

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALGUNOS PRODUCTOS NATURALES UTILIZANDO EL MEDIO AGAR COCO Y ELISA LIGADA

Br. Mariano Freddy Medina Gutiérrez, José Irely Namijira y Mirtha Roque Alcarraz

Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnología
"Marco Antonio Garrido Malo"

Identificación, determinación y cuantificación de aflatoxinas producidas por hongos aflatoxigenicos en productos naturales, como alimentos naturales y medicamentos de origen vegetal. Utilizando el medio Agar Coco Oxitetraciclina (CAMO) donde se aprecia fluorescencia azul en el UV para determinar y cuantificar la aflatoxina se uso Elisa ligada, utilizando el fotocolorimetro EIH Neogen y el programa Logit donde los resultados se dan en ppb o ug/kg de aflatoxina.

Palabras clave: Aflatoxinas, Agar Coconut Oxitetraciclina, Elisa.

Hace mucho se ha observado que la presencia de hongos puede ocasionar cambios en textura, color, sabor y calidad de los alimentos. En nuestro país es considerable el consumo de productos naturales como: alimentos naturales o medicamentos de origen vegetal. Estos se elaboran y se expenden sin el control sanitario que requieren estos productos; siendo la presencia de aflatoxinas un riesgo para su salud.

En tal sentido se justifica el presente trabajo para demostrar la existencia de aflatoxina en productos naturales y asimismo estudiar un método rápido y sensible para la determinación de ellas.

Materiales y Métodos

Materiales, Reactivos y Equipos

Reactivos Químicos

- Etanol al 70%
- Metanol al 70%
- Oxitetraciclina 250 mg PFIZER

Medios de Cultivo

- Agua Peptonada
- Agar Sabouraud DIFCO
- Agar Coco Oxitetraciclina (CAMO)
- Agar Czapeck extracto de levadura.

Materiales de Laboratorio

- Placas Petri
- Placas Petri descartables
- Tubos de vidrio de 10 cm
- Pipetas de 25 mL, 10 mL y 1 mL.
- Espátulas de Driglaski
- Viales
- Bolsas estériles de 15x30
- Laminas porta y cubre objetos
- Papel Whatman N°1
- Papel toalla
- Micropipeta de 100 uL
- Micropipeta multicanal de 100 uL
- Tips descartables

- Timer
- Papel indicador MERCK

Equipos

- Microscopio simple
- Lámpara UV
- Equipo de Karl Fisher
- Kit Cuantitativo de ELISA para aflatoxinas VERATOX
- Lector EIA para ELISA
- Programa Logit versión 1.04

Análisis de las Muestras

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizaron diversos métodos de análisis, con la siguiente secuencia:

- Toma de muestras.
- Determinación de pH y humedad de las muestras.
- Recuento de hongos totales en Agar Sabouraud Oxitetraciclina (ASO) y en Agar Coco Oxitetraciclina (CAMO).
- Recuento de hongos aflatoxigenicos en CAMO.
- Análisis de hongos aflatoxigenicos en CAMO con inductores para

- aumentar la producción de aflatoxinas.
- Identificación de hongos aflatoxigénicos.
 - Análisis cualitativo y cuantitativo de aflatoxinas usando ELISA competitiva.

Toma de muestras

Las muestras en número de 50 fueron tomadas al azar entre los diferentes establecimientos de venta de productos naturales del centro de Lima. Para mejorar el análisis estadístico se dividieron en dos grupos.

Tabla 1: Muestras Analizadas en la Investigación

| Cantidad | Productos |
|----------|--------------------------|
| 26 | Suplementos Alimentarios |
| 24 | Medicamentos Vegetales |

Determinación del pH y Humedad de las Muestras

Para determinar la humedad se tomó 1 g de muestra, se mezcló con agua destilada con agitación constante durante 3 a 5 minutos, se decantó y al líquido decantado se midió su pH con papel indicador MERCK.

Para determinar la humedad se tomó 3 a 5 g de muestra y se usó el equipo de Karl Fisher (determina la cantidad total de agua en las muestras).

Dilución de las muestras

En una bolsa estéril (15x30) se tomó 10 g de muestra molida, se agregó 90 mL de Agua Peptonada (AP), agitó durante 2 a 3 minutos, obteniendo de esta manera la dilución 10^{-1} o 1/10, se dejó a temperatura ambiente por 1 a 2 horas para revivificar y dispersar a los microorganismos. Posteriormente se realizaron diluciones, transfiriendo 1 mL de la dilución 10^{-1} a 9 mL de AP hasta completar de la misma forma la dilución 10^{-3} .

Recuento de hongos totales y hongos aflatoxigénicos

De las diluciones realizadas, se transfirieron 0,1 mL a las placas con

Agar Sabouraud Oxitetraciclina (ASO) y Agar Coco Oxitetraciclina (CAMO), se dispersó homogéneamente con ayuda de la espátula de vidrio Driglaski, por cada siembra se esterilizó la espátula con etanol al 70% y flameándola en el mechero. Las placas se incubaron a 25°C por 5 a 6 días en forma invertida.

El recuento de hongos totales se realizó en las placas con ASO y CAMO. El recuento de hongos aflatoxigénicos se realizó en las placas con CAMO, colocándolos bajo la luz UV para observar la fluorescencia azul alrededor de las colonias (característica de las aflatoxinas). El recuento de hongos totales y aflatoxigénicos se realizó tomando las placas que contenían entre 10 a 150 unidades formadoras de colonia. Las colonias con fluorescencia se aislaron en viales conteniendo Agar Sabouraud para su posterior identificación.

Hongos aflatoxigénicos en CAMO con inductores para aumentar la producción de aflatoxinas

Las muestras aisladas en viales se sembraron en CAMO con diferentes inductores para estimular la producción de aflatoxinas, se incubaron a 25°C por 3 a 4 días. Los diferentes medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

- CAMO sin inductores.
- CAMO mas 0,5 g de Zn en 1000 mL de medio (ion metálico que estimula la producción de aflatoxinas).
- CAMO mas 63 mg de sacarosa en 1000 mL de medio (carbohidrato que estimula la producción de aflatoxinas).
- CAMO mas 63 mg de extracto de levadura en 1000 mL de medio (fuente de nitrógeno que estimula la producción de aflatoxinas).
- CAMO mas los tres inductores.

Identificación de Hongos Aflatoxigenicos

- a) Utilizando Microcultivos.- Para la identificación de los hongos se usaron microcultivos, estos se incubaron a 25°C por tres días y se observaron en un microscopio simple a mediano aumento.
- b) Cultivo en Agar Czapeck Extracto de Levadura CYA.- Este medio de cultivo se incubo a dos temperaturas: 25°C y 37°C y se leyeron después de siete días, esto se uso solo para identificar a las especies del genero *Aspergillus*, para este fin se usaron claves que se deben seguir desde el principio porque son descartables (Pitt, 1996).

Análisis Cualitativo y Cuantitativo de Aflatoxinas***Características de la Prueba de ELISA***

La prueba de ELISA usualmente emplea un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido y el ligando esta marcado a una enzima; la fosfatasa y la peroxidasa del rabano son enzimas económicas y están disponibles comercialmente en forma muy purificada, estas pueden emplear sustratos cromógenos o fluorógenos, dando una señal de absorbancia o fluorescencia, respectivamente.

La ventaja de un sustrato cromogenico es que sus productos pueden detectarse visualmente, los productos fluorescentes pueden detectarse a concentraciones 100 a 1000 veces menores de los cromógenos. Numerosas son las variaciones ideadas para la prueba de ELISA, algunas están basadas en reacciones competitivas mientras que otras son ensayos "sándwich" directos.

Principios de la prueba de ELISA VERATOX

Las aflatoxinas están conjugadas a una enzima peroxidasa de rábano, esta es usada como un antígeno conocido (conjugado). En unas celdillas se

mezclan nuestras supuestas aflatoxinas (extraídas por solventes) y las enzimas conjugados. Posteriormente esta mezcla a unas celdillas de plásticos en donde compiten por los anticuerpos específicos a las aflatoxinas adheridos a la superficie de la pared interior de las celdillas; los excesos de aflatoxinas y enzimas – conjugados no fijados al anticuerpo son desechados.

La enzima sustrato, adicionada a cada celdilla, es catalizada por la enzima fijadora y cambia de color, la intensidad de color depende de la cantidad de enzima, conjugado fijados a los anticuerpos de color oscuro indica menor presencia de aflatoxinas en las muestras (aflatoxinas libres), mientras el color claro indican mayor presencia de aflatoxinas. Después de 2 a 3 minutos el cambio de color pueden ser evaluado visualmente o midiendo la absorbancia (ODE). Por adición de la solución Stop-enzyme, por los niveles de aflatoxina en las muestras se pueden comparar con estándares coloreados (método cualitativo).

Las celdillas pueden ser leídas en un fotocolorimetro con filtro de 650 nm y los datos obtenidos se cuantifican usando el Logistic-log paper, un programa donde obtenemos la concentración de aflatoxinas en ppb (método cuantitativo).

Contenido del Kit de ELISA

- Cuatro tiras de 12 celdillas (48 celdillas) con anticuerpo fijados en su interior.
- Cuatro tiras de 12 celdillas (48 celdillas) marcado de rojo.
- Cuatro botellas con etiquetas amarillas de aflatoxinas control: 1,5 mL de 0,5,15,50 ppb de aflatoxinas.
- Una botella con etiqueta azul de enzima – conjugado: 7 mL aflatoxina – HRP conjugado (Horseradish Peroxidase).
- Una botella con etiqueta verde de sustrato: 24 mL de TMB (Tetrametilbenzidina).

- Una botella de etiqueta roja de Stop-enzyme 32 mL de solución (3,5 mL HF, 10,5 g sodio citrato, 6 mL de NaOH 1N y 400 mg edetato de sodio).

Los reactivos de deben de mantener a temperatura de refrigeración.

Extracción de las muestras

Las muestras se molieron hasta obtener partículas como café instantáneo; se mezclaron 5 g de muestra sólida como 25 mL de metanol al 70% agitando vigorosamente por 3 minutos, se filtro a través del papel Whatman N°1 y se trabajo con la solución filtrada.

Procedimientos de la prueba de ELISA

- Separar las celdillas de la mezcla (marcadas de rojo) de acuerdo a la cantidad de muestras a trabajar y 4 celdillas para los controles.
 - De igual forma separar las celdillas fijadas con anticuerpos.
 - Agitar los reactivos antes de ser usados y dejarlos a temperatura ambiente.
 - Llevar 100 uL el de enzima – conjugado (etiqueta azul) a cada celdillas de mezcla.
 - Usar nuevos tips y transferir 100 uL de controles y muestras a las celdillas y mezclar con el conjugado dentro de ellas.
- 0 5 15 50 M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7
M8 tira 1
M9 M10 M11 M12 M13 14 M15 M16
M17 M18 M19 M20 tira 2
- Usar la pipeta multicanal (2 tips) y transferir 100 anticuerpos, mezclar e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
 - Descartar la mezcla de las celdillas, lavar 5 veces con agua desionizada, voltear las celdillas y secar en papel toalla.
 - Transferir cantidad necesidad de enzima – sustrato (etiqueta verde) a un envase largo o “bote para

reactivos” y llevar a las celdillas 100 uL de sustrato usando una pipeta multicanal, mezclar completamente.

- Secar la parte inferior de las celdillas y leer en el fotocolorimetro EIA (NEOGEN) usando filtro de 650 nm (leer primero los controles, después las muestras).

Resultados y discusión

Recuento de Hongos Aflatoxigénicos

Los resultados en el recuento de hongos aflatoxigénicos se observan en las tablas 2 y 3.

En la tabla 2 se observa que el mayor número en el recuento de hongos aflatoxigenicos se encuentran en la muestra 4, soya alimentos naturales “la salud” con 3×10^2 ufc/g seguido de la muestra 3 y 6 kiwicha molida “productos andinos” y maca “Huayre”, respectivamente con 2×10^2 ufc/g; 21 muestras tienen < 100 ufc/g. También se observan en la columna de nivel de aflatoxinas, que las mayores concentraciones se encuentran en la muestra 6, maca “Huayre” con 20 ppb, seguida de la muestra 9, Germen de trigo “Bircher Berber” con 16,5 ppb; las muestras 15 y 18, galletas naturales dietéticas “productos vera” y kiwicha tostada y molida “Conselva”, respectivamente tienen 0,0 ppb de aflatoxinas.

Observamos en la tabla 3, que la mayor concentración de aflatoxina se encuentra en la muestra 36, Ginseng Dicter’s Tea “King” con 103,7 ppb seguida de la muestra 28, Hercampuri “los ficus” con 81,4 ppb, la menor concentración de aflatoxina se encuentra en la muestra 50, Conferí “ITEPAR” cápsulas con 2,6 ppb.

En la tabla 4 se observan que el promedio (mediana) de aflatoxina en los suplementos alimentarios es igual a

7,10 ppb, y en los medicamentos vegetales es igual a 41,90 ppb.

Al adquirir las muestras en establecimientos de venta de productos naturales se analizaron inicialmente su forma de presentación, donde se observó que los suplementos alimentarios 17 muestra se presentaban en bolsas simples y 9 muestras en bolsas dobles; por su parte, los medicamentos vegetales se encontraron 15 muestras en bolsa simple, 5 muestras en sobres filtrantes, 2 muestras en forma de cápsulas, 1 muestra en sobre y una muestra a granel. Posteriormente, se determino el pH y la humedad de todas las muestras si son productos lábiles de ser contaminados por hongos productos de aflatoxina, quienes demostraron la relación existente entre pH y humedad con presencia de aflatoxinas en muestra de maíz y trigo. El pH promedio de las muestras fue 5,54 y la unidad promedio 8,841, estos resultados se encontraron dentro de las condiciones optimas para la producción de aflatoxinas Lie y Marth (referido en Ellis y Etal, 1991), reportaron que *A. Flavus* y *A. Parasiticus* son capaces de crecer en un rango de pH que van de 1,7 a 9,34 con crecimiento optimo entre pH 3,42 y 5,47. en el análisis estadístico, se encontró diferencias significativas entre los promedios de los 2 grupos de muestras analizadas, los medicamentos vegetales presentaron pH 5,042 y humedad 11,140, mientras que los suplementos presentaron pH 6 y humedad 6,718.

Los resultados obtenidos en los recuentos de hongos totales fueron transformados a logaritmo en base 10 ya que el fenómeno de los hongos no tienen distribución normal, sino distribución geométrica (ISO 1980) se utilizaron 2 medios de cultivo: Agar Sabouraud Oxitetraclina (ASO) por ser el medio de cultivo mas común para el recuento de hongos, y Agar Coco

Oxitetraclina (CAMO) que es un medio para observar la fluorescencia de los hongos Aflatoxigenicos bajo la luz UV. En total, 42 muestras (84%) se encontraron contaminadas siendo 12×10^3 ufc/g el valor mas alto en el recuento de hongos totales en los 2 medios de cultivo. Según el análisis estadístico (prueba "t" de student) los medicamentos vegetales tuvieron como promedio en el recuento de hongos totales mas altos que los suplementos alimentarios en los dos medios de cultivo; estadísticamente se determino que no hay diferencias significativas en los recuentos de hongos por lo tanto, se pueden utilizar cualquiera de los medios de cultivo para el recuento de hongos totales. Esos resultado coinciden con el trabajo realizado por Torres, donde analizó muestra de harina y alimentos para animales en 4 medios de cultivo, también demostró que el medio Agar Coco Oxitetraclina (CAMO) es un método fácil y económico para detectar hongos aflatoxigenicos.

En el recuento de hongos aflatoxigénicos en Agar Coco Oxitetraclina (CAMO) los resultados también se expresaron como logaritmos en base 10. en total, 16 muestras (32%) estuvieron contaminadas con hongos productores de aflatoxinas. Según el análisis estadístico en el recuento de hongos aflatoxigénicos existió diferencias significativas entre los medicamentos vegetales y los suplementos alimentarios, el 1 grupo tuvo un promedio de 2,66 (antilog 5×10^2 ufc/g) y 13 muestras presentaron < 100 ufc/g, mientras que el 2 grupo tuvo un promedio de 2,21 (antilog 2×10^2 ufc/g) y 21 muestras presentaron < 100 ufc/g; estos resultados nos indican mayor contaminación de hongos aflatoxigénicos en muestra de medicamentos vegetales.

Tabla 2

RECUENTO DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS EN SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS

| MUESTRA | PRODUCTO | Ufc/g | NIVEL DE AFLATOXINA ppb |
|---------|---|-------------------|-------------------------|
| 1 | Salvado "Alimentos Naturales" | <100 | 16,0 |
| 2 | Salvado de Trigo "Bircher Berner" | <100 | 9,8 |
| 3 | Kiwicha molida "Productos Andinos" | 2x10 ² | 8,3 |
| 4 | Soya Alimentos Naturales "La Salud" | 3x10 ² | 9,7 |
| 5 | Salvado de Trigo "Agroindustrial la Salud" | <100 | 4,4 |
| 6 | Maca "Huayre" | 2x10 ² | 20 |
| 7 | Kiwicha pop "Alimentos Andinos para Exportación" | <100 | 1,0 |
| 8 | Kiwicha pop "Productos Andinos" | <100 | 4,7 |
| 9 | Germen de Trigo "Bircher Berner" | <100 | 16,5 |
| 10 | Soya cruda y molida "Nutri Andina" | <100 | 4,5 |
| 11 | Kiwicha pop dulce "Covinda" | <100 | 2,4 |
| 12 | Salvado de Trigo "Nutri Andina" | <100 | 7,1 |
| 13 | Kiwicha pop "Nutri Andina" | <100 | 3,8 |
| 14 | Trigo Atómico "Productos TAJ" | <100 | 11,8 |
| 15 | Galletas naturales dietéticas "Productos Vera" | <100 | 0,0 |
| 16 | Carne de Soya "Bircher Berner" | <100 | 10,9 |
| 17 | Maca Vit "Productos Nuestra Señora de Fátima" | 10 ² | 11,4 |
| 18 | Kiwicha tostada y molida "Conselva" | <100 | 0,0 |
| 19 | Salvado de Trigo "Cogomo" | <100 | 4,4 |
| 20 | Salvado de Trigo "Proina" | <100 | 5,2 |
| 21 | Kiwicha dulce "For Export" | <100 | 10,9 |
| 22 | Kiwicha tostada instantánea "Productos Valentina" | 10 ² | 2,4 |
| 23 | Germen de Trigo "Mi Salud" | <100 | 10,0 |
| 24 | Quinoa Tostadita "Conselva" | <100 | 3,6 |
| 25 | Germen de Trigo "Unión" | <100 | 13,1 |
| 26 | Kiwicha molida "Mi Salud" | <100 | No se analizo |

Tabla 3

RECUENTO DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS EN MEDICAMENTOS VEGETALES

| MUESTRA | PRODUCTO | Ufc/g | NIVEL DE AFLATOXINAS ppb |
|---------|-----------------------------------|--------------------|--------------------------|
| 27 | Uña de Gato "Codeplan" S. R. Lida | 10 ² | 63,5 |
| 28 | Hercampuri "Los Ficus" | 4x10 ² | 81,4 |
| 29 | Chance Piedra "Los Ficus" | 2x10 ³ | 78,1 |
| 30 | Hoja de Boldo "Los Ficus" | <100 | 30,6 |
| 31 | Achiote | 5x10 ² | 29,4 |
| 32 | Infusiones "Wawasana" | 13x10 ² | 48,2 |
| 33 | Uña de Gato "Longfile" | <100 | No se analizo |
| 34 | Uña de Gato "Medisana" | 3x10 ² | 24,8 |
| 35 | Emoliente clásico "Medisana" | 102 | 17,5 |
| 36 | Ginseng Dieter's tea "King" | <100 | 103,7 |
| 37 | Higasan "Naturista Odilia" | <100 | No se analizo |
| 38 | Valeriana "Los Ficus" | 10 ² | 15,1 |
| 39 | Bronquiosan "Naturista Odilia" | <100 | No se analizo |
| 40 | Diabetisan "Naturista Odilia" | 4x10 ² | 41,9 |
| 41 | Chuchuhuasi "Los Ficus" | 17x10 ² | No se analizo |
| 42 | Uña de Gato "Los Ficus" | <100 | 23,7 |
| 43 | Tonillo "Los Ficus" | <100 | 52,3 |
| 44 | Rifosan "Odilia" | 2x10 ³ | 59,6 |
| 45 | Nerviosan "Naturista Odilia" | <100 | No se analizo |
| 46 | Hoja de Tilo "Los Ficus" | <100 | No se analizo |
| 47 | Te de zanahoria "Jelisa" | <100 | 44,1 |
| 48 | Kore Ginseng Tea Korean | <100 | No se analizo |
| 49 | Diente de León "ITEPAR" | <100 | 36,6 |
| 50 | Conferi "ITEPAR" | <100 | 2,6 |

Tabla 4

RESUMEN DE DATOS DESCRIPTIVOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ELISA TANTO EN SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS Y MEDICAMENTOS VEGETALES

| VARIABLE | MEDIANA | CUARTIL 1 | CUARTIL 2 |
|--------------------------|---------|-----------|-----------|
| SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS | 7,10 | 3,70 | 11,15 |
| MEDICAMENTOS VEGETALES | 41,90 | 24,25 | 61,35 |
| TOTAL | 11,60 | 4,47 | 31,35 |

En la utilización de inductores para aumentar la producción de aflatoxinas se utilizaron 5 medios de cultivo y se observó en todos la fluorescencia de las aflatoxinas bajo la luz UV pero en el medio CAMO con todos los inductores (ion sn, extracto de levadura y sacarosa) se mas grande la fluorescencia.

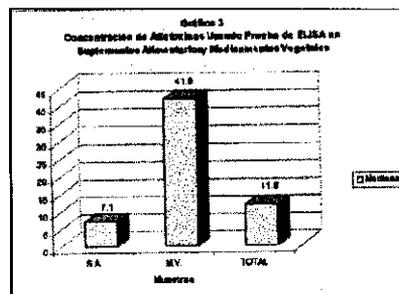
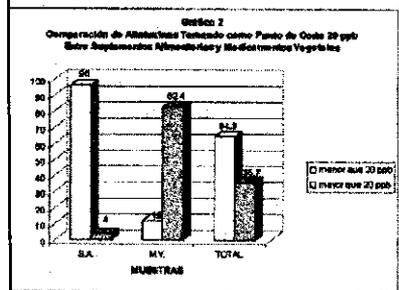
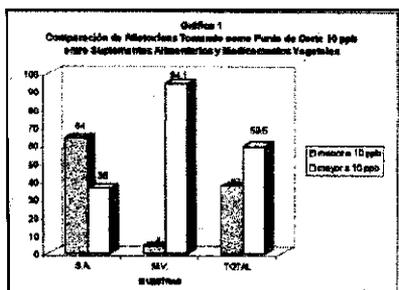
Después de aislar los hongos aflatoxigenicos enviales (frascos pequeños) se procedió a su identificación usando microcultivos para su observación en el microscopio los dificilmente reconocibles se sembraron en Agar Czapeck extracto de levadura (Pitt, 1996), quien utilizo este medio para observar la morfología de las especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Se identificaron cuatro especies de hongos aflatoxigenicos en 16 muestras (5 de suplementos alimentarios y 11 medicamentos vegetales), estos son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp, *Aspergillus Níger* y *Penicillium* sp, siendo el mas abundante *A. flavus* seguido de *Penicillium* sp y solo 2 colonias de *A. níger* y 4 colonias de *Aspergillus* sp. En 3 muestras se identificaron dos diferentes hongos productores de aflatoxinas, donde la pareja conformada por *A. flavus* y *Penicillium* sp es la mas abundante.

El kit de ELISA que se uso en la presente investigación sirve para 48 pruebas y para cuantificar aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂; el limite mas bajo detección en 1 ppb (ug/kg) se usaron 4 pruebas para los controles y se analizaron 42 muestras, de las cuales 25 muestras eran suplementos alimentarios y 17 medicamentos vegetales.

De las 42 muestras analizadas, 40 se encuentran contaminadas con aflatoxinas (95,24%), solo 2 muestras tuvieron 0 ppb (pertenecen a los suplementos alimentarios), se utilizo como promedio a la mediana. El promedio total fue 11,60 ppb, la menor concentración fue 1 ppb y la mayor concentración 103,4 ppb según el análisis estadístico (prueba no parametrica "U" de Mann Whitney), existieron diferencias significativas entre las concentraciones de suplementos alimentarios y los medicamentos vegetales, el 1 grupo tuvo un promedio de 7,10 ppb donde la menor concentración fue 1 ppb y la mayor concentración 20 ppb.

El 2 grupo tuvo un promedio de 41,9 ppb siendo la menor concentración 2,6 ppb y la mayor 103,4 ppb estos resultados nos indicaría que los medicamentos vegetales se encontraron concentraciones mas altas de aflatoxina. Por ultimo el limite máximo tolerable para los alimentos de consumo humano en el Perú es de 10 ppb según el codees alimentario (referido por Torres) pues no hay normas alimentarias en nuestro país. De acuerdo a este parámetro se tuvo que 17 muestras (40,5%) están por debajo de 10 ppb y 25 muestras (59,55) por encima. En los suplementos alimentarios 16 muestra (64%) estuvieron por debajo de 10 ppb y 9 muestras (36%) por encima 1, en los medicamentos vegetales una muestra (5,9%) estuvo por debajo de 10 ppb y 16 muestras (94,1%) por encima. La administración de alimentos y drogas (FDA) establece que el limite máximo permitido en los alimentos y productos

para consumo humano es de 20 ppb, según este parámetro 27 muestra (64,3%) esta por debajo de 20 ppb y 15 muestras (35,7%) por encima. En suplementos alimentarios, 24 muestras (96%) estuvieron por debajo de 20 ppb y una muestra (4%) por encima, en los medicamentos vegetales 3 muestras (17,6%) están por debajo de 20 ppb y 14 muestras (82,4%) por encima.



Conclusiones y Recomendaciones

La presente investigación tuvo las siguientes conclusiones:

1. El 84% de las muestras analizadas se encontraron contaminadas con hongos. En el recuento de hongos totales no hay diferencias entre el Agar Sabouraud Oxitetraciclina

(ASO) y Agar Coco Oxitetraciclina (CAMO) por lo tanto únicamente se puede usar CAMO para los recuentos de hongos totales y hongos aflatoxigénicos.

2. El 32% de las muestras analizadas estuvieron contaminadas con hongos aflatoxigénicos. El Agar Coco Oxitetraciclina (CAMO), es un buen método preliminar para determinar la existencia de aflatoxina ya que es fácil y económico. Para observar la mayor producción de aflatoxina se puede usar CAMO mas de tres inductores (ion zinc, extracto de levadura y sacarosa).
3. El 95,2% de las muestras analizadas se encontraron contaminadas con aflatoxinas, la carencia de hongos en la muestra no necesariamente indica la ausencia de aflatoxinas. Las muestras contienen un promedio de 11,6 ppb de aflatoxinas y en los medicamentos vegetales se encontró la mayor concentración de aflatoxinas por encima de 20 ppb índice máximo tolerable según FDA.
4. El Agar Czapeck extracto de levadura es un magnifico medio de cultivo para la identificación de especies del genero *Aspergillus*.

Como resultante del presente trabajo de investigación, podemos recomendar lo siguiente:

1. Los reactivos del kit de ELISA deben ser utilizados a temperatura ambiente y usados antes de la fecha de expiración; en la prueba de elisa se debe respetar los tiempos de incubación.
2. El Ministerio de Salud debe establecer normas para el análisis de aflatoxinas antes y después de la elaboración de todos los productos que van a ser consumidos.
3. Ampliar los estudios sobre el análisis de aflatoxinas en el carnes,

vísceras y otros productos de consumo humano

Referencias

Aflatoxina. Mycotoxinas. 1997 (citada 24 de marzo de 1998). Home page:

<http://orion.ufrgs.br/farmacia/megadado/s/files/aflatoxins>.

Aflatoxins. 1995. Neogen Corporation. Miami. (citada el 30 de abril de 1998). Home page:

<http://www.Neogen.com>

Aflatoxins. Mycotoxins and mycotoxicosis. 1996 (citada 30 de abril de 1998). Home page:

<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong7bot135/lect111.htm>

Aflatoxins. Nabil Saad. 1997 (citada 30 de abril de 1998). Home page:

<http://www.ansci.cornil.edu/toxicagents/aflatoxin/image>.

Agrios G. 1994. *Mycotoxins. Fitopatología.* (citada 30 de abril de 1998). Home page:

<http://www.healthanswers.com/database/ami/converted/002429.html>

Andrews W. 1992. manual of Food Quality Control. Microbiological Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 4 (Rev 1): 221-36. Roma.

El Kadi I, El Maraghy S, Zohri AN. 1994. Mycotoxins producing potencial of some isolates of *A. Flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiol-Res.* Sep 149 (3):297-307.

Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH. 1991. Aflatoxins ind food: Ocurrance, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection, and Methods of Control. *Crit-Rev-Food-Sci-Nutr.* 30 (3): 413-39.

Jacobsen BJ, Bowen KL, Shelby RA, Diener UL. 1993. *Mycotoxin and Mycotoxicoses.* Extensión Veterinarian. Auburn University. Alabama. Pp. 3-10

Mycotoxins. Tech Fash. 1997. Countrymark Cooperative. Texas. (citada el 30 de abril de 1998)Home page:<http://www.maff.gov.uk/food/infsheet/1996/no78/78afla.htm>.

Pelczar M, Reid RD, Chane C. 1990. *Microbiología.* 4ta Edición. Mc. Graw Hill. México D.F. pp. 247-250.

Pitt J. 1996. An Introduction to *Penicillum* and *Aspergillus* Identification. CSIRO Division of Food Science and Technology. North Ryde. Pp. 2-5.

Pitt J, 1996. Major Genera of Foodborne Fungi. CSIRO División of Food Science and Technology. North Ryde pp. 4-7.

Reyes E. 1982. *Determinación de Aflotoxinas MI* en Productos Alimenticios de Origen Animal en Guatemala. XI Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica Colegio Farmacéutico del Perú. Lima. Pp. 326-332.

Ruan CC. 1991. The co-mutagenic effect of metabolic extracts of fungi grown on the main grain in high incidence liver cancer areas Fusui Country. *Chung-Hua-Yu-Fang-I-Hsueh_Tsa-Chih.* Sep 25 (85): 288

Shane SM. 1994. *Mycotoxicoses.* Shool of Veterinary Medicine. Louisiana State. University. Lousiana. pp. 2-6.

Whitlow LW, Hagler WM. 1994. *Micotoxinas.* Poultry Science Department. North Carolina State University North Carolina. Pp. 2-6.

Woloshuk CP, Foutz KR, Brewer JF, Bratnagar D, Cleveland T, Payne GA. 1994. Molecular characterization of aflR a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Jul 60(7): 2408-14.*

Woloshuk CP. 1997. *Mycotoxins and Mycotoxin Test Kits.* Corn Diseases. Department of Botany and Plant Pathology. Purdue University. West Lafayette. IN. 1997. pp. 2-4.