

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA**  
**“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**



DIVERSIDAD DE LAS ESPECIES DE *Aspergillus* SECCIÓN *Nigri*  
CONTAMINANTES DE “PÁPRIKA” (*Capsicum annum L.*) Y  
PRESENCIA DE OCRATOXINA A.

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADA EN BIOLOGIA

LAURA FIORELLA CADENILLAS SUELDO

LIMA-PERÚ

2017

## Agradecimientos

1. Gracias al proyecto Fincyt (159-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2014)
2. Agradecer a mi asesora, mentora y amiga, Dra Pavlich, por transmitirme esa energía única que la caracteriza, por demostrarme que es intentando lo imposible como se realiza lo posible, por enseñarme a amar a la ciencia pero principalmente a los hongos. Un mundo hermoso lleno de misterios ocultos que están dispuestos a ser descubiertos por jóvenes motivados gracias a los mejores mentores que podríamos tener.
3. A mi co asesora de tesis y amiga, la doctora María Laura Chiotta , gracias Pali por apoyarme constantemente en la revisión de mi tesis , por la paciencia , los buenos ánimos y la confianza depositada en mí.
4. Un agradecimiento muy especial a la doctora Sofia Chulze de la Universidad Nacional de Rio Cuarto(UNRC)-Argentina , quien me dio la oportunidad de ampliar mis conocimientos en el campo de la micotoxicología , permitiéndome avanzar parte de mi trabajo de investigación en el laboratorio de Micología de la UNRC.
5. Al doctor Jorge Benavides, director del proyecto de investigación:  
Con quien realicé toda la parte experimental, gracias por las enseñanzas, las orientaciones y por su amistad.
6. Gracias a mis compañeras Rosario y Bianca del laboratorio de control de calidad de la empresa los Sauces S.A.C, por haberme apoyado durante el proceso de evaluación de las muestras y por capacitarme en el manejo de los equipos (HPLC).
7. Gracias a mis amigos del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro –LID por el gran apoyo durante la realización de mi trabajo de investigación, por colaborar en la parte experimental y por la gran amistad que siempre me han brindado.
8. El más grande agradecimiento a mis dos guías y ejemplos de vida, mis papas. Gracias por la confianza, y por enseñarme el valor de la perseverancia y la responsabilidad.

**Asesor:**

Dra. Rebeca Magdalena Pavlich Herrera  
(Universidad Peruana Cayetano Heredia)

**Co asesor:**

Dra. María Laura Chiotta  
(Universidad Nacional de Rio Cuarto-Argentina)

**Jurado calificador:**

**Presidenta:**

Dra. Rosario Rojas Durán

**Secretario:**

M. Sc .Dora Maurtua Torres

**Vocal:**

M. Sc. Ana Colarossi Salinas

## RESUMEN

El pimiento (*Capsicum annuum L.*), también llamado “páprika”, es originario del continente americano específicamente de la zona de México, Bolivia y Perú. Concretamente en Perú, es uno de los cultivos más importantes para la economía nacional debido a su potencial de exportación. En los últimos años se ha observado un aumento de la contaminación con hongos toxicogénicos en paprika y productos derivados, la cual afecta su calidad y genera un riesgo toxicológico en los consumidores. Las especies de *Aspergillus* incluidas en la sección *Nigri* se aíslan frecuentemente en páprika y entre ellas *A. niger* y *A. carbonarius*, son las principales especies productoras de ocratoxina A (OTA). Esta toxina presenta propiedades nefrotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas e inmunotóxicas en ratas y posiblemente en humanos. Los objetivos del presente trabajo fueron: determinar la microbiota presente en muestras de páprika recolectadas en los departamentos de Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa; caracterizar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* mediante morfología clásica y el uso de herramientas moleculares; y determinar la incidencia natural de OTA en las muestras de páprika. Los resultados obtenidos mostraron que los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia fueron *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*. Con respecto a *Aspergillus* sección *Nigri*, todas las especies pertenecieron al agregado *A. niger* y se aislaron con mayor frecuencia en las localidades de Arequipa e Ica. En estas localidades se detectaron los valores más altos de OTA en páprika siendo estos 33.2 ppb y 33.6 ppb, respectivamente.

**Palabras claves:** *Capsicum annuum*, *Aspergillus* sección *Nigri*, Ocratoxina A.

## ABSTRACT

*Capsicum annuum* L., also called "paprika", is originally from the American continent specifically from the area of Peru, Mexico, and Bolivia. In Peru, it is one of the most important crops for the national economy due to its export potential. In recent years there has been an increase in contamination with toxicogenic fungi in paprika and derived products, which affects their quality and generates a toxicological risk to consumers. The species of *Aspergillus* included in the section *Nigri* are frequently isolated in paprika and among them, *A. niger* and *A. carbonarius* are the main ochratoxin A (OTA) producing species. This toxin exhibits nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic and immunotoxic properties in rats and possibly in humans. The objectives of the present work were: to determine the mycobiota present in samples of paprika collected in the regions of Lambayeque, Lima, Ica and Arequipa; to characterize the species of *Aspergillus* section *Nigri* by classical morphology and the use of molecular tools; and to determine the natural incidence of OTA in paprika samples. The results showed that the most frequently isolated fungal genera were *Aspergillus* sp and *Penicillium* sp. According to *Aspergillus* section *Nigri*, all species belonged to the aggregate *A. niger* and were most frequently isolated in the localities of Arequipa and Ica. In these localities the highest values of OTA (33.2 ppb and 33.6 ppb, respectively) were detected.

**Key words:** *Capsicum annuum*, *Aspergillus* section *Nigri*, Ochratoxin A.

# CONTENIDO

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
	2.1. <i>Capsicum annum</i> “páprika” .....	3
	2.2. Producción de Páprika en el Perú .....	5
	2.2.1. Proceso de producción de páprika .....	6
	2.3. El género <i>Aspergillus</i> .....	7
	2.3.1. <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .....	8
	2.3.1.1. Especies biseriadas.....	10
	2.3.1.1.1. <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	10
	2.3.1.1.2. <i>Aspergillus</i> “agregado” <i>niger</i> .....	11
	2.3.1.2. Especies uniseriadas: <i>A. japonicus</i> / <i>A. aculeatus</i> .....	12
	2.3.2. Criterios moleculares complementarios.....	13
	2.4. Ocratoxina .....	14
	2.4.1. Toxicidad .....	16
	2.5. Producción de ocratoxina A por especies fúngicas .....	18
	2.6. Presencia de ocratoxina A en alimentos y factores influyentes.....	20
	2.7. Análisis de ocratoxina A .....	20
<b>III.</b>	<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	23
	3.1. Hipótesis .....	23
	3.2. Objetivos generales.....	23
	3.3. Objetivos específicos .....	23
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
	4.1. Ubicación del área de estudio .....	24
	4.2. Muestreo .....	25

4.3. Análisis de microbiota y de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> en páprika	27
4.3.1 Recuento y aislamiento de la microfiora contaminante	.....28
4.3.2 Identificación taxonómica de las especies pertenecientes a <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .	.....28
4.4. Identificación de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> mediante métodos moleculares basados en PCR	.....29
4.4.1. Cepas	.....29
4.4.2. Producción de la biomasa fúngica	.....29
4.4.3. Extracción y purificación del ADN genómico	.....30
4.4.4. Evaluación de integridad del DNA	.....31
4.4.5. Reacciones de PCR	.....32
4.5. Incidencia natural de ocratoxina A en las muestras de páprika	32
4.5.1. Detección y cuantificación	.....33
<b>V. RESULTADOS</b>	.....36
5.1. Distribución de la microfiora en las diferentes regiones de cultivos de páprika	.....36
5.2. Identificación morfológica de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> aisladas de páprika	.....37
5.3 Identificación de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> mediante primers específicos amplificados por PCR	.....39
5.4 Incidencia natural de ocratoxina A en muestras de páprika	.....40
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	.....42
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	.....46
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b>	.....47

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción morfológica de la planta de *Capsicum annuum*, L.....3

Figura 2. *Composición nutricional de la páprika por cada 100 gramos de porción* .4

Figura 3. Estructura química de la ocratoxina A.....15

Figura 4. Estructura química de la ocratoxina B.....16

Figura 5. Departamentos productores de páprika evaluados en el presente estudio<sup>45</sup> .....24

Figura 6. Estrategia de muestreo sugerida por la Comisión Reguladora de la Unión Europea <sup>46</sup> .....26

Figura 7. Muestras representativas de páprika colectadas en las 4 regiones de estudio. A) Muestra seca M1-1 proveniente de Ica, B) Muestra fresca M4-1 proveniente de Lambayeque, C) Muestra seca M3-4 proveniente de Arequipa, D) Muestra fresca M2-4 proveniente de Lima .....27

Figura 8. Curva de calibración de los estándares OTA: 1, 5, 10, 15, 25 ppb .....35

Figura 9. Características macroscópicas del *agregado A. niger* a los 7 días de incubación. A) Colonia desarrollada en agar extracto de malta (AEM) a 25C , B) Reverso de la colonia en AEM a 25C, C) Colonia desarrollada en agar Czapek extracto de levadura (CYA) a 37C, D) Reverso de la colonia en CYA a 37C.....38

Figura 10. Características microscópicas del *agregado Aspergillus niger* observadas en AEM a los 7 días de incubación, A) Cabeza conidial y conidióforo, B) Conidios, C) Métulas y fiálides .....38

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR. Marcador de peso molecular DNA ladder 1KB Características de los hongos evaluados en anexo 4. ....40

Figura 12. Cromatogramas de ocratoxina A de 2 muestras de páprika. A) Muestra M3-8 proveniente de Arequipa (33.2 ppb). B) Muestra M1-10 proveniente de Ica (33.6 ppb) .....41

### ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Principales destinos de exportación de páprika peruana en los años 2015 y 2016 .....6

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas de las diferentes especies pertenecientes al grupo *Aspergillus* sección *Nigri* .....10

Tabla 2. Especies del género *Aspergillus* sugeridas como productoras de OTA...19

Tabla 3. Descripción de las condiciones climáticas en los departamentos de Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa-Perú .....25

Tabla 4. Puntos de muestreo en los departamentos de estudio .....25

Tabla 5. reas obtenidas en los estándares de OTA.....34

Tabla 6. Presencia de la micobiota contaminante en las muestras de páprika (seca y fresca) en los 4 departamentos evaluados. ....36

Tabla 7. Concentración de ocratoxina A (OTA) expresada en PPB en las muestras de páprika evaluadas y hongos posibles productores de OTA aislados en cada muestra expresado en UFC/g. ....42

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Relación de muestras colectas en los departamentos de La Libertad, Lima, Ica y Arequipa-Perú.....	56
Anexo 2. Medios de cultivo .....	58
Anexo 3. Características macroscópicas y microscópicas del <i>Aspergillus sección Nigri</i> .....	60
Anexo 4. Descripción macroscópica y microscópica de los <i>Aspergillus sección Nigri</i> en las 4 regiones evaluadas. ....	63
Anexo 5. Condiciones para PCR.....	68
Anexo 6. Preparación de soluciones para HPLC .....	69
Anexo 7. Cromatogramas de los estándares de Ocratoxina A (OTA) a diferentes concentraciones .....	70

## I. INTRODUCCIÓN

La páprika (*Capsicum annuum*) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas, crece en forma de arbustos y el fruto obtenido es una baya cartilaginosa inicialmente verde y conforme madura se vuelve roja. La misma presenta un alto valor nutricional, conteniendo grandes cantidades de vitamina C y flavonoides, además de ser de gran utilidad en la industria como colorante natural para alimentos y cosméticos<sup>1,2</sup>. En los últimos años, el Perú se ha posicionado como uno de los países líderes en la producción y exportación de “páprika”. Su productividad media por hectárea alcanza las 5.4 toneladas siendo las zonas principales de producción los departamentos de Lima, Arequipa, Lambayeque e Ica<sup>1</sup>. No obstante, también se ha reportado un gran desarrollo y diseminación de hongos en la páprika a causa de factores tales como los altos niveles de humedad, variaciones estacionales de clima, daño mecánico producido sobre el fruto, malas condiciones de colecta, tiempos extensos de secados, malas condiciones fitosanitarias e inadecuado transporte del producto<sup>3</sup>.

Entre las especies fúngicas que se aislan con frecuencia en la páprika se encuentran las pertenecientes al *Aspergillus* sección *Nigri*, entre ellas están *Aspergillus japonicus*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus* y las especies de *A. niger* y *A. tubigenis* incluidas en el “agregado” *A. niger*<sup>4</sup>. Estas especies causan el deterioro del producto y a la vez producen micotoxinas<sup>4,5</sup>.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos cuya ingest n, inhalación o absorpci n cutánea causa efectos negativos en los hombres y animales<sup>6</sup>. La presencia de hongos y micotoxinas en alimentos, además de los problemas asociados con la salud, conllevan a

grandes pérdidas económicas causando un gran impacto a nivel comercial, principalmente a nivel internacional. Las especies del *Aspergillus* sección *Nigri* son consideradas como uno de los principales contaminantes en diversos productos alimenticios, principalmente en la páprika, ya que diversas especies incluidas en dicha sección se han señalado como productoras de ocratoxinas<sup>7</sup>. Las ocratoxinas constituyen, luego de las aflatoxinas, el primer grupo mayoritario de micotoxinas que contaminan tanto materias primas como alimentos elaborados<sup>8</sup>. En dicho grupo se encuentra la ocratoxina A (OTA), la cual presenta propiedades nefrotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas e inmunotxicas<sup>9</sup>. El Comité Científico sobre alimentos de la Comunidad Europea ha propuesto diversas regulaciones específicas para OTA presentes en diferentes productos destinados al consumo humano y animal, estableciendo como límite máximo permisible una concentración de 15 ppb de OTA en la páprika<sup>55</sup>.

Por todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo se busca aislar e identificar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, presentes en los cultivos de páprika provenientes de los departamentos de Ica, Arequipa, Lima y Lambayeque, aplicando una adecuada caracterización taxonómica y molecular. Asimismo, se tiene como objetivo determinar los niveles de contaminación de las muestras de páprika con OTA mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Capsicum annum*, L “Páprika”

El *Capsicum annum* L. var. *longum* o también conocido como “páprika” o “pimentón”, es una planta herbácea, perteneciente al género *Capsicum* de la familia *Solanaceae*. Planta de tamaño diverso, oscilando entre los 0,5 metros en caso de variedades cultivadas al aire libre; y más de 2 metros, en caso de los híbridos cultivados en invernaderos <sup>1</sup>.



Figura 1. Descripción morfológica de la planta de *Capsicum annum*, L <sup>1</sup>

América es considerado como el continente centro del origen de Ají paprika siendo este originario de México, Bolivia y Perú. En 1643, esta hortaliza fue cultivada en España para luego ser extendida por otros países de Europa, Asia y África. Hungría es uno de los principales países que más ha desarrollado el cultivo de la páprika desde su aparición a mediados del siglo XVI <sup>2</sup>.

A lo largo del tiempo ha sido un producto de alto consumo a nivel mundial debido a sus propiedades nutricionales (Figura 2). El principal componente de la páprika es el agua, seguido de los hidratos de carbono, lo que lo vuelve una hortaliza de bajo aporte calórico. Además, presenta un contenido bajo de proteínas y de grasas. La páprika roja contiene valores altos de vitamina C y son una buena fuente de carotenos, entre ellos está la capsantina, pigmento con propiedades antioxidantes, que aporta la coloración roja al fruto. Entre los minerales, presentan potasio y en menor proporción magnesio, fósforo y calcio <sup>2</sup>.

Energía (Kcal)	19,3
Agua (g)	92
Proteínas (g)	0,9
Hidratos carbono (g)	3,7
Fibra (g)	1,4
Potasio (mg)	210
Fósforo (mg)	25
Magnesio (mg)	13,5
Folatos (mcg)	25
Vitamina C (mg)	131
Vitamina A (mcg de Eq. de retinol)	67,5
Vitamina E (mg)	0,8

mcg = microgramos (millonésima parte de un gramo)

Figura 2. Composición nutricional de la páprika por cada 100 gramos de porción <sup>2</sup>.

Así mismo constituye uno de los colorantes naturales alimenticios más empleados para el consumo humano, ya sea en la preparación de comidas como sazonador, elaboración de embutidos, mermeladas y alimentos balanceados. De igual forma, utilizado en la producción de cosméticos, industria farmacéutica y textil <sup>3</sup>.

## **2.2. Producción de páprika en el Perú**

La producción de Páprika en Perú se extiende desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.n.m que alcanzan las quebradas y/o valles interandinos, sin embargo, las condiciones óptimas se encuentran por debajo de los 1000 m.s.n.m. Entre los principales departamentos del Perú productores de páprika se encuentra Arequipa (Provincia de Majes), Lima (Provincia de Barranca, Supe, Huaura y Cañete), Ica (Provincia de Chincha, Ica y Pisco), Ancash, Piura, Lambayeque, La Libertad y Tacna. Durante los últimos 5 años se ha tenido un crecimiento promedio estable de 1% influenciado por la exportación de páprika fresca y en conservas, logrando en el 2015 exportar el 58% de las exportaciones totales de productos de origen agrícola. En el año 2016, la producción nacional de páprika alcanzó 128,878 toneladas siendo considerado como uno de los mejores años en la exportación de páprika ya que el sector creció en 13% en cuanto a cantidad y en el transporte internacional realizado por barco (FOB) subió a 19%<sup>1</sup>.

La páprika constituye el tercer producto de agroexportación más importante del país, después del café y el espárrago<sup>3</sup>. La páprika cosechada destinada a la exportación es comercializada como páprika entera seca, pulverizada y en rodajas, siendo la primera exportada en mayor proporción. Los principales mercados de destino en el mundo

son: Estados Unidos (51%), España (20%), México (11%) y en menor proporción Alemania (4%) y Puerto Rico (2%)<sup>3</sup> (Gráfico 1).

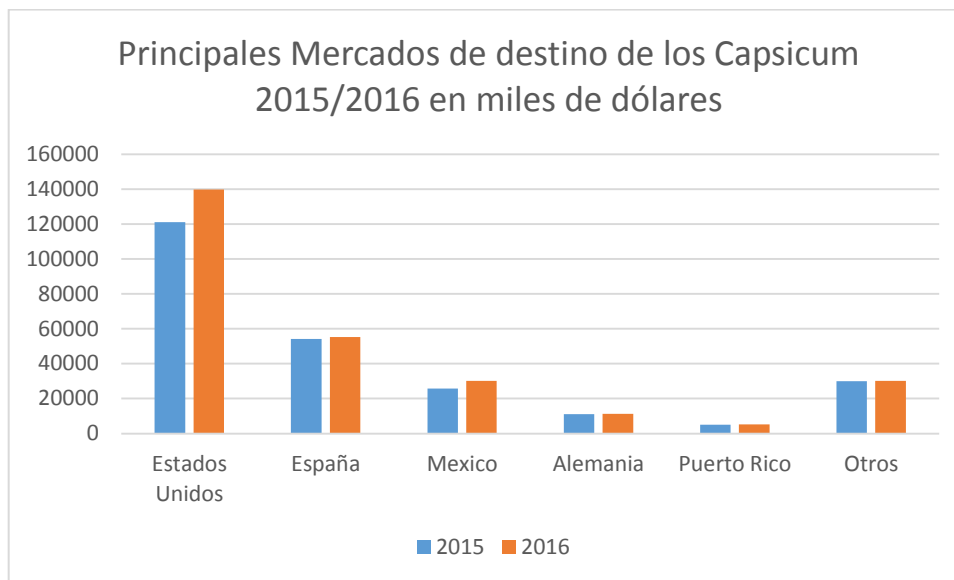


Gráfico 1. Principales destinos de exportación de páprika peruana en los años 2015 y 2016<sup>3</sup>.

### 2.2.1. Proceso de producción de páprika

El proceso de producción de la páprika consiste en la selección de semillas de la mejor calidad y la siembra en almgicos para luego ser trasladadas a campos de cultivo previamente acondicionados. La colecta del fruto se realiza manualmente y son seleccionados según su tamaño y forma del fruto, aquellas que presentan algún contaminante o daño mecánico son descartadas. Una vez cosechados son generalmente lavados con agua clorada para eliminar rastros de suciedad y residuos. El proceso de deshidratación de la páprika se puede realizar mediante secado en sol o secado en tablas de madera colocadas en estufas de temperatura controlada. El secado al sol es un proceso lento el cual depende de los factores climatológicos, el cual

puede favorecer el crecimiento de microorganismos contaminantes como los hongos.

Mientras que, el secado en estufas es un proceso más rápido, que disminuye la probabilidad de aparición de microorganismos. Las condiciones de almacenamiento que involucren temperatura y humedad durante el proceso de transporte deben ser controladas, ya que constituyen otro punto crítico para mantener la inocuidad del fruto. Una vez obtenida la páprika seca, se le debe retirar el pedúnculo y parte de las semillas, previo a la molienda. Con la finalidad de obtener un tamano de partícula adecuado, los frutos deshidratados son sometidos a un proceso de molturación, donde se procede a molerlo varias veces hasta conseguir el tamano de partícula deseado. Finalmente es llevado a un proceso de esterilización mediante vapor <sup>3</sup>.

La contaminación de estos productos alimenticios por especies del género *Aspergillus* presentan un amplio impacto económico y social dado que dichas especies se desarrollan en diferentes hábitats y son conocidos por producir deterioro en estos alimentos, además de micotoxinas, las cuales han mostrado tener efectos tóxicos en humanos y animales <sup>4</sup>.

### **2.3. El género *Aspergillus***

Tradicionalmente, el género *Aspergillus* se incluía dentro de los *Deuteromycetes* (suborden *Deuteromycotina*) u “hongos imperfectos”, porque no se conocía la forma sexual o teleomrfica de sus especies. Actualmente, se incluye dentro del Phylum *Ascomycota*, orden *Eurotiales*, familia *Trichocomaceae*, aproximadamente un tercio de las especies descritas poseen forma sexual conocida y se agrupan principalmente dentro de los géneros *Eurotium* y *Emericella* <sup>5</sup>.

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en el año 1729 por Micheli, pero la primera monografía publicada fue realizada por Raper y Fennell (1965) y describía 150 especies, clasificadas en 18 grupos. La identificación de las diferentes especies se basaba en la descripción de las características macroscópicas y microscópicas, tales como pigmentación, forma y textura de las colonias, pigmentos solubles, grado de esporulación, presencia de exudados, forma y tamaño de las esporas, color, dimensión forma y textura de los estípites y vesículas, morfología de los conidióforos, métulas y fiálides, así como la presencia o ausencia de células de Hulle.

Posteriormente, Gams et al.<sup>5</sup> revisaron el trabajo inicial realizado por Raper y Fennell y adaptaron las especies descritas al Código Internacional de Nomenclatura Botánica, reclasificando el género e incluyendo la sección *Nigri* dentro del subgénero *Circumdati*. El número de especies de *Aspergillus* reconocidas se ha ido modificando en base a la construcción de filogenias utilizando marcadores bioquímicos y moleculares, y a la aplicación del concepto filogenético de especie<sup>6</sup>. Recientemente, se han descrito más de 40 taxones nuevos dentro del género y se incluyen aproximadamente 250 especies<sup>7,8</sup>.

### **2.3.1. *Aspergillus* sección *Nigri***

La clasificación de las especies incluidas en *Aspergillus* sección *Nigri* se basaba principalmente en las características morfológicas, y el carácter unificador de los miembros de esta sección, era el color oscuro de sus conidios. En 1934, Mosseray, describió 35 especies de *Aspergillus* negros. Posteriormente, Thom y Raper subdividieron este grupo en 3 series en base a los criterios morfológicos, proponiendo 15 especies. En 1965, Raper y Fennell redujeron a 12 el número de especies y 2 variedades

denominándolo grupo *Aspergillus niger*. El criterio de esta clasificación fue básicamente al tamaño y coloración de las colonias, presencia o ausencia de métulas y la forma de los conidios.

Sin embargo, en 1980, Musallam realizó nuevos aportes a la taxonomía de las especies de este grupo reclasificando el género *Aspergillus* mediante descripciones morfológicas y creando la sección *Nigri*. Además, evaluando la taxonomía del grupo *A. niger*, reconoció 5 especies: *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus* y el agregado *niger* (*A. foetidus* y *A. niger*)<sup>9,10</sup>.

Kozakiewicz, logró observar que la maduración de las conidias de las especies de la sección *Nigri* era lenta. Por tal razón, basándose en la ornamentación de los conidios y haciendo uso de técnicas de microscopia electrónica de barrido (SEM) propuso la división de los *Aspergillus* negros en 10 especies y 8 variedades. Samson *et al.*<sup>8</sup>, describieron 4 nuevas especies dentro de la sección *Nigri*, considerando en total 15 taxones, siendo *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. hoomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. tubigensis* y *A. vadensis*. Esta diferenciación entre especies fue realizada mediante determinadas características morfológicas, análisis de los perfiles de 8 metabolitos secundarios y el secuenciamiento del gen de  $\beta$ -tubulina. Sin embargo, afirmaron que se requería un análisis multigenético para poder comprender la complejidad de ciertos taxones, como es el caso del agregado *niger*.

En el 2007, durante un estudio de relaciones genéticas y de evaluaciones morfológicas entre los *Aspergillus* negros colectados en todo el mundo, Samson *et al.*<sup>8</sup> definieron un total de 19 especies que conforman a los *Aspergillus* sección *Nigri* (Tabla 1).

Tabla 1. Características morfológicas de las diferentes especies pertenecientes al grupo *Aspergillus* sección *Nigri*<sup>11</sup>

Especies	Tamaño de conidias	Tamaño de vesículas	Color y tamaño del esclerocio
Uniseriadas			
<i>A. aculeatinus</i>	2.5-4.5	45-80	Blanco a crema, 0.4-0.6
<i>A. aculeatus</i>	3.5-5	60-80	Crema, más de 0.5
<i>A. japonicus</i>	3.5-5	20-35	Blanco a crema, más de 0.5
<i>A. uvarum</i>	3—4	20-30	Marrón oscuro a negro, 0.5-0.8
Biseriadas			
<i>A. brasiliensis</i>	3.5-4.5	30-45	Blanco, 1-1.5
<i>A. carbonarius</i>	7-9	40-80	Rosado -amarillo, 1.2-1.8
<i>A. costaricensis</i>	3.1-4.5	40-90	Rosado a amarillo grisáceo, 1.2-1.8
<i>A. ellipticus</i>	3.3-5.5	75-100	Amarillo oscuro a marrón, 0.5-1.5
<i>A. foetidus</i>	3.5-4.5	50-80	Blanco, 1.2-1.8
<i>A. heteromorphus</i>	3.5-5	15-30	Blanco, 0.3-0.6
<i>A. homomorphus</i>	5-7	50-65	-----
<i>A. ibericus</i>	5-7	50-60	-----
<i>A. lacticoffeatus</i>	3.4-4.1	40-65	-----
<i>A. niger</i>	3.5-5	45-80	-----
<i>A. piperis</i>	2.8-3.6	40-55	Amarillo a rosado, 0.5-0.8
<i>A. scleroticarbonarius</i>	4.8-9.5	45-90	Amarillo a naranja a rojo oscuro
<i>A. sclerotioniger</i>	4.5-6.4	30-50	Amarillo a naranja a rojo oscuro
<i>A. tubingensis</i>	3-5	40-80	Blanco a rosado, 0.5-0.8
<i>A. vadensis.</i>	3-4	25-35	-----

### 2.3.1.1. Especies biseriadas

#### 2.3.1.1.1. *Aspergillus carbonarius*

Dentro de la sección *Nigri*, *Aspergillus carbonarius* es quizás la especie más distinta de todas. Morfológicamente, es claramente

diferenciable debido al gran tamaño de sus conidios cuyo diámetro varía entre 7-9  $\mu\text{m}$  y una ornamentación rugosa o equinulada<sup>9</sup>.

Actualmente se han desarrollado técnicas moleculares como RFLP del rDNA y mtDNA, RAPD e ITS para su identificación y diferenciación del resto de especies. Parenicova *et al.*<sup>12</sup>, lograron diferenciar *A. carbonarius* del resto de especies de su sección haciendo el secuenciamiento de los ITS, encontrando que existían diferencias entre 18 y 51 pares de bases en las secuencias de *A. carbonarius* frente a las otras especies estudiadas.

La identificación del *Aspergillus carbonarius* es de gran importancia debido a los diversos reportes que indican su alta capacidad de producción de Ocratoxina A (OTA).

### **2.3.1.1.2. “agregado” *Aspergillus niger***

En un comienzo solo 2 especies integraban el *agregado A. niger* (*A. niger* y *A. foetidus*), los cuales se diferenciaban debido al tamaño de las colonias y a la vez *A. niger* presentaba 6 variedades, diferenciables en base a la morfología de sus conidios<sup>13</sup>.

Entre las características morfológicas que caracterizan a las especies incluidas en el *agregado A. niger* se encuentran la coloración negruzca de sus colonias, la forma globosa y ligeramente espiculada de los conidios, de tamaño inferior a 6  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, dada la complejidad de poder realizar una diferenciación morfológica entre las diversas especies y

variedades del *agregado A. niger* se han realizado determinados estudios moleculares para aclarar su clasificación<sup>11</sup>.

En 1997, Parenicova *et al.*<sup>12</sup>, describió un nuevo patrón de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del rDNA obtenido de cepas de la variedad de *A. foetidus*. En dicho estudio se sugirió la división del agregado en 3 especies, las cuales son morfológicamente iguales, siendo: *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. foetidus*. Posteriormente, los mismos autores, sugirieron la división del agregado en 4 especies: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis*.

Así mismo, se vienen realizando análisis de polimorfismo de ADN nuclear y de ADN mitocondrial (mtDNA) así como técnicas de PCR que permiten el reconocimiento y diferenciación de estas especies. Los análisis de taxonomía polifásica están siendo usados para la determinar la delimitación y la variabilidad de nuevas especies<sup>13</sup> y para evaluar las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *A. niger* usando secuencias parciales de los genes de  $\beta$ -tubulina y Calmodulina<sup>14</sup>. Actualmente, dentro del *agregado A. niger* se han determinado un total de 10 especies biseriadas, subdivididos en 3 clados basados en el secuenciamiento de los genes de B-tubulina y Calmodulina: *A. brasiliensis*<sup>6</sup> *A. niger* (*A. niger* y *A. awamori*)<sup>15</sup> y *A. tubingensis* (*A. tubingensis*, *A. vadensis*, *A. piperis*, *A. acidus*, *A. costaricaensis*, *A. neoniger*, *A. eucalipicola*).

### **2.3.1.2. Especies Uniseriadas : *A. japonicus* / *A. aculeatus***

En un inicio *Aspergillus japonicus* y *A. aculeatus* fueron considerados como dos especies diferentes<sup>16</sup>, mientras que otros autores

asignaron 2 variedades a *A. japonicus*: *A. japonicus var aculeatus* y *A. japonicus var japonicus* <sup>17</sup>.

Ambas especies no pueden ser identificadas mediante la evaluación de sus características morfológicas, por esta razón, Parenicova *et al.*<sup>18</sup> realizaron diversos análisis mediante técnicas moleculares que permitieron diferenciar los 2 taxones mediante RFLP usando enzimas de restricción y encontraron un alto grado de polimorfismo del ADN mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>), el cual fue correlacionado con amplificaciones de patrones polimórficos de ADN.

Actualmente, se han reportado nuevas especies uniseriadas dentro de la sección *Nigri*, entre ellas están: *Aspergillus violceofuscus*, *A. indolagenus*, *A. uvarum* y *A. fijensis* <sup>15,19</sup>.

### **2.3.2. Criterios moleculares complementarios**

Los métodos de diagnóstico tradicional usados en la micología, basados en las características macroscópicas y microscópicas han sido de gran utilidad y aplicabilidad para poder diferenciar determinadas especies. Sin embargo, estos métodos presentan un bajo grado de sensibilidad siendo difíciles para estandarizar. Así mismo, el desarrollo de las estructuras fúngicas requieren entre 2 a 10 días de cultivo en diferentes medios <sup>20</sup>. Por ello, se han desarrollado determinadas herramientas moleculares como una nueva alternativa de clasificación taxonómica.

La aplicación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con el secuenciamiento del ADN ha permitido resolver diversas interrogantes relacionadas a la taxonomía y morfología de especies fúngicas, ello debido a su alta especificidad y sensibilidad.

Además, las técnicas de caracterización de especies de *Aspergillus* y *Penicillium* a nivel intra e interespecífico está relacionado a los análisis de secuencias de determinadas regiones de ADN (ITS-1/ITS-2;  $\beta$ -tubulina, calmodulina y factores de elongación). Por ejemplo las regiones ITS de las unidades de rADN están presentes entre las 100 a 300 copias por genoma haploide y son consideradas como regiones de alta variabilidad, lo cual provee la particularidad de diferenciar entre especies altamente relacionadas o a nivel intraespecífico <sup>20</sup>.

Existen también variantes de la técnica de PCR, las cuales permiten determinar en tiempo real la cantidad inicial de ADN, esta técnica es llamada real time PCR (RT-PCR).

## 2.4. Ocratoxina

Las ocratoxinas son metabolitos secundarios (micotoxinas) producidas por determinadas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Constituyendo las ocratoxinas, después de las aflatoxinas, uno de los grupos principales causantes de la contaminación de materias primas y alimentos. Dentro de este grupo, se han descrito 5 tipos de ocratoxinas: A, B, C,  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo la ocratoxina A la más tóxica <sup>21</sup>.

La ocratoxina A (OTA), es una molécula formada por un anillo 3,4-dihidro metil isocumarina, la cual está unida por medio de un grupo carboxilo y a través de un enlace tipo amida, a una molécula de fenilalanina. Además, presenta la particularidad de contener un átomo de cloro (Figura 3).

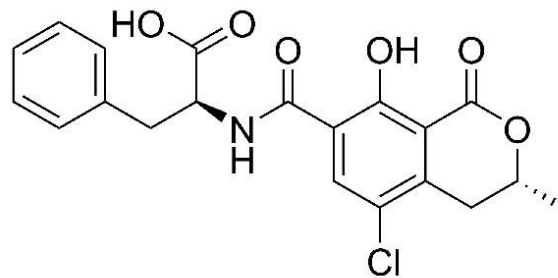


Figura 3: Estructura química de la ocratoxina A

La OTA es un compuesto cristalino e incoloro con características de ácido orgánico débil, el cual es moderadamente soluble en la mayoría de solventes orgánicos como lo alcoholes, cetonas, bencenos y cloroformo, no es muy soluble en agua e insoluble en éteres de petróleo y en los hidrocarburos saturados. Esta molécula, presenta la particularidad de poder ser detectada mediante fluorescencia al ser excitado con la luz UV <sup>22</sup>. Debido a su estructura química, es inestable a la luz, especialmente en condiciones húmedas, sin embargo, es estable en la oscuridad, resistiendo el almacenamiento, generalmente en los procesos habituales de tratamiento de alimentos (cocción, lavado, deshidratación, etc.) dado que para degradarla y reducir su concentración requiere ser sometida a 250°C durante varios minutos<sup>23</sup>.

La ocratoxina A como contaminante en los alimentos también presenta una molécula análoga no clorada, la ocratoxina B (Figura 4). Se ha demostrado que esta molécula puede coexistir en algunos materiales sometidos a pruebas de toxicidad en estudios con animales. Sin embargo, sus concentraciones son muy bajas y son menos tóxicas que la ocratoxina A <sup>23</sup>. La ocratoxina C, es el éster de la OTA, de toxicidad prácticamente nula <sup>24</sup>.

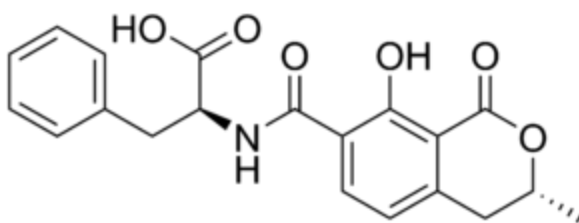


Figura 4: Estructura química de la ocratoxina B

Las ocratoxinas  $\alpha$  y  $\beta$ , son producidas por hidrólisis ácidas durante reacciones metabólicas, en las cuales se pierde la molécula de L-fenilalanina, desapareciendo la toxicidad <sup>25</sup>.

#### 2.4.1. Toxicidad

La OTA se encuentra altamente distribuida como agente contaminante de diversos productos alimenticios, siendo comúnmente encontrada en frutas secas, cereales, café, vinos, carnes y especias. Recientemente, la incidencia de esta toxina en alimentos como el café y las especias ha generado la necesidad de evaluarla debido a que los procesos de manufactura incluyen largos y elaborados periodos de secado, los cuales permiten el desarrollo y propagación de hongos y por tanto la generación de toxinas <sup>26</sup>.

El consumo de alimentos contaminados con ocratoxina A representa un factor de alto riesgo debido a sus propiedades fisicoquímicas que le permiten ser absorbida fácilmente en el tracto gastrointestinal y es eliminada lentamente <sup>27</sup>. De igual manera, presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, actuando sobre la etapa post-transcripcional, afectando la síntesis proteica por inhibición competitiva de la fenilalanina-tRNA sintetasa y secundariamente la

síntesis de RNA y DNA <sup>28,29</sup>. A la vez tiene la propiedad de perdurar en el organismo.

En el caso de los mamíferos, esta toxina es acumulada en diferentes tejidos, siendo su concentración en mayor proporción en el suero, seguido por riñones, hígado, tejidos muscular y graso.

Tanto la comunidad científica y los comités de alimentos, han tenido gran interés por investigar a esta molécula debido a que son nefrotóxicas, teratogénicas, genotóxicas, inmunosupresoras y presentan propiedades carcinogénicas <sup>28</sup>.

Entre los síntomas agudos que produce esta toxina se encuentran: hemorragias multifocales en el cerebro, bazo, riñón, hígado y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática.

Particularmente, su órgano diana es el riñón y el sistema nervioso <sup>25</sup> produciendo lesiones agudas y crónicas. El grado de lesión depende de la dosis y del tiempo de exposición de la toxina en el organismo. Estudios realizados en ratas para evaluar los efectos de OTA sobre la función y morfología renal indicaron que se produce un incremento relativo del peso del riñón, volumen de la orina, concentración de nitrógeno ureico en la sangre, incremento de la glucosa, proteinuria y trastornos del transporte urinario de sustancias orgánicas <sup>30</sup>.

También presenta efectos hemorrágicos similares al generado por la carencia de vitamina K, generando la acumulación de glucógeno en el hígado. De igual forma, presenta efectos sobre la producción de ATP mitocondrial y en la inhibición de la síntesis de proteínas <sup>31</sup>.

En base a sus propiedades carcinogénicas, experimentos realizados en ratas y ratones, han demostrado que pueden generar cáncer hepático y renal. Por ello ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer como posible carcinógeno humano clase 2B <sup>32</sup>.

## 2.5. Producción de ocratoxina A por especies fúngicas

Las ocratoxinas, después de las aflatoxinas, son el segundo grupo de micotoxinas más estudiadas, cuyo descubrimiento ocurrió en el año 1965 por Van der Merwe quien realizó un cultivo de *Aspergillus ochraceus* <sup>33</sup> para luego ser descrita en 1974 al ser aislada en granos de café.

Posteriormente, se demostró la producción de esta toxina por otras especies pertenecientes a la sección *Circumdati*, cuyo principal productor de OTA es *Aspergillus ochraceus*, cuyo porcentaje de producción varía del 100% a valores menores al 10%<sup>21</sup>. Sin embargo, otras especies del mismo grupo también son productores como: *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. persii*, *A. wetterdijkiae*, *A. steynii* y *A. sclerotiorum*. Dentro de los *Aspergillus* sección *Nigri* las especies *Aspergillus niger* y *A. carbonarius* son consideradas como las más importantes con respecto a la producción de OTA <sup>34</sup>.

No obstante, se ha reportado que 2 especies pertenecientes al género *Penicillium* también son productoras de OTA (*P. verrucosum* y *P. nordicum* <sup>35</sup>) (Tabla 2).

Tabla 2: Especies del género *Aspergillus* sugeridas como productoras de OTA<sup>20, 26, 31,34</sup>.

<b>Especie</b>	<b>Especie</b>	<b>Especie</b>
<b>A. sección <i>Aspergillus</i></b>	<b>A. sección <i>Fumigati</i></b>	<b>A. sección <i>Versicolores</i></b>
<i>Eurotidium amstelodami</i> <i>E. herbariorum</i> <i>A. glaucus</i>	<i>A. fumigatus</i> * <i>A. viridimutans</i>	<i>A. versicolor</i> <i>A. sydowii</i>
<b>A. sección <i>Circumdati</i></b>	<b>A. sección <i>Nigri</i></b>	<b>A. sección <i>Wentii</i></b>
<i>A. persii</i> * <i>A. melleus</i> * <i>A. ochraceus</i> <i>A. insulicola</i> <i>A. petrakii</i> * <i>A. pseudoelegans</i> <i>A. reseoglobulosus</i> <i>A. sclerotiorum</i> <i>A. steynii</i> <i>A. elegans</i> <i>A. westerdijkiae</i> <i>A. cretensis</i>	<i>A. carbonarius</i> <i>A. tubingensis</i> * <i>A. japonicus</i> * <i>A. aculeatus</i> * <i>A. lacticoffeatus</i> <i>A. niger</i>	<i>A. wentii</i>
	<b>A. sección <i>Terrei</i></b>	
	<i>A. terreus</i>	
	<b>A. sección <i>ustii</i></b>	
	<i>A. ustus</i>	

\*Referencias que indican la baja o nula probabilidad de producción de OTA

En relación a la capacidad ocratoxicogénica de los hongos pertenecientes a la sección *Nigri*, diversos autores han sugerido que *Aspergillus niger* representa ser un riesgo para la salud humana y animal, ya que esta especie es de una amplia distribución, además de ser de gran uso en la industria alimentaria.

Por otro lado, si bien *A. carbonarius* presenta una menor distribución que *A. niger*, la mayoría de las cepas son productoras de OTA. Se ha reportado que el porcentaje de producción de ocratoxina A por las cepas del agregado *A. niger* varía del 0.6% al 50%, mientras que el 100% de las cepas de *A. carbonarius* pueden llegar a ser productoras<sup>37</sup>.

## **2.6. Presencia de la ocratoxina A en alimentos y factores influyentes**

La ocratoxina A presenta una distribución mundial, debido a que los hongos son componentes normales de la microflora de los alimentos. Sin embargo, el desarrollo y proliferación de hongos contaminantes productores de micotoxinas puede ocurrir durante el cultivo, cosecha, almacenamiento y comercialización de los alimentos, asociado también a las condiciones ambientales <sup>38</sup>.

Dentro de los alimentos con más riesgo de contaminación, se encuentran las leguminosas, cereales y derivados <sup>39</sup>, así como los productos de origen animal como aves y cerdos debido a la ingestión de la toxina y posterior almacenamiento en el cuerpo. También se ha reportado la presencia de OTA en otros tipos de alimentos como el vino, café, cacao, quesos y cervezas <sup>27, 29, 34,40, 41</sup>.

La presencia de hongos ocratoxicogénicos también ha sido reportada en especias, principalmente en la paprika roja. Ello debido a factores abioticos (como la temperatura y el porcentaje de humedad) <sup>38</sup> asociados a los inadecuados tratamientos durante los procesos de cosecha y secado de los productos.

## **2.7. Analisis de Ocratoxina A**

Los procesos de extraccion de OTA son realizados mediante disolventes organicos y bajo condiciones acidas con la finalidad de evitar la disociacion de la molecula. Una vez purificada, se aplican diversos metodos para la determinacion cualitativa o cuantitativa de la ocratoxina A, siendo estos metodos de gran importancia debido a que permiten asegurar la calidad de los alimentos para humanos y

animales. Entre ellos encontramos: Cromatografía por capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de gases (GLC) y ensayos de inmunofluorescencia (ELISA) <sup>42</sup>.

En un inicio, los ensayos para detectar micotoxinas eran hechos en base a cultivos fúngicos y requerían una gran inversión de material, en especial cuando se analizaban muchas cepas. Consistía en el desarrollo del hongo en sustratos naturales o en medios de cultivo sólidos, para luego realizar la extracción, purificación y concentración de la toxina. La técnica más usada en la determinación cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de micotoxinas era TLC <sup>42</sup>.

Los métodos de TLC fueron empleados, en un comienzo, como técnicas de barrido; actualmente se ha incorporado a esta técnica el uso de columnas multifuncionales de limpieza que permiten purificar las micotoxinas en menor tiempo. El desarrollo de estas columnas ha permitido retomar esta técnica como una herramienta eficaz en la determinación rápida de micotoxinas, con mayor exactitud y precisión.

En la década de los 80, se desarrollaron métodos rápidos basados en anticuerpos (ELISA competitivo directo e indirecto), los cuales adquirieron gran popularidad debido a su facilidad de uso y bajo costo, generando resultados cuantitativos. La técnica de Elisa competitivo directo consiste en la producción de color rosa asociada a la unión de micotoxinas marcadas con una enzima, las cuales ocupan sitios activos (anticuerpos) no ocupados por ellas <sup>42</sup>. Es decir se fundamenta en la producción de anticuerpos específicos contra las micotoxinas. Sin embargo, hasta el momento el método de ELISA es considerado como una técnica preliminar, cuyos resultados

positivos deben necesariamente confirmarse mediante métodos analíticos finales (cromatografía) <sup>43</sup>.

Actualmente, la técnica más empleada para la determinación de OTA es la combinación de una primera etapa de purificación por columna de inmovilización, que consiste en el empleo de columnas empaquetadas con un relleno en el que se inmoviliza un anticuerpo específico frente al analito que se quiera evaluar, ocurriendo su captura debido al reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Seguida de esta etapa ocurre la separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un detector UV o fluorescencia (FL). Generalmente se utiliza este tipo de detección debido a que ciertas micotoxinas (ocratoxina A y aflatoxinas) presentan fluorescencia nativas, ofreciendo ciertas ventajas como mayor sensibilidad y selectividad. Considerando que las longitudes de onda de excitación y emisión pueden variar dependiendo de la metodología, se ha propuesto que una longitud de onda de excitación de 330 nm y una de emisión de 460 nm, es la adecuada<sup>44</sup>.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

La páprika producida en la regiones de Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa, presenta como principales contaminantes a las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, las cuales son potencialmente productoras de ocratoxina A (OTA) .

#### **3.2 Objetivo General:**

- Caracterizar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* presentes en los cultivos de páprika (*Capsicum annum*, L) y determinar su grado de contaminación con Ocratoxina A.

#### **3.3 Objetivos específicos:**

- Aislar e identificar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* presentes en los cultivos de páprika provenientes de los departamentos de Ica, Arequipa, Lima y Lambayeque – Perú.
- Comparar la incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* en las muestras de cada región para determinar aquellas con mayor contaminación.
- Reforzar el resultado obtenido del estudio morfológico de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* mediante el uso de herramientas moleculares (primers específicos).
- Evaluar la incidencia natural de ocratoxina A en las muestras de Paprika mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Ubicación del área de estudio

El estudio fue realizado en las principales zonas de producción de páprika de 4 departamentos del Perú: Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa (Figura 5).

El departamento de Lambayeque se encuentra ubicado al noroeste del Perú, abarcando una superficie de 9346.63 km<sup>2</sup>. Por otro lado, el departamento de Lima se localiza al centro-oeste del país, presenta una superficie de 34.801,59 km<sup>2</sup>, representando cerca del 3% del territorio nacional peruano<sup>45</sup>, comprende básicamente un territorio costero y andino en determinadas provincias. El departamento de Ica se ubica al centro oeste del país, teniendo una superficie de 21, 327 km<sup>2</sup> y ocupando el puesto 18 en extensión territorial, sus áreas están comprendidas básicamente por los desiertos costeros del Perú. Finalmente el departamento de Arequipa, se encuentra ubicado al sur del país, presenta una superficie de 63.345,38 km<sup>2</sup>, siendo el sexto departamento de mayor extensión<sup>45</sup>, a la vez, cuenta con 528 km de costas, así como valles escarpados y cañones.

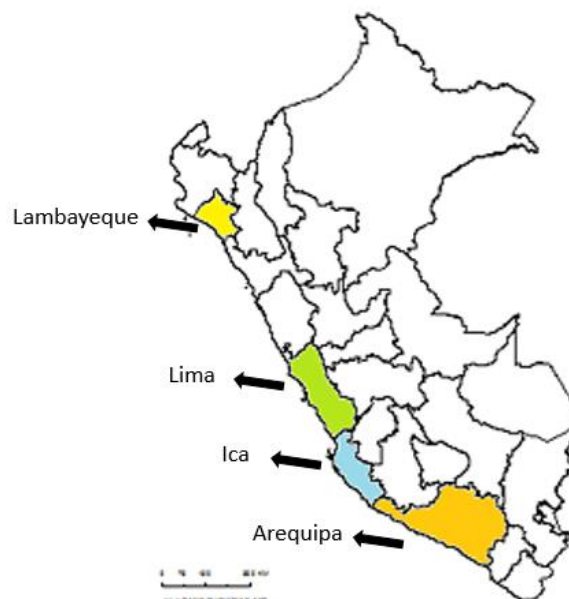


Figura 5 .Departamentos productores de páprika evaluados en el presente estudio <sup>45</sup>

Debido a su localización geográfica, los departamentos de Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa presentan determinadas variaciones en lo que respecta al clima como la humedad relativa, precipitaciones y temperatura (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de las condiciones climáticas en los departamentos de Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa-Perú

Departamento	Coordenadas	Temp Mínima (°C)	Temp Máxima (°C)	Humedad Relativa (%)	Precipitación (mm)	Características climáticas
Lambayeque	8°00'S 70°32'O	19	30	82	15	Cálido y soleado
Lima	12°02'S 77°01'O	14	28	84-96	16	Subtropical, desértico y húmedo
Ica	14°04'S 75°44'O	22	40	78	10	Cálido , desértico, subtropical seco
Arequipa	15°52'S 72°15'O	14	35	75	17-29	Cálido y templado

## 4.2 Muestreo

La tabla 4 indica los lugares específicos en cada departamento donde se obtuvieron las muestras de páprika.

Departamento	Provincia/Distrito	Localidad	Coordenadas	Número de muestras
Lambayeque	Chiclayo/Jayanca	Jayanca	6°23'44"S 79°49'49"O	4
Ica	Pisco/San Andrés	Lanchas	13°43'51"S 76°13'17"O	5
	Pisco/Paracas	Las Antillas	13°42'45"S 76°12'29"O	5
Lima	Barranca/Supe	Santa Elena Sur	10°47'44"S 77°43'00"O	4
	Barranca/Barranca	Fundo Potao	10°45'09"S 77°45'41"O	3
Arequipa	Caylloma/Majes	Agrícola Pampa Baja	16°19'16"S 72°36'49"O	5
	Caylloma/Majes	Peru Spiced	16°23'56"S 71°32'13"O	4
	Caylloma/Majes	Majes	15°38'12"S 71°36'08"O	5

El muestreo fue realizado en diferentes localidades de 4 departamentos del Perú: Lambayeque (Jayanca), Lima (Santa Elena Sur y Fundo Potao), Ica (Lanchas y Las Antillas) y Arequipa (Agrícola Pampa Baja, Peru spiced y Majes). Se aplicó la estrategia de muestreo estipulada por la directiva de la Comisión reguladora de la Unión Europea <sup>46</sup>. Para ello, dependiendo de la extensión, se escogieron entre 3 a 5 puntos de muestreo en cada campo (localidad) con distancias aproximadas de 5 metros entre ellos (Figura 6). En cada punto, se seleccionaron plantines al azar que se encontraban en el estadio fisiológico de cosecha, y se colectó un aproximado de 1 a 2 kg de páprika (Figura 7). Las muestras fueron envueltas con papeles absorbentes y empaquetadas inmediatamente en bolsas Ziploc para luego ser refrigeradas a 4°C hasta su posterior evaluación. La colecta se complementó mediante el muestreo de páprika seca de las mismas localidades de producción, tomando muestras representativas de manera aleatoria de las zonas de secado. Se obtuvo un total de 35 muestras entre frescas y secas en los 4 departamentos evaluados (Anexo 1)

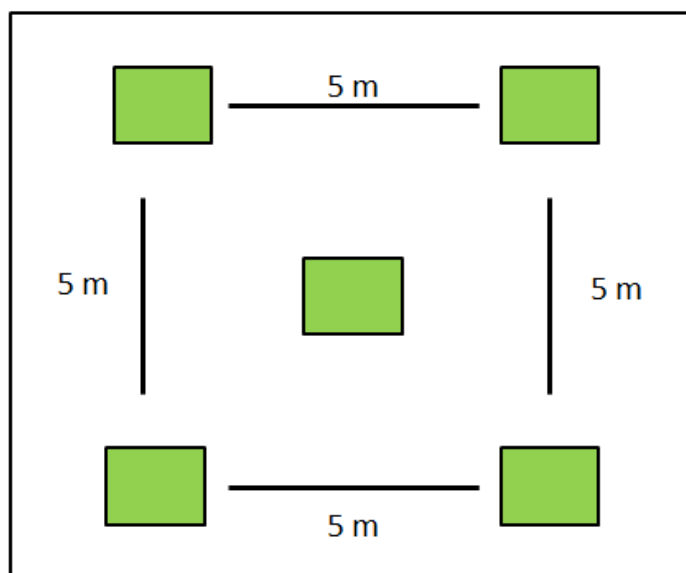


Figura 6. Estrategia de muestreo sugerida por la Comisión Reguladora de la Unión Europea <sup>46</sup>.



Figura 7. Muestras representativas de páprika colectadas en las 4 regiones de estudio. A) Muestra seca M1-1 proveniente de Ica, B) Muestra fresca M4-1 proveniente de Lambayeque, C) Muestra seca M3-4 proveniente de Arequipa, D) Muestra fresca M2-4 proveniente de Lima.

#### 4.3 Analisis de la micobiota y de *Aspergillus seccion Nigri* en páprika.

Todas las muestras obtenidas en cada colecta fueron llevadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro–LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. En un principio, fueron fotografiadas con una cámara Nikon 3200, para luego ser secadas en una estufa CONTERM 80I a 37°C durante un par de días, seguidamente fueron sometidas a un proceso de molienda haciendo uso de un molino Braun KSM2-BLK. Finalmente cada

muestra de paprika molida fue pesada y conservada en una bolsa ziploc a 4°C hasta su posterior analisis.

#### **4.3.1. Recuento y aislamiento de la micobiota contaminante**

Con la finalidad de determinar la micobiota presente en las muestras de Paprika y hacer el recuento de la misma, se aplico el metodo de diseminacion en placa. A partir de cada muestra molida se diluyo 10g de paprika, secada previamente, en 90ml de agua peptonada y dicha mezcla fue agitada durante 3 min en un Stomacher<sup>®</sup> 400. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> y alicuotas de 0.1ml fueron inoculadas por duplicado en el medio de recuento general Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC)<sup>47</sup> (Anexo 2). Las placas fueron incubadas a 28°C en una estufa CONTERM 80I durante 5 a 7 dias. Una vez transcurrido el periodo de incubacion se realizo el recuento de las colonias de hongos desarrolladas y los resultados fueron expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de paprika (UFC/g).

#### **4.3.2 Identificacion taxonomica de las especies pertenecientes a *Aspergillus* seccion *Nigri*.**

Para identificar las especies de *Aspergillus* seccion *Nigri*, se aplico la metodología propuesta por Klich ,2002<sup>48</sup>. Se utilizaron los medios de cultivo agar extracto de Malta (AEM) y agar Czapek-extracto de levadura (CYA) (Anexo 2). Cada cepa fue inoculada en los medios de cultivo previamente descritos en tres puntos equidistantes entre sı, en relacion con el borde y el centro de la placa. Los cultivos fueron incubados en medio CYA y AEM a 37 ± 1°C y 28 ± 1°C respectivamente durante 7 dias<sup>47</sup>.

Las características macroscópicas de las colonias fueron evaluadas considerando el color, textura y diámetro de la colonia, color del reverso de la placa, presencia o ausencia de exudados, pigmentos solubles y esclerocios.

Las características microscópicas más relevantes que se tuvieron en cuenta para la diferenciación de las especies de la sección *Nigri* fueron: el ancho y largo de los conidióforos, presencia o ausencia de métulas y forma de la cabeza aspergilal, tamaño, forma y ornamentación de los conidios<sup>48</sup> (Anexo3).

Las cepas identificadas dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* fueron incluidas en tres grupos: *Aspergillus* “agregado” *niger*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus* uniseriados. *A. carbonarius* fue identificado microscópicamente por el tamaño y forma de sus conidios. Sin embargo, los demás *Aspergillus* negros biseriados fueron identificados como pertenecientes al agregado *A. niger*. Las especies que presentaron conidióforos uniseriados fueron agrupadas como *Aspergillus* uniseriados.

#### **4.4 Identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* mediante métodos moleculares basados en PCR**

##### **4.4.1. Cepas**

Todas las cepas del presente estudio agrupadas dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* por taxonomía clásica, fueron identificadas por métodos moleculares utilizando cebadores específicos de especie.

##### **4.4.2. Producción de la biomasa fúngica**

A partir de cada cepa desarrollada en agar extracto de malta (AEM) durante 7 días a 28°C, se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido y

se transfirió una asada a frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio Wickerham (Anexo 2). Las cepas fueron incubadas a 26°C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm). El micelio fue cosechado por filtración, lavado con agua destilada estéril y secado con papel absorbente. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

#### **4.4.3 Extracción y purificación del ADN genómico.**

El micelio congelado fue pulverizado en morteros con nitrógeno líquido para lograr la ruptura mecánica de las células. Para extraer el ADN, se utilizó el buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Murray y Thompson <sup>49</sup>, y modificada por Kéryenyi et al <sup>50</sup>.

Al micelio congelado (aproximadamente 1,5 a 2 g) se le adicionó 700 µL de buffer CTAB al 2% (2% CTAB, 100 mM Tris-ClH [pH 8], 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) y fue calentado a 65°C por 30 minutos. Luego se agregó 700 µl de cloroformo isoamilalcohol, se agitó la muestra por 20 segundos en un agitador Vortex y se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm durante 2 minutos. Se extrajo 700 µl de la fase acuosa y los ácidos nucleicos crudos fueron precipitados con un volumen igual de isopropanol. Esta solución fue centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los tubos fueron invertidos sobre papel absorbente y el pellet fue resuspendido agregando 500 µl de Buffer TE. Para eliminar el RNA y así obtener una muestra más limpia se agregó 1.5 µl de RNAsa y se incubó a 37°C por 15 minutos. Se agregó 500 µl de fenol: cloroformo: isoamilalcohol (1:1:1), se agitó por 20 segundos en el Vórtex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 500 µl de cloroformo: isoamilalcohol (1:1), posteriormente se agregó 45 µl de acetato de sodio (3M pH: 5.2) y 500 µl de isopropanol, se dejó reposar la solución

por 3 minutos para luego centrifugarlo a 10000 rpm durante 5 minutos. Todo el sobrenadante fue descartado y se resuspendió el pellet con 500 µl de etanol frío al 70%(v/v). Finalmente la mezcla fue centrifugada por 2 minutos a 12000 rpm y secada a temperatura ambiente invirtiendo los tubos sobre papel absorbente. El residuo fue resuspendido en 50 µl de buffer TE (Buffer TRIS 10mM-EDTA 1mM).

Las muestras de ADN fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 – 1%. Se realizaron las diluciones correspondientes en agua bidestilada calidad biología molecular hasta obtener una concentración aproximada de 10–20 ng/µl.

#### **4.4.4 Evaluación de integridad del DNA**

Para la evaluación de la calidad del DNA extraído se elaboró una electroforesis. Para esto, se preparó un gel de agarosa al 1% en 100 ml de buffer TBE 1X. La carga para cada carril estuvo compuesta por 8µL de agua de PCR, 2µL de buffer de carga DNA gel loading Dye (6X) (Thermo scientific™ MA, USA) y 2 µl de DNA.

A esta corrida, se incluyó también el marcador de peso molecular 1KB DNA Ladder (Thermo scientific™ MA, USA). Por último, se corrió el gel a 100 V por 30 minutos en una cámara de electroforesis

#### 4.4.5 Reacciones de PCR

Para la identificación de *Aspergillus* uniseriados (*A. japonicus*), biseriados (*A. niger* y *A. tubingensis*) y *A. carbonarius*, se utilizaron las condiciones de amplificación en el anexo 5 y se usaron los siguientes primers:

*A. niger*:           NIG 1: (5'-GATTTTCGACAGCATTT (CT/TC) CAGAA-3')<sup>51</sup>  
                      NIG 2: (5'-AAAGTCAATCACAATCCAGCCC-3')<sup>51</sup>  
*A. tubingensis*:   TUB 1: (5'-TCGACAGCTATTTCCCCCTT-3')<sup>51</sup>  
                      TUB 2: (5'-TAGCATGTCATATCACGGGCAT-3')<sup>51</sup>  
*A. carbonarius*:   CARBO1: (5'-AAGCGAATCGATAGTCCACAAGAATAC)<sup>52</sup>  
                      CARBO2 : (5'-TCTGGCAGAAGTTAATATCCGGTT-3')<sup>52</sup>  
*A. japonicus*:     JAPO 1: (5'-TTACTGATTCATTTTCGTGATYCCT-3')<sup>52</sup>  
                      JAPO 2: (5'-TCAAGCAGGGAATGTGTGGA-3')<sup>52</sup>

A la vez, un control negativo que no contenga el ADN templado fue incluido en cada experimento. La amplificación fue realizada en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc, Watertown, MA). Los productos de amplificación fueron examinados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y fueron visualizados con un digitalizador MiniBis Pro (DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos fue estimado por comparación con el marcador molecular de ADN testigo (Fermentas™ Generuler 1KB ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 250–10000 pb.

#### 4.5. Incidencia natural de ocratoxina A en las muestras de páprika

Para la extracción de OTA de las 35 muestras de páprika se aplicó la metodología descrita por *Hadj et al*<sup>53</sup>. Para ello, 10 gramos de páprika seca molida fueron mezclados con 20 ml del solvente de extracción (solución de bicarbonato de sodio NaHCO<sub>3</sub> 1%) (Anexo 6) durante 30 minutos en un

agitador magnético (IKA<sup>R</sup> C-MAG HS4 digital). El extracto fue centrifugado a 4000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y se filtró haciendo uso de papel filtro Whatman 0.45 µm. Posteriormente, 5 ml del extracto fueron diluidos con 5 ml de una solución HCl (pH=1): Acetonitrilo 60/40 (v/v). Esta solución fue usada como solución de carga, la cual fue sometida a un procedimiento de limpieza (Anexo 6) usando las columnas de inmunoafinidad SPE AFFINIMIP<sup>R</sup> (SPE OCHRATOXIN A). Una vez obtenido el extracto, fue depositado en frascos de vidrio color ámbar de 1.5 ml, codificados y conservados a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC.

#### **4.5.1. Detección y cuantificación**

La detección y cuantificación de la toxina fue realizada en las instalaciones de la empresa Los Sauces Representaciones S.A.C y se utilizó un sistema de detección con fluorescencia por HPLC, en un cromatógrafo Thermo Scientific Dionex ultimate serie 3000.

Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo en una columna de fase reversa HYPERSIL Gold CC18 150MMX2. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo: agua: ácido acético (60:39:1) que fue filtrada al vacío usando papel Whatmann de 6 µm de poro y sonicada durante 5 minutos usando un equipo de baño limpiador ultrasónico ELMASONIC E100H.

El flujo de la fase móvil fue de 0,2 ml/min. La longitud de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 333 y 460 nm, respectivamente y se aplicó una inyección con un volumen de 50 µl. La temperatura durante el proceso fue de 30°C.

Se usaron las soluciones testigos o estándares Ochratoxin AFFINISEP que fueron preparadas disolviendo 100 mg del standard en 1 ml de acetonitrilo, obteniendo concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 25 µg/Kg (ppb). Se hicieron las corridas de HPLC para estos estándares con la finalidad de poder utilizarlos como referencia para la cuantificación de OTA (Anexo 7). Las áreas de cada estándar fueron usadas para hallar la ecuación de una recta haciendo uso del asistente de graficas de Excel, se seleccionó el tipo de gráfica de dispersión X-Y, se insertó la línea de tendencia en forma lineal para los datos “Y”, equivalente a las áreas de cada estándar (Tabla 5 ),

Tabla 5. Áreas obtenidas en los estándares de OTA

<b>X</b>	<b>Y</b>
<b>Ppb</b>	<b>Área</b>
1	44546.235
5	198966.512
10	417487.363
15	606947.343
20	823918.867
25	1055604.411

Y automáticamente mostró la ecuación de la recta (Figura 8):

$$Y = 41901x - 6164.7$$

**Siendo:**

Y: área integrada de la curva de la corrida por HPLC.

X: concentración del estándar en ppb.

\* 41901 es el valor de la pendiente de la recta obtenida.

\* 6164.7 el valor del intercepto en el eje Y.

Dicha fórmula fue expresada en la siguiente curva de calibración de los estándares:

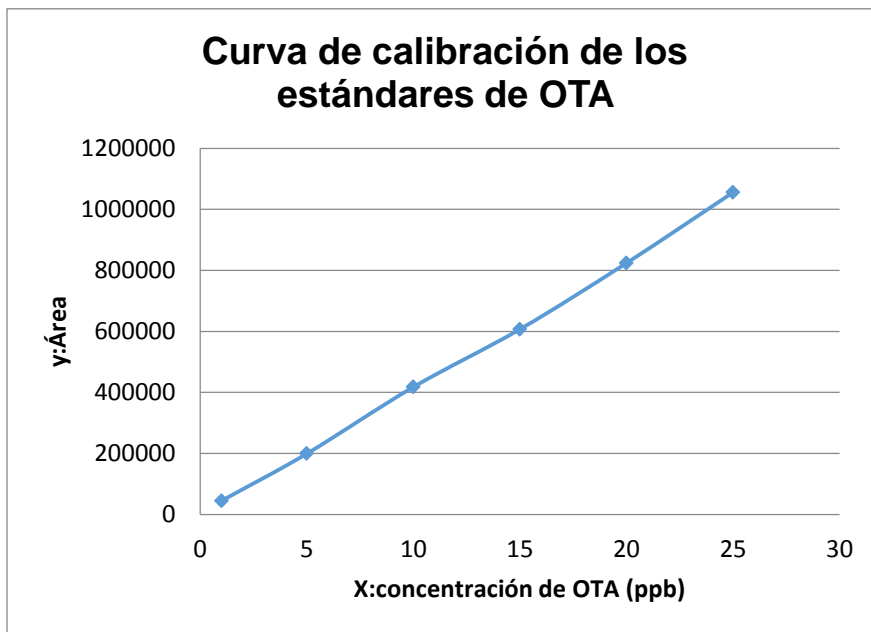


Figura 8. Curva de calibración de los estándares OTA: 1, 5, 10, 15,20 25 ppb

## V. RESULTADOS

### 5.1 Distribución de la micobiota en las diferentes regiones de cultivos de páprika

El estudio sobre la incidencia de la micobiota aislada en cada región evaluada reveló que en el departamento de Ica fue predominante la presencia de *Aspergillus* sp (75%) seguido por *Penicillium* sp (25%) en las muestras secas y en las frescas se encontró mayor incidencia del género *Penicillium* sp (66,6%) y *Cladosporium* sp (33.3%). El departamento de Arequipa presentó una amplia contaminación en ambos estados de las muestras, siendo prevalente el género *Aspergillus* sp en las muestras secas (85%) y *Cladosporium* sp (71,42%) en las frescas. Mientras que en los departamentos de Lambayeque y Lima solo las muestras secas presentaron contaminación, siendo el género *Aspergillus* sp (100%) el más prevalente en Lambayeque y el género *Cladosporium* sp (100%) en Lima (Tabla 6).

Tabla 6. Presencia de la micobiota contaminante en las muestras de páprika (seca y fresca) en los 4 departamentos evaluados.

Departamento	Estado de la muestra	Incidencia(%) – (UFC/g)			
		<i>Aspergillus</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	<i>Cladosporium</i> sp
ICA (n=10)	SECA (n=4)	75%--(20x10 <sup>3</sup> )	25%--(13x10 <sup>2</sup> )	0%	0%
	FRESCA (n=6)	0%	66.6%--(215x10 <sup>2</sup> )	16.6%-(10x10 <sup>3</sup> )	33.3%--(26x10 <sup>2</sup> )
LIMA (n=7)	SECA (n=3)	0%	33.3%--(130x10 <sup>3</sup> )	33.3%-(25x10 <sup>2</sup> )	100%--(24x10 <sup>3</sup> )
	FRESCA (n=4)	0%	0%	0%	0%
AREQUIPA (n=14)	SECA (n=7)	85%--(38x10 <sup>3</sup> )	57.14%--(179x10 <sup>2</sup> )	14.28%-(34x10 <sup>2</sup> )	14.28% -- (157x10 <sup>2</sup> )
	FRESCA (n=7)	0%	28.57%--(27x10 <sup>2</sup> )	57.14%--(63x10 <sup>2</sup> )	71.42% - (144x10 <sup>2</sup> )
LAMBAYEQUE (n=4)	SECA (n=1)	100%- (29x10 <sup>2</sup> )	0%	0%	0%
	FRESCA (n=3)	0%	0%	0%	0%

## 5.2 Identificación morfológica de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de páprika.

Una vez realizado el procedimiento de aislamientos de la microbiota presente en las muestras de páprika se prosiguió con la identificación morfológica de las especies fúngicas presentes, a través de la caracterización macroscópica y microscópica. Se aislaron un total de 30 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*. De los cuales, todos fueron identificados como especies pertenecientes al agregado *A. niger*, dado que presentaron colonias negras, flocosas con un diámetro entre 50-70 cm en el medio de cultivo EAM y entre 45-65 cm en el medio CYA a los 7 días de incubación, la coloración del reverso varió de amarillo claro a crema (Figura 9), las vesículas fueron biseriadas (Presencia de métula y fiálide) con un diámetro entre 30-75  $\mu\text{m}$  y los conidios entre los 3-4.5  $\mu\text{m}$  (Figura 10)(Anexo 4).

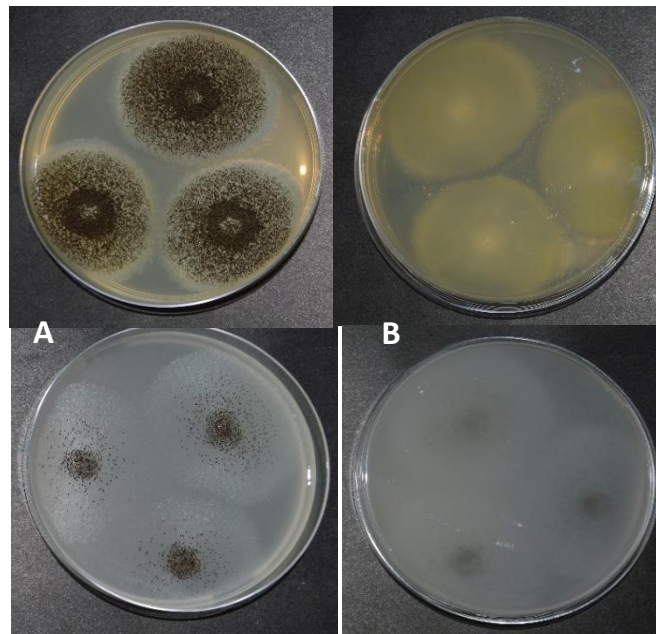


Figura 9. Características macroscópicas del agregado *A. niger* a los 7 días de incubación. A) Colonia desarrollada en agar extracto de malta (AEM) a 25C , B) Reverso de la colonia en AEM a 25C, C) Colonia desarrollada en agar Czapek extracto de levadura (CYA) a 37C, D) Reverso de la colonia en CYA a 37C.

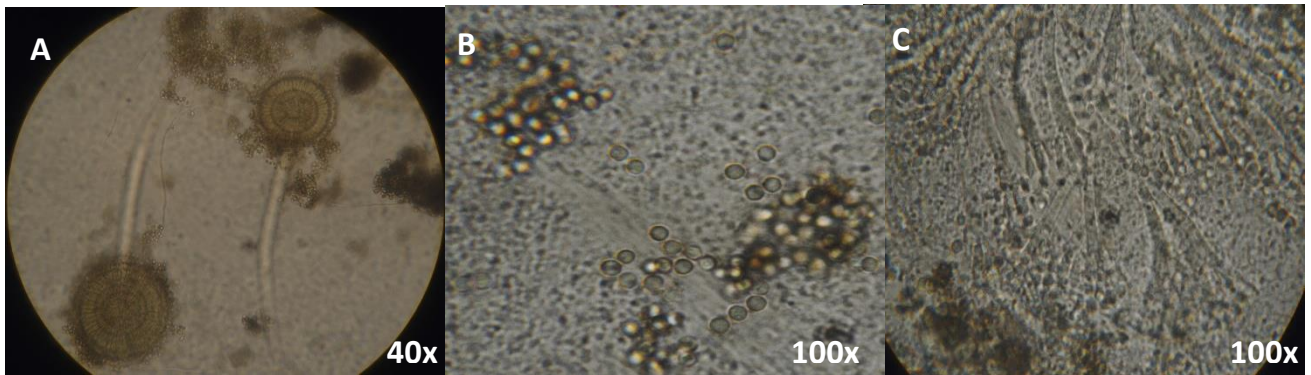


Figura 10. Características microscópicas de *Aspergillus* del “agregado” *niger* observadas en AEM a los 7 días de incubación, A) Cabeza conidial y conidióforo, B) Conidios, C) Métulas y fiálides.

### 5.3 Identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* mediante primers específicos amplificados por PCR.

En la presente tesis, se utilizaron primers selectivos para identificar qué especies incluidas en el *agregado A. niger* con potencial para producir ocratoxina A, se aíslan frecuentemente en paprika. Para ello, se seleccionaron 30 cepas previamente identificadas por taxonomía clasica para la extraccion de ADN y su posterior amplificacion.

Los resultados obtenidos en la amplificacion de las cepas identificadas morfologicamente como especies pertenecientes al *agregado A. niger* mostraron que el 100 % amplificaron con el par de primer NIG1/NIG2 de *Aspergillus niger* (245 pb) (Figura 11).

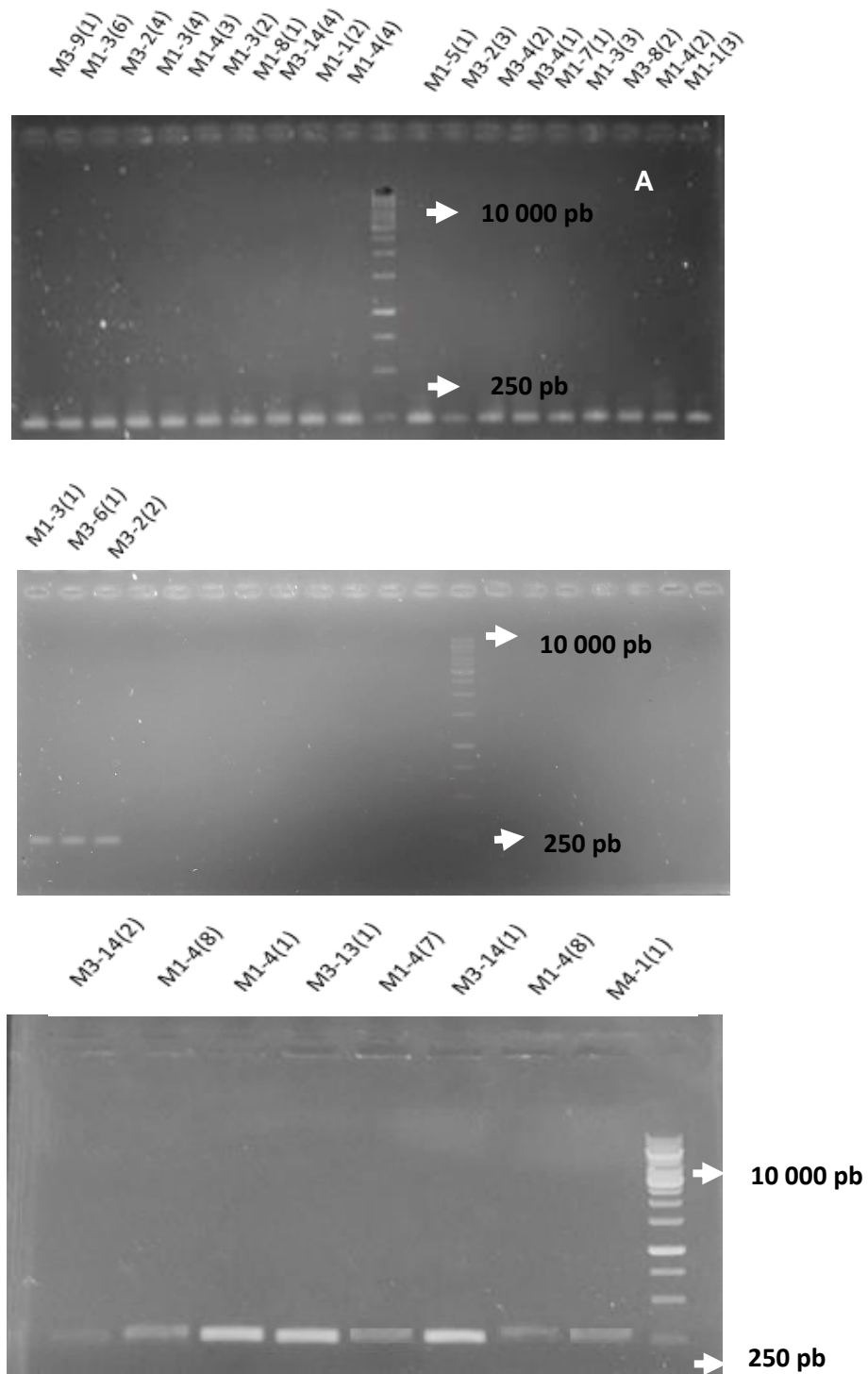


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR. Marcador de peso molecular DNA ladder 1KB. Características de los hongos evaluados en anexo 4.

## 5.4 Incidencia natural de ocratoxina A en muestras de páprika.

La cuantificaci3n de ocratoxina A mediante la técnica de HPLC se realiz3 en 35 muestras de páprika provenientes de las diferentes regiones en estudio: 10 muestras de Ica, 7 de Lima, 14 de Arequipa y 4 de Lambayeque. Solo se observ3 contaminaci3n con OTA en los departamentos de Ica y Arequipa. Solo 3 de las 10 muestras evaluadas en el departamento de Ica (n=10) estuvieron contaminadas con OTA en niveles que variaron entre 11.6 y 33.6 ppb (Tabla 7). En el departamento de Arequipa (n=14), solo 4 de las muestras presentaron contaminaci3n por OTA (6.4 a 33.2 ppb). En la figura 12, se muestran los cromatogramas de las muestras de páprika con mayores niveles de contaminaci3n detectados.

Tabla 7. Concentraci3n de ocratoxina A (OTA) expresada en PPB en las muestras de páprika evaluadas y hongos posibles productores de OTA aislados en cada muestra expresado en UFC/g.

Regi3n	C3digo-Muestra/Estado	<i>Penicillium sp</i> (UFC/g)	<i>Aspergillus secci3n Nigri</i> (UFC/g)	OTA(PPB)
Arequipa	M3-1 / Seca	11X10 <sup>2</sup>	0	10.8
	M3-2 / Seca	1X10 <sup>4</sup>	1X10 <sup>4</sup>	6.4
	M3-3 / Seca	0	39X10 <sup>2</sup>	32
	M3-8 / Seca	0	1X10 <sup>4</sup>	33.2
ICA	M1-6 / Fresca	93x10 <sup>2</sup>	0	14
	M1-7 / Fresca	4x10 <sup>3</sup>	0	11.6
	M1-10 / Fresca	0	0	33.6

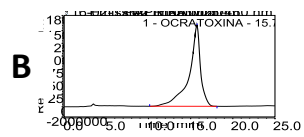
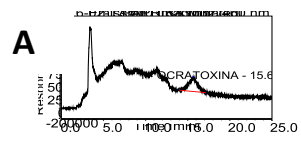


Figura 12. Cromatogramas de ocratoxina A de 2 muestras de páprika. A) Muestra M3-8 proveniente de Arequipa (33.2 ppb). B) Muestra M1-10 proveniente de Ica (33.6 ppb).

## 6. DISCUSIÓN

La presencia de hongos filamentosos contaminantes en la paprika genera una serie de daños como pudrici3n del fruto o maduraci3n irregular del mismo, afectando directamente su calidad y producci3n. A la vez, la paprika contaminada con hongos puede contener micotoxinas, las cuales representan ser un gran problema en relaci3n a la seguridad alimentaria generando un gran impacto en la salud humana y animal.

En las 4 regiones productoras de paprika evaluadas en el presente estudio, las diversas muestras colectadas presentaron un alto nivel de contaminaci3n fungica. Se observ3 que los generos predominantes fueron *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*. Previamente, *Almela et al.*<sup>34</sup>, evaluaron la microbiota presente en la paprika roja en las zonas de producci3n de Brasil, Murcia-España y Peru, demostrando que en las regiones de Peru evaluadas (costa Norte y sur), hubo tambi3n mayor incidencia del genero *Aspergillus sp* equivalente al 68,41%, y seguida por una incidencia del 1,17% para el genero *Penicillium sp*.

De igual forma, en el presente trabajo se encontr3 que todas las regiones evaluadas tuvieron una mayor incidencia de hongos contaminantes en las muestras secas frente a las frescas (Tabla 6). Los departamentos de Lima y Lambayeque no presentaron microbiota en las muestras frescas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en un estudio realizado por Ikoma et al.<sup>54</sup> en muestras de paprika colectadas en los países de Chile, Peru y Bolivia. Ellos encontraron que la paprika seca proveniente del Peru fue la mas contaminada con OTA en comparaci3n con las otras zonas evaluadas, determinando que principalmente el desarrollo de estos generos de hongos se encuentra relacionado a 2 factores: las condiciones medioambientales y el manejo post cosecha de los productos.

Las condiciones climáticas en el Perú son favorables para la proliferación de hongos en cultivos de páprika que presentan factores predisponentes , debido a que las temperaturas durante la producción de las mismas oscilan entre los 20-28 C, así como la alta humedad atmosférica (>80%) ,favoreciendo la aparición de estos organismos en cualquier estado del fruto. El tratamiento post cosecha y de secado de la páprika son cruciales para evitar una posterior contaminación.

Desafortunadamente en el Perú, los procesos aplicados en muchos centros de producción nacional de páprika se basan en técnicas tradicionales como largos procesos de secado al sol, exponiendo los productos al aire libre y permitiendo la propagación de hongos y generación de toxinas <sup>26</sup>. Mandeel *et al.* <sup>38</sup>, demostraron que el manejo postcosecha que incluye el proceso de secado y almacenaje de la páprika, es un factor crucial para evitar la contaminación de la páprika en especial en los países latinoamericanos debido a las condiciones climáticas. Y que de la totalidad de muestras evaluadas en su investigación, el 75 % de muestras secadas mediante técnicas tradicionales presentaron mayor contaminación fúngica.

Mediante la identificación taxonómica de la micobiota contaminante perteneciente al género *Aspergillus* realizada en el presente trabajo, se pudo determinar que los departamentos de Ica, Arequipa y Lambayeque, presentaron mayor incidencia de las especies pertenecientes al *Aspergillus* sección *Nigri*, equivalente al 75%, 85% y 100% respectivamente. La identificación a nivel de especie fue realizada mediante métodos moleculares y los resultados indicaron que todos los *Aspergillus* de la sección *Nigri* aislados pertenecieron al agregado *A. niger* (Figura 11). Diversos estudios han demostrado que si bien es cierto que determinadas especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* son los principales productores de OTA, no todas las cepas tienen la capacidad de ser toxicog nicas. Los resultados mencionados anteriormente referente al grado de contaminación con especies de *Aspergillus* sección *Nigri* concuerdan con una investigación realizada por Almela *et al.* <sup>38</sup>, quienes encontraron un porcentaje de contaminación

del 68% con las especies del agregado *A. niger* en muestras de páprika, y solo un 10% de las cepas analizadas resultaron ser productores de OTA.

El principal problema que enfrentan muchos países, entre ellos el Perú, es que aún no existen límites máximos específicos para alimentos contaminados con OTA. Sin embargo, para exportar alimentos a otros países se debe cumplir con la reglamentación que establece el país importador. La unión europea (UE) ha establecido niveles máximos permisibles para determinados contaminantes (micotoxinas), proponiendo que para la páprika se permite un valor máximo de 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA <sup>55,56</sup>.

En la presente tesis, se detectaron valores de OTA en determinadas muestras de páprika en un rango de 6.4-11.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , los cuales estuvieron por debajo del límite establecido por la UE. Sin embargo, dos de las muestras evaluadas duplicaron el valor de la concentración de OTA permisible (33.2  $\mu\text{g}/\text{g}$  en Arequipa y 33.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en Ica). Estos resultados superan los valores permisibles establecidos por la UE, siendo considerados como productos no aptos para consumo humano.

Los niveles altos de OTA en determinadas muestras de Arequipa estaría asociada probablemente a la presencia de especies del agregado *A. niger* productoras de OTA, mientras que las muestras de Ica, que reportaron determinadas concentraciones de ocratoxina A, solo tuvieron presencia del género *Penicillium sp* más no del agregado *A. niger*, y en una de ellas (Muestra1-10) no hubo presencia de microbiota contaminante. Hashem et al. <sup>4</sup> sugieren que la molécula de OTA presenta una amplia estabilidad siendo resistente incluso a tratamientos térmicos o químicos, por lo que la molécula de OTA puede prevalecer en el sustrato en cuestión incluso si el agente fúngico no se encontrara. Además de resaltar que determinadas especies como *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum* presentan la propiedad de producir OTA en sustratos como la páprika. Es importante hacer menc n que la muestra M1-10 se encontraba en estado fresco a diferencia de la muestra M3-8 (seca), esto podría indicarnos que probablemente la

muestra fue sometida a algún tratamiento químico (fungicida) que permitió eliminar la presencia de algún agente fúngico contaminante, sin embargo como ya se mencionó anteriormente la molécula de OTA es lo suficientemente estable para prevalecer en el sustrato.

Existen diversas investigaciones que revelan la alta contaminación por OTA en diversos tipos de alimentos como el cacao, uvas, maíz, café e incluso algunas especias como la pimienta negra y blanca <sup>15,25,27,28,29</sup>. Sin embargo, en relación a una investigación publicada por Almela et al. <sup>34</sup>, a pesar del interés por investigar en esta área, se conocen pocos estudios sobre la presencia de OTA en las especias, además de ser muy pocos los países que tiene regulaciones para OTA en alimentos. Principalmente este es un problema muy común en determinados países latinoamericanos como el Perú, donde no hay suficiente información referente al tema o investigación sobre micotoxicología en sus productos de origen agrícola y por tanto carecen de regulaciones referentes a micotoxinas en este tipo de producto.

## VII. CONCLUSIONES

1. De las 35 muestras de *Capsicum annum* (páprika) evaluadas, se encontró contaminación con hongos filamentosos, siendo las especies de *Aspergillus sección Nigri* aisladas las que presentaron mayor incidencia en las muestras secas de los departamentos de Ica (75 %), Arequipa (85%), y Lambayeque (100%). El departamento de Lima no presentó contaminación con esta sección.
2. Las muestras secas en todas las localidades evaluadas tuvieron mayor microbiota en comparación con las frescas.
3. Se aislaron e identificaron 30 cepas pertenecientes a *Aspergillus niger*
4. De las 35 muestras de páprika evaluadas mediante HPLC, 7 de ellas presentaron contaminación con OTA, siendo las muestras M3-8 (Arequipa) y M1-10 (Ica) las que tuvieron los valores más altos, con 33.2 ppb y 33.6 ppb, respectivamente. Estos valores son superiores a lo permitido por la Comunidad Europea.

## VIII.RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar la evaluación de la capacidad toxicogénica de las especies aisladas del genero *Aspergillus sección Nigri*, con la finalidad de determinar aquellas especies de esta sección productoras de OTA.
2. Para complementar la investigación se recomienda evaluar las condiciones climáticas de cada región de estudio así como los métodos post cosecha de tratamientos para poder determinar las principales causas de contaminación con hongos de páprika en el Perú.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borda E, Choquehuayta G. La cadena productiva del ají páprika y la Asociatividad: Un reto para la competitividad en el mercado internacional con equidad. 2nd ed. CIES (Perú); 2009 [actualizado 15 Sep 2009; citado 02 abr 2017].
2. Libreros D, Zonneveld M, Petz M, Meckelmann W, Rios L, Peña K. Catálogo de ajíes (*Capsicum* spp.) peruanos promisorios conservados en el banco de semillas del INIA-Perú. *Biodiversity international*. 2013;6-48.
3. Ministerio de agricultura. Páprika: Perú un campo fertil para sus inversiones. Proinversion; 2010 [actualizado 14 Jul 2010; citado 02 abr 2017].
4. Hashem M, Alamri S. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2010; 17:161-175.
5. Gams W, Christensen M, Onions A.H. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson R.A., Pitt J.I., editors. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Plenum Press. 1985; 11: 55–62.
6. Pelegrinelli-fungaro M, Vissoto P, Sartori D, Vilas-Boas L, Taniwaki M. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*. 2004; 49:123-127.
7. Geiser D, Klich M, Frisvad J, Peterson S, Varga J, Samson R. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 2007; 59:1-10.

8. Samson R.A, Visagie C.M, Houbraken J, Hong S, Hubka V, Klaassen C.H. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*.2014; 78:141-173.
9. Varga J, Frisvad J.C, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 2011; 69:1-17.
10. Samson R, Houbraken J, Kuijpers A, Frank J, Frisvad J. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*.2004; 50:45-61.
11. Samson R, Visague C, Houbraken J, Hong S, Hubka V, Klaassen C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Apergillus*. *Studies in Mycology*. 2014; 78:141-173.
12. Parenicova L, Skouboe P , Frisvad J ,Samson R , Rossen L , Hoor M . Combined Molecular and Biochemical Approach Identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Food and environmental microbiology*.1997; 67(2):521-527.
13. Varga J, Kevei F, Vriesema A, Debet F, Kozakiewics Z, Croft J. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *The Journal of Microbiology*.1994; 40:612-621.
14. Selma M, Martinez P, Aznar R. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International journal of Food Microbiology*.2008; 122:126-134.

15. Perrone G, Varga J, Susca A, Frisvad J, Stea G, Kocsubé S. *Aspergillus uvarum* sp an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. 2008; 58:1032-1039.
16. Raper K, Fennell D. The genus *Aspergillus*. Vo1 Baltimore: Williams and Wilkins.1965.
17. Al Mussallam A. Revision of the black *Aspergillus* species. Tesis doctoral. Universidad de Utrech.1980.
18. Parenicova L, Benen J, Samson R, Viesser J. Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black *Aspergilli*. *Mycological Research*.1997; 100:869-874.
19. Varga J, Kocsubé S, Tóth B, Frisvad J, Perrone G, Susca A. *Aspergillus brasiliensis* sp.nov.,a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.2007; 57:1925-1932.
20. Patiño B, Gonzalez A ,Gonzalez M, Covadonga F. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *Mycological Research*. 2005; 107:207-214.
21. Abarca M, Accensi F, Bragulat M, Cabañes F. Current Importance of Ochratoxin A–Producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food protection*.2001; 65(6): 903-906.
22. Vallejos C. Estudios comparativos para la determinación de ocratoxina A en granos de café verde.*Encuentro*.2005; 73:60-76.

23. EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. EFSA Journal.2006; 365:1-56.
24. O'Brien E, Dietrich D R. Ochratoxin A: The continuing enigma. Journal of Toxicology. 2005; 35 (1): 33-60.
25. López de Cerain A, Soriano JM. Ocratoxina A: Micotoxinas en Alimentos. Díaz de Santos Eds, Madrid. 2007.
26. Ahn J, Kim D, Jang H, Kim Y, Shim W, Chung D. Occurrence of ochratoxin A in Korean red paprika and factors to be considered in prevention strategy. Mycotoxin Research. 2010; 26: 279-286.
27. Filali A, Ouammi L, Betbeder M, Baudrimont I, Soulaymani R, Benayada A. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. Food Additives and Contaminants. 2001; 18(6): 565-568.
28. Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. International Journal of Food Microbiology.2006, 111:46-52.
29. Ravelo A, Rubio C, Gutiérrez AJ, Hardisson de la Torre A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: Revisión. Nutrición Hospitalaria. 2011; 26 (6): 1215-26.
30. EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to Ochratoxin A in food. The EFSA Journal.2009; 365:1-56.
31. Creppy E, Baudrimont I, Betbeder A. Prevention of nephrotoxicity of Ochratoxin A, a food contaminant. Toxicology Letters. 1995; 82: 869-77.

32. IARC (1987). Ochratoxin A: Overall evaluations of carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Report of IARC Expert Committee. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer 1987; 1-42 Suppl 7: 271-2.
33. Van der Merwe A, Monteoliva M, Rasero S, Gorgé J, Mayor F. Ochratoxin A, a toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature. 1965; 205: 1112-1118.
34. Almela L, Virginia R, Sanchez B, Torrella F, López-Pérez J, Gabaldón J. Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. Food Microbiology. 2007 (24): 319-327.
35. Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V, Combina, M. Ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food Additives and Contaminants. 2002; 19: 408– 414.
36. Atoui A, Mitchell D, Mathieu F, Magan N, Lebrihi A. Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes and wine. Applied microbiology. 2007; 103: 961-968.
37. Barberis M, Glaj G, Reynoso M, Chulze S, Torres A. Factors affecting distribution and abundance of *Aspergillus* section *Nigri* in vineyard soils from grapevine growing regions of Argentina. Science of Food and Agriculture. 2014; 11: 42-49.
38. Mandeel Q. Fungal contamination of some imported spices. Mycopathology. 2005; 159: 291-298.

39. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Guía de la FAO/OMS para desarrollar y mejorar sistemas nacional de retiro de animales.2012; 1:1-76.
40. Mulé G, Susca A, Logrieco A, Stea G, Visconti A. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. Journal of Food Microbiology. 2006; 111: 28-34.
41. Bau M, Bragulat M, Abarca M, Minguez S, Cabañes F. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. Food Microbiology.2005; 98: 125-130.
42. Scussel VM, Da Rocha M, Lorini I, Sabino M, Rosa C. Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Graos II. Vol 2.1ra ed. Brasil: ABMAG; 2011.
43. Diaz G. Limitaciones de la Técnica de ELISA en el análisis de micotoxinas. Food Microbiology.2012; 20:72-75.
44. Dunne C, Meancy M, Smyth M. Multimycotoxin detection and clean-up method for aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in animal feed ingredients using high-performance liquid chromatography and gel permeation chromatography. Journal of Chromatography. 1993; 629: 229-235.
45. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú: MAC1, 2000 [Actualizado 04 enero 2017, citado 15 abril 2017]. Disponible en: <https://www.inei.gob.pe/estadisticas/indice-tematico/surface/>
46. Commission regulation. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union. 2006; 1:12-34.

47. Samson R, Hoekstra E, Frisvad J. Introduction to food-and airborne fungi. 6<sup>th</sup> Ed. Holanda: CBS; 2001.
48. Klich M. Identification of Common *Aspergillus* Species. 1<sup>ra</sup> Ed. Holanda: CBS, 2002.
49. Murray M, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. International Journal of Food Microbiology. 1980; 19:4321-4325.
50. Kérenyi Z, Moretti A, Waalkij C. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. Applied Environmental Microbiology. 2004; 8: 4419-4423.
51. Susca A, Stea G, Perrone G. Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. Food Additives and Contaminants. 2009; 24(10): 1148-1153.
52. Perrone G, Susca A, Stea G, Mulé G. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. European Journal of Plant Pathology. 2004; 1: 1-9.
53. Hadj W, Derrien D, Alix F, Pérrolier C, Lepine O, Bayoudh S. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. Journal of Chromatography. 2010; 1217(43): 6668-6673.
54. Ikoma T, Tsuchiya Y, Asai T, Okano K, Ito N, Endoh K. Ochratoxin A contamination of Red Chili Peppers from Chile, Bolivia and Peru, Countries

with a High Incidence of Gallbladder Cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.2015; 16: 5987-5991.

55.Comisión Europea. Reglamento (UE) N°105/2010: Contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios con OTA. 2010: 35-40.

56.Promperu. Norma Técnica Peruana NTP 011.051:2010 Páprika. Buenas prácticas para prevenir la contaminación de micotoxinas (ocratoxina A y aflatoxinas). Perú.2013.

## ANEXOS

### Anexo 1. Relación de muestras colectadas en los departamentos de Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa-Perú

	Código	Estado	Localidad	Peso (Kg)
<b>CHICLAYO</b>				
1	M4-1	Fresca	Jayanca –Chipote	2
2	M4-2	Seco	Jayanca- Chipote	2
3	M4-3	Fresca	Jayanca- Chipote	2
4	M4-4	Fresca	Jayanca- Chipote	2
<b>ICA</b>				
1	M1-1	Seco	Lanchas	1,850
2	M1-2	Seco	Lanchas	1,900
3	M1-3	Seco	Lanchas Pisco	2
4	M1-4	Seco	San Andrés Pisco	2,050
5	M1-5	Fresca	Paracas	2,100
6	M1-6	Fresca	Lanchas Pisco	2
7	M1-7	Fresca	Paracas	2
8	M1-8	Fresca	Paracas	2,050
9	M1-9	Fresca	Las Antillas Paracas	1,950
10	M1-10	Fresca	Las Antillas	2,100
<b>LIMA</b>				
1	M2-1	Seco	Sta Elena sur	2,050
2	M2-2	Seco	Sta Elena sur	1,950
3	M2-3	Seco	Potao campo	2,050
4	M2-4	Fresca	Sta Elena sur fresco 18/03	2
5	M2-5	Fresca	Sta Elena sur	2,100
6	M2-6	Fresca	Potao alto	1,900
7	M2-7	Fresca	Potao Campo	2
<b>AREQUIPA</b>				
1	M3-1	Seca	Prov: Caylloma Dist: Majes	2,200

<b>2</b>	<b>M3-2</b>	Seca	Prov: Caylloma Dist: Majes	2
<b>3</b>	<b>M3-3</b>	Seca	Prov: Caylloma Dist: Majes	1,950
<b>4</b>	<b>M3-4</b>	Seca	Agrícola Pampa Baja Molle 1	2,100
<b>5</b>	<b>M3-5</b>	Fresca	Prov: Caylloma Dist: Majes	2,150
<b>6</b>	<b>M3-6</b>	Fresca	Perú Spiced Provincia: Caylloma Dist: Majes	2
<b>7</b>	<b>M3-7</b>	Fresca	Agrícola Pampa Baja Molle 1	1,900
<b>8</b>	<b>M3-8</b>	Seca	Prov: Caylloma Dist: Majes	2
<b>9</b>	<b>M3-9</b>	Seca	Perú Spiced Prov: Caylloma Dist: Majes	2
<b>10</b>	<b>M3-10</b>	Seca	Agrícola Pampa Baja Molle 1	2,050
<b>11</b>	<b>M3-11</b>	Fresca	Perú Spiced Prov: Caylloma Dist: Majes	2
<b>12</b>	<b>M3-12</b>	Fresca	Perú Spiced Prov: Caylloma Dist: Majes	1,950
<b>13</b>	<b>M3-13</b>	Fresca	Agrícola Pampa Baja Molle 2	2
<b>14</b>	<b>M3-14</b>	Fresca	Agrícolas Pampa baja	2

## Anexo 2. Medios de cultivo

### 1. DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloramfenicol) <sup>49</sup>

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Dicloran	0.002 g
Rosa bengala	0.025 g
Cloramfenicol	0.1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
<b>pH final</b>	<b>5.6</b>

### 2. AEM (Extracto de malta agar) <sup>49</sup>

Extracto de malta	20 g
Peptona bacteriológica	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml
<b>pH final</b>	<b>5.0-5.5</b>

**3. CYA (Czapek extracto de levadura agar) <sup>47</sup>**

<b>NaNO<sub>3</sub></b>	<b>3 g</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1 g</b>
<b>KCl</b>	<b>0.5 g</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.5 g</b>
<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.01 g</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>5 g</b>
<b>Sucrosa</b>	<b>30 g</b>
<b>Agar</b>	<b>20 g</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>
<b>pH final</b>	<b>6.0-6.5</b>

**4. Medio Wickerham (molecular) <sup>47</sup>**

<b>Glucosa</b>	<b>40g</b>
<b>Peptona</b>	<b>5g</b>
<b>Extracto de malta</b>	<b>3g</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>3g</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

### Anexo 3. Características macroscópicas y microscópicas del *Aspergillus* sección *Nigri*

#### 1. *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom<sup>48</sup>

##### **Diámetro de la colonia (días):**

- **CYA 25** : 65-70 mm
- **AEM 25** : 55-70 mm
- **CYA 37** : 10-30 mm

##### **Color de la colonia y textura:**

En medio MEA, las conidias son negras, presentan micelio inconspicuo de color blanco; esclerocios, si están presentes son de color amarillo. El reverso presenta una coloración ligeramente amarillenta.

##### **Características microscópicas**

**Cabezas conidiales:** radiadas, presentan un conidioforo (100x) entre 1000-3500  $\mu\text{m}$  x 15-20  $\mu\text{m}$ , presentan una pared delgada y ligeramente rugosa, de coloración hialiana a ligeramente pardas.

**Vesículas:** presentan una medida de 65-90  $\mu\text{m}$ , ligeramente esféricas; biseriadas, metuladas posicionadas sobre la superficie de la vesícula con una medida de 25-40  $\mu\text{m}$  x 6-11  $\mu\text{m}$ ; fiálides de 8-12x5-7  $\mu\text{m}$ .

**Conidias:** son grandes de 7-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, globosas, paredes rugosas con pequeñas espículas o tuberculadas en la madurez.

**Características principales:** Se caracteriza por tener conidias negras de pared rugosa y de gran tamaño entre 7-11  $\mu\text{m}$ .

## 2. Agregado *Aspergillus niger*

### *Aspergillus niger* Tiegh

#### **Diámetro de la colonia (días):**

**CYA 25** : 55-70 mm

**MEA 25** : 50-70 mm

**CYA 37** : 50-70 mm

#### **Color de la colonia y textura:**

En medio MEA, las conidias son de coloración negra, verde oscuro a marrón parda, presentan micelio inconspicuo de color blanco; colonias granulares o flocosas; el reverso es incoloro a amarillo palido.

#### **Características microscópicas**

**Cabezas conidiales:** radiadas, presentan un conidioforo (100x) entre 400-3000  $\mu\text{m}$  x 12-17  $\mu\text{m}$ , presentan una pared delgada y ligeramente rugosa, de coloración hialiana a ligeramente marrón amarillenta.

**Vesículas:** presentan una medida de 30-75  $\mu\text{m}$ , ligeramente esféricas; biseriadas (en la mayoría de los casos), metuladas cubren completamente la vesícula con una medida de 12-20  $\mu\text{m}$  x 3-6  $\mu\text{m}$ ; fialides de 7-10x3-4  $\mu\text{m}$ .

**Conidias:** presenta un tamaño de 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, globosas, usualmente tienen paredes rugosas con irregularidades pequeñas.

**Características principales:** esta especie se caracteriza por presentar colonias negras o marrón oscuro, con cabezas conidiales biseriadas y con vesículas grandes, metuladas y con conidias irregulares rugosas.

### 3. *Aspergillus uniseriados*

#### *Aspergillus Japonicus Saito*

##### **Diámetro de la colonia (días):**

**CYA 25** : 60-70 mm

**MEA 25** : 60-70 mm

**CYA 37** : 20-50 mm

##### **Color de la colonia y textura:**

En medio MEA, las conidias son marrón oscuras a negras, presentan micelio inconspicuo de color blanco, ausencia de exudados; el reverso presenta una coloración incolora a ligeramente amarillenta.

##### **Características microscópicas**

**Cabezas conidiales:** radiadas, presentan un conidióforo (100x) entre 300-600  $\mu\text{m}$  x 12-25  $\mu\text{m}$ , presentan una pared delgada y ligeramente rugosa, de coloración hialina.

**Vesículas:** presentan una medida de 14-30  $\mu\text{m}$ , ligeramente globosas a elongadas; uniseriadas, fialides de 5-9 x 3.5-4  $\mu\text{m}$  cubriendo solo un tercio de la vesícula.

**Conidias:** de 4-5  $\mu\text{m}$  de diámetro, globosas o subglobosas, paredes rugosas con una superficie equinulada y ligeramente espiculada.

**Características principales:** Se caracteriza por ser uniseriado y produce conidias negras espinosas.

**Anexo 4.** Descripción macroscópica y microscópica de los *Aspergillus* sección *Nigri* en las 4 regiones evaluadas.

**Departamento de ICA**

Muestras		Características macroscópicas (Colonias)			Características microscópicas (100x)				
		Descripción			Conidióforo	Vesícula		Conidias	
		Diámetro (mm)	Anverso	Reverso	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)	Biseriada/Uniseriada (µm)	Tamaño (µm)	Forma
M1-1	1	50-56	Granuloso/negro	Amarillento	1100-1675 x 10	60	Biseriada: Métula(25x7.25) Fiálide (12x5)	3	Globosa/espiculada
	2	50-60	Granuloso/negro	crema amarillento	725-925 x 12	52.5	Biseriada: Métula(23x6.55) Fiálide (10x4.5)	4	Globosa/rugosa
	3	64-66	Granuloso/negro	crema amarillento	500-550 x 12.5	50-52	Biseriada: Métula(18x5) Fiálide (9x4)	3.5	Globosa/rugosa
M1-3	1	50-54	Granuloso/negro	semi amarillento	825-1600 x 10	57.5-65	Biseriada: Métula(20x5) Fiálide (7x4)	3-3.5	Globosa/espiculada
	2	60-65	Granuloso/negro	crema	825-1575 x 12	42.5-52.5	Biseriada: Métula(23x5) Fiálide (10.5x2.5)	3-3.5	Globosa/rugosa
	3	48-57	Granuloso/negro	crema amarillento	875-1475 x 12.5	52-55	Biseriada: Métula(27.5-31.25x6.25) Fiálide (7.5x3.75)	3-3.5	Globosa/rugosa
	4	52-56	Granuloso/negro	crema amarillento	800-1125 x 11.25	32.5-50	Biseriada: Métula(20-24x3.5) Fiálide (7.5x3)	3-3.5	Globosa/espiculada
	5	53-55	Granuloso/negro	crema amarillento	500-587 x 11	32.5-52.5	Biseriada: Métula(20-22x3) Fiálide (7x2)	3-3.5	Globosa/rugosa

	<b>6</b>	50-52	Granuloso /negro	crema amarillento	925-1050 x 11.15	42.5-52.5	Biseriada: Métula(23x4) Fiálide (5.5x3)	3-3.5	Globosa/ rugosa
<b>M1-4</b>	<b>1</b>	54-59	Granuloso /negro	Amarillento	600-1250 x 12.5	42.5-57.5	Biseriada: Métula(14x2) Fiálide (3.5x1.5)	3	Globosa/ rugosa
	<b>2</b>	50-53	Granuloso /negro	crema amarillento	575-1350 x 8.75	42.5-57.5	Biseriada: Métula(11-12.5x3-4.5) Fiálide (7-8x2.5)	3-3.5	Globosa/ espiculada
	<b>3</b>	55-58	Granuloso /negro	crema amarillento	750-1625 x 17.5	60-67.5	Biseriada: Métula(19-23x4) Fiálide (7-8x3-3.5)	3-3.5	Globosa/ rugosa
	<b>4</b>	50-57	Granuloso /negro	crema amarillento	850-2500 x 15	62.5-70	Biseriada: Métula(15-20x3.5) Fiálide (7-8x3-3)	3.5-4	Globosa/ rugosa
	<b>5</b>	47-50	Granuloso /negro	crema amarillento	750-1050 x 12.5-15	42.5-55	Biseriada: Métula(22-26x4.5-6) Fiálide (7-9x2.5-3)	3.5-4	Globosa/ rugosa
	<b>6</b>	47-54	Granuloso /negro	crema amarillento	1000-1300x 10-12.5	30-62.5	Biseriada: Métula(15-20x4-5) Fiálide (8-9x2-3)	3	Globosa/ espiculada
	<b>7</b>	50-53	Granuloso /negro	crema	800-1650 x 12.5-15	55-60	Biseriada: Métula(20-24x4-5) Fiálide (7-10x2.5-3.5)	3	Globosa/ espiculada
	<b>8</b>	50-55	Granuloso /negro	crema amarillento	1175-1325 x 13.75-15	55-70	Biseriada: Métula(17-20 x 5-7) Fiálide (10x 3.5-4 )	3-3.5	Globosa/ espiculada
<b>M1-8</b>	<b>1</b>	45-49	Granuloso /negro	crema amarillento	975-1125 x 10-15	60-65	Biseriada: Métula(29-32 x 4-6) Fiálide (7-11x 3-3.5 )	3.5-4	Globosa/ espiculada

**Departamento de AREQUIPA**

Muestras		Características macroscópicas (Colonias)			Características microscópicas (100x)				
		Descripción			Conidióforo	Vesícula		Conidios	
		Diámetro (mm)	Anverso	reverso	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)	Biseriada/uniseriada (µm)	Tamaño (µm)	Forma
<b>M3-2</b>	1	55-60	Granuloso /Negro	crema amarillento	67.6-222.5 x 10-15	35-45	Biseriada: Métula:(30-35x8.75-10) Fiálide (17.5-20x7.5-8)	3-3.5	Globosa /rugosa
	2	45-65	Granuloso /Negro	crema amarillento	90-147.5x11.25-15	16-21	Biseriada: Métula(32.5-45.5x9-12.5) Fiálide (16-18-20x8.5-11)	3.5-4.5	Globosa /rugosa
	3	65-68	Granuloso /Negro	crema amarillento	55-150 x 12.5-15	12--23	Biseriada: Métula(21-30x9.5-12.5) Fiálide (11.5-15x7.5-10)	3-3.5	Globosa /espiculada
	4	60-65	Granuloso /Negro	crema amarillento	60-142.5x11.25-16.25	16.5-21	Biseriada: Métula(25-31x9-11.5) Fiálide (7-9.5x3.5-5)	3.5-4	Globosa /espiculada
<b>M3-3</b>	1	52-70	Granuloso /Negro	crema amarillento	40-60 x 5.5-6.5	42.5-50	Biseriada: Métula(14-21x8.5-10.5) Fiálide (8-10.5x3-3.5)	3.5-4	Globosa /rugosa
	2	58-61	Granuloso /Negro	crema amarillento	82.5-175 x 10-15	20-23	Biseriada: Métula(12-16.5x4-5.5) Fiálide (6-8.5x3-3.5)	3.5-4	Globosa /rugosa

<b>M3-4</b>	1	60-65	Granuloso /Negro	crema amarillento	115-140 x 12.5-15	30-40	Biseriada: Métula(10-12.5 x 3.5-4) Fiálide (6-8 x 2.5-3.5)	3.5-4	Globosa /espiculada
	2	60-63	Granuloso /Negro	crema amarillento	100-155 x 12.5-15	35-40	Biseriada: Métula(14-17 x 3.5-4.5) Fiálide (7-9 x 3-4)	3.5-4	Globosa /espiculada
<b>M3-6</b>	1	35- 60	Granuloso /Negro	crema amarillento	55-112.5 x 7.5 -15	13 - 15	Biseriada: Métula(10-15x 3.5 -4) Fiálide (6-7 x 3-3.5)	3-4	Globosa /espiculada
<b>M3-8</b>	1	60- 63	Granuloso /Negro	crema amarillento	105-142.5 x 12.5 -15	40 - 55	Biseriada: Métula(11-20x 3.5 -4) Fiálide (7-8 x 3)	3-3.5	Globosa /rugosa
	2	60- 65	Granuloso /Negro	crema amarillento	110-170 x 11.25-12.5	47.5 -50	Biseriada: Métula(10-17x 3.5 -4) Fiálide (6-8 x 3)	3.5-4	Globosa /espiculada
	3	63-66	Granuloso /Negro	crema amarillento	80-150 x 7.5 - 10	37.5-52-5	Biseriada: Métula(20-25x 4-5) Fiálide (6-8 x 3-3.5)	3.5-4	Globosa /rugosa
<b>M3-9</b>	1	60-67	Granuloso /Negro	crema	75.5-100 x 10-12.5	30-45	Biseriada: Métula(12-14x 3.5-4) Fiálide (6-7x 3-3.5)	3—4	Globosa /rugosa
	2	57-68	Granuloso /Negro	crema	75-150 x 10-12.5	45-48	Biseriada: Métula(12-17x 3.5-4) Fiálide (5-7x 3-3.5)	3-3.5	Globosa /rugosa
<b>M3-13</b>	1	60-64	Granuloso /Negro	crema amarillento	75-162.5 x 11.25 -12.5	35-40	Biseriada: Métula(13-16x 3.5-4) Fiálide (5-7x 3)	3-3.5	Globosa /espiculada

<b>M3-14</b>	<b>1</b>	60-62	Granuloso /Negro	crema amarillento	137.5 x 12.5-15	35-52.5	Biseriada: Métula(18-21 x 3.5-4 ) Fiálide (7-9 x 3-3.5 )	3- 4	Globosa /espiculada
	<b>2</b>	55-70	Granuloso /Negro	crema amarillento	125-200 x 10-11.25	37.5-50	Biseriada: Métula(10-15 x 3.5-4 ) Fiálide (6-7 x 3-3.5 )	3.5-4	Globosa /rugosa
	<b>3</b>	55-72	Granuloso /Negro	crema	85-137.5 X8.75-12.5	37.5-42.5	Biseriada: Métula(12-15 x 3-3.5 ) Fiálide (5-7 x 3-3.5 )	3--4	Globosa /espiculada
	<b>4</b>	60-80	Granuloso /Negro	crema	62.5-130 X 12.5	35-42.5	Biseriada: Métula(12-4 x 3-4 ) Fiálide (7-8 x 3-3.5 )	3.5-4	Globosa /espiculada

### Departamento de LAMBAYEQUE

Muestras		Características macroscópicas (Colonias)			Características microscópicas(100x)				
		Descripción			Conidióforo	Vesícula		Conidios	
		Diámetro	Anverso	Reverso	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)	Biseriada/uniseriada (µm)	Tamaño (µm)	Forma
<b>M1-7</b>	<b>ak 10-1</b>	48-50 mm	Granuloso/negro	Crema	650-850 x 12.5-13.75	42.5-50	Biseriada: Métula(20-50 x 7.5-8.75 Fiálide (17.5-22.5 x5-7.5	3.5-4	Globosa /rugosa
<b>M1-5</b>	<b>ah 10-3</b>	49-56 mm	Granuloso /negro	Crema	800-900 x 15	42.5-55	Biseriada: Métula(20-27 x 4- 4.5 ) Fiálide (15-18.75 x3-3.5)	3-3.5	Globosa /rugosa

**Anexo 5. Condiciones para PCR**  
**PCR para *A.niger* y *A.tubingensis* <sup>51</sup>**

dNTPs(0.2mM)	1 µL
Buffer PCR (1X)	1 µL
Taq polimerasa(1.25 U)	0.25 µL
Cl <sub>2</sub> Mg(1.5 mM)	0.3 µL
Primer TUB1 o NIG 1(0.1 µm)	0.1 µL
Primer TUB2 o NIG 2 (0.1 µm)	0.1 µL
H <sub>2</sub> O	6.25 µL
<b>Volumen final</b>	<b>9 µL</b>

**Condiciones en el termociclador:**

**1 ciclo: 94°C por 5 minutos**

**30 ciclos 94°C por 50 segundos**

**60°C por 50 segundos**

**72°C por 1 minuto**

**1 ciclo: 72°C por 7 minutos**

**4°C por 7 minutos**

**PCR para *A.carbonarius* y *A.japonicus* <sup>52</sup>**

dNTPs(0.2mM)	1 µL
Buffer PCR (1X)	1 µL
Taq polimerasa(1.25 U)	0.25 µL
Cl <sub>2</sub> Mg(1.5 mM)	0.3 µL
Primer CAR 1 o JAP 1(0.5 µm)	0.5 µL
Primer CAR 2 o JAP 2 (0.5 µm)	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	5.45 µL
<b>Volumen final</b>	<b>9 µL</b>

**Condiciones en el termociclador:**

**1 ciclo: 94°C por 5 minutos**

**35 ciclos 94°C por 50 segundos**

**58°C por 50 segundos**

**72°C por 1 minuto**

**1 ciclo: 72°C por 10 minutos**

**4°C por 10 minutos**

## Anexo 6. Preparación de soluciones para HPLC

### Solución de extracción

- Solución de Bicarbonato de sodio  $\text{NaHCO}_3$  1%  
En un matraz aforado de 100 ml, se añade 1 gr de  $\text{NaHCO}_3$  y se completa con agua.

### Solución de Ácido Clorhídrico (pH=1)/ Acetonitrilo 60/40 (V/V)

- En un matraz aforado de 10 ml, añadir 4 ml de acetonitrilo y completar con HCL 0.1 M pH=1

### Solución de 2/98 Ácido acético /Metanol (v/v)

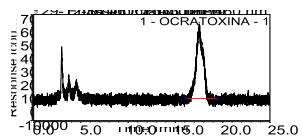
- En un matraz aforado de 10 ml, añadir 200  $\mu\text{l}$  de ácido acético y completar con metanol

### Procedimiento de limpieza

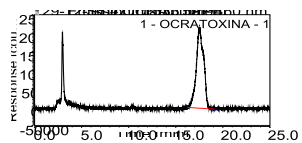
Flujo	Columna AFFINIMP <sup>R</sup> SPE OCHRATOXIN A
Equilibrado	3ml de acetonitrilo 3ml de agua miliQ No dejar secar la columna durante este proceso
Carga	Hasta 4 ml de la solución de carga
Lavado de interferentes	6 ml de solución Ácido clorhídrico 0.1 M (Ph=1)/Acetonitrilo 60/40(v/v)
Secado	Aplicar vacío 3 a 5 minutos para eliminar los residuos restantes de Agua y por ello, disminuir el tiempo de evaporación de la solución de elución
Elución	2ml 2/98 Ácido acético/Metanol (v/v)

## Anexo 7. Cromatogramas de los estándares de Ocratoxina A (OTA) a diferentes concentraciones

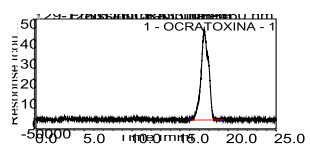
A) 1 ppb



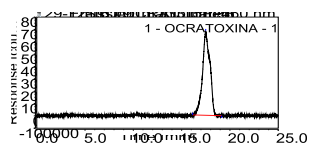
B) 5 ppb



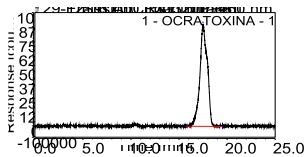
### C) 10 ppb



### D) 15 ppb



### E) 20 ppb



## F) 25 ppb

