.407
Cola de caballo	Media	5.067	8.683
	Desv. Típ.	1.568	1.740
Muña	Media	2.817	2.633
	Desv. Típ.	0.677	0.852
Total	Media	4.562	5.160
	Desv. Típ.	0.047	1.139

Aflatoxina vs. Planta, $P= 0.221$

OTA vs. Planta, $P= 0.046$

Los valores de aflatoxinas en función de la planta analizada presentaron diferencias no significativas ($P>0.05$), mientras que los de OTA sí presentaron diferencias significativas ($P<0.05$), permitiendo concluir que los niveles de OTA

pueden depender en mayor grado del tipo de planta, mientras que la contaminación por aflatoxinas puede darse en diversos tipos de plantas medicinales.

4.2.2 Niveles de micotoxinas según el tipo de procesamiento de las plantas medicinales

La Tabla 5 muestra los niveles de aflatoxinas y OTA en relación al tipo de muestra (si ya es procesada industrialmente como bolsas filtrantes o si son plantas enteras, como se venden tradicionalmente). Se puede observar que las plantas vendidas tradicionalmente muestran mayores valores de ambas micotoxinas en relación a las muestras procesadas industrialmente. Las diferencias de los valores de ambas micotoxinas según el tipo de muestra fueron significativas ($P < 0.05$), lo que permite concluir que el procesamiento industrial de las plantas medicinales puede disminuir la contaminación por hongos que producen estos tipos de toxinas.

Tabla 5. Niveles de micotoxinas (ppb) según el tipo de procesamiento de las plantas medicinales.

Procesamiento		Aflatoxina	OTA
Industrial	Media	2.671	2.676
	Desv. Típ.	1.5957	1.7533
Tradicional	Media	6.452	7.643
	Desv. Típ.	4.8501	4.3693
Total	Media	4.562	5.160
	Desv. Típ.	4.0470	4.1388

Aflatoxina vs. Procesamiento Industrial, $P = 0.002$

OTA vs. Procesamiento Industrial, $P = 0.000$

4.2.3 Niveles de aflatoxinas en las muestras evaluadas según su procedencia (Industrial y tradicional)

Los niveles de aflatoxinas en las infusiones tradicionales fueron, en el 71.42% de los casos, superiores a los de procedencia industrial. Sólo en dos casos (manayupa y muña) se tuvieron resultados mayores en las muestras industriales. Los niveles de aflatoxinas en las muestras tradicionales son 65% más altos que sus correspondientes industrializados. En las infusiones tradicionales el nivel más alto lo tuvo la manayupa con 12.2 ppb y el nivel más bajo en el boldo con 1.7 ppb (Tabla 6). La mayor dispersión (Desviación estándar) de resultados en cada especie de planta medicinal se encontró en la muestra de manayupa de procedencia tradicional y la menor en la misma muestra, pero de procedencia industrial (Figura 2). El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), lo que permite concluir que el expendio tradicional como plantas enteras puede ser un factor que favorece la contaminación por aflatoxinas.

Tabla 6: Niveles de aflatoxinas (ppb) según su procedencia.

Planta		Industrial	Tradicional
Flor de Arena	Media	5.367	9.133
	Desv. Típ.	0.2082	1.380
Hercampuri	Media	2.033	1.333
	Desv. Típ.	0.058	0.208
Manayupa	Media	0.600	12.200
	Desv. Típ.	0.000	2.200
Boldo	Media	0.900	1.700
	Desv. Típ.	0.173	0.200
Chancapiedra	Media	2.833	6.300
	Desv. Típ.	0.208	0.954
Cola de caballo	Media	3.733	6.400
	Desv. Típ.	0.153	0.889
Muña	Media	3.233	2.400
	Desv. Típ.	0.681	0.400
Total	Media	2.671	5.638
	Desv. Típ.	1.596	3.999

P= 0.000

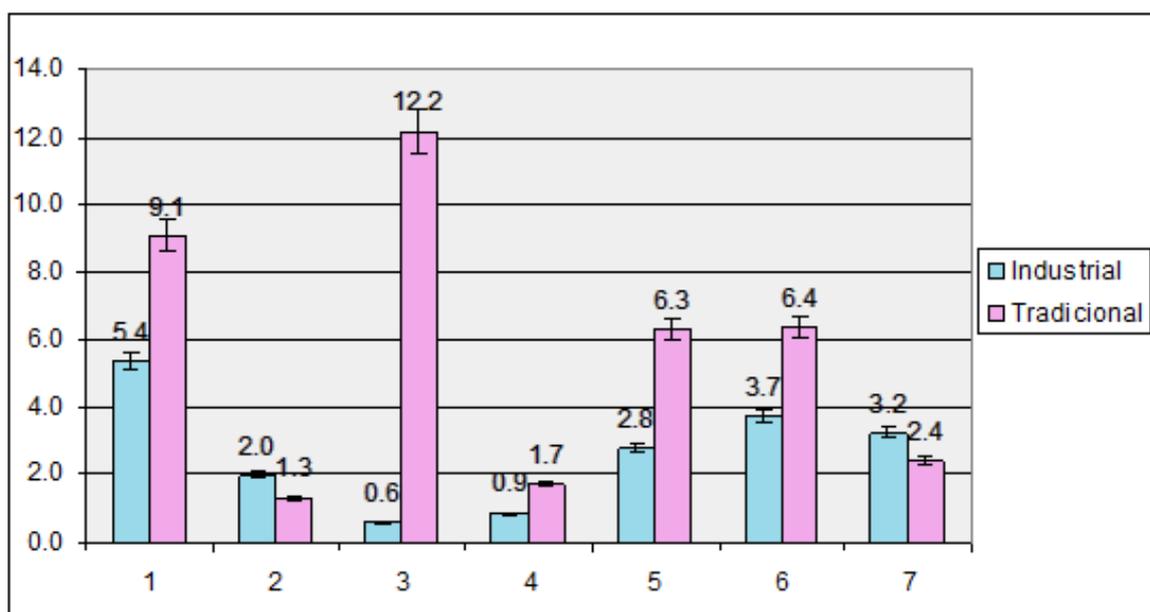


Figura 2. Niveles de aflatoxinas según su procedencia. 1: Flor de arena, 2: Hercampuri, 3: Manayupa, 4: Boldo, 5: Chancapiedra, 6: Cola de Caballo, 7: Muña.

4.2.4. Niveles de OTA (en ppb) en las muestras evaluadas según su procedencia (Industrial y Tradicional)

Se observaron niveles altos de contaminación con ocratoxina en las muestras de procedencia tradicional, siendo el mayor nivel encontrado en la muestra de cola de caballo con 13.8 ppb (Tabla 7). La mayor dispersión de resultados (desviación estándar) en cada especie de planta medicinal se encontró en la muestra de cola de caballo de procedencia tradicional y la menor en la manayupa de procedencia industrial (Figura 3). El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), lo que permite concluir que el expendio tradicional como plantas enteras puede ser un factor que favorece la contaminación por ocratoxinas.

Tabla 7: Niveles de ocratoxina A (ppb) según su procedencia.

Planta		Industrial	Tradicional
Flor de Arena	Media	5.700	8.233
	Desv. Típ.	1.389	1.365
Hercampuri	Media	2.033	4.500
	Desv. Típ.	0.351	0.656
Manayupa	Media	0.633	6.233
	Desv. Típ.	0.058	1.124
Boldo	Media	0.867	13.533
	Desv. Típ.	0.058	0.551
Chancapiedra	Media	2.733	5.133
	Desv. Típ.	0.710	0.351
Cola de caballo	Media	3.533	13.833
	Desv. Típ.	0.611	1.554
Muña	Media	3.233	2.033
	Desv. Típ.	0.851	0.116
Total	Media	2.676	7.643
	Desv. Típ.	1.753	4.369

P= 0.000

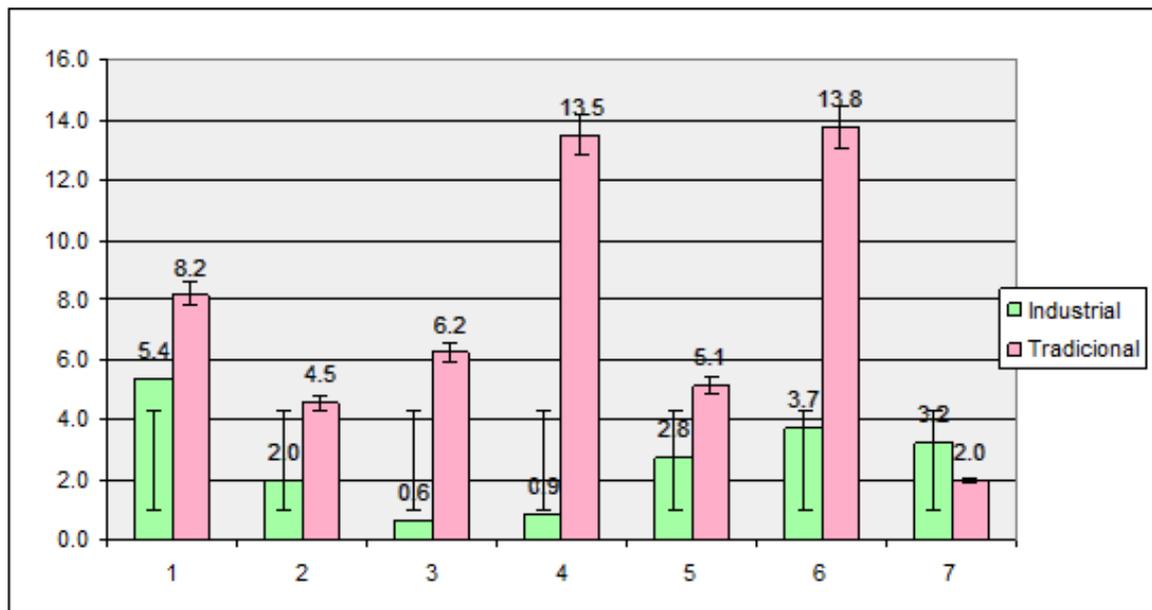


Figura 3. Niveles de Ocratoxina A (OTA) según su procedencia. 1: Flor de arena, 2: Hercampuri, 3: Manayupa, 4: Boldo, 5: Chancapiedra, 6: Cola de Caballo, 7: Muña

4.2.5 Incidencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en diferentes plantas medicinales.

Los resultados muestran que la mayor incidencia de contaminación en las plantas medicinales fue debido a la ocratoxina A, y que las muestras de cola de caballo fueron las que mostraron mayor incidencia para las dos micotoxinas evaluadas (Tabla 8 y Figura 4).

Tabla 8: Incidencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en diferentes plantas medicinales

Tipo de muestra	Aflatoxinas		Ocratoxina	
	Incidencia %	Concentración media (ppb)	Incidencia %	Concentración media (ppb)
Flor de Arena	83.3	7.250	100.0	6.967
Hercampuri	66.7	1.683	50.0	3.267
Manayupa	66.7	6.400	100.0	3.433
Boldo	50.0	4.150	83.3	7.200
Chancapiedra	83.3	4.567	66.7	3.933
Cola de caballo	100.0	5.067	100.0	8.683
Muña	66.7	2.817	100.0	2.633

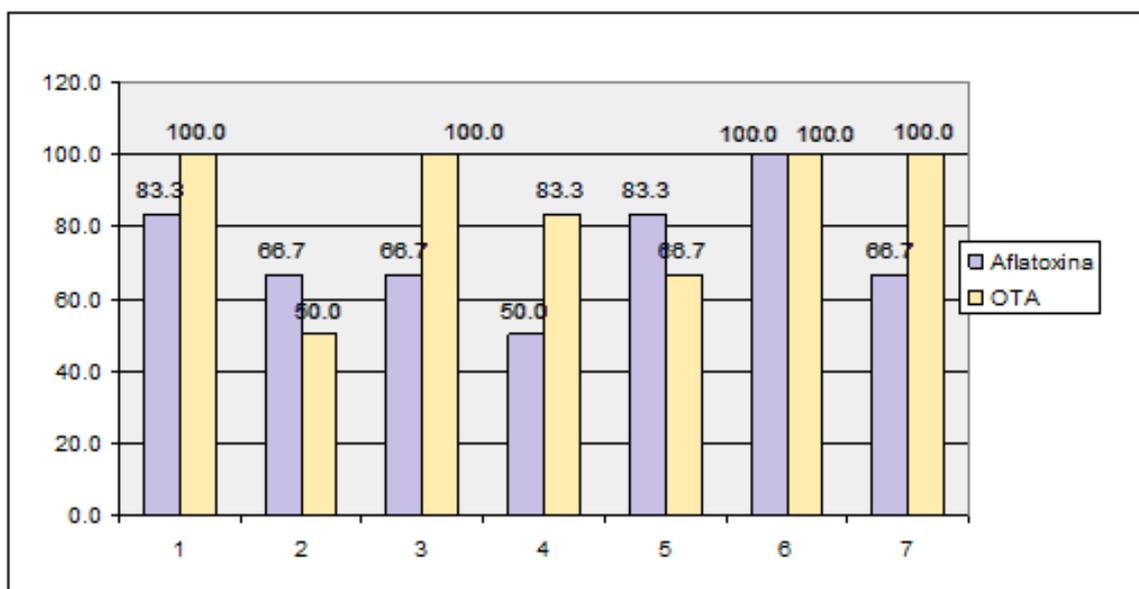


Figura 4. Incidencia de contaminación con Aflatoxinas y OTA en las muestras evaluadas. 1: Flor de arena, 2: Hercampuri, 3: Manayupa, 4: Boldo, 5: Chancapiedra, 6: Cola de Caballo, 7: Muña

4.2.6. Incidencia de muestras contaminadas con Aflatoxinas y OTA según su procedencia (Industrial y tradicional)

Se observó una mayor incidencia de aflatoxinas y ocratoxina A en las muestras de procedencia tradicional, lo mismo para los niveles medios de contaminación que se encontraron en 5.6 ppb y 7.6 ppb respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9: Incidencia y concentración de Aflatoxinas y OTA en plantas medicinales según su procedencia Industrial y tradicional.

Procedencia	Aflatoxina		Ocratoxina	
	Incidencia %	Concentración media (ppb)	Incidencia %	Concentración media (ppb)
Industrial	66.6	2.6	80.9	2.1
Tradicional	80.9	5.6	90.5	7.6

ppb: partes por billón

CAPÍTULO V

5.1 Discusión

La contaminación de plantas por micotoxinas, principalmente Aflatoxinas y Ocratoxina A (OTA) principalmente es evaluada en plantas directamente comestibles o procesadas para uso en la dieta humana. Ambos compuestos han sido detectados por ejemplo en café de exportación (Franco *et al.*, 2014), y también han sido detectados asociados a contaminación fúngica específica; por ejemplo, Babu *et al.* (2011) aislaron y cuantificaron aflatoxinas en muestras de arroz contaminados por *Aspergillus flavus*, y Palumbo *et al.* (2015) aislaron e identificaron cepas de *Aspergillus* ocratoxigénicas y también cuantificaron la presencia de OTA a partir en frutas secas y nueces. La prevalencia de estas toxinas soporta el procesamiento de los alimentos, pudiéndose detectar por ejemplo aflatoxinas en leche en polvo (Josephs *et al.*, 2005) y OTA en vinos (Hoeltz *et al.*, 2012). El peligro de la ingesta de alimentos contaminados por estas micotoxinas es bastante serio por sus propiedades sobre todo carcinogénicas. Asai *et al.* (2012) detectaron niveles de aflatoxinas muy por encima de los niveles máximos propuestos en ajíes de Perú y Bolivia, países con mayor incidencia de cáncer de vesícula biliar. Tchana *et al.* (2010) sugirieron que la presencia de aflatoxinas y el virus hepatitis B podrían ser considerados

como factores de riesgo que podrían aumentar la incidencia y prevalencia de malnutrición y cáncer en Camerún.

La Tabla 4 muestra que la presencia de Ocratoxina A es más restringida en función de la especie de planta, mientras que las aflatoxinas fueron detectadas en mayor número de especies de plantas. Este resultado coincide con la literatura que indica que, si bien tanto las aflatoxinas y la Ocratoxina A presentan incidencia en América del Sur, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (las principales especies de hongos que producen aflatoxinas) se encuentran de manera más amplia infestando diversos tipos de plantas, tanto en momentos previos como posteriores a la cosecha (Denli y Pérez, 2006). Migahed et al. (2017) investigaron la incidencia de hongos aflatoxigénicos contaminando plantas medicinales y encontraron que 16 de 48 plantas analizadas estaban contaminadas por *A. flavus* y 20 lo estuvieron por *A. flavus* var. *columnaris*, mientras que 13 plantas estuvieron contaminadas por *A. ochraceus*, principal especie productora de ocratoxina A.

La Tabla 5 muestra que ambos tipos de micotoxinas (aflatoxinas y OTA) disminuyen su presencia en plantas medicinales que han sido procesadas industrialmente, siendo su principal presentación las bolsas filtrantes, lo que requiere que las plantas sean previamente secadas de manera industrial. Este secado plantea el uso de temperaturas mayores a la ambiental y una reducción de la humedad en las muestras. Ambos factores son cruciales para el desarrollo de los hongos productores de estas micotoxinas (Ashiq et al., 2014). Estos resultados deben ser considerados en términos generales, debido a que en

algunas especies no se cumplen tal y como se describe. Por ejemplo, en el caso del hercampuri, los niveles de OTA disminuyen y los de aflatoxinas son mayores en las muestras con procesamiento industrial que en las muestras tradicionales. Por otro lado, las muestras de muña presentaron mayores niveles de ambas micotoxinas en muestras procesadas industrialmente que en las muestras tradicionales. Por tanto, hay que considerar la influencia de la especie de planta sobre la contaminación e incidencia de micotoxinas (Tablas 6 y 7, Figuras 2 y 3).

La contaminación con aflatoxinas y ocratoxina A en plantas medicinales como resultado de la presencia de hongos micotoxigénicos ha sido reportado por Sanchez *et al.* (2006). Los resultados de la presente Tesis (Tablas 8 y 9, Figura 4) muestran una mayor incidencia de ocratoxina A (OTA) respecto a aflatoxinas, lo cual es parecido a trabajos como el de Cho *et al.* (2009), quienes evaluaron la contaminación simultánea de *Thuja orientalis* por diversas micotoxinas y encontraron que, si bien el porcentaje de contaminación por ocratoxina A es hasta 3 veces menor respecto al de aflatoxinas, la concentración media de ocratoxina A fue de 52.1 µg/kg, y la de aflatoxina B1 fue de 24.8 µg/kg.

La técnica usada en la presente Tesis (basada en el método de ELISA) ha mostrado ser adecuada para evaluar los niveles de micotoxinas en plantas medicinales. Osorno (2015) estandarizó y evaluó un método de determinación de micotoxinas basado en ELISA en materias primas para alimentos para aves pudiendo calcular los criterios de calidad para este método y pudiendo detectar y cuantificar diferentes micotoxinas como zearalenona, aflatoxina, ocratoxina, fumonisina, etc. Venkataramana *et al.* (2015) también desarrollaron en la India

un método basado de ELISA para detección específica de Ocratoxina A en granos de cereal contaminados por hongos y la compararon con técnicas más sofisticadas como las basadas en HPLC, considerando a su método de ELISA una buena alternativa para el análisis de rutina de cereales y otros productos vegetales. Sin embargo, existen otros métodos alternativos para evaluar presencia de micotoxinas, como los basados en HPLC (Valdez et al., 2014), fluorescencia (Semeniuk et al., 2014) y columnas de inmunoafinidad (Ramos et al., 2016).

5.2 Conclusiones

- Se han detectado los mayores niveles de aflatoxinas en la flor de arena (7.250 ± 244 ppb), mientras que los menores niveles fueron encontrados en hercampuri (1.683 ± 0.407 ppb).
- Se han detectado los mayores niveles de ocratoxina A en la planta cola de caballo (8.683 ± 1.740 ppb) mientras que los niveles más bajos fueron encontrados en la muña (2.633 ± 0.852 ppb).
- Se ha demostrado que la mayor incidencia (100%) de contaminación en las plantas medicinales fue debido a la ocratoxina A, sobre todo en flor de arena, manayupa, cola de caballo y muña, mientras que la mayor incidencia (100%) de aflatoxinas fue encontrada en cola de caballo.
- Se ha determinado que, según la procedencia, hay una mayor contaminación con ambos tipos de micotoxinas en las muestras de

procedencia tradicional que en las de procedencia industrial, y que los niveles de ocratoxina A son mayores en muestras industriales (80.9%) y tradicionales (90.5%) que los de aflatoxinas (66.6% y 80.9% repectivamente).

5.3 Recomendaciones

- Debido a la posible interferencia de la planta medicinal en el desarrollo del método ELISA, es recomendable el empleo de columnas de inmunoafinidad como etapa previa al desarrollo de la técnica ELISA propiamente dicha.

- Dada la importancia que está cobrando la presencia de Aflatoxinas y Ocratoxina A en los alimentos y productos medicinales, es necesario realizar un estudio más amplio sobre su incidencia a nivel nacional, trabajos que permitirán determinar normativas de estándares nacionales.

- Evaluar la inclusión de Aflatoxinas y Ocratoxina A en la normativa de aprobación de registro sanitario de Alimentos y recursos terapéuticos naturales.

- Realizar un estudio de las plantas medicinales del Perú considerando evaluaciones comparativas entre el método ELISA y HPLC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Accensi, F. y Cabañes, F.J. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev Iberoam Micol*; 17, S63-S68.
https://www.researchgate.net/publication/239603267_Hongos_productores_de_micotoxinas_emergentes (Revisado el 15-10-2017).
- Abd, M., Aidoo, K. y Candlish, A. (2009). Mixed Herbs Drugs: Inhibitory Effect on Growth Of The Endogenous Mycoflora And Aflatoxin Production. *Mycopathologia*, 167, 273-286.
- Ahmad, B., Ashiq, S., Hussain, A., Bashir, S. y Hussain, M. (2014). Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Fungal Biology*, 118, 776-784.
- Ali, N., Hashim, N., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M. y Yoshizawa, T. (2005). Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1763-1772.

- Alwakeel, S. (2009). The effect of mycotoxins found in some herbal plants on biochemical parameters in blood of female albino mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(8), 637–642.
- Asai, T., Tsuchiya, Y., Okano, K., Piscocya, A., Nishi, C.Y., Ikoma, T., ...Yamamoto, M. (2012). Aflatoxin contamination of red chili pepper from Bolivia and Peru, countries with high gallbladder cancer incidence rates. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13(10), 5167-5170.
- Ashiq, S., Hussain, M. y Ahmad, B. (2014). Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. *Fungal Genetics and Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.005> (recuperado el 15-04-2018).
- Babu, G., Prasad, M.G. y Prasad, T.N.V.K.V. (2011). Isolation and quantification of Aflatoxin from *Aspergillus Flavus* Infected Rice. *Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.*, 5(1), 16-24.
- Bussmann, R., Glenn, A., Meyer, K., Kuhlman, A. y Townesmith, A. (2010). Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 6(10), 1-11.
- Calvert, T.W., Aidoo, K.E., Candlish, A.G. y Fuat, A.R. (2005). Comparison of in vitro cytotoxicity of Fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenona on selected human epithelial cell lines. *Micopatologia*, 159(3), 413-419.

- Cañigueral, S. (2013). Medicamentos a base de plantas: el reto de la calidad y la Farmacopea como herramienta para alcanzarla. *Revista de Fitoterapia*, 13(2), 101–122.
- Caravaca, F., Barea, J.M., Figueroa, D. y Roldán, A. (2002). Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *Applied Soil Ecology*, 20, 107-118.
- Chávez, M. C., White, L., Moctezuma, S. y Herrera, F. (2017). Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*, 56 (2), 26-47.
- Chen, A.J., Jiao, X., Hu, Y., Lu, X. y Gao, W. (2015). Mycobiota and Mycotoxins in Traditional Medicinal Seeds from China. *Toxins*, 7: 3858-3875. *Toxicol. Res.*, 25(3), 125-131.
- Cho, S.Y., Kang, S.J., Jung, J., Jeong, B.O. y Jeong. C.S. (2009). Co-contamination of Aflatoxins with Ochratoxin A and Zearalenone in *Thuja orientalis* Semen. *Toxicol. Res*, 25(3), 125-131.
- Córdova, J. (2009). *Uso y utilización de plantas medicinales en universidades de Lima*. Tesis para Título en Antropología. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.

- Da Silva, S., Oliveira, G., Dias, R. y Martins, M.R. (2012). Representaciones y usos de las plantas medicinales en mayores. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 20(4), 9 págs. www.eerp.usp.br/rlae.834.pdf (recuperado el 15-05-2017).
- Denli, M. y Pérez J.F. (2006). *Contaminación por Micotoxinas en los piensos: Efectos, tratamiento y prevención*. XXII Curso de Especialización FEDNA: Avances en nutrición y alimentación animal. Barcelona. http://fundacionfedna.org/sites/default/files/06CAP_1.pdf (recuperado el 22-12-2017).
- Franco, H., Vega, A., Reyes, S., De León, J. y Bonilla, A. (2014). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(1), 42-49.
- García, Z. (2011). *Plantas medicinales aplicables al tratamiento de las enfermedades más prevalentes en el Centro de Salud de San Lucas Sacatepéquez, Sacatepéquez*. Tesis para Título de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos. Guatemala.
- Hoeltz, M., Monezzi, L.P., Manfroi, V., Noll, I.B. y Dottori, H.A. (2012). Ocratoxina A: análise da qualidade de vinhos brasileiros e importados. *Braz. J. Food Technol.*, IV SSA, 58-63.

http://www.scielo.br/pdf/bjft/v15nspe/aop_15e0110.pdf (recuperado el 5-02-2018).

Johnston, L., Jaykus, A., Moli, D., Martinez, C., Anciso, J., Mora, B. y Moe, L. (2005). A field study of the microbiology quality of fresh produce. *J. Food Protection*, 69, 1840-1847.

Josephs, R. D., Ulberth, F., Van Egmond, H. P. y Emons, H. (2005). Aflatoxin M1 in milk powders: processing, homogeneity and stability testing of certified reference materials. *Food Additives and Contaminants*, 22(9), 864–874.

Maffini, T. (2013). *Aflatoxinas em plantas medicinais comercializadas em estabelecimentos de produtos naturais na cidade de Cascavel – Paraná*. Tesis em Farmácia. Faculdade Assis Gurgacz. Universidade Paranaense. Cascavel, Brasil.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leskowicz, A., Malir, J. y Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins (Basilea)*, 8(7). <http://www.mdpi.com/2072-6651/8/7/191/htm> (recuperado el 2-11-2017).

Miedaner, T., y Geiger, H. (2015). Biology, Genetics, and Management of Ergot (*Claviceps spp.*) in Rye, Sorghum, and Pearl Millet. *Toxins*, 7, 659–678.

Migahed, F.F., Abdel-Gwad, M.M. y Mohamed, S.R. (2017). Aflatoxigenic Fungi Associated with Some Medicinal Plants. *Annual Research & Review in Biology*, 14(6), 1-20.

Nunes, F.C., Godoy-Martínez, P., Urrutia, M., Correa, B. y Fischman, O. (2016). Hongos productores de micotoxinas asociados a hierbas medicinales en la ciudad de São Paulo, Brasil. *Bol. Micol.*, 31(2), 1-8.

Orellana, A., Muchaypiña, J. y Guillermo, J. (2005). Prevalencia de hongos en harina de *Lepidium peruvianum* "Maca" en mercados de Andahuaylas, Ica y Cañete–Perú. *Revista Peruana de Biología*, 12(3), 445-448.

Osorno, C. (2015). *Estandarización y evaluación de un método para la determinación de micotoxinas por medio de la técnica fotométrica (Kit ELISA) a materias primas de avicultrua en la industria de alimentos para animales CIPA S.A.* Tesis para Título Profesional, Universidad de Pereira. Colombia.

Palumbo, J.D., O’Keeffe, T.L., Ho, Y.S. y Santillán, C.J. (2015). Occurrence of Ochratoxin A contamination and detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species in retail samples of dried fruits and nuts. *Journal of Food Protection*, 78(4), 836–842.

Quesada, A. y Ortega, A. (2011). El cornezuelo del centeno a lo largo de la historia: mitos y realidades. *Pasaje a la Ciencia*, número 14, páginas 26–

25. <http://www.pasaiealaciencia.es/2011/pdf/02-ergotismo.pdf>.
(recuperado el 22/09/2017).

Ramos, N., Castro, A., Juárez, J., Acha de la Cruz, O., Rodríguez, N., Blancas, J., Escudero, J. y Navarro A. (2016). Evaluación de Ocratoxina A en *Theobroma cacao* L. “cacao blanco” durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. *Rev Soc Quím Perú*, 82(4), 431-439.

Razak, M.F.A., Aidoo, K.E. y Candlish, A.G.G. (2009). Mixed herbs drugs: Inhibitory effect on growth of the endogenous mycoflora and aflatoxin production. *Mycopathologia*, 167, 273–286.

Reyes, V. y Quevedo, F. (2006). Determinación de aflatoxina total y Ocratoxina A en maca seca y en harina de maca. *Ciencia e Investigación*, 9(1), 7–14.

Richard, J.L. (2008). Discovery of Aflatoxins and significant historical features. *Toxin Reviews*, 27, 171–201.

Rustom, A. (2012). *Estadística descriptiva, probabilidad e inferencia. Una visión conceptual y aplicada*. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.

Sánchez, E. (2002). *Inhibición del crecimiento y la producción de toxinas de Aspergillus flavus y A. parasiticus por extractos de plantas del género Agave*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

- Sánchez, V., González, A. y Lurá, M. (2006). Análisis Microbiológico de hierbas medicinales y su control por especies de *Aspergillus* toxicogénicos. *Acta Farm. Bonaerense*, 25(1), 89-94.
- Santos, L., Marín, S., Sanchis V. y Ramos, A.J. (2013). Mycotoxin in Medicinal/Aromatic Herbs – A Review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticos*, 12(2), 119 – 142. <http://www.redalyc.org/pdf/856/85625780002.pdf> (recuperado el 5-12-2017).
- Semeniuk, M., Schenone, A., Sobrero, M.S. y Marsili, N. R. (2014). Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de aflatoxina y ocratoxina, utilizando matrices de excitación–emisión de fluorescencia y calibración multivariada. *Revista FABICIB*, 18, 36–48.
- Serrano-Coll, H.A. y Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med*, 29(1), 143-152.
- Tchana, A.N., Moundipa, P.F. y Tchouanguep, F.M. (2010). Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 178-188.
- Trucksess, M.W. y Scott, P.M. (2008). Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess*, 25(2), 181–192.

- Valdez, M.S., Lavezzo, C. y Flores Quinteros, M.N. (2014). Análisis de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y totales en maní, maíz y alimentos balanceados con columnas de Inmunoafinidad; detección y cuantificación con HPLC y derivatización postcolumna: Proceso de verificación de la metodología. *Revista SNS, Senasa Argentina*, 4, 7–18.
- Venkataramana, M., Rashmi, R., Uppalapati, S.R., Chandranayaka S., Balakrishna, K., Radhika, M., Gupta, V.K. y Batra, H.V. (2015). Development of sandwich dot-ELISA for specific detection of Ochratoxin A and its application on to contaminated cereal grains originating from India. *Frontiers in Microbiology*, 6, 511. doi: 10.3389/fmicb.2015.00511 (revisado el 15-02-2018).
- Vila, G.R. (2009). *Análisis del uso de plantas medicinales en mercados de abastos del distrito de Ventanilla – Callao, 2007*. Tesis para Título de Químico Farmacéutico. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Lara-Zaragoza, E.B., Franco-Monsreal, J., Cardeña-Bozziere, I. M., Galván-Valencia, O. T. y Ruiz-Gómez, L.M. (2011). Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 15(43), 13–20.
- Wild, C.P. y Gong, Y.Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1), 71 – 82.

VII. ANEXOS

1. GLOSARIO:

- **Micotoxina:**

Es una toxina producida por alguna especie del reino fungi, incluye setas, mohos y levaduras.

- **Metabolito secundario:** Compuesto orgánico sin un papel directo en las principales rutas metabólicas. Puede ser tóxico o no.

- **Aflatoxina:**

Metabolito secundario producido por mohos de las especies de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*. Son cuatro los tipos de Aflatoxinas conocidas dependiendo de su comportamiento a la luz ultravioleta y por su procedencia láctea:

Aflatoxina: B1 y B2: Fluorescen de azul en presencia de luz ultravioleta

Aflatoxinas: G1 y G2: Florecen de verde en presencia de luz ultravioleta

Aflatoxina M1: Es un metabolito hidroxilado proveniente de la Aflatoxina B1

- **Ocratoxina A:**

Metabolito secundario producido por especies de *Aspergillus ochraceus* (sección Circumdati) y *Aspergillus alliaceus*

- **Planta medicinal:** Cualquier parte de una planta o la planta entera que tiene propiedades terapéuticas favorables para la salud.

- **Infusión:** Preparado bebible que se obtiene al someter la planta medicinal a agua caliente por unos minutos.
- **ELISA:** InmunoEnsayo de Enzima Ligada. Técnica que bajo el principio de complementariedad de antígeno anticuerpo permite realizar la detección y/o cuantificación de metabolitos, moléculas y estructuras celulares.
- **Estudio Descriptivo:** Tipo de estudio donde el investigador sólo observa y describe la frecuencia de las variables.
- **Diseño pre-experimental:** Diseños formulados para establecer algún tipo de asociación entre dos o más variables. Por lo tanto, al no buscarse relaciones estrictas de naturaleza causa-efecto, no resulta adecuado, al menos a priori, hablar de variable(s) dependiente(s) ni de variable(s) independiente(s) propiamente dichas.

2. INSTRUMENTOS

2.1 VALIDACION DE INSTRUMENTOS

LEGISLACION MUNDIAL DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS				
MICOTOXINA	PAIS	PRODUCTO	NIVEL PERMITIDO	ENCARGADO
ZEARALENONA	Brasil	MAIZ	200ppb	Programa Nacional de Monitoreo y control de Micotoxinas de Brasil
	Rumania	Todos los alimentos	20ppb	
	Antigua Union Sovietica	Granos, Grasas y Aceites	1000ppb (1ppm)	
AFLATOXINA	Estados Unidos	Maiz	20ppb alimento destinado a consumo Humanos, animales jovenes y vacas lecheras; 100ppb para Aves, cria de bovinos y porcinos; 200ppb para Cerdos de engorde y 200ppb bovinos de engorde.	Administración de alimentos y drogas (Food and Drug Administration, FDA)
	Mayoría de Pises	Todos los alimentos	10-20ppb	
OCRATOXINA	Brasil	Granos y Cereales (Arroz, Frijol, Maiz y Cevada)	50ppb	Programa Nacional de Monitoreo y control de Micotoxinas de Brasil
	Checoslovaquia	Todos los alimentos	20ppb alimento destinado a consumo de humanos adultos; <5ppb a niños y <1ppb a bebes.	
DON	Estados Unidos	Harina, Germen de Trigo y salvado	1ppm para consumo humano	Administración de alimentos y drogas (Food and Drug Administration, FDA)
		Granos y subproductos	10ppm para consumo de bovinos y pollos que no exceda el 50% de la dieta	
		Granos y subproductos	5ppm para consumo de cerdos y demas animales.	
	Rumania	Todos los alimentos	5ppm para consumo de cerdos y demas animales.	
	Antigua Union Sovietica	Trigo	500ppb	

2.2 CONFIABILIDAD DE INSTRUMENTOS

Parámetros para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad, repetibilidad intermedia y reproducibilidad para Aflatoxina

PRECISION AFLATOXINA									
PARAMETROS ESTADISTICOS	REPETIBILIDAD			REPETIBILIDAD INTERMEDIA			REPRODUCIBILIDAD		
	Eb	Em	Ea	Eb	Em	Ea	Eb	Em	Ea
PROMEDIO	4,9	25,0	49,8	4,9	25,0	49,8	4,9	25,0	49,8
DESVIACION	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CV	0,4	0,1	0,1	0,4	0,1	0,0	0,6	0,1	0,0
LD	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
LC	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2
%ERROR	2,3	0,1	0,5	2,1	0,0	0,5	1,9	0,0	0,5

Catalina (2015)

Parámetros para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad, repetibilidad intermedia y reproducibilidad para Ocratoxina

PRECISION OCRATOXINA									
PARAMETROS ESTADISTICOS	REPETIBILIDAD			REPETIBILIDAD INTERMEDIA			REPRODUCIBILIDAD		
	Eb	Em	Ea	Eb	Em	Ea	Eb	Em	Ea
PROMEDIO	1,9	15,0	24,9	1,9	15,0	24,9	1,9	15,0	24,9
DESVIACION	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CV	0,5	0,1	0,0	0,6	0,1	0,0	0,6	0,1	0,0
LD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
%ERROR	3,8	0,1	0,4	4,1	0,1	0,4	4,1	0,1	0,4

Catalina (2015)

Parámetros para la determinación de la exactitud a tres niveles de concentración para aflatoxinas

PARAMETROS ESTADISTICOS	EXACTITUD AFLATOXINA					
	Eb		Em		Ea	
	A	[]	A	[]	A	[]
DIA 1	2,136	4,9	1,455	25,0	0,615	49,8
	2,137	4,9	1,456	25,0	0,616	49,8
DIA 2	2,137	4,9	1,457	24,9	0,617	49,7
	2,136	4,9	1,455	25,0	0,614	49,8
DIA 3	2,137	4,9	1,458	24,9	0,615	49,8
	2,136	4,9	1,455	25,0	0,615	49,8
DIA 4	2,137	4,9	1,456	25,0	0,615	49,8
	2,137	4,9	1,455	25,0	0,616	49,8
DIA 5	2,137	4,9	1,457	24,9	0,616	49,8
	2,136	4,9	1,457	24,9	0,616	49,8
PROMEDIO		4,9		25,0		49,8
DESVIACION		0,0		0,0		0,0
CV		0,3		0,1		0,1
LD		0,0		0,1		0,1
LC		0,2		0,3		0,3
%ERROR		1,9		0,1		0,5

Catalina (2015)

Parámetros para la determinación de la exactitud a tres niveles de concentración para ocratoxina

PARAMETROS ESTADISTICOS	EXACTITUD OCRATOXINA					
	Eb		Em		Ea	
	A	[]	A	[]	A	[]
DIA 1	2,584	1,9	1,658	15,0	0,957	24,9
	2,584	1,9	1,658	15,0	0,957	24,9
DIA 2	2,584	1,9	1,657	15,0	0,956	24,9
	2,584	1,9	1,657	15,0	0,957	24,9
DIA 3	2,585	1,9	1,657	15,0	0,957	24,9
	2,584	1,9	1,658	15,0	0,958	24,9
DIA 4	2,586	1,9	1,657	15,0	0,957	24,9
	2,586	1,9	1,657	15,0	0,956	24,9
DIA 5	2,584	1,9	1,657	15,0	0,957	24,9
	2,586	1,9	1,658	15,0	0,957	24,9
PROMEDIO		1,9		15,0		24,9
DESVIACION		0,0		0,0		0,0
CV		0,7		0,0		0,0
LD		0,0		0,0		0,0
LC		0,1		0,1		0,1
%ERROR		4,2		0,1		0,4

