



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Evaluación de ocratoxina A y análisis micotoxigénico
en *Zea mays* L. “maíz morado”**

TESIS

Para optar el Título de Segunda Especialidad Profesional en
Toxicología y Química Legal

AUTOR

Kely Jackeline CABANILLAS VILLOSLADA

ASESOR

Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima – Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cabanillas K. Evaluación de ocratoxina A y análisis micotoxigénico en *Zea mays* L. “maíz morado” [Tesis de segunda especialidad]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Kely Jackeline Cabanillas Villoslada.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44358077
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3014-4948
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25455526
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8012-967X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Amadeo Collado Pacheco.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07535726
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	18089817
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Tania Torres Aguilar.
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	28314802
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.3.2 Toxicología alimentaria.
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	No aplica
Ubicación geográfica de la investigación	<p>El proceso de extracción de la Ocratoxina A en <i>Zea Mayz</i> L “maíz morado”, se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Avenida: Miguel Grau 755 Latitud: -12.055961315414917 Longitud: -77.02336328241867 -12.055961315414917, -77.02336328241867</p> <p>El procedimiento de identificación de hongos micotoxigénicos en <i>Zea Mayz</i> L “maíz morado”, se realizó en el laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Facultad de Ciencias Biológicas - de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Dirección: Block 34, Ciudad Universitaria - UNMSM, Av. República de Venezuela, Cercado de Lima. Latitud: -12.059718598822856 Longitud: -77.08212680679748 -12.059718598822856, -77.08212680679748</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2022
URL de disciplinas OCDE	<p>Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07</p> <p>Alimentos y bebidas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.01</p> <p>Micología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.05</p>



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA LEGAL

Siendo las **16:00 horas del 15 de marzo de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Mg. Amadeo Collado Pacheco e integrado por los siguientes miembros: Dr. Américo Jorge Castro Luna (asesor), Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz y Mg. Tania Torres Aguilar ; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **Evaluación de ocratoxina A y análisis micotoxigénico en *Zea mays* L. "maíz morado**, presentado por la Q.F. **Kely Jackeline Cabanillas Villoslada**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Título de Segunda Especialidad Profesional en **Toxicología y Química Legal**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

DIECISIETE (17) – Muy bueno

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Q.F. **Kely Jackeline Cabanillas Villoslada**, el Título de Segunda Especialidad Profesional en **Toxicología y Química Legal**.

Siendo las **17:35** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **17:50** hrs. del 15 de marzo de 2022.

Mg. Amadeo Collado Pacheco (P.Asoc., T.P.)
Presidente

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P., D.E.)
Miembro - Asesor

Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Asoc., T.P.)
Miembro

Mg. Tania Torres Aguilar (P. Aux., T.P.)
Miembro

Observaciones: Ninguna

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios, mis padres, esposo e hijo, por haber sido la base de mi formación, cada uno de ustedes ha aportado grandes cosas a mi vida.

Agradecimientos

Mi agradecimiento especial a Dios, por estar presente en todo momento de mi vida, debido a que su amor y bondad no tienen límites.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por haberme aceptado ser parte de su casa de estudios durante estos años de la especialidad.

A cada uno de los diferentes docentes, por impartir sus conocimientos y enseñanzas y ayudarme a forjar camino en el futuro.

A mi asesor de tesis, el Dr. Américo Castro Luna, por los consejos, la orientación y el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

A mi esposo, por su amor y apoyo incondicional, que siempre me da los ánimos para seguir adelante; a mi hijo, por ser mi motivación para alcanzar cada una de mis metas.

A mis queridos padres, hermano y familiares por sus consejos y siempre tenerme presente en sus oraciones.

Resumen

Las micotoxinas son contaminantes naturales producidos por especies fúngicas que colonizan y contaminan los cultivos ya sea en el campo o en productos postcosecha. *Zea mays* L, es uno de los cultivos más valiosos en todo el mundo, y es propenso a infectarse por hongos micotoxigénicos. El objetivo de la investigación fue evaluar OTA en *Zea mays* L. “maíz morado”. Las muestras procedieron del centro poblado de Santa Rosa de Callancas, provincia de San Pablo del departamento de Cajamarca. La ocratoxina A fue evaluada mediante el método de HPLC y separada por columnas de inmunoafinidad, adicionalmente se identificó la presencia de hongos micotoxigénicos mediante método directo e indirecto. Se utilizó 25g por cada muestra, adicionándose 100 mL de acetonitrilo al 60%. Luego se adicionó 46mL de solución buffer fosfato salino a 4 mL de la anterior solución. Se trabajó a un nivel de contaminación del 5 ppb. Las muestras presentaron un nivel de contaminación de 10,917; 13,271 ppb de OTA y presentó un porcentaje promedio de recuperación del $80,81\% \pm 7,38$. Se identificó la presencia de *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, mediante el método directo y *Rhizopus* sp. mediante el método indirecto. Se concluye que el sistema de solventes usados en la identificación de OTA es el adecuado presentando un porcentaje de recuperación adecuado, y el contenido de las muestras superan el límite de detección. Teniendo en cuenta la aparición de OTA a nivel mundial, existe la necesidad de un monitoreo continuo, vigilancia y control del contenido de ocratoxina A como un problema importante de salud y economía global.

Palabras clave: Ocratoxina A, *Zea mays* L, inmunoafinidad, Cromatografía.

Abstract

Mycotoxins are natural contaminants produced by fungal species that colonize and contaminate crops either in the field or in post-harvest products. *Zea mays* L, is one of the most valuable crops in the world, and it is prone to infection by mycotoxigenic fungi. The objective of the research was to evaluate ochratoxin A in *Zea mays* L. "purple corn". The samples came from the town of Santa Rosa de Callancas, San Pablo province, Cajamarca department. Ochratoxin A was evaluated using the High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) method and separated by immunoaffinity columns, additionally the presence of mycotoxigenic fungi was identified by direct and indirect method. 25g was used for each sample, adding 100 mL of 60% acetonitrile. Then 46mL of phosphate buffer saline was added to 4 mL of the previous solution. We worked at a contamination level of 5 ppb. The samples presented a level of contamination of 10,917; 13,271 ppb of OTA and presented an average recovery percentage of $80.81\% \pm 7.38$. The presence of *Penicillium* sp. *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, by the direct method and *Rhizopus* sp., by the indirect method. It is concluded that the solvent system used in the identification of OTA is adequate, presenting an adequate recovery percentage, and the content of the samples does exceed the detection limit. Considering the emergence of Ochratoxin A (OTA) worldwide, there is a need for continuous monitoring, surveillance and control of Ochratoxin A content as a major health and global economic problem.

Key words: Ochratoxin A, *Zea mays* L, immunoaffinity, Chromatography.

Índice

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	xi
Capítulo I. Introducción	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 Objetivo general	2
1.1.2 Objetivo especificado	2
Capítulo II. Marco Teórico	2
2.1 Antecedentes	3
2.2 Aspectos teóricos	6
2.2.1 Clasificación taxonómica	6
2.2.2 Características botánicas de <i>Zea mays</i> L.	7
2.2.3 Distribución	8
2.2.4 Usos tradicionales de <i>Zea mays</i> L.	9
2.2.5 Micotoxinas	9
2.2.6 Importancia de las micotoxinas	12
2.2.7 Ocratoxina A	14
2.2.8 Toxicidad	17
2.2.9 Toxicocinética	18
2.2.10 Mecanismo de acción	22
2.2.11 Evaluación de riesgo	24
Capítulo III. Metodología	26
3.1. Instrumentos de laboratorio	26
3.1.1 Materiales	26

3.1.2 Equipos	26
3.1.3 Insumos químicos	26
3.2. Parte experimental	28
3.2.1 Colecta de la muestra	27
3.2.2 Lugar de ejecución de la investigación	27
3.2.3 Tratamiento de la muestra y extracción de OTA	27
3.2.4 Preparación de la curva de calibración	28
3.2.5 Pruebas de recuperación	28
3.2.6 Cuantificación por HPLC	28
3.2.7 Cálculo del Límite de Detección	29
3.2.8 Análisis micotoxigénico	30
Capítulo VI. Resultados	31
4.1. Curva de calibración	31
4.2. Límite de detección	32
4.3. Cromatogramas de las muestras	33
4.4. Cromatogramas de la prueba de recuperación	37
4.5 Análisis micotoxigénicos	47
Capítulo V. Discusión	49
Capítulo VI. Conclusión	53
Capítulo VII. Recomendaciones	54
Capítulo VII. Referencias Bibliográficas	55

Anexos

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Límites de algunas micotoxinas establecidos por la Unión Europea 2017.	13
Tabla 2. Ensayos realizados para la identificación de OTA y metabolitos.	21
Tabla 3. Valores de los estándares de ocratoxina A.	31
Tabla 4. Estadísticas de la curva de calibración.	32
Tabla 5. Resultados del Límite de Detección (LDD)	32
Tabla 6. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 1	33
Tabla 7. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 2	34
Tabla 8. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 1	35
Tabla 9. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 2 36
Tabla 10. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 1	37
Tabla 11. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 2	38
Tabla 12. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 1	39
Tabla 13. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 2	40
Tabla 14. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 1	41
Tabla 15. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 2	42
Tabla 16. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 1	43
Tabla 17. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 2	44
Tabla 18. Resumen de los datos cromatográficos	45

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Mazorcas de <i>Zea mays</i> L.	6
Figura 2. Distribución geográfica por departamentos de <i>Zea mays</i> L.	8
Figura 3. A. moniliformina; B. ácido nitropropiónico; C. fumonisina B1 y D. beauvericina.	10
Figura 4. Ocratoxina A.	14
Figura 5. <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	15
Figura 6. <i>Aspergillus carbonarius</i>	16
Figura 7. <i>Penicillium verrucosum</i>	16
Figura 8. Representación del mecanismo de acción de OTA	23
Figura 9. Estrés oxidativo generado por la OTA	24
Figura 10. Gráfico de dispersión del área de los picos vs concentración de OTA.	31
Figura 11. Cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 1	33
Figura 12. Cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 2	34
Figura 13. Cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 1	35
Figura 14. Cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 2	36
Figura 15. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 1	37
Figura 16. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 2	38
Figura 17. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 1	39
Figura 18. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 2	40
Figura 19. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 1	41
Figura 20. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 2	42
Figura 21. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 1	43
Figura 22. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 2	44
Figura 23. Representación de los valores de OTA presentes en las muestras analizadas.	46
Figura 24. Representación de los porcentajes de recuperación de OTA en muestras autocontaminadas.	46

Figura 25. A: Características macroscópicas de <i>Penicillium</i> sp. (GD1) en medio APD. B: Características microscópicas de <i>Penicillium</i> sp.	47
Figura 26. A: Características macroscópicas de <i>Rhizopus</i> sp. (GD2) en medio APD. B: Características microscópicas de <i>Rhizopus</i> sp.	47
Figura 27. A: Características macroscópicas de (GD3) en medio APD. B: Características microscópicas de GD3.	48
Figura 28. A: Características macroscópicas de <i>Geotrichum</i> sp. (GD4) en medio APD. B: Características microscópicas de <i>Geotrichum</i> sp.	48
Figura 29. A: Características macroscópicas de <i>Rhizopus</i> sp. (GD5) en medio APD. B: Características microscópicas de <i>Rhizopus</i> sp.	48

Lista de abreviaturas

OTA: Ocratoxina A

OTB: Ocratoxina B

OTC: Ocratoxina C

WHO-OMS: Organización Mundial de la Salud.

UE: Unión Europea.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

JECFA: Comité de Calidad y Seguridad alimentaria.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HPLC-FD: Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia.

AF: Aflatoxina.

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

LC-MS/MS: Cromatografía Líquida acoplado a un espectrómetro de masa/masa.

ZEN: zearalenona.

IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

PBS: Buffer fosfato salino.

SS: Solución salina.

R²: Coeficiente de Pearson.

TLC: Cromatografía en capa fina.

CIA: Inmunoensayo quimioluminiscente.

PFIA: Inmunoensayo de polarización de fluorescencia.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son los contaminantes naturales de los alimentos más extendidos a nivel mundial. Las principales cepas productoras de toxinas se encuentran en los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas poseen efectos carcinogénicos, teratogénicos, embriotóxicos y hepatotóxicos. Afectan el sistema hormonal, respiratorio e inmunológico. Debido a su gran variedad de efectos tóxicos y sobre todo a su extrema resistencia al calor (termorresistencia), la presencia de micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de los animales¹.

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que una cuarta parte de las cosechas mundiales están contaminadas por micotoxinas. Un estudio analizó 2 800 muestras de cereales y piensos en el año 2007 y revelaron que más de la mitad de las muestras de origen europeo y una tercera parte de la región Asia – Pacífico estaban contaminadas con niveles de micotoxinas por encima del límite de cuantificación de los métodos aplicados².

OTA es un metabolito producido por los mohos *Aspergillus* y *Penicillium*; encontrado en productos como el maíz, la cebada, el café verde y varias frutas secas³. La ocratoxina A puede estar presente en conjunción con las aflatoxinas, sustancias consideradas como carcinógenos naturales, además está reportado que la OTA es un potencial agente carcinógeno, que afecta los riñones de los animales expuestos a dicha micotoxina⁴.

El estudio de micotoxinas es de mucha importancia debido a su alto nivel de toxicidad, sin embargo, en el Perú no existen normas de control ni parámetros para ningún tipo de producto susceptible a contaminación, ni investigaciones referentes a la incidencia de ocratoxina “A” en los productos de consumo humano. Esto genera una consecuencia seria para los problemas de salud por su elevada toxicidad y por sus efectos carcinogénicos y/o nocivos⁵.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Determinar la presencia y concentración de ocratoxina A y el análisis micotoxigénicos en *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia y concentración de ocratoxina A por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”.
2. Evaluar el análisis micotoxigénico en *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”.
3. Verificar si el contenido de ocratoxina A supera los límites máximos permisibles establecidos por los organismos reguladores de la Unión Europea.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Dhanshetty M y et al⁶. En India, desarrollaron un análisis directo simultáneo de aflatoxinas y ocratoxina A en cereales y sus productos procesados por cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detección de fluorescencia. Se obtuvieron varias muestras al azar de varios supermercados, cuando se aplicó el método al maíz y matrices de harina de maíz, todas las muestras estaban contaminadas. Las contaminaciones de ocratoxina estaban en el rango de 2-4 y 3-8 ng/g en maíz y matrices de maíz procesado, respectivamente. El estudio concluye en la realización de un análisis robusto de alto rendimiento de aflatoxinas y ocratoxina A.

Castillo Najar W⁷, En México, realizó un estudio de determinación de ocratoxina A en maíz y productos derivados comercializados en la ciudad de Morelia, Michoacán. Se utilizaron 34 muestras y sus derivados entre ellas el “maíz morado”, la detección se realizó mediante la prueba de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). Como resultado se observó la concentración promedio es de 3,41 µg/kg en “maíz morado” de 4,2 µg/kg, el estudio concluye que ninguna concentración de las 34 muestras supera los límites establecidos por la Unión Europea.

Vega Ortiz V⁸, En México, realizó un estudio de determinación de hongos micotoxigénicos y aflatoxinas en granos de maíz de diferentes orígenes geográficos de la república mexicana, estas muestras fueron de maíces blancos, amarillos, y de colores colectados de forma aleatoria en el campo. La detección se realizó por el método Aflatest de Vicam, como resultado se determinó la presencia de *Fusarium* en un 76,99%, *Aspergillus flavus* en un 11,72%, seguido por *Penicillium* en un 9,69 %.

Salcedo O et al⁹, En Lima - Perú, realizaron un estudio de determinación de ocratoxinas en maíz utilizado en granjas porcinas de Lima. Se utilizaron 62 muestras de maíz amarillo, la detección se realizó mediante la prueba de ELISA. Se determinó un total de 35,5% de muestras contaminadas con ocratoxina con un promedio de 8 µg/kg.

Huassainu A, et al¹⁰, En Nigeria, evaluaron la presencia natural de ocratoxina A en algunos alimentos comerciales de origen nigeriano. Se utilizó un total de 109 muestras de maíz (*Zea mays*), 17 de mijo (*Pennisetum spp*), 18 de guinea (*Sorghum*), 17 de acha (*Digitaria exilis stapf*), 20 de sésamo (*Sesamum indicum*), 19 de escamas de yuca fermentada (*Manihot esculenta*) y 18 de encurtidos de kion (garri) de mercados ubicados en Minna y sus alrededores pretendiendo detectar ocratoxina A (OTA) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se detectó OTA en el 98,2% de las muestras. Los niveles encontrados en maíz fueron (0 – 139,2 µg/kg), mijo (10,20 – 46,57 µg/kg), maíz de Guinea (0 – 29,50 µg/kg), semillas de sésamo (1,90 – 15,66 µg/kg), acha (1,38 – 23,90 µg/kg) y garri (3,28 – 22,73 µg/kg). El maíz tenía el nivel más alto de OTA. Los niveles de OTA que se encuentran en los alimentos comercializados y los productos alimenticios que estaban en su mayoría (74,3 %) por encima de 5 µg/kg, el estándar de la Unión Europea suscita preocupación por la salud pública. El estudio es el primer informe de contaminación por OTA de acha, semillas de sésamo y garrí en Nigeria y posiblemente en África.

Oliveria M, et al¹¹, En Brasil, evaluaron la coincidencia natural de metabolitos fúngicos en muestras de maíz de la región sur de Brasil, el equipo de investigación utilizó un método de múltiples micotoxinas basado en Cromatografía Líquida acoplado a un Espectrómetro de Masa-Masa (LC-MS / MS). Todas las muestras de maíz (n = 148) estaban contaminadas con fumonisina B 1 (FB 1) y fumonisina B 2 (FB 2). La aflatoxina B 1 (AFB 1) y la aflatoxina G 1 (AFG 1) se detectaron en 38 y 11 muestras, respectivamente, mientras que la zearalenona (ZEN) y el deoxinivalenol (DON), que fueron regulados por primera vez en 2014 y se encontraron en 110 y 71 muestras, respectivamente además de una pequeña proporción de Ocratoxina A. Aparte de las micotoxinas reguladas, también se detectó una amplia gama de metabolitos no regulados provenientes de diversos microorganismos, en la muestra de maíz. Se encontró que todas las muestras de maíz analizadas estaban contaminadas por al menos diez metabolitos diferentes, siendo el mayor número de metabolitos encontrados en la misma muestra.

Lawson B, et al¹². En Gran Bretaña desarrollaron la investigación titulada “Residuos de aflatoxinas y ocratoxina A en alimentos suplementarios utilizados para aves silvestres”. La provisión de alimentos suplementarios para aves de jardín se practica a gran escala en varios países. Si bien este recurso tiene beneficios para las poblaciones de aves silvestres, se ha expresado preocupación con respecto al potencial de contaminación de los alimentos por las micotoxinas, y las implicaciones que esto podría tener para la salud de la vida silvestre. Se investigó si los residuos de aflatoxina (AF) y ocratoxina A están presentes en los alimentos vendidos para consumo de aves silvestres en el punto de venta en Gran Bretaña utilizando análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia. Si bien, la mayoría de las muestras de maní fueron negativas para los residuos de AF, una muestra excedió el límite máximo permitido de 20 µg/kg. No se encontraron diferencias significativas en la detección de micotoxinas entre productos con y sin marca. La importancia clínica de la exposición de las aves silvestres a las micotoxinas requiere mayor investigación.

Leite M, et al¹³. Desarrollaron una revisión titulada “Maíz (*Zea mays* L.) y micotoxinas: una revisión sobre optimización y validación de métodos analíticos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas”. La investigación buscó evaluar los parámetros de validación, incluidos el límite de detección, el límite de cuantificación, la precisión y la exactitud, se compilan y comparan entre los diferentes métodos analíticos. Se ha optimizado y validado una gran cantidad de metodologías analíticas para la determinación de micotoxinas en muestras a base de maíz, pero debido a la diversidad química de estas toxinas, así como a la creciente aparición de las llamadas micotoxinas emergentes, se siguen desarrollando nuevos métodos y publicado. LC-MS / MS se ha convertido en el método de oro para el análisis simultáneo de múltiples micotoxinas, con diferentes enfoques de preparación de muestras, debido al rango de diferentes propiedades fisicoquímicas de estos químicos.

2.2 Aspectos teóricos

2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *Zea mays* L.

Variedad: Var. INIA 601

Ecotipo: Purple o maíz morado

Nombre común: maíz morado



Figura 1. Mazorcas de *Zea mays* L.

Fuente: Ministerio agrario de desarrollo y riego¹⁹.

2.2.2 Características botánicas de *Zea mays* L.

Las raíces son fasciculadas y aporta un perfecto anclaje de la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces a nivel del suelo y suele ocurrir en aquellas raíces secundarias o adventicias¹⁴. La planta presenta un sistema radicular fasciculado y muy extenso compuesto por tres tipos de raíces¹⁵:

- raíces primarias, emitidos por la semilla y forma parte de las raíces seminales.
- raíces principales que se forman a partir de la corona.
- raíces aéreas o adventicias que nacen en el último lugar de los nudos de la base del tallo.

El tallo consta de una caña maciza, de orientación vertical con una altura variable que puede ir de 80 cm a 250 cm, y en climas tropicales hasta 400 cm de altura, la cantidad de nudos varía de 8 a 14¹⁶. Los entrenudos son muy cortos y los nudos se originan de las raíces aéreas y el grosor del tallo disminuye de abajo a arriba, con una sección circular hasta la panícula o inflorescencia masculina que corona la planta¹⁵.

Las hojas son grandes, largas, lanceoladas, alternas, paralelinervias. Se encuentran abrazadas al tallo y por el haz presenta vellosidades. Los extremos de las hojas son muy afilados y cortantes¹⁶. Es una planta anual que presenta de 15 a 30 hojas verdaderas que nacen de cada nudo y de color verde intenso¹⁵.

La inflorescencia masculina es una panícula formada por numerosas flores pequeñas llamadas espículas. La inflorescencia femenina es una estructura única llamada mazorca¹⁷. El maíz es de inflorescencia monoica con inflorescencia masculina y femenina separada dentro de la misma planta¹⁴. Sólo de algunas yemas que se encuentran en las axilas de las hojas nace la inflorescencia femenina o espiga, conocida como mazorca que incluye el eje central o coronta y donde se insertan las flores que darán origen a los granos¹⁸.

El fruto es cariósipide, redondeado, morado situado en hileras a lo largo de toda la mazorca¹⁷. El grano o fruto del maíz es una cariósipide. La pared del ovario o pericarpio está fundida con la cubierta de la semilla o testa y ambas están combinadas conjuntamente para conformar la pared del fruto. El fruto maduro consiste de tres partes

principales: la pared, el embrión diploide y el endospermo triploide. La parte más externa del endospermo en contacto con la pared del fruto es la capa de aleurona¹⁴.

2.2.3 Distribución

La producción nacional de maíz morado se localiza en 8 departamentos y el 80% de la producción se concentra en Lima, Huánuco, Ancash, La Libertad y Cajamarca. En los últimos 05 años la producción de maíz morado ha presentado una tasa anual promedio de crecimiento del 25 %¹⁹.



Figura 2. Distribución geográfica por departamentos de *Zea mays* L. 01- Lima; 02- Ica; 03- Arequipa; 06- Ancash; 07- La Libertad; 11- Cajamarca; 14- Huánuco; 18- Ayacucho.

Fuente: Minagri-Ministerio de Agricultura y Riego.

2.2.4 Usos tradicionales de *Zea mays* L.

El maíz morado era empleado en la antigüedad como bebida, se elabora la "chicha" la cual es una bebida fermentada. El uso sufrió un cambio con el tiempo, así es, como en la colonia por influencia de la cultura española y por el ingenio de las amas de casa criollas apareció la "mazamorra" y la "chicha morada" que tenían características organolépticas²⁰.

El maíz morado es usado a nivel casero como colorante natural para la "mazamorra morada" y la "chicha". A nivel industrial se usa para obtener colorante de la coronta, debido a su contenido de antocianinas. Dicho pigmento es usado a nivel industrial como insumo para la coloración de bebidas, productos lácteos, productos de panadería, productos vegetales, conservas de pescado, grasas, aceites, mermeladas, jaleas, frutas confitadas, frutas en almíbar, jarabes de frutas, sopas, shambar; también se usa para teñir tejidos y en la industria de cosméticos. El grano se puede aprovechar para la extracción de almidones y/o derivados o en la elaboración de alimentos balanceados para animales¹⁷. Debido a sus propiedades anticarcinogénicas y antioxidantes es considerado como un cultivo atractivo para el mercado de alimentos funcionales y nutraceuticos²¹.

Presentan fitonutrientes (o fotoquímicos), que no son ni vitaminas ni minerales sino sustancias químicas o compuestos dentro los cuales podemos nombrar flavonoides, carotenoides, luteína, terpenos, antocianinas, sulforafanos, entre muchos otros. Los fitonutrientes se diferencian de las vitaminas y minerales porque carecen de valor nutricional, sin embargo, actúan como antioxidantes, protegiendo al ADN celular de los efectos dañinos oxidativos de los radicales libres y evitando mutaciones que podrían causar cáncer²².

2.2.5 Micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo químicamente diverso de sustancias producidas por hongos filamentosos. El peso molecular de las micotoxinas varía aproximadamente de 100 g/mol, como la moniliformina y ácido nitropropiónico hasta 700 g/mol, como la fumonisina B1. La clasificación de una sustancia como micotoxina se realiza únicamente por el hecho de que es un metabolito secundario de un hongo filamentosos y tóxico para humanos o animales²³.

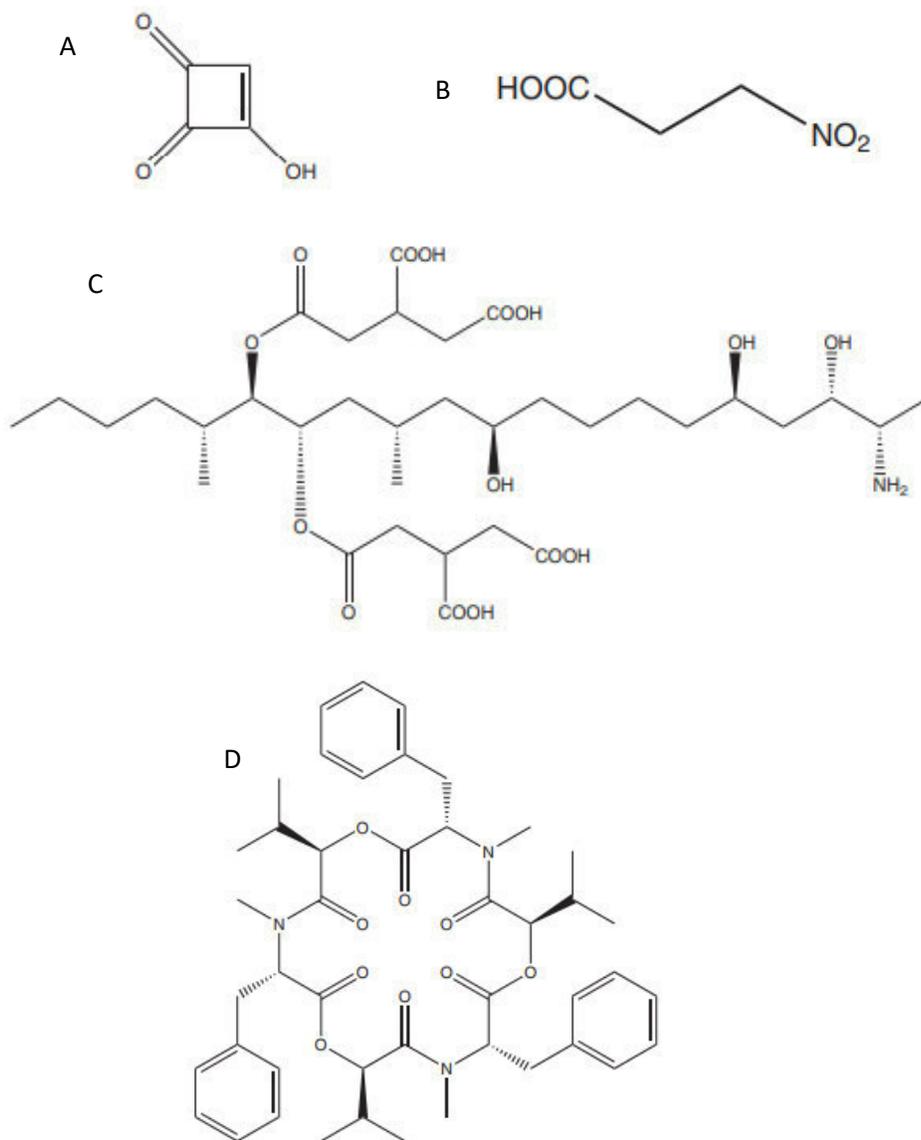


Figura 3. A. moniliformina; B. ácido nitropropiónico; C. fumonisina B1 y D. beauvericina.

La presencia de micotoxinas no se limita a los productos agrícolas, ya que los hongos pueden contaminar casi cualquier materia orgánica que presente humedad. Como resultado, el crecimiento de hongos en los materiales de construcción puede dar lugar a la producción de micotoxinas similares a las que se encuentran en los alimentos, como la esterigmatocistina o las toxinas de alternaria. Sin embargo, no todos los hongos producen la producción de micotoxinas²⁴.

Se han descrito espectroscópicamente más de mil metabolitos fúngicos, incluidas las micotoxinas identificadas como un problema de salud pública. La razón por la cual los hongos producen micotoxinas no se comprende completamente en todos los casos. Pero, la biosíntesis ha sido ampliamente estudiada y se identificaron las vías metabólicas típicas. Estas vías conducen a numerosos metabolitos secundarios, incluidas las micotoxinas²⁵.

En algunos casos, como el tricoteceno deoxinivalenol (DON), es un elemento clave en la patogenicidad, lo que permite que los hongos debiliten la planta y causen el color característico de la cabeza del *fusarium* (FHB) en el trigo²⁶.

Los efectos tóxicos de las micotoxinas difieren tanto como difieren en su estructura química, desde la aflatoxina B1 que es hepatotóxica y cancerígena para los humanos, clasificada en el del Grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC)²⁷.

La zearalenona (ZON) y sus metabolitos no se dirige a un órgano específico, la distribución es sistémica a humanos y animales, ya que son disruptores endocrinos. Los tricotecenos como el DON y la toxina T-2 interfieren con la síntesis de proteínas y, en consecuencia, producen numerosos efectos que van desde la disfunción inmune hasta el vómito²⁸.

Los riesgos para la salud de las micotoxinas deben evaluarse individualmente en función de su modo de acción, su presencia en alimentos y piensos, así como las vías metabólicas para la desintoxicación dentro de una especie.

2.2.6 Importancia de las micotoxinas

Las intoxicaciones por micotoxinas se conocen desde hace siglos y se producen brotes a intervalos irregulares. Los brotes históricamente más relevantes están relacionados con *Claviceps purpurea*, lo que resulta en ergotismo. Los cereales infestados con esclerocios de *C. purpurea* contienen alcaloides tóxicos del cornezuelo de centeno. Otros brotes importantes de micotoxicosis se describieron en el pasado, como el "beriberi cardíaco", que es causado por el consumo de arroz infestado con *Penicillium citreonigrum* y la "aleuquia tóxica alimentaria" en la década de 1940 en la antigua Rusia causada por toxinas *Fusarium* en los cereales que se dejaron en el campo durante el invierno afectando a los humanos y animales²⁹.

Inicialmente, la investigación se centró en la seguridad del maní para la alimentación animal, mientras que el alcance global del impacto de las aflatoxinas se aborda en la actualidad^{30,31}.

Actualmente, varias décadas después de los brotes de micotoxicosis, ocasionalmente ocurren como aflatoxicosis en regiones africanas o beriberi cardíaco en Brasil. Este hallazgo allanó el camino para el desarrollo de una serie de métodos analíticos basados en la cromatografía de aflatoxinas y muchas otras micotoxinas³²⁻³³.

En el curso del desarrollo instrumental y analítico, se discutió una cantidad de micotoxinas como contaminantes potenciales de alimentos y piensos, sin embargo, solo se ha identificado una fracción que potencialmente puede imponer un riesgo general para la salud pública. Estos están regulados en muchas partes del mundo, mientras que la Unión Europea (UE) tiene la regulación más extensa sobre micotoxinas en los alimentos³⁴⁻³⁶.

Actualmente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realiza esfuerzos para evaluar las micotoxinas "emergentes" y su potencial para la preocupación de la salud pública y animal. Las opiniones científicas resultantes de la EFSA abordan las preguntas científicas que necesitan los legisladores y los gestores de riesgos y en el pasado se han abordado varias micotoxinas, como alcaloides del

cornezuelo, toxinas de alternaria, beauvericina y otros. Esto ha sido fomentado por los avances recientes en el acoplamiento de la cromatografía líquida con la espectroscopía de masas, lo que permite la detección de cientos de metabolitos fúngicos con un solo método^{37, 38}.

Esta tecnología es actualmente la herramienta más útil para generar datos de ocurrencia, lo cual es un desafío clave para cualquier evaluador de riesgos como la EFSA o la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. La lista mundial de regulaciones sobre micotoxinas demuestra que casi 100 países han implementado regulaciones para micotoxinas en 2003 que cubren el 87 % de la población mundial y los niveles de aflatoxinas y ocratoxina en la legislación corresponden en la mayoría de los casos con los establecidos por el Codex Alimentarius³⁹.

Tabla 1. Límites de algunas micotoxinas establecidos por la Unión Europea 2017.

Micotoxina	Alimentos ug/kg		Piensos ug/kg	
	Nivel inferior	Nivel superior	Nivel inferior	Nivel superior
Aflatoxina total	0,1	5	5	20
Aflatoxina M1	0,05	0,025	-	-
Deoxinivalenol	50	750	900	1200
Fumonisinias	200	1000	5000	60000
Ocratoxina A	0,5	10	10	250
Zearalenona	20	200	100	3000
Toxina T2 y HT-2	15	200	50	2000
Patulina	10	50	-	-
Citrina	2000	2000	-	-
Esclerocios del centeno	500000	500000	1000000	1000000

2.2.7 Ocratoxina A

La ocratoxina A (OTA), se conoce como contaminante potencial en una serie de productos alimenticios y se ha monitoreado en las últimas décadas debido a que se ha encontrado OTA en una variedad de productos en todo el mundo. En la dieta humana, las principales fuentes de OTA son los cereales y derivados como el pan, la harina o la cerveza, seguidos de las uvas y sus derivados como el vino y mosto. El café es otro producto alimenticio importante frecuentemente contaminado con OTA, así como frutas y nueces, especias y cacao. Recientemente, el número de estudios sobre la presencia de OTA ha aumentado notablemente y la toxina se ha detectado en otros alimentos no convencionales como hierbas medicinales, regaliz, aceitunas y aceite de oliva. Es producido por algunos hongos *Penicillium* y *Aspergillus*. Una micotoxina a menudo asociada con la OTA es la citrinina, que llamó la atención en la Unión Europea debido a los niveles ocasionalmente encontrados en el arroz de levadura roja "fermentada", un producto tomado como medicina natural contra los niveles altos de colesterol. Ambas micotoxinas son nefrotoxinas potentes y están reguladas en la UE. La OTA se ha asociado con la nefropatía endémica de los Balcanes. La OTA se une fuertemente a la albúmina sérica⁴⁰. Esto permite el monitoreo de la exposición a largo plazo a OTA con facilidad en comparación con la mayoría de las otras micotoxinas que se excretan o metabolizan rápidamente. Debido al patrón de consumo y la aparición de OTA, es un biomarcador encontrado con frecuencia en humanos.

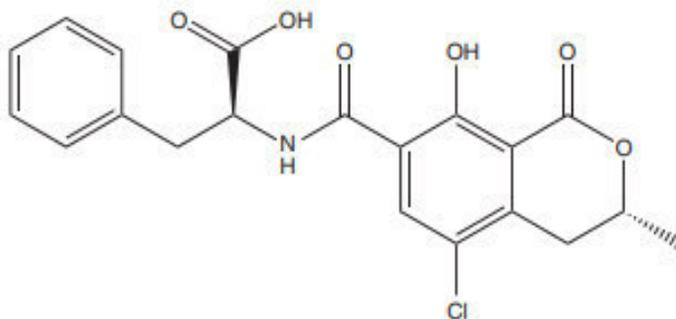


Figura 4. Ocratoxina A.

La ocratoxina A es una micotoxina muy extendida y el compuesto más tóxico en el grupo de las ocratoxinas. Estructuralmente, la OTA es un compuesto de isocumarina

clorada. Comúnmente, *Aspergillus ochraceus* ha sido considerada la principal especie productora de OTA desde la descripción de la toxina en 1965. Sin embargo, se sabe que varias especies son capaces de producir OTA y están incluidas en diferentes secciones de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Los *Aspergillus* negros están presentes en la uva del área mediterránea y en particular, *A. carbonarius* y algunas especies *A. niger* (*A. niger* y *A. welwitschiae*).

Recientemente, se ha informado que diferentes especies incluidas en la sección de *Aspergillus* producen OTA en niveles elevados, principalmente *A. steynii* y *A. westerdijkiae*. En climas fríos, dos especies incluidas en el género *Penicillium*, *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum*, también son importantes productoras de OTA.

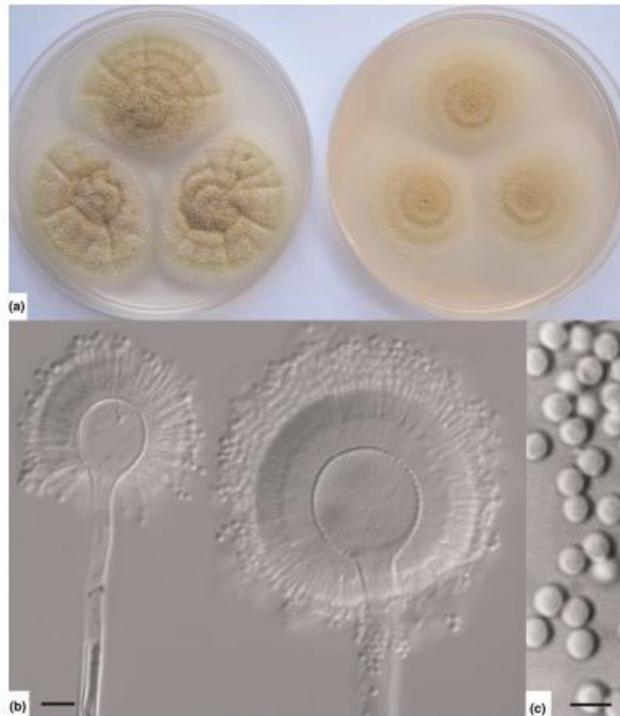


Figura 5. *Aspergillus westerdijkiae* (a) colonias en Agar extracto de levadura Czapek (CYA) y agar extracto de malta (MEA) 7 días 25°C. (b) estructuras de fructificación 10 μ m, (c) conidias 5 μ m.

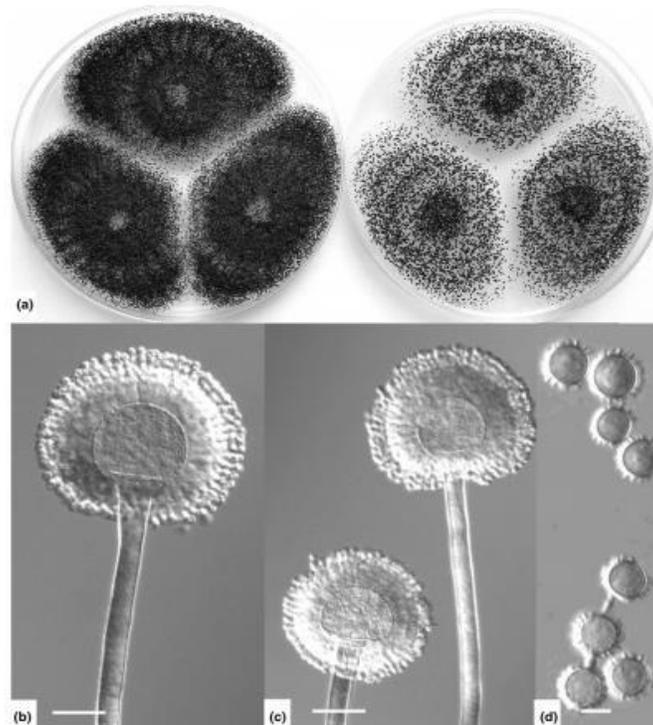


Figura 6. *Aspergillus carbonarius*. (a) Colonias en CYA y MEA, 7 días, 25° C; (b, c) estructuras de fructificación, 10 mm; y (d) conidios, 5 mm.

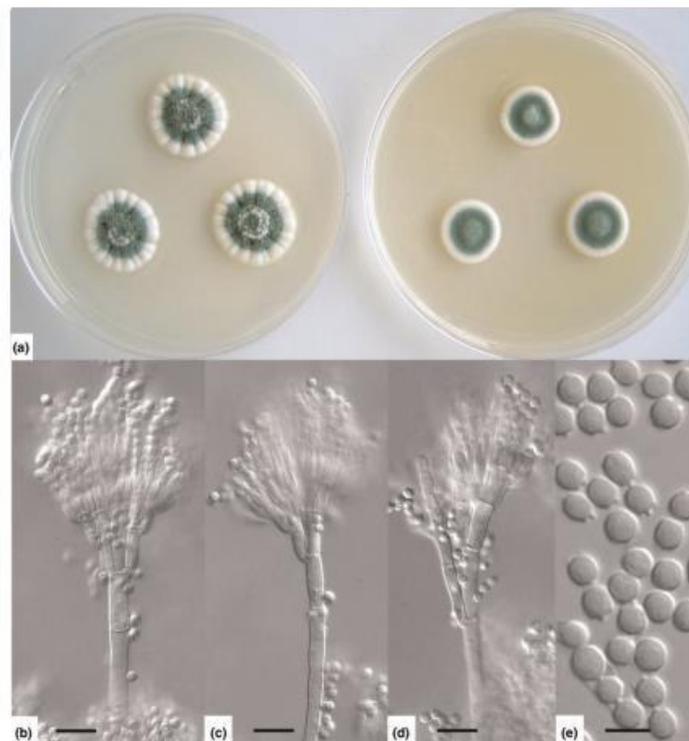


Figura 7. *Penicillium verrucosum*. (a) Colonias en CYA y MEA, 7 días, 25° C; (b, c, d) estructuras de fructificación, 10 mm y (e) conidios, 5 mm.

2.2.8 Toxicidad

La toxicidad de la OTA puede variar según la especie, el género y la vía de administración. La dosis letal media (DL50) de OTA se informa en varias especies animales como, ratones hembra (22 mg/kg vía intraperitoneal (v.i)), ratas macho (30,5 mg/kg, vía oral (v.o); 12,6 mg/kg, v.i), ratas hembra (21,4 mg/kg, v.o ; 14,3 mg/kg, i.v), pollos (3,3 mg/kg, v.o), pavos (5,9 mg/kg, v.o), codornices (16,5 mg/kg, v.o), pollitos de 1 día (3,6 mg/kg , v.o), trucha arcoiris (4,7 mg/kg, v.i), perro (0,2 mg/kg, v.o) y cerdos hembra (1 mg/kg, v.o).

Los efectos más sensibles y fundamentales de la OTA son sus efectos sobre el riñón en perros y cerdos, siendo las especies de animales más sensibles. En un estudio de alimentación crónica realizado en cerdas hembras, se obtuvo un nivel más bajo de efectos adversos observados de 8 mg/kg de peso corporal/día, basado en los efectos sobre las enzimas renales y las pruebas de función renal. No se observó nefropatía a 8 mg/kg de peso corporal por día. En otro estudio crónico (2 años) en cerdas hembras, se observó nefropatía progresiva, pero no insuficiencia renal, a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal por día. Entre estas investigaciones y otras sugirieron que la OTA tiene potencial para inducir nefrotoxicidad/nefropatía, hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, neuroinflamación y neurotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad⁴¹⁻⁴⁹.

Otros efectos tóxicos de OTA observados incluyen anomalías histológicas cardíacas y hepáticas, aberración de factores de coagulación en ratas, acompañado de hemorragia y trombosis en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, lesiones del tracto gastrointestinal y tejidos linfoides en hámster, mielotoxicidad en ratones y fragilidad intestinal y lesiones renales en pollos⁵⁰.

Los órganos diana para la OTA son los riñones y el sistema nervioso en desarrollo⁵¹⁻⁵². Después de la exposición con una dosis aguda alta, la OTA produce necrosis de túbulos renales y células hepáticas periportales donde se observan los principales cambios patológicos. Los efectos nefrotóxicos están relacionados con el hecho de que la OTA

interactúa con el hierro, formando un complejo y produciendo radicales hidroxilos que promueven la peroxidación lipídica. El daño renal se caracteriza morfológicamente por atrofia del túbulo proximal, fibrosis y esclerosis. Se caracteriza funcionalmente por la incapacidad de la función tubular, que se muestra por una capacidad reducida para concentrar la orina⁵³.

Aparte de la nefropatía y los tumores urinarios, la evidencia de toxicidad humana es escasa. La enfermedad renal humana es asociada con la OTA y es reportada principalmente en Europa (Bulgaria, Croacia y países vecinos) donde la OTA es relativamente alta en la dieta⁵⁴⁻⁵⁵.

Observaciones similares también se hacen en Egipto y Turquía, donde tanto hombres como mujeres que presentan tumores del tracto urinario tenían niveles elevados de OTA en sangre y orina. Aproximadamente un tercio de los pacientes que mueren por enfermedad renal humana tienen papilomas y/o carcinomas de la pelvis renal, el uréter o la vejiga.

Según los datos en animales, la OTA se ha clasificado como posible carcinógeno humano en el Grupo 2B⁵⁶.

Se ha sugerido que la OTA puede causar cáncer testicular en humanos. Las tasas de incidencia de cáncer testicular en 20 países se correlacionaron significativamente con el consumo de café y carne de cerdo que contenía OTA. Schwartz y Srinivasa proporcionaron evidencia molecular de que la OTA es una causa plausible de cáncer testicular en ratones y humanos⁵⁷⁻⁵⁸. Sin embargo, Mantle no encontró evidencia experimental de que la OTA produzca cáncer testicular en ratas y ratones⁵⁹.

2.2.9 Toxicocinética

La OTA se absorbe en el estómago debido a sus propiedades liposolubles, no ionizadas y ácidas (pKa 5 a 7,1)⁶⁰. La absorción de OTA también tiene lugar en el duodeno y yeyuno, interviene en la circulación enterohepática y su excreción biliar es muy eficaz⁶¹⁻⁶².

La OTA se distribuye a varios órganos, principalmente a los riñones, en el hígado, los músculos y tejido adiposo contienen concentraciones más bajas. Después de la administración oral, el porcentaje global de absorción de OTA es del 66% en cerdos, 56% en ratas, 56% en conejos y 40% en pollos⁶³⁻⁶⁴. Después de una sola dosis oral, las concentraciones máximas de OTA se encuentran en 48 h en cerdos y ratas⁶³⁻⁶⁴, 24 h en terneros⁶⁵, después de 1 h en conejos y después de 0,33 h en pollos⁶⁶. Las concentraciones tisulares máximas en los tejidos de las ratas ocurren en 48 h⁶⁴.

La OTA ha mostrado una alta afinidad de unión por las proteínas plasmáticas. demostraron que las ratas macho tenían menor biodisponibilidad de OTA que las hembras debido a la proteína alfa-2u-globulina específica del macho⁶⁷.

La OTA se encontró en orden decreciente en concentraciones de riñón, hígado, grasa y músculo. La semivida sérica de la OTA es larga y varía ampliamente entre especies, con valores de 2439 h en ratones; 55120 h en ratas: 6,7 h en codornices; 510 h en monos; 72120 h en cerdos; 4,1 h en pollo y 840 h en un ser humano⁶⁸⁻⁷¹. Se ha demostrado que el ayuno aumenta la tasa de absorción de OTA y sus concentraciones plasmáticas máximas en ratas⁶⁸.

La toxicocinética de OTA en cerdos reveló que el riñón es generalmente el tejido más contaminado y son aproximadamente cinco veces mayores que los niveles en la sangre. El nivel de OTA en el riñón de cerdo es de 12,1 ng/g (resultante de aproximadamente 1000 ng/g en el alimento), sus niveles serían de 7,8 ng/g en el hígado 4,2 ng/g en el músculo y 2,8 ng/g en tejido adiposo. En los rumiantes, la OTA suele hidrolizarse en el estómago por los protozoos y las enzimas bacterianas y, en consecuencia, se encuentra poca OTA en los tejidos⁷²⁻⁷³.

En el contexto del metabolismo, se examinan varios tejidos de todas las especies, la OTA se hidroliza a ocratoxina alfa, que es el principal metabolito⁷⁴. Este proceso de desintoxicación también tiene lugar en el ciego de ratas y es facilitado por la microflora bacteriana⁷⁵. Las enzimas responsables de la hidrólisis a ocratoxina alfa en vacas,

ovejas y roedores son la carboxipeptidasa A y la quimotripsina. Suzuki y col. demostraron que el homogeneizado de tejido de rata del duodeno, íleon y páncreas también tiene una alta actividad de estas enzimas para catalizar esta reacción⁷⁶.

La actividad de estas enzimas en el hígado y los riñones es baja. Los estudios en ratones sugieren que la OTA circula desde el hígado hacia la bilis y hacia el intestino, donde se hidroliza a ocratoxina alfa⁷⁷. Aproximadamente el 25% al 27% de OTA, ya sea por vía intravenosa o por vía oral a ratas, se encontró ocratoxina alfa en la orina. Su presencia en la orina se puede explicar por la reabsorción del intestino. Se ha sugerido que ocurre un mecanismo similar de reabsorción intestinal de ocratoxina alfa en terneros rumiante⁷⁸.

En ovejas, se demostró que la hidrólisis de OTA en el tracto gastrointestinal fue sustancialmente menor que la descrita anteriormente, especialmente si la OTA se ingirió en combinación con dietas ricas en concentrados⁷⁹.

La OTA y sus metabolitos se excretan en la orina y las heces en todas las especies. La OTA también en la leche de algunos animales mamíferos y humanos⁸⁰, pero muy poco se excreta en la leche de vaca debido a su metabolismo por la microflora ruminal. Esta ruta es de importancia porque la leche es consumida por la descendencia. Posteriormente a su excreción urinaria, la OTA se reabsorbe en todos los segmentos de la nefrona. La excreción de OTA puede verse influida por la vía de administración, la dosis y el sexo, la edad y el peso del animal, como anteriormente se explicó. La excreción de OTA también se ve afectada por la extensión de la circulación enterohepática y la unión a la albúmina sérica y otras macromoléculas. La constante de asociación para la unión de la OTA a la albúmina sérica es $7,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para cerdos; $5,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ por mol para pollos y $4,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ por mol para ratas⁶⁴⁻⁶⁸.

La transferencia placentaria de OTA en especies de mamíferos como ratones, ratas y cerdos es bien conocida. Sin embargo, en rumiantes la transferencia placentaria de OTA es muy pequeña. Después de la administración intravenosa de una dosis alta de

OTA (1 mg/kg de peso corporal) a ovejas preñadas, no detectaron OTA en el líquido amniótico y los niveles de tejido fetal fueron 400 a 1000 veces más bajos que en la sangre materna⁸¹. El mecanismo exacto involucrado en la transferencia placentaria de OTA aún no se ha dilucidado. La OTA puede estar presente en los huevos debido a su excreción biliar si las gallinas ponedoras están expuestas a esta micotoxina en dosis elevadas⁸².

A estas alturas, está claro a partir de varios estudios en animales que la OTA tiene un alto grado de biodisponibilidad, una baja tasa de aclaramiento plasmático y una larga vida media tisular. Debido a las diferencias en la fisiología animal, se observan amplias variaciones en los patrones toxicocinéticos de la OTA.

Tabla 2. Ensayos realizados para la identificación de OTA y metabolitos.

Especie	Método experimental	Material Analizable	Método de detección
Humano	In vitro	Microsomas del hígado	UPLC-Q / TOF-MS
Mono	In vitro	Células epiteliales del pulmón y células de riñón	HPLC
Rata	In vitro	Orina	HPLC
		Riñón y bazo	LC-MS / MS
		Microsomas del hígado	UHPLC
		Hepatocitos	ESI MS / MS
		Páncreas y duodeno	Espectrómetro de centelleo líquido
Conejos	In vitro	Fracciones microsomales de hígado	HPLC
Cerdos	In vitro	Microsomas del hígado	UPLC-Q / TOF-MS
Vacas	In vitro	Microsomas del hígado	UPLC-Q / TOF-MS
Ovejas	In vitro	Contenido estomacal y estomago	HPLC-Q / FLD and LC-MS / MS
Pollos	In vitro	Microsomas del hígado	UPLC-Q / TOF-MS
Cabras	In vitro	Microsomas del hígado	UPLC-Q / TOF-MS

2.2.10 Mecanismo de acción

La toxicidad de OTA es multifacética y compleja, y como resultado, están involucrados múltiples mecanismos. La OTA es un genotóxico comprobado tanto en estudios in vitro como in vivo, pero el mecanismo de genotoxicidad no está claro por interacción directa con el ADN. Se sugiere que la OTA puede causar daño genético en los tejidos objetivo y no objetivo, independientemente de la unión covalente directa al ADN. La evidencia indica que la toxicidad renal específica del sitio, así como el daño en el ADN y la genotoxicidad de OTA, es más probable que se atribuya al daño oxidativo celular. OTA, al competir con la reacción de aminoacilación de fenilalanina catalizada por la fenilalanina tRNA ligasa (Phe-tRNA sintasa), provocó la inhibición de la síntesis de proteínas, ADN y ARN⁸³⁻⁸⁴.

Varias líneas de observaciones experimentales demuestran que la OTA causa daño y disfunción mitocondrial. La OTA deteriora la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa a través de la interferencia con la membrana mitocondrial y por la inhibición de las actividades de transferencia de electrones con soporte de succinato de la cadena respiratoria, y el agotamiento de ATP. La OTA también altera la homeostasis hepática del calcio microsomal al alterar la membrana del retículo endoplásmico a través de la peroxidación lipídica⁸⁵.

Se ha demostrado que la OTA causa cambios patológicos en la ultraestructura de las mitocondrias en el hígado y en los túbulos contorneados proximales (PCT) y glomérulos de los riñones. Estos cambios incluyen formas anormales, matriz mitocondrial agrandada y gotas de lípidos excesivos.

La OTA aumentó la peroxidación lipídica tanto en estudios in vitro como in vivo, indican la generación excesiva de radicales libres y estrés oxidativo. Finalmente, se evidencia a la muerte celular en hepatocitos y túbulos proximales⁸⁶⁻⁸⁷. La OTA causa la muerte celular por apoptosis, que está mediada por procesos celulares involucrados en la degradación del ADN. Curiosamente, la OTA causaba cariomegalia, actividad de

proliferación celular, apoptosis, daño al ADN, aberraciones del ciclo celular y detención del ciclo celular, sin inducir estrés oxidativo.

En una investigación in vitro, la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos por OTA y el retraso de la cinética de reparación del ADN a concentraciones (1,5 y 5 mM) que no son ni citotóxicas ni citostáticas. Sin embargo, encontraron que la OTA, a concentraciones de 1 y 5 mM, no causa genotoxicidad en los leucocitos humanos⁸⁸⁻⁸⁹.

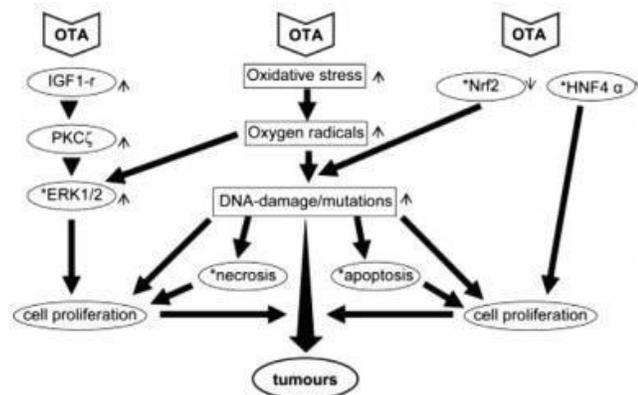


Figura 8. Representación del mecanismo de acción de OTA

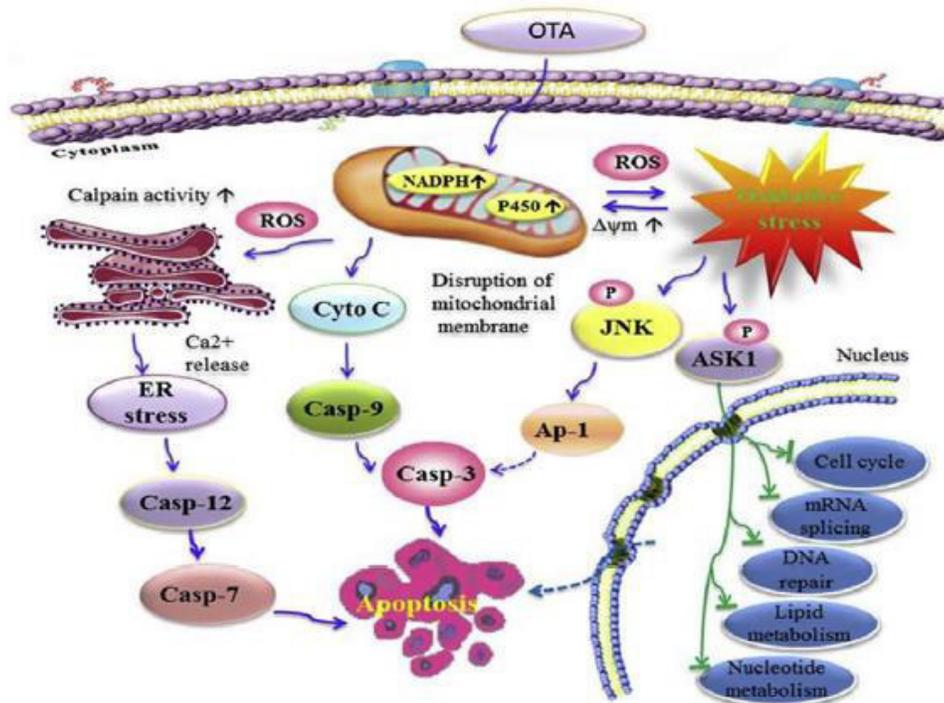


Figura 9. Estrés oxidativo generado por la OTA

2.2.11 Evaluación de riesgo

OTA es el componente principal y el más tóxico entre todas las ocratoxinas. Según el estudio de carcinogenicidad del Programa Nacional de Toxicología en ratas, la ingesta diaria tolerable estimada (TDI) en humanos oscila entre 0,2 y 4,2 ng/kg de peso corporal, dependiendo del método de extrapolación utilizado. La Organización Mundial de la Salud estableció el valor de TDI de 5 ng OTA/kg de peso corporal por día. Se informó que el TDI provisional de OTA por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios fue de 17 y 14 ng/kg de peso corporal por día, respectivamente⁹⁰. Dada la vida media relativamente larga de la OTA en humanos, se determina una ingesta semanal tolerable de 120 ng/kg de peso corporal/semana, lo que equivale a un TDI de 17,1 ng/kg de peso corporal/día. recomendaron la detección de ocratoxina alfa en estudios de biomonitordeo para OTA. Actualmente, no hay un nivel regulatorio establecido para la citrinina debido a la falta de datos suficientes⁹¹⁻⁹².

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Instrumentos de laboratorio

3.1.1. Materiales

- Tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer de 250 mL, probetas de 25, 50 y 100 mL, vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 mL, matraz aforado de 10, 25, 500 y 1000 mL, pipetas, embudo, baguetas, micropipetas de 20-200uL, micropipetas de 100 – 1000uL, gradillas, puntas para micropipeta, soporte universal, pinzas, papel Whatman N°42, papel de filtro rápido.

3.1.2. Equipos

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-SHIMADZU: desgasificador DGU-20A5R, automuestreador SIL-30AC, bomba cuaternaria LC-30AD, horno de columna: CTO-20AC, detector de fluorescencia RF-20Axs, control de sistema SBM-20^a, columna cromatográfica RP C18 de 250 mm x 4,6 mm ID x 5 µm partícula (Restek), Agitador magnético Thermo Scientific Cimarec, balanza analítica GR-300 AND, estufa, baño ultrasónico WISD, ultrapurificador de agua ELGA PURELAB CLASSIC UV y columnas de inmunoafinidad NEOCOLUMN.

3.1.3. Insumos químicos

- Estándar de Ocratoxina A 99.18%, metanol HPLC, acetonitrilo HPLC, ácido acético grado analítico, buffer fosfato salino pH= 7,40; agua ultrapura, agua destilada. Los insumos químicos fueron adquiridos de la industria Merck.

3.2. Parte experimental

3.2.1 Colecta de la muestra

Los granos *Zea mays* L. Var. Purple “maíz morado” fueron provenientes del centro poblado de Santa Rosa de Callancas, provincia de San Pablo del departamento de Cajamarca, Las actividades de muestreo se realizaron en el periodo comprendido en el mes de octubre a diciembre. Las muestras analizadas tuvieron como característica un buen estado de conservación.

3.2.2 Lugar de ejecución de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y en el Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).

3.2.3 Tratamiento de la muestra y extracción de OTA

Los granos fueron secados en una estufa a 40°C durante 7 días. Posteriormente las muestras fueron sometidas a la reducción de partículas con un molino de cuchillas 1 mm.

Se utilizó 25 g de muestra, adicionándose 100 mL de acetonitrilo al 60%. La solución paso por un agitador magnético a 350 RPM durante 3 minutos. Se dejó decantar la solución por 5 minutos y se trasvaso el líquido a una probeta de 50 mL.

La solución se filtró al vacío con papel Whatman N°42, de los cuales 5 mL fueron pasado por un filtro de 0,22 µm, utilizándose 4 mL con 46 mL de solución buffer PBS.

Con una de jeringa de 50 mL, se pasó la solución de 50 mL a través de la columna gota a gota, evitando que la columna se seque. Posteriormente se lavó la columna pasando 20 mL de PBS.

Se eluyó lentamente la ocratoxina A unida a la columna, haciendo pasar 0,75 mL de ácido acético/metanol de grado HPLC (2:98) a través de la columna. Se enjuagó tres veces con el mismo volumen a través de la columna para asegurar la eliminación completa de la ocratoxina A unida. Se recogió la ocratoxina A eluida en un vial de vidrio ámbar limpio. NOTA: el lavado a contracorriente se realizó con una jeringa de 5 mL o menos. Luego, se pasó 0,75 mL de metanol a través de la columna gota a gota. Y se recogió el eluyente en el mismo vial de vidrio. Finalmente se agregó 1,5 mL de agua ultrapura en la columna. Se recogió este eluyente en el mismo vial de vidrio.

3.2.4 Preparación de la curva de calibración

La solución principal del estándar de OTA se preparó diluyendo 1 mg de estándar de OTA en 50 mL de Metanol, teniendo una concentración de 20 ppb. A partir de la solución principal, se preparó la solución de trabajo, los estándares utilizados para la construcción de la curva de calibración, cuyas concentraciones fueron de 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 7,5 µg/L y la solución de contaminación para evaluar la prueba de recuperación.

3.2.5 Pruebas de recuperación

La finalidad es evaluar la eficacia del proceso de extracción. Se procedió elaborando un blanco para los granos de maíz morado, contaminado al nivel de 1 µg/kg con estándar de OTA. Las muestras de recuperación fueron sometidos al mismo proceso de extracción.

3.2.6 Cuantificación por HPLC

Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia siguiendo los parámetros recomendados por Ramos.

La longitud de onda de excitación fue de 333 nm y la de emisión fue de 460 nm. La temperatura del horno de la columna fue de 25 °C. La elución fue a un flujo constante de 1 mL/min y CH₃CN (ácido acético 1%) – H₂O (ácido acético 1%) (50:50 v/v) como el sistema de eluyentes inicial. El sistema inicial fue linealmente

modificado a un CH3 CN 100 % en 20 minutos. Después de 3 minutos de permanecer constante, el sistema fue restablecido linealmente a su condición inicial en 10 minutos, sumando un tiempo total de 33 minutos por análisis. Los eluyentes fueron preparados en el momento y filtrados (0,45 µm) antes de su uso. Para la lectura de los estándares se realizaron tres inyecciones y dos para el análisis de las muestras. Todas las muestras se filtraron a través de filtro de jeringa (0,45 µm) antes de la inyección (25µL) a la columna cromatográfica. La identificación de OTA se realizó utilizando el tiempo promedio de retención de las diluciones de trabajo. Este tiempo se obtuvo midiendo diez veces el estándar de trabajo a una concentración de 0,05 ppb, procedimiento que también fue útil para obtener el límite de detección (LDD). El tiempo de retención promedio fue de 8,245 minutos (RSD=0,055 %) y el LDD fue de 0,100 ppb.

3.2.7 Cálculo del límite de Detección

El límite de detección es la cantidad mínima necesaria de un componente que puede ser reconocido como un pico en los cromatogramas LC. El método aplicado para el análisis de acuerdo al instrumento es el de la relación señal – ruido. Se realizaron 10 repeticiones del estándar de menor concentración de la curva de calibración (0,09918ug/L) para el cálculo del límite de detección.

El software usa la relación S/N para determinar el límite de detección según la siguiente ecuación:

$$\text{LDD} = A \times \text{Conc} \times N / S \dots (\text{Ec. 01})$$

LDD = Límite de detección

A = Coeficiente (3,3)

Conc = concentración del pico

N = ruido

S =Altura del pico

3.2.8 Análisis micotoxigénico

Procesamiento de mazorcas

a) Método directo

Para la obtención de hongos se tomó de 3 a 5 granos por mazorca, se inoculó a un matraz con 90mL de Solución salina (SS) (10^{-1}) más una gota de tween 80 estéril, se dejó en agitación a 120 rpm por 15 min, luego se tomó 1mL de esta y se colocó en un tubo de 9mL con SS estéril (10^{-2}), realizando diluciones seriadas hasta 10^{-4} , de las últimas tres diluciones se tomó 100 μ l y fueron sembradas por diseminación en placas con Agar Papa Dextrosa (APD) más Gentamicina 0,5mL al 10%, finalmente se incubo a 28°C por 5 días.

b) Método indirecto

En la obtención de hongos por este método, se realizó un pre enriquecimiento de los granos en caldo YPG incubándolo por 24h a 28°C a 120 rpm de agitación y luego de ese periodo se tomó 1mL de esta y se colocó en un tubo de 9mL con SS estéril (10^{-1}), realizando diluciones seriadas hasta 10^{-4} , de las últimas tres diluciones se tomó 100 μ l y fueron sembradas por diseminación en placas con APD más Gentamicina 0,5mL al 10%, finalmente se incubo a 28°C por 5 días.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Curva de calibración

Tabla 3. Valores de los estándares de ocratoxina A.

Niveles	Concentración Ajustada	Área	Área promedio
1	0,099	347	348,5
		350	
2	0,496	1772	1764
		1756	
3	0,992	3584	3574,5
		3565	
4	1,984	8919	8936,5
		8954	
5	4,959	18961	18997
		19012	
6	7,439	29521	29522
		29523	

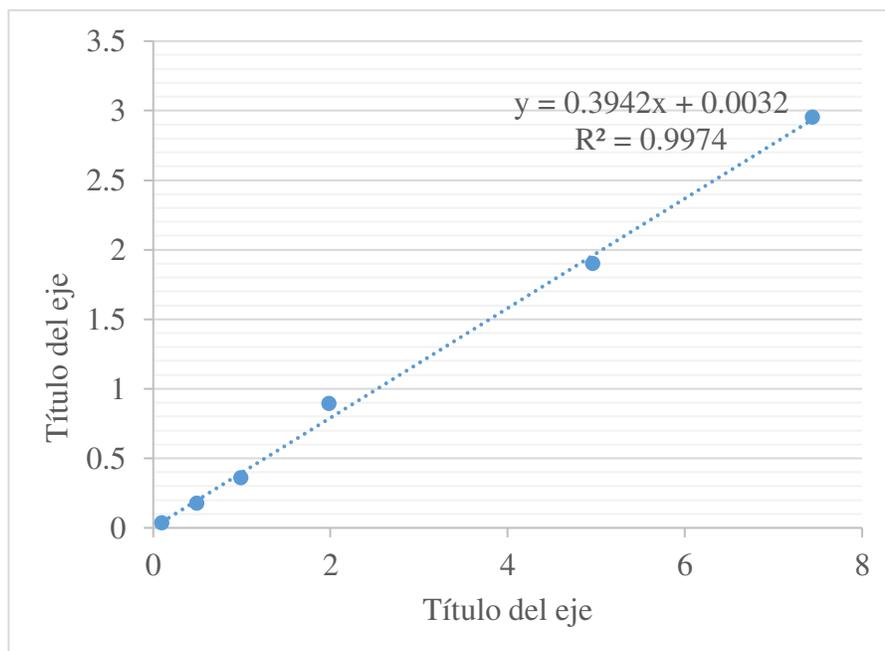


Figura 10. Gráfico de dispersión del área de los picos vs concentración de OTA.

Tabla 4. Estadísticas de la curva de calibración.

#	Concentración ug/L	Área Iny 1	Área Inye 2	Área Prom	Desviación estándar SD	Desviación estándar relativa RSD %
1	0,099	347	350	348,5	2.12E+00	0,609
2	0,496	1772	1756	1764	1.13E+01	0,641
3	0,992	3584	3565	3574,5	1.34E+01	0,376
4	1,984	8919	8954	8936,5	2.47E+01	0,277
5	4,959	18981	19012	18996,5	2179E+01	0,115
6	7,439	29521	29523	29522	1.41E+00	0,005

4.2. Límite de detección**Tabla 5.** Resultados del límite de detección (LDD)

Repetición	Tiempo	Área	Altura	Conc (ug/L)	Ruido	LDD
1	8,145	325	52	0,0743	8,91	0,042
2	8,13	320	51	0,0730	8,47	0,040
3	8,124	327	52	0,0748	8,28	0,039
4	8,125	321	52	0,0733	8,41	0,039
5	8,122	329	53	0,0754	8,04	0,038
6	8,121	323	53	0,0740	8,29	0,038
7	8,12	319	52	0,0730	8,3	0,038
8	8,116	316	53	0,0722	8,14	0,037
9	8,117	324	52	0,0741	8,35	0,039
10	8,109	321	52	0,0734	8,31	0,039
Promedio	8,123	322,5	52,2	0,0737	8,35	0,039
Desviación	0,010	3,9	0,6	0,0010	0,23	0,001
RSD	0,118	1,208	1,212	1,294	2,778	3,728

4.3. Cromatogramas de las muestras

Tabla 6. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 1

Señal /pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,878	1285	143	-	-	-
2	2,433	165	27	-	-	-
3	2,713	1013	155	-	-	-
4	2,815	1515	210	-	-	-
5	2,947	970	145	-	-	-
6	3,732	106	22	-	-	-
7	3,880	108	17	-	-	-
8	6,615	619	98	-	-	-
9	8,102	14358	2196	3,634	µg/L	OTA
10	11,419	508	77	-	-	-
Total		20649	3091			

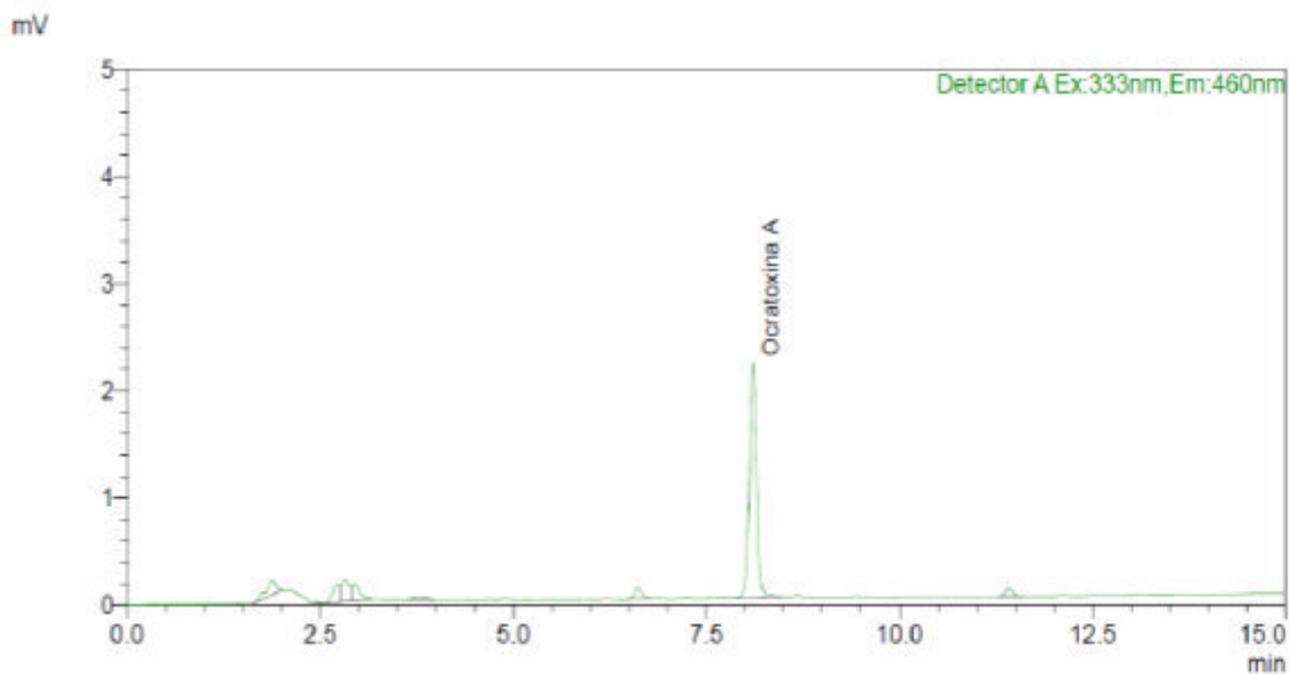


Figura 11. Cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 1

Tabla 7. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 2

Señal /pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	Unidades	Compuesto
1	1,857	1330	130	-	-	-
2	2,547	1016	117	-	-	-
3	2,673	473	124	-	-	-
4	2,844	3327	239	-	-	-
5	3,88	115	17	-	-	-
6	6,613	632	101	-	-	-
7	8,099	14396	2206	3,644	µg/L	OTA
8	11,417	495	77	-	-	-
Total		21785	3012			

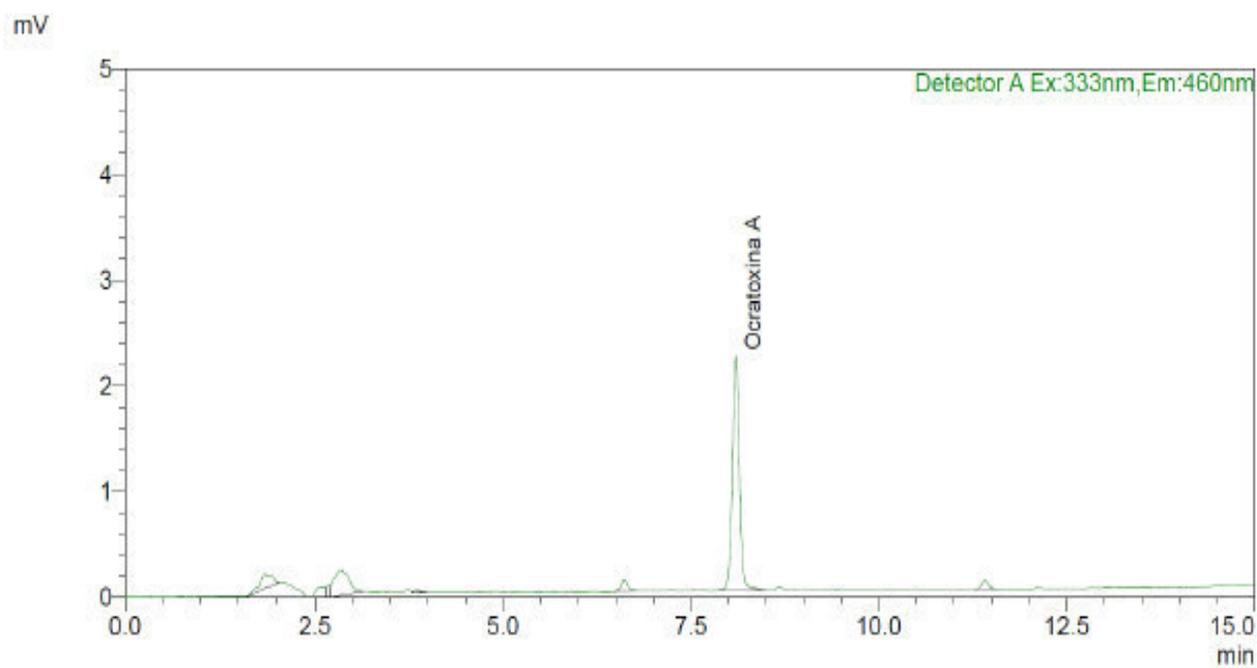


Figura 12. Cromatograma HPLC de la muestra 1- inyección 2

Tabla 8. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 1

Señal /pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	Unidades	Compuesto
1	1,747	160	34	-	-	-
2	1,882	778	88	-	-	-
3	2,617	821	93	-	-	-
4	2,81	2186	188	-	-	-
5	2,966	817	118	-	-	-
6	6,618	544	83	-	-	-
7	8,102	17554	2654	4,445	µg/L	OTA
8	8,679	209	29	-	-	-
9	11,419	519	81	-	-	-
Total		23588	3368			

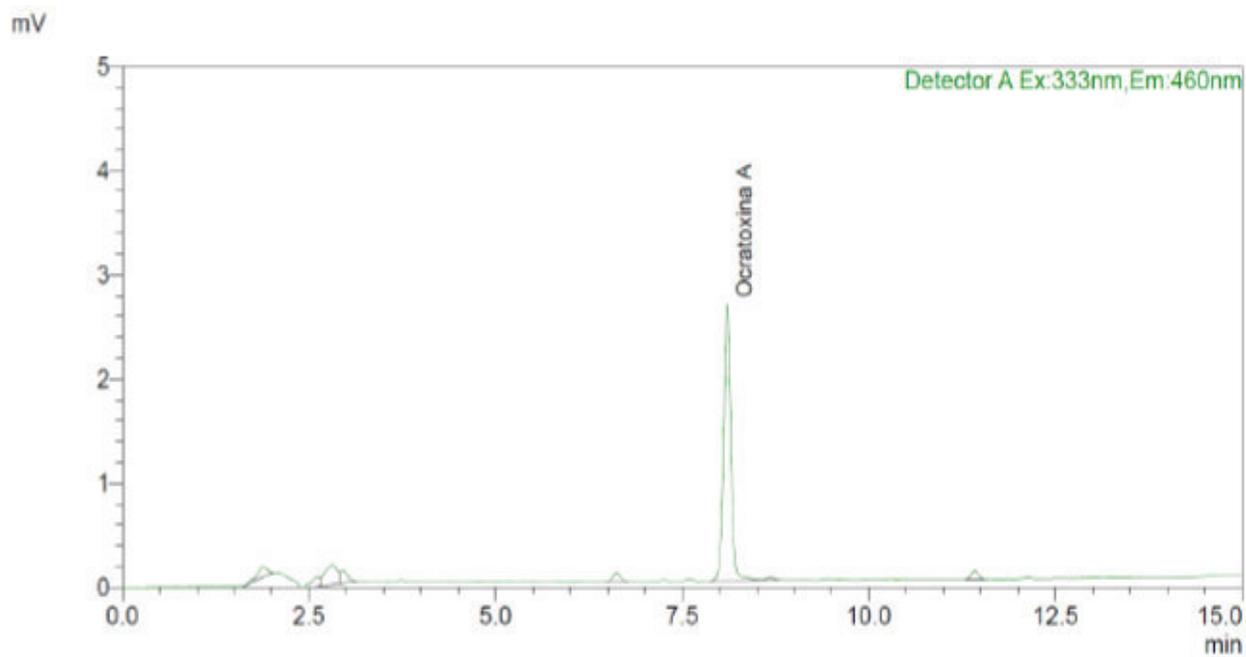


Figura 13. Cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 1

Tabla 9. Datos de cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 2

Señal/ pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	Unidades	Compuesto
1	1,747	498	86	-	-	-
2	1,868	2656	204	-	-	-
3	2,133	2096	142	-	-	-
4	2,520	376	64	-	-	-
5	2,653	1065	132	-	-	-
6	2,902	3301	225	-	-	-
7	3,867	306	60	-	-	-
8	6,622	523	84	-	-	-
9	8,105	17385	2665	4,402	µg/L	OTA
10	8,678	136	26	-	-	-
11	11,424	517	80	-	-	-
Total		28860	3768			

mV

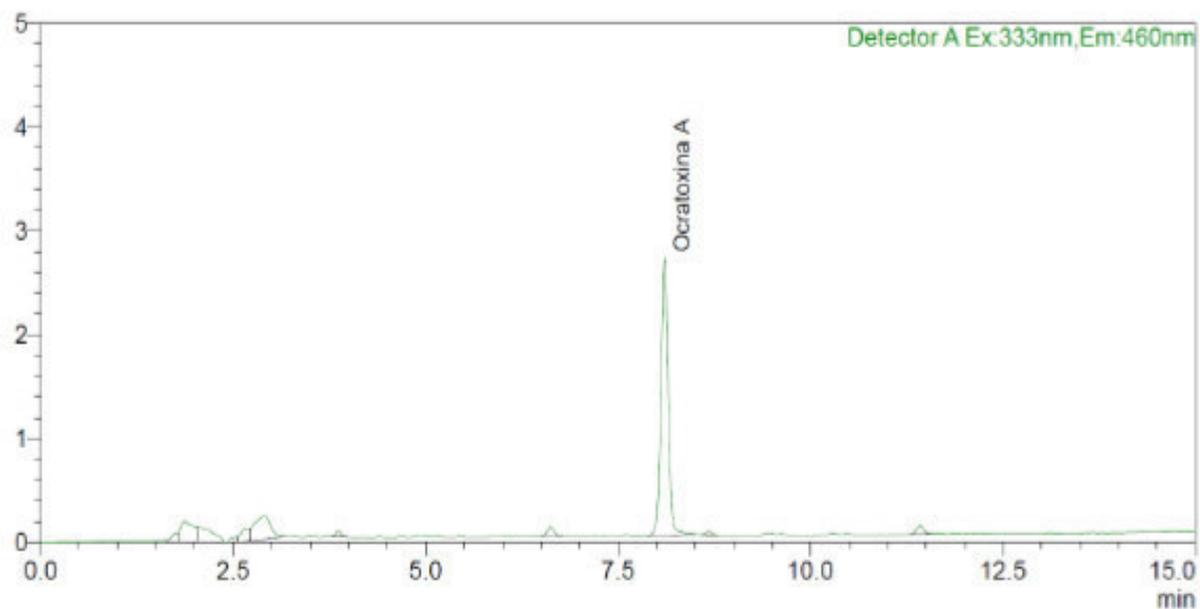


Figura 14. Cromatograma HPLC de la muestra 2- inyección 2

4.4 Cromatogramas de la prueba de recuperación

Tabla 10. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 1

Señal/ pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	Unidades	Compuesto
1	1,74	145	27	-	-	-
2	1,87	712	95	-	-	-
3	2,473	145	32	-	-	-
4	2,64	757	107	-	-	-
5	2,876	1999	162	-	-	-
6	2,96	718	136	-	-	-
7	6,608	792	125	-	-	-
8	8,091	15507	2392	3,926	µg/L	OTA
9	8,668	104	20	-	-	-
10	11,406	386	62	-	-	-
Total		21266	3159			

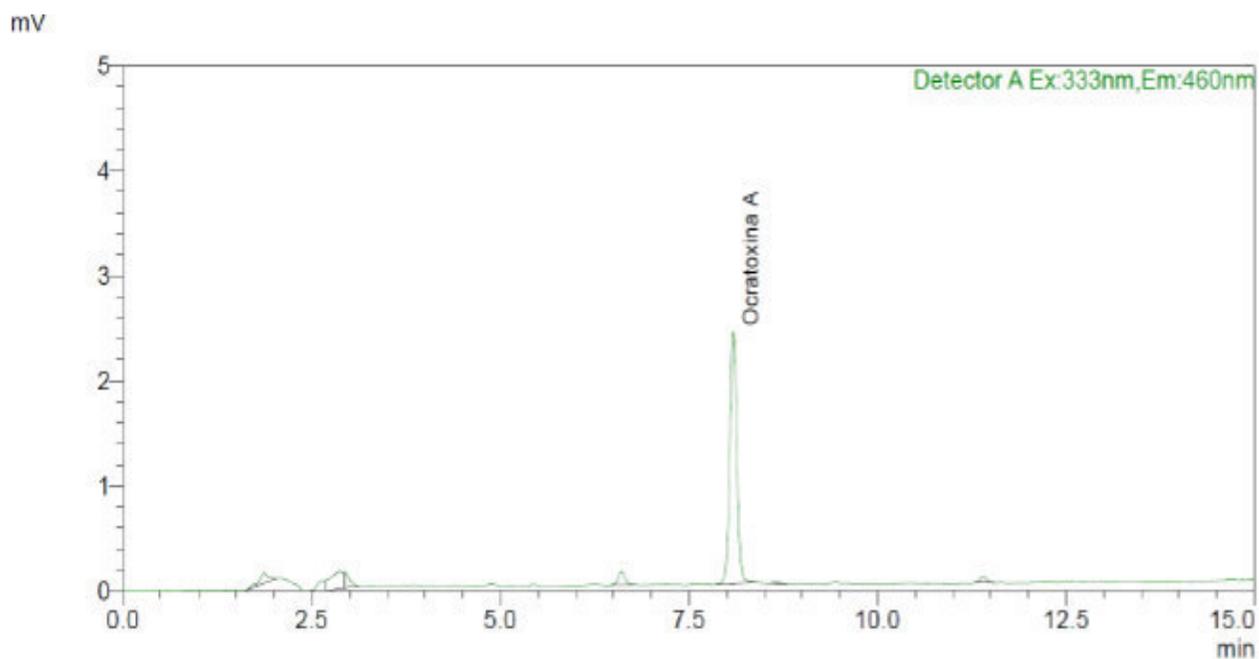


Figura 15. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 1

Tabla 11. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 2

Señal/ pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	Unidades	Compuesto
1	1,884	2615	171	-	-	-
2	2,14	2172	137	-	-	-
3	2,613	890	105	-	-	-
4	2,853	2978	217	-	-	-
5	6,609	819	129	-	-	-
6	8,095	15525	2394	3,93	µg/L	OTA
7	11,410	399	63	-	-	-
Total		25399	3217			

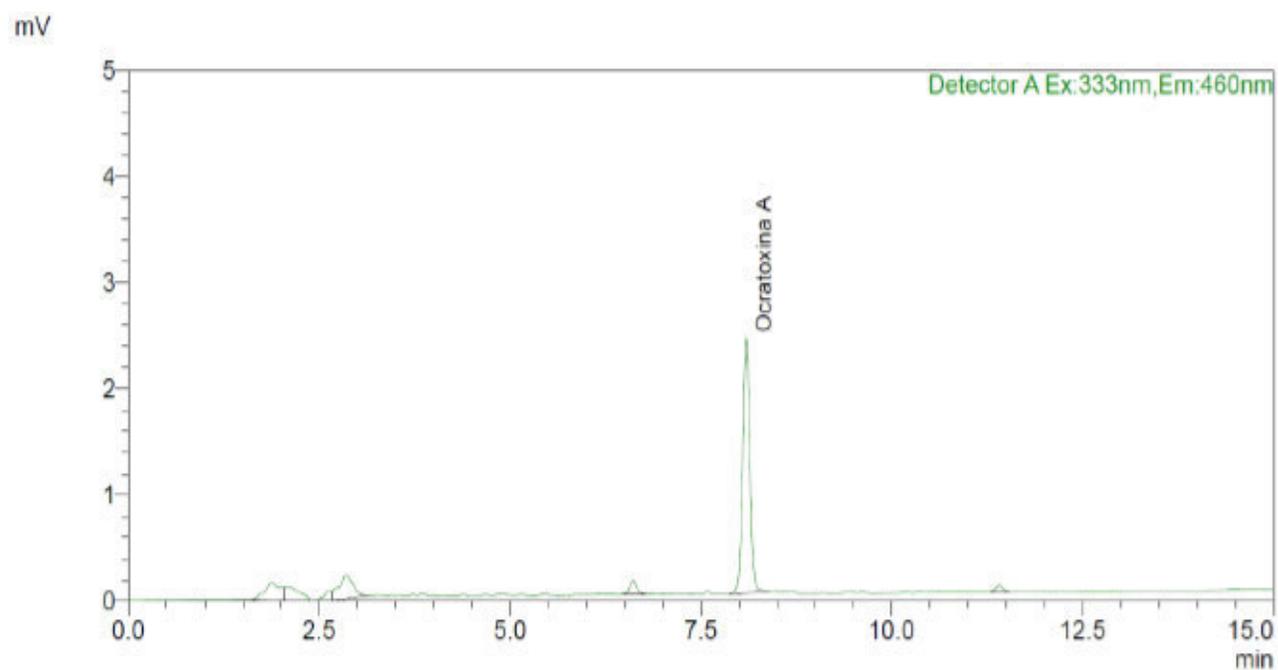


Figura 16. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 1- inyección 2

Tabla 12. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 1

Señal/ pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,740	177	39	-	-	-
2	1,862	859	99	-	-	-
3	2,469	193	37	-	-	-
4	2,657	669	104	-	-	-
5	2,885	3022	211	-	-	-
6	3,86	210	40	-	-	-
7	5,958	143	29	-	-	-
8	6,609	821	131	-	-	-
9	8,093	17317	2679	4,385	µg/L	OTA
10	11,408	503	77	-	-	-
Total		23914	3445			

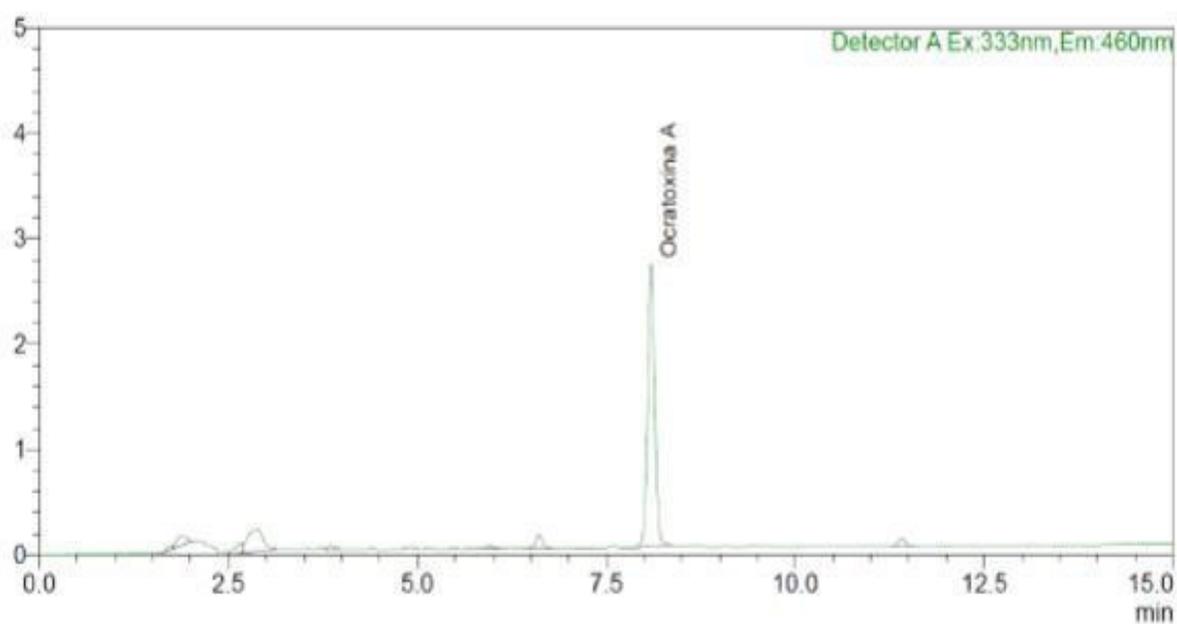


Figura 17. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 1

Tabla 13. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 2

Señal/ pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,747	201	39	-	-	-
2	1,874	708	112	-	-	-
3	2,486	329	51	-	-	-
4	2,653	853	128	-	-	-
5	2,767	1527	192	-	-	-
6	2,875	1025	187	-	-	-
7	2,967	676	141	-	-	-
8	3,864	308	63	-	-	-
9	5,961	147	28	-	-	-
10	6,609	911	147	-	-	-
11	8,094	17355	2685	4,395	µg/L	OTA
12	8,672	116	22	-	-	-
13	11,408	519	20	-	-	-
Total		24658	3874			

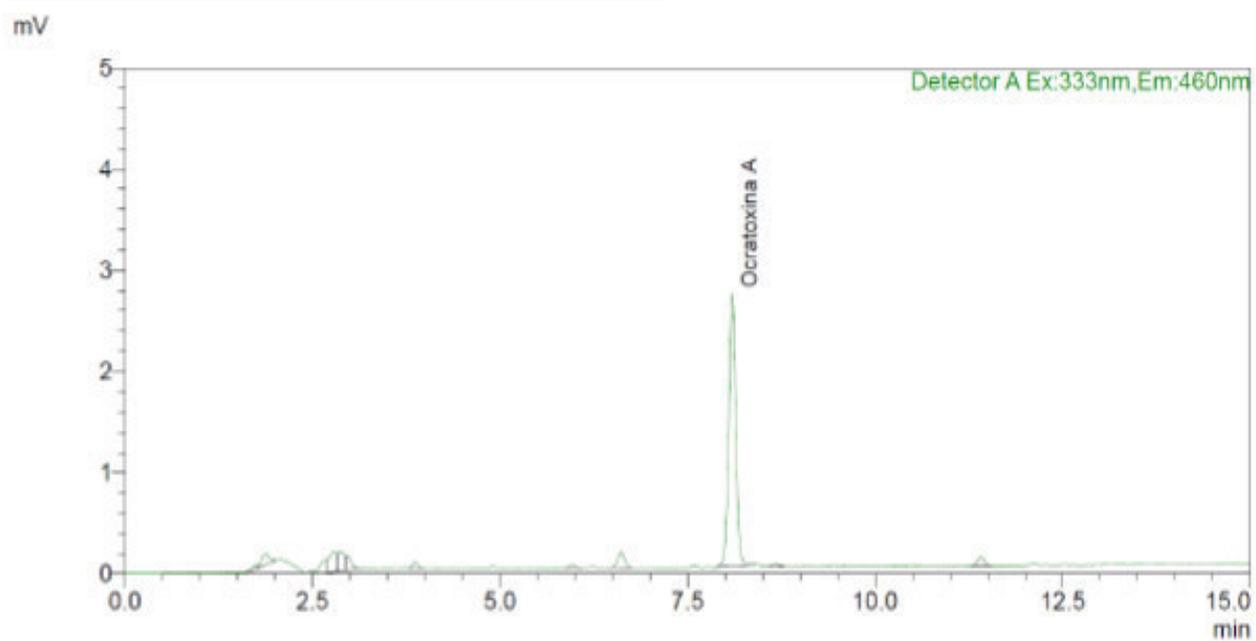


Figura 18. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 2- inyección 2

Tabla 14. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 1

Señal/ pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,74	253	44	-	-	-
2	1,87	805	103	-	-	-
3	2,473	116	27	-	-	-
4	2,633	677	98	-	-	-
5	2,760	735	126	-	-	-
6	2,883	1884	166	-	-	-
7	3,860	166	17	-	-	-
8	6,606	729	116	-	-	-
9	8,089	17016	2591	4,308	µg/L	OTA
10	11,403	432	67	-	-	-
Total		22813	335			

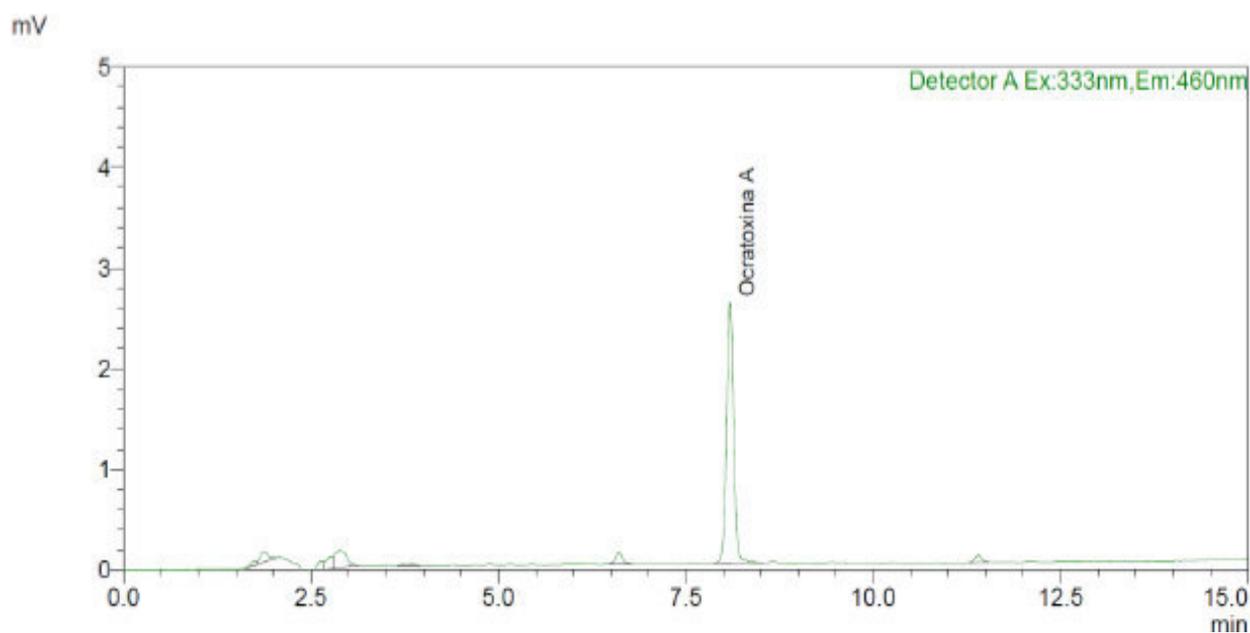


Figura 19. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 1

Tabla 15. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 2

Señal /pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,74	569	90	-	-	-
2	1,877	2427	193	-	-	-
3	2,14	2023	135	-	-	-
4	2,453	221	38	-	-	-
5	2,727	1707	151	-	-	-
6	2,898	1867	172	-	-	-
7	3,863	213	41	-	-	-
8	6,605	720	116	-	-	-
9	8,087	16796	2597	4,253	µg/L	OTA
10	11,401	422	67	-	-	-
Total		26965	3599			

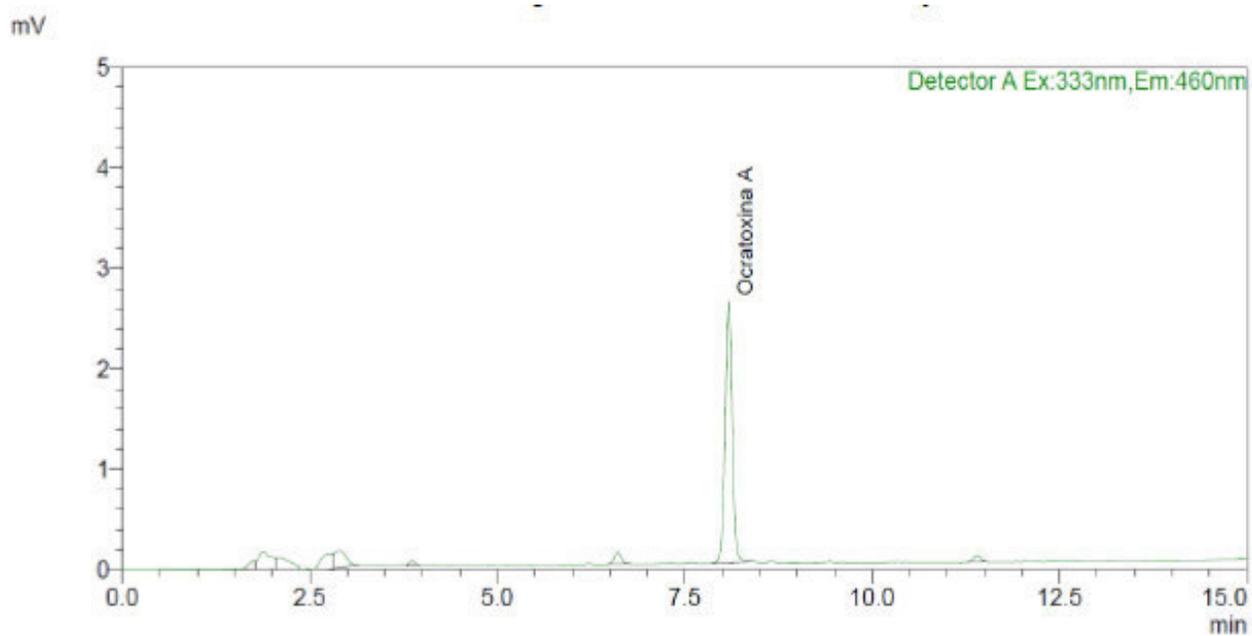


Figura 20. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 3- inyección 2

Tabla 16. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 1

Señal /pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,747	180	36	-	-	-
2	1,872	631	78	-	-	-
3	2,453	120	29	-	-	-
4	2,593	605	61	-	-	-
5	2,86	2669	187	-	-	-
6	6,605	1028	168	-	-	-
7	8,087	14128	2174	3,576	µg/L	OTA
8	11,4	471	73	-	-	-
Total		19831	2803			

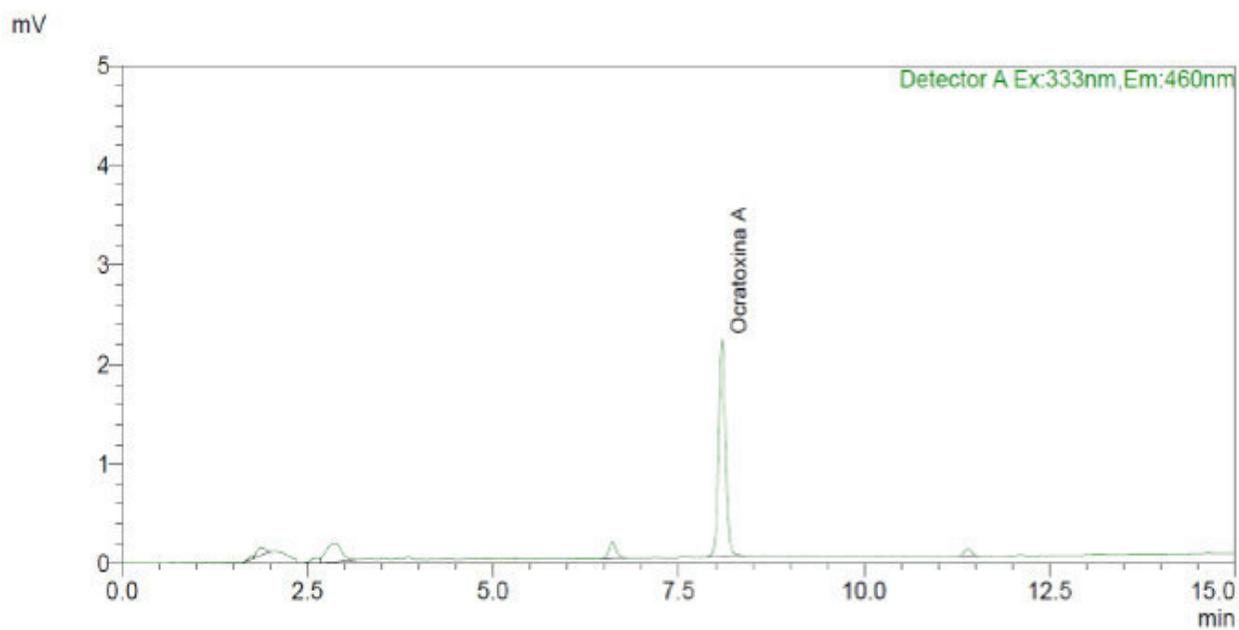


Figura 21. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 1

Tabla 17. Datos de cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 2

Señal /pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Conc.	Unidades	Compuesto
1	1,74	164	33	-	-	-
2	1,37	661	90	-	-	-
3	2,902	3588	172	-	-	-
4	3,859	136	27	-	-	-
5	6.606	1028	165	-	-	-
6	8,089	14159	2167	3,584	µg/L	OTA
7	11,404	488	17	-	-	-
Total		20223	2728			

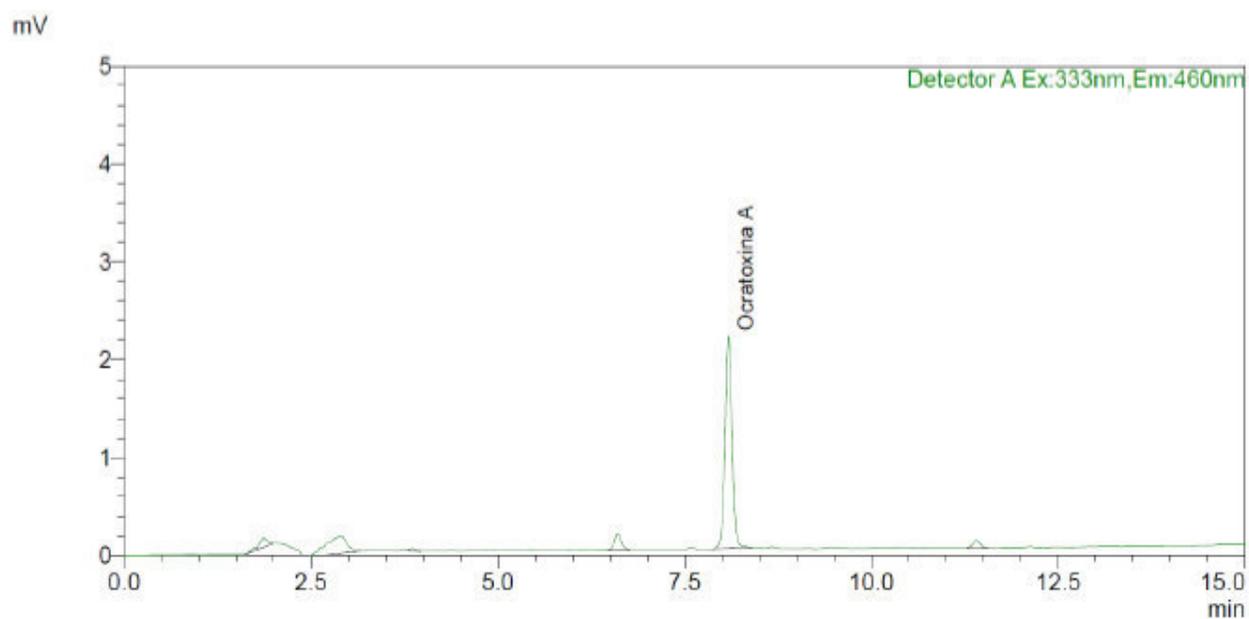


Figura 22. Cromatograma HPLC de la muestra de recuperación 4- inyección 2

Tabla 18. Resumen de los datos cromatográficos.

Tipo	Promedio							% Recuperación
	Tiempo de Retención	Área	Altura	Concentración				
				µg/L	DS *	DSR%*	Interpretación	
MP A1	8,1005	14377	2201	3,639	0,0067	0,1844	10,917 ppb	
MP A2	8,1035	17469,5	2659,5	4,4236	0,0303	0,6845	13,2708 ppb	
MP R1	8,093	15516	2393	3,9128	0,0032	0,0826	11,7384 ppb	78,256
MP R2	8,0935	17336	2682	4,3897	0,0068	0,1542	13,1691 ppb	87,794
MP R3	8,088	16906	2594	4,2805	0,0395	0,9221	12,8415 ppb	85,61
MP R4	8,088	14143,5	2170,5	3,5797	0,0055	0,1529	10,7391 ppb	71,594

DS= Desviación Estándar; DSR%=Desviación Estándar relativa; *n=2

MP A1: Muestra problema A1.

MP A2: Muestra problema A2.

MP R1: Muestra de recuperación R1.

MP R2: Muestra de recuperación R2.

MP R3: Muestra de recuperación R3.

MP R4: Muestra de recuperación R4.

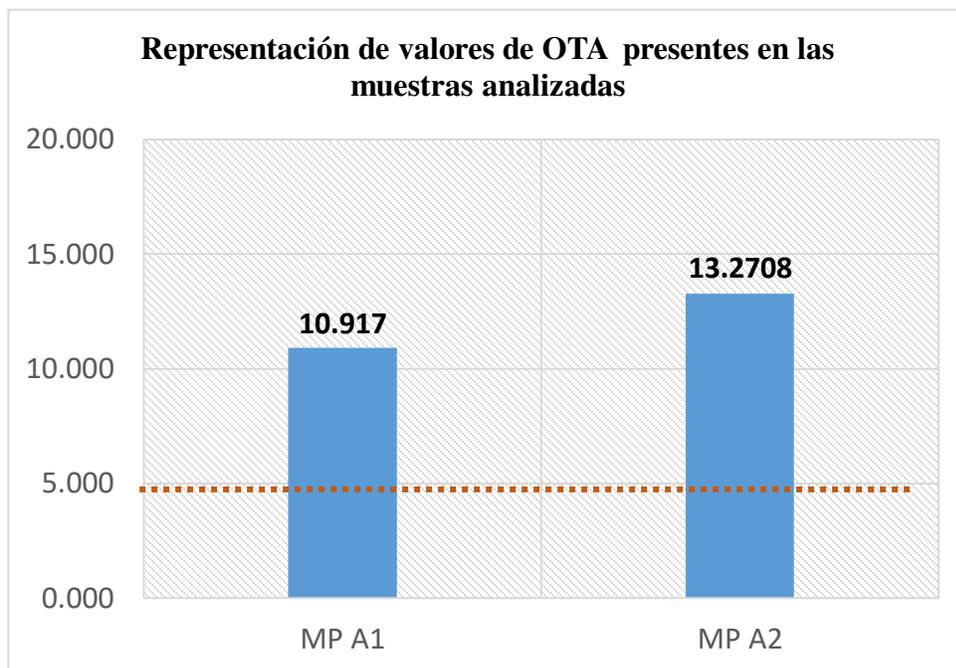


Figura 23. Representación de los valores de OTA presentes en las muestras analizadas. La línea punteada indica los niveles máximos permitidos por la UE - European Commission Regulation (EC, 2005) 5 μ g/kg

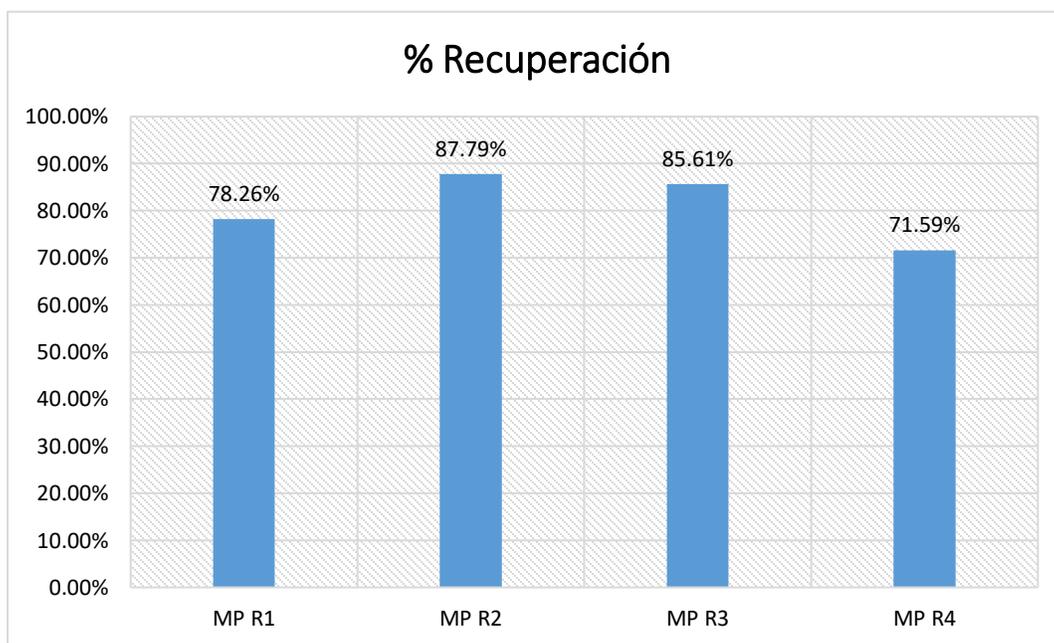


Figura 24. Representación de los porcentajes de recuperación de OTA en muestras autocontaminadas.

4.5 Análisis micotoxigénicos

De las mazorcas, procesadas por medio de del método directo se obtuvieron las siguientes cepas: GD1, GD2, GD3 y GD4.

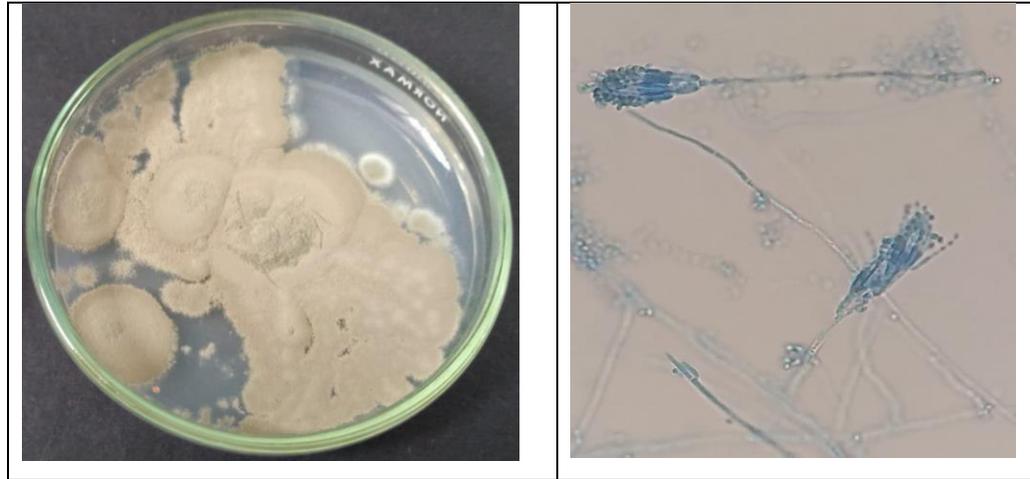


Figura 25. A: Características macroscópicas de *Penicillium* sp. (GD1) en medio APD. B: Características microscópicas de *Penicillium* sp.

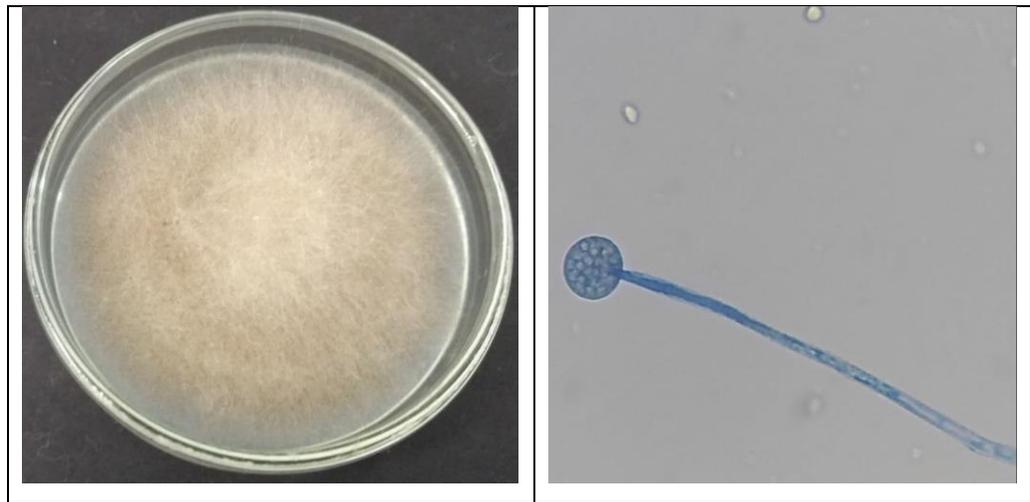


Figura 26. A: Características macroscópicas de *Rhizopus* sp. (GD2) en medio APD. B: Características microscópicas de *Rhizopus* sp.

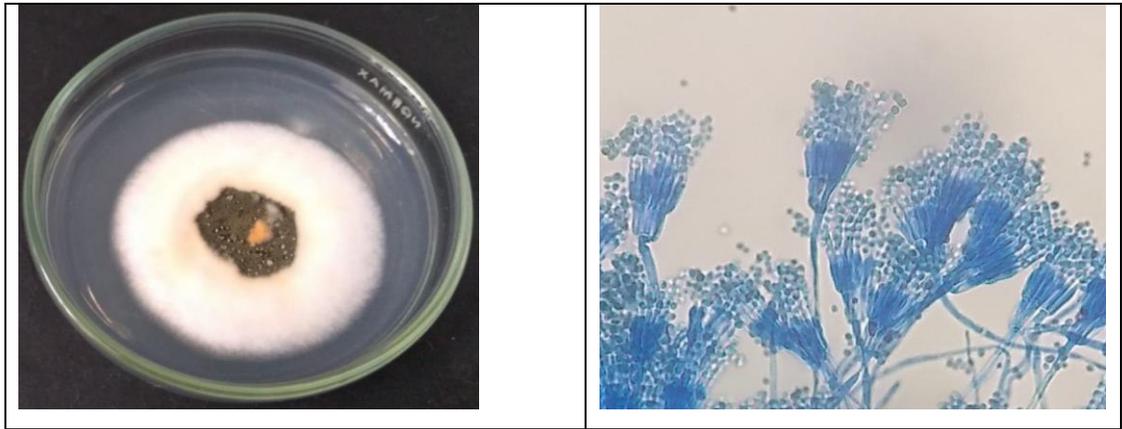


Figura 27. A: Características macroscópicas de (GD3) en medio APD. B: Características microscópicas de GD3.

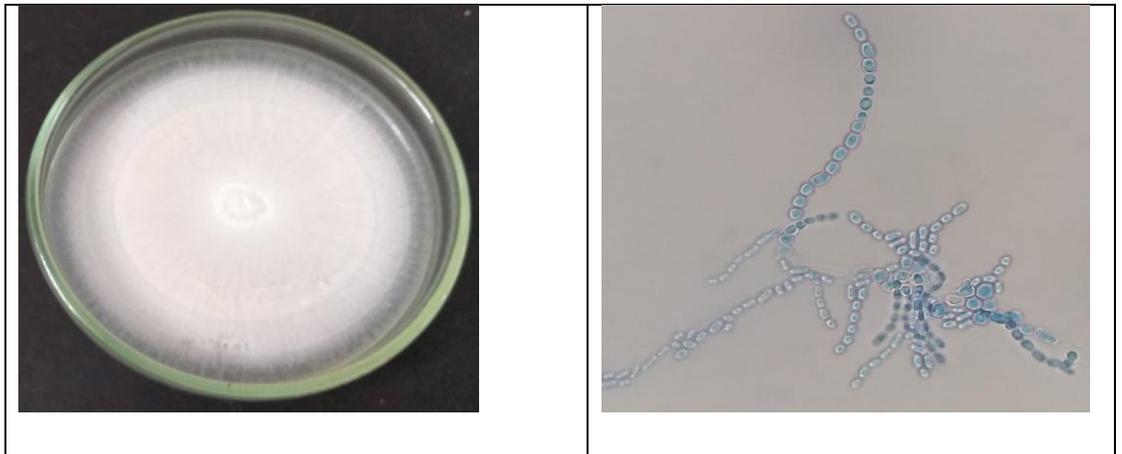


Figura 28. A: Características macroscópicas de *Geotrichum* sp. (GD4) en medio APD. B: Características microscópicas de *Geotrichum* sp.

De las mazorcas, por medio del método indirecto se obtuvo la siguiente cepa: GD5.

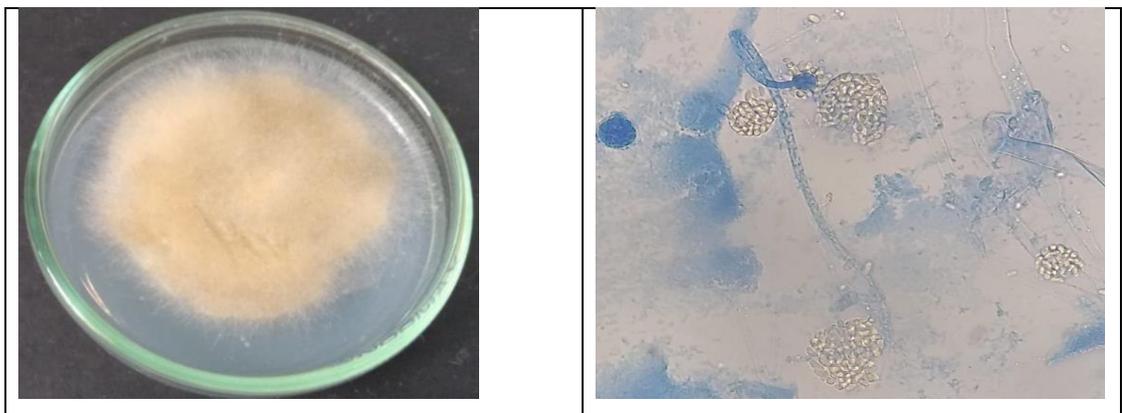


Figura 29. A: Características macroscópicas de *Rhizopus* sp. (GD5) en medio APD. B: Características microscópicas de *Rhizopus* sp.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se determinó la concentración de ocratoxina A en dos muestras de granos de *Zea mays* L “maíz morado”, las muestras procedieron del centro poblado de Santa Rosa de Callancas provincia de San Pablo del departamento de Cajamarca. La separación de OTA se realizó mediante Cromatografía de Inmunofinidad disponibles comercialmente bajo la presentación de columnas de la marca NeoColumn®, a pesar que actualmente existen diferentes opciones como OtaClean®, Puritox®, Ochratest®; entre otras, la gran mayoría brinda seguridad, facilidad, versatilidad, durabilidad, sensibilidad; resaltando que los factores críticos para la separación de OTA son la preparación y extracción⁹⁹.

Para el reconocimiento se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia (HPLC-FD), al ser una de las metodologías detalladas en la AOAC, se escogió al HPLC-FD por su sensibilidad y selectividad, en comparaciones a los métodos convencionales (Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas “ELISA”, cromatografía en capa fina “TLC”) y no convencionales (inmunoensayo quimioluminiscente “CIA”, Inmunoensayo de polarización de fluorescencia “PFIA”), entre otros¹⁰⁰.

El contenido de OTA identificable para las muestras de maíz morado fueron de $10,917 \pm 0,0067$ y $13,271 \pm 0,0303$ ppb, como indica la Tabla 18. Castillo evaluó la presencia de OTA en maíz morado y derivados comercializados en la ciudad de Michoacán (México) reportando un valor de incidencia de 4,2 ppb⁷. Otra investigación realizada por Rossi et al, reportan la ocurrencia de diversas micotoxinas en maíz morado peruano en dos periodos (diciembre 2015 a marzo 2016) y (marzo 2017 a abril 2017) en las cuales no se logró identificar a la presencia de OTA⁹³, datos similares fueron reportados por Haffmann y col⁹⁴, usando el método de identificación por HPLC-FD, reportaron la ausencia de OTA esto se puede deber al análisis sistemático de múltiples micotoxinas, como sabemos las micotoxinas son productos químicos tóxicos relativamente pequeños, con pesos moleculares que rondan los 700 g/mol.

Se han discutido tendencias sobre la ventajas, desventajas y perspectivas futuras de métodos. Pero hasta donde sabemos, no parece haber una técnica única que se destaque por encima del resto, aunque es probable que la cromatografía líquida analítica, comúnmente relacionada con la espectroscopia de masas, sea popular, pero no específica cuando se realizan análisis sistemáticos⁹⁵⁻⁹⁷. La combinación de cromatografía de inmovilización y HPLC-FD aumentó la selectividad y la sensibilidad del método.

Se ha identificado la presencia de OTA en otras variedades de maíz y derivados, exceptuando al maíz morado. Los valores medios de ocratoxina A encontrados según Zinedine y col. informó que los niveles de OTA en muestras de cereales oscilaron entre 5,1 a 224,6 ppb y en muestras de maíz entre 5,1 a 15,7 ppb¹⁰¹. Otra investigación ha informado que la concentración de OTA en los productos de cereales y maíz variaba de 0,11 a 33,9 ppb y de 28 a 22,3 ppb respectivamente¹⁰¹⁻¹⁰². Majeed y col, identificaron la presencia de OTA en arroz, maíz y productos derivados del maíz, en muestras de Pakistán, de un total de 105 muestras solo 28 fueron positivas en maíz con un nivel promedio de 5,29 +/- 0,91 ppb, con un tiempo de retención de 8,87 min presentando un Límite de detección 0,06 y límite de cuantificación 0,18 ppb¹⁰³.

Nasseam Zahara y col, encontró que el 59% del total de 80 muestras fueron contaminado con ocratoxina. Entre las muestras contaminadas, el 26% de las muestras superaron los niveles permitidos, es decir, 5 µg / kg de OTA en muestras de maíz según lo establecido por el Reglamento de la Comisión Europea, mientras que el 33% de las muestras se encontraron contaminadas dentro de lo permitido niveles. Sin embargo, el 41% de las muestras no estaban contaminadas con OTA. El nivel más alto de 231,49 +/- 29,39 µg / kg de OTA se encontró en el maíz proveniente de Faisalabad. Las muestras de maíz recolectadas durante la temporada de verano se encontraron más contaminadas que en la temporada de invierno¹⁰⁴.

También resultado demostrado que el nivel de contaminación era superior al límite establecido por el Codex Alimentarius en cereales y productos a base de cereales es de 5 ppb¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ y para productos procesados derivados directamente con el consumo humano de 3 ppb.

Las pruebas de recuperación para la identificación de OTA en maíz morado, presentaron un porcentaje de recuperación del 80,81 % al nivel de 15 ppb. Para la concentración evaluada de 5 ppb, el porcentaje de recuperación del método de nuestro estudio se encontró entre los límites aceptables entre 75% a 105%; sin embargo, existen métodos en donde el % de recuperación para concentraciones inferiores a 5 ppb fueron inferiores al 75% con el método de validado por entidades internacionales⁹⁸.

Las relaciones señal-ruido para el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) se establecieron para asegurar la calidad analítica. Para estimar la recuperación de cada analito, cuatro replicas enriquecidas fueron analizadas. La linealidad se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), que se calculó después inyecciones triplicadas de curvas analíticas en siete diferentes niveles de concentración. Curvas analíticas donde $R^2 > 0,99$ fueron usados. Coloma⁹³ y colaboradores, reportaron un valor de recuperación del 80 % al mismo nivel evaluado que la presente investigación.

El propósito de la extracción es la eliminación de ocratoxina A en la matriz de análisis, usando solventes adecuados para su posterior recuperación y cuantificación. Los solventes de extracción y el método utilizado son consideraciones importantes para el procedimiento de extracción de Ocratoxina A. La selección del solvente de extracción adecuado depende de varios factores, incluidas las características físico químicas del analito, el costo, la seguridad del solvente, la solubilidad de compuestos diferentes a la OTA y los procedimientos después de la extracción⁹⁵.

Se ha utilizado como solvente de extracción el acetonitrilo al 60 %. Al saber que la OTA es una molécula con propiedades semipolares, se busca el uso de solventes con dicha característica, esto es contrastable con diversos estudios, aunque suelen existir modificaciones para permitir mayores eficiencias. Existen investigaciones que utilizan solventes como la acetona, cloroformo para la extracción de ocratoxina A en matrices complejas o con elevado contenido de grasas como el chocolate o alimentos procesados⁹⁶, el solvente apolar como en acetato de etilo para la extracción de OTA, puede ser necesario bajo

un procedimiento de desengrase adicional antes de la detección o purificación, adicionalmente del uso de solventes semipolares tratados para su reconocimiento por HPLC⁹.

La identificación de la Ocratoxina A se realizó utilizando el tiempo promedio de retención de las diluciones de trabajo, el cual fue de 8,088 min, a partir del estándar de menor concentración (0,099 µg /L) se realizaron 10 repeticiones.

Se identifico la presencia de *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp mediante el método directo y *Rhizopus* sp mediante el método indirecto en los granos de *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”, siendo cepas potencialmente productoras de micotoxinas.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de ocratoxina A en dos muestras analizadas de *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”, evidenciando concentraciones de 10,917 y 13,271 ppb respectivamente, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con detector de Fluorescencia y columnas de inmunoafinidad.
2. Según el análisis micotoxigénico en los granos de *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”, se identificó la presencia de *Penicillium* sp por el método directo, y *Geotrichum* sp mediante el método directo, y *Rhizopus* sp mediante los métodos directo e indirecto.
3. El contenido de ocratoxina A supera los límites máximos permisibles (5µg/kg) establecidos por los organismos reguladores de la Unión Europea.
4. El solvente para la extracción de ocratoxina A en muestras de granos de *Zea mays* L. Var. Purple, “maíz morado”, fue acetonitrilo al 60% evidenciando un porcentaje de recuperación promedio de 80.8135% al nivel contaminante de 15 ppb.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar investigaciones para testear el nivel de ocratoxina A diferentes procesos en la cadena de valor de *Zea mays* L. “maíz morado”.
2. Realizar la identificación de otras micotoxinas para garantizar la seguridad de *Zea mays* L. “maíz morado”.
3. Realizar testeos periódicos en los principales centros de acopio y distribución de *Zea mays* L. “maíz morado”.
4. Se recomienda evaluar diferentes solventes de extracción para ocratoxina A, a fin de realizar comparaciones con diversos niveles de contaminación.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. European Food Safety Authority (EFSA). Statement on recent scientific information on the toxicity of Ochratoxin A. *EFSA Journal* 2010; 8(6): 1626.
2. Méndez-Albores A, Moreno-Martínez E. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Comunicaciones libres*. 2010.
3. Benites A, Fernandes M, Boletto A, Azevedo S, Silva S, Leitão A. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*. 2017;73(1):1223-1228.
4. Geremew T, Abate D, Landschoot S, Haesaert G, Audenaert K. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control*. 2016;69(1):65-73.
5. Ravelo A, Rubio C, Gutiérrez AJ, Hardisson A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano. *Nutrición Hospitalaria*. 2011. 26 (6), 1215-1226.
6. Dhanshetty M, Banerjee K. Simultaneous Direct Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Cereals and Their Processed Products by Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *JAOAC* [Internet] 102(6):1666-1672. 2019; 300: 125176. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31039831/?from_term=Ochratoxin+A+and+corn&from_filter=simsearch3.fft&from_filter=ds1.y_1&from_pos=3
7. Castillo W, Fuente R. Determinación de ocratoxina A en maíz y productos derivados comercializados en la ciudad de Morelia, Michoacán. *Rev. Avances de las ciencias en México*. [Internet] 2015: 1102-6. Disponible en: <file:///C:/Users/alor2/Desktop/OTA/TESIS%20OCRA%20A%20EN%20MAIZ.pdf>
8. Vega Ortiz, V. Hongos micotoxigénicos y aflatoxinas en granos de maíz de diferentes orígenes geográficos de la república mexicana. [Tesis especialidad]. Mexico: Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”; 2012. 79 p. Disponible en: <file:///D:/OTA/Nueva%20carpeta/micotoxinas%20en%20maiz%20-%20tesis%20Mexico.pdf>
9. Salcedo R, Arbaiza T, Lucas O, Ampuero A. Determinación de ocratoxinas en maíz utilizado en granjas porcinas de Lima. *Rev. Inv Vet Perú*. [Internet] 2001. Vol (12): 109-11. Disponible en:

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/6807/12625>

10. Makun H, Adeniran A, Mailafiya S, Ayanda I, Mudashiru A, Ojukwu U et al. Natural occurrence of ochratoxin A in some marketed Nigerian foods. *Food Control*. 2013;31(2):566-571.
11. Oliveira M, Rocha A, Sulyok M, Krska R, Mallmann C. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control*. 2017;73(2):127-132.
12. Lawson B, Robinson R, Parmar M, Killick R, Cunningham A, MacDonald S. Aflatoxin and ochratoxin A residues in supplementary foods used for wild birds. *Science of The Total Environment*. 2020;731 (1):138851.
13. Leite M, Freitas A, Silva A, Barbosa J, Ramos F. Maize (*Zea mays* L.) and mycotoxins: A review on optimization and validation of analytical methods by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;99(1):542-565.
14. Takhtajan A. Outline of classification of: flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review*. New York, Estados Unidos. 1980;46: 225-226, 316-318.
15. LLanos C M. 1984. El maíz su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid, España.
16. Tocagni, 1982. El maíz. Editorial albatros. Buenos aires- argentina.
17. Risco, M. 2007. Conociendo la cadena productiva del maíz morado en Ayacucho. *Solid -Perú*. 88 p.
18. Tapia M y Fries A, 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima-Perú .209 p.
19. MIANGRI- Maíz morado INIA 601, propiedades de antioxidantes. 2019. Disponible en: <https://www.inia.gob.pe/2019-nota-159/>
20. Fernández N A. 1995. Estudio de la extracción y pre- purificación de antocianinas de maíz morado (*Zea mays* L.). Tesis Ing. En Industrias Alimentarias. Lima - Perú. UNALM.116 pp.
21. Bravo A. Caracterización morfológica y molecular de accesiones de maíz negro mediante análisis de secuencias simples repetidas. Tesis de grado presentada como

- requisito para la obtención del título de ingeniería en procesos biotecnológicos. Quito, diciembre 2009.58 p.
22. Justiniano,E. Fenología e intensidad de color en corontas del maíz morado (*Zea mays* L.) en sus diferentes estados de desarrollo en la localidad de La Molina. Tesis para optar el título de Mg. Se. EPG, UNALM. 2010, 77 p.
 23. Pal S, Singh N, Ansari KM. Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicol. Res.* 2017; 6, 764–771.
 24. Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet. Biol.* 2003;39: 103–117
 25. Cole RJ, Schweikert MA. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. Academic Press, USA, New York, 2003. ISBN 0-12-179460-1.
 26. Gunupuru, LR, Perochon A, Doohan FM. Deoxynivalenol resistance as a component of FHB resistance. *Trop. Plant Pathol.* 2017;42, 175–183.
 27. International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. IARC Monogr. Evaluation Carcinogenic Risks Humans 100F 225–248. 2012.
 28. EFSA Scientific Committee. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA J.* 14, 4654, 2016.
 29. Pitt JI, Miller JD. A concise history of mycotoxin research. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65, 7021–7033.
 30. Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. Mycotoxins as human carcinogens d the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res.* 2017;33, 65–73.
 31. Wild CP, Miller JD, Groopman JD. *Mycotoxin Control in Low- and Middleincome Countries*. International Agency for Research on Cancer, France, Lyon, 2015.
 32. Rosa C, Keller KM, Oliviera AA, Keller L, Marassi AC, Kruger CD, Deveza MV, Monteiro BS, Nunes LMT, Astoreca A. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhao State, Brazil. *Food Addit. Contam. Part A.* 2010;27, 241–248.
 33. Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Giesecker K, et al. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113, 1779–1783

34. Van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA., Regulations relating to mycotoxins in food - perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389, 147–157.
35. European Commission. Guidance Document on Identification of Mycotoxins in Food and Feed, 2016. (SANTE/12089/2016).
36. European Union. Commission implementing Regulation (EU) No 1060/2013 of 29 October 2013 concerning the authorisation of bentonite as a feed additive for all animal species. *Off. J. Eur. Union L*,2013; 289 (33).
37. Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A* 2014;1362: 145–156.
38. Vishwanath V, Sulyok M, Labuda R, Bicker W, Krska R. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009;395: 1355–1372.
39. Van Egmond HP, Jonker MA. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Italy, Rome.2004, ISBN 92-5-105162-3.
40. Riley RT Voss KA. Developing mechanism-based and exposure biomarkers for mycotoxins in animals. In: De Saeger, S. (Ed.), *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Woodhead Publishing, Oxford. 2011.
41. Gupta RC. Toxicology of the placenta. In: Ballantine, B., Marrs, T.C., Syversen, T. (Eds.), *General and Applied Toxicology*, third ended 2009. John Wiley and Sons, West Sussex, UK, pp. 2003-2039.
42. Gupta RC, Lasher MA, Miller Mukherjee IR, Srivastava A, Lall R. Aflatoxins, ochratoxins, and citrinin. In: Gupta, R.C. (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology*, second edn. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. General and Applied Toxicology, third ended 2017; 945-962.
43. Gautier JC, Holzhaeuser D, Marcovic J, et al. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30: 1089-1098.

44. Malir F, Ostry V, Novotna E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin. Rev.* 2013; 32(b), 1-10.
45. Stoev SD. Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. *Toxins*, 2010; 2: 649-664.
46. Vettorazzi A, Gonzalez-Penas E, Troconiz IF. A different kinetic profile of ochratoxin A in mature male, 2009;47:1921-1927.
47. Wu Q, Dohnal V, Huang L. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr. Drug Met.* 2012;12: 1-10.
48. Signorini ML, Gaggiotti M, Molineri A. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50: 250-257.
49. Armorini S, Al-Qudah KM, Altafini, A. Biliary ochratoxin A as a biomarker of ochratoxin exposure in laying hens: an experimental study after administration of contaminated diets. *Res. Vet. Sci.* 2015; 100, 265-270.
50. Suzuki S, Satoh T, Yamazaki M. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 1977; 27: 735-744.
51. Stoev SD. Studies on some feed additives and materials giving partial protection against the suppressive effect of ochratoxin A on egg production of laying hens. *Res. Vet. Sci.* 2010; 88, 486-491.
52. Klapac T, Sarkanj B, Banjari I, Strelec I. Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50: 4487-4492.
53. Gupta RC. Ochratoxins and citrinin. In: Gupta, R.C. (Ed.), *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 2012, 1220-1226.
54. Pitt JI, Basilico JC, Abarca ML, Lopez C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med. Mycol.* 2000; 38 (1): 41-46
55. IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 2002; 82: 171-300.
56. IARC. Some naturally occurring and synthetic food components, coumarins and ultraviolet radiation. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 1998;40: 141.
57. Schaaf GJ, Nijmeijer SM, Maas RF. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular effects. *Biochem. Biophys.* 2002;1588: 149-158.

58. Schwartz GC. Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes Control*. 2002; 13: 91-100.
59. Comments on Mantle PG. Ochratoxin A: in utero exposure in mice induces adducts in testicular DNA. *Toxins* 2010 (2), 1428e1444. Mis-citation of rat literature to justify a hypothetical role for ochratoxin A in testicular cancer. *Toxins*, 2010; 2: 2333-2336
60. WHO. World Health Organization Environmental Health Criteria 105. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. World Health Organization- Geneva, 1990.
61. Malir F, Ostry V, Novotna E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Rev*. 2013;32(2): 19-33.
62. González-Arias CA, Benitez-Trinidad AB, Sordo M. Low doses of ochratoxin A induce micronucleus formation and delay DNA repair in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol*. 2014; 74: 249-254
63. Hennemeier I, Humpf H, Gekle M, Schwerdt G. Role of microRNA-29b in the ochratoxin A-induced enhanced collagen formation in human kidney cells. *Toxicology* 2014;324: 116-122
64. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Roubal T. Ochratoxin A exposure biomarkers in the Czech Republic and comparison with foreign countries. *Biomarkers*. 2012;17(7): 577-587.
65. Huybrechts B, Martins JC, Debongnie P. Fast and sensitive LC-MS/MS method measuring human mycotoxin exposure using biomarkers in urine. *Arch. Toxicol*. 2015; 89(1): 1993-2005.
66. Gong YY, Cardwell K, Hounsa A. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *Br. Med. J*. 2002; 325(7354): 20-21
67. Muñoz K, Blaskewicz M, Degen H. Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. *J. Chromatogr. B* 2010;878(1): 2623-2629.
68. Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula, AD. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol*. 1990;40(86): 1180-1191.

69. Partanen HA, El-Nezami HS, Leppänen, JM. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. *Toxicol. Sci.* 2010;113(1): 216-225.
70. Wild CP, Turner PC. The toxicity of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 2002; 17(6): 471-481.
71. Zurich MG, Honegger P. Ochratoxin A at nanomolar concentration perturbs the homeostasis of neural stem cells in highly differentiated but not in immature three-dimensional brain cell cultures. *Toxicol. Lett.* 2011;205(1): 203-208.
72. Ringot D, Chango A, Schneider Y, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions.* 2006;159(1):18-46.
73. Wei YH, Lu CY, Lin TN, Wei RD. Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology.* 1985; 36(1), 119-130.
74. Von Tobel JS, Antinori P, Zurich MG. Repeated exposure to ochratoxin A generates a neuroinflammatory response, characterized by neurodegenerative M1 microglial phenotype. *Neurotoxicology* 2014;44(1): 61-70.
75. Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR. Kinetic parameters and intra-individual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch. Toxicol.* 2000; 74(1): 499-510.
76. Srinivasa J. Does ochratoxin A (OTA) cause testicular cancer in humans?. *Acta Med. Litu.* 2011;18(1): 1-3.
77. Seegers JC, Bohmer LH, Kruger MC. A comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and heLa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994; 129(1): 1-11.
78. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A. Differential DNA adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin, ochratoxin A. *Mutat. Res.* 1991; 115(1): 245-253.
79. Wu Q, Dohnal V, Huang L. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr. Drug Met.* 2011; 12(1): 1-10.
80. Mally A, Hard GC, Dekant W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2007; 45(1): 2254-2260.

81. Munro IC, Scott PM, Moodie CA, Willes RF. Ochratoxin A occurrence and toxicity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1973; 163(11): 1269-1278.
82. Iqbal SZ, Nisar S, Asi MR, Jinap S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control*, 2014; 43(1): 98–103.
83. Sateesh CC, Sharma AK, Dwivedi P. Immunosuppressive effects of ochratoxin A in Wistar rats. *J. Anim. Vet. Adv.* 2005;4(6): 603-609.
84. Sava V, Reunova O, Velasquez A. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin A. *Neurotoxicology.* 2006;27(1): 82-92.
85. Klaric MS, Darabos D, Rozgaj R. Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: single and combined genotoxic action. *Arch. Toxicol.* 2010;84(1): 641-650.
86. Klaric MS, Medic N, Hulina A. Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments. *Food Chem. Toxicol.* 2014;71(1): 97-105.
87. Gonzalez-Arias CA, Benitez-Trinidad AB, Sordo, M. Low doses of ochratoxin A induce micronucleus formation and delay DNA repair in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* 2014;74(1). 249-254.
88. Simarro Doorten Y, Nijmeijer S, Nijs-Tjon L, Fink-Gremmels J. Metabolism-mediated ochratoxin A genotoxicity in the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Food Chem. Toxicol.* 2006;44(1): 261-270
89. Chopra M, Link P, Michels C, Schrenk D. Characterization of ochratoxin A-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 2010;26(1): 239-254.
90. 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, Q-2005-154.
91. Coronel MB, Tarrago MM, Cano-Sancho G. Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. *Food Chem. Toxicol.* 2011; 49(1): 1436-1442
92. JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 68th Meeting. Evaluation of Certain Additives and Contaminants. WHO, Geneva, 2007.p 208.
93. Coloma Z, Oliveira M, Dilkin P, Mallmann A, Almeida C, Mallmann C. Mycotoxin occurrence in Peruvian purple maize. *World Mycotoxin Journal.* 2019;12(3):307-315.

94. Rossi N, Oliveira M, Wovst L, Mallmann C. Simultaneous determination of mycotoxins in peruvian purple maize. *Ciência Rural*. 2019;49(11):1-5.
95. Comisión del CODEX ALIMENTARIUS. DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE LA OCHRATOXINA A EN EL CACAO.2012.
96. Serrano A, Font G, Ruiz M, Ferrer E. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean área. *Food Chemistry*. 2012;135(2):423-429.
97. Munkvold G, Arias S, Taschl I, Gruber-Dorninger C. Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management. *Corn*. 2019;1(1):235-287.
98. Diana Di, Monbaliu S, Scippo M, Maghuin-Rogister G, Schneider Y, Larondelle Y, Callebaut A, y col. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Addit. Contam. Part A*. 2009;26(1):885–895
99. Ochratest. Mycotoxin testing Susystem. <https://www.vicam.com/products/ochratest>
- 100.FAO. Ocerview on Analytical Methodos for Ochratoxin A (Part B: Techniques). Good hygiene Practices along the coffee chain. 2-13.
- 101.Zinedine A, Blesa J, Mahnine N, Abidi AE, Montesano D, Manes J. Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infant’s cereals from Morocco. *Food Cont* 2010; 21(1): 132-5.
- 102.Shah HU, Simpson TJ, Alam S, Khattak KF, Perveen S. Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1111-6.
- 103.Majeed S, Iqbal M, Asi M, Iqbal S. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*. 2013;58(3):446-450.
104. Zahara N, Jamil N, Rashid S. OCHRATOXIN CONTAMINATION OF CORN AND APPLIED DETOXIFICATION APPROACHES: A CASE STUDY FROM PUNJAB PAKISTAN. *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 2020;57(5): 1345-1352.
- 105.JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO food additives series (Vol. 47). FAO food and nutrition paper 74. Geneva: WHO. 2001.

106. European Commission, Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L. 364, 5-24. 2006.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

Anexo 1. Certificación de especie botánica



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, KELY JACKELINE CABANILLAS VILLOSLADA, con Grado Académico de Químico Farmacéutica, con fines de investigación, para desarrollar su tesis y obtener el título de segunda especialidad en Toxicología y Química Legal en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta de maíz, colectada en el Centro Poblado de Santa Rosa de Callancas, provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca, donde es conocida con el nombre vulgar de “maíz morado”, la muestra con flores y frutos ha sido identificada como *Zea mays* L. Según el Sistema de clasificación APG, sistema moderno de clasificación de las angiospermas publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016) comparado con el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

Categorías	SISTEMA APG-2016	SISTEMA CRONQUIST 1981
REINO	Plantae	Plantae
DIVISIÓN	Angiospermae	Magnoliophyta
CLASE	Equisetopsida	Liliopsida
SUBCLASE	Magnoliidae	Commelinidae
SUPERORDEN	Lilianae
ORDEN	Poales	Cyperales
FAMILIA	Poaceae	Poaceae
GENERO	<i>Zea</i>	<i>Zea</i>
ESPECIE	<i>Zea mays</i> L.	<i>Zea mays</i> L.

Variedad: **Var. INIA 601**

Ecotipo: **Purple o maíz morado**

Nombre vulgar: “maíz morado”

Se expide la presente certificación para fines de investigación científica.

Lima, 13 de noviembre del 2019



Jr. Sánchez Silva 156 – 2do. Piso- Urbanización Santa Luzmila – Lima 07

Anexo 2. Fotos del proceso de secado en estufa de los granos de maíz morado



Anexo 3. Fotos del proceso de extracción de OTA



Anexo 4. Informe de análisis emitido por la UNI



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABICER (Laboratorio N° 12)
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



INFORME TÉCNICO N° 0127 – 20 – LABICER

1. **DATOS DEL SOLICITANTE**
- 1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE : KELY JACKELINE CABANILLAS VILLOSLADA
- 1.2 D.N.I. : 44358077
2. **FECHA DE EMISIÓN** : 27 / 01 / 2020
3. **ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE OCRATOXINA A POR HPLC
4. **DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA SEGÚN EL SOLICITANTE**
- 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 06 EXTRACTOS PROVENIENTES DE ZEA MAYS L. (MAÍZ MORADO)

N°	MUESTRA
1	A1
2	A2
3	PR-A1a
4	PR-A1b
5	PR-A2a
6	PR-A2b

5. **DATOS DEL ESTÁNDAR DE OCRATOXINA A**
- 5.1 NOMBRE DEL PRODUCTO : OCRATOXINA A
- 5.2 NÚMERO DE LOTE : D00171728
- 5.3 MARCA : MERCK MILLIPORE
- 5.4 PUREZA : 99.18%
6. **LUGAR DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA** : LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS
7. **CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 20°C; Humedad relativa: 60 %
8. **MÉTODO UTILIZADO** : CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO.
9. **DOCUMENTO DE REFERENCIA** : Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. A. Tafuri et al. / Food Chemistry 88 (2004) 487-494.
10. **EQUIPOS UTILIZADOS**
CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTO RENDIMIENTO-HPLC. SHIMADZU.
 - Desgasificador: DGU-20A5R
 - Bomba: LC-30AD
 - Automuestreador: SIL-30AC
 - Homo de Columna: CTO-20AC
 - Detector de fluorescencia: RF-20AxS
 - Control de Sistema: CBM-20ABALANZA ANALÍTICA DIGITAL. SARTORIUS, CPA225D.
EQUIPO ULTRASONIDO, WISD Laboratory Instruments.
EQUIPO DE AGUA ULTRA PURA. ELGA PURELAB CLASSIC UV.
11. **REACTIVOS**
 - Estándar OCRATOXINA A, 99.18%, adquirido de MERCK PERUANA.
 - Acetonitrilo, gradient 240nm/far UV HPLC grade, adquirido de MERCK PERUANA.
 - Ácido acético glacial P.A., adquirido de MERCK PERUANA.
 - Agua ultrapura, purificada en equipo ELGA PURELAB CLASSIC UV.

12. SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se recibieron las siguientes soluciones estándar de trabajo de Ocratoxina A: 0.1; 0.5; 1; 2; 5 y 7.5 µg/L preparadas en Metanol: Ac. Acético: Agua (49:1:50), filtrados usando filtros de jeringa de 0.22µm.

13. MUESTRAS

Se recibieron 06 extractos provenientes del ZEA MAYS L. (MAÍZ MORADO), filtrados usando filtros de jeringa de 0.22µm.

14. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Columna	RP C18 de 250 mm x 4.6 mm ID x 5 µm Partícula (Restek)
Horno de Columna	25°C
Detector	Detector de Fluorescencia
Longitud de onda de excitación	333nm
Longitud de onda de emisión	460nm
Bomba	Cuatemaria
Flujo	1 mL/min
Fase móvil	A: CH ₃ CN (1% ac. Acético) B: H ₂ O (1% ac. Acético)
Elución	Gradiente 0 a 20min: A:B, 50:50 a A:B, 100:0 20 a 23min: A:B, 100:0 23 a 33min: A:B, 100:0 a A:B, 50:50
Volumen de Inyección	25 µL
Tiempo de corrida	33min
Integración	Area vs Concentración

15. RESULTADOS

Muestra	Concentración HPLC, µg/L ⁽¹⁾	R.S.D., % ⁽²⁾
A1	3.6390	0.1844
A2	4.4236	0.6845
PR-A1a	3.9280	0.0826
PR-A1b	4.3897	0.1542
PR-A2a	4.2805	0.9221
PR-A2b	3.5797	0.1529

⁽¹⁾ Ver cromatogramas en Anexo.

⁽²⁾ R.S.D.: Desviación estándar relativa.

16. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO

El Informe técnico es válido solo para la muestra y las condiciones indicadas en los ítems del uno (1) al cuatro (4) del presente informe técnico.

Bach. Nadia Rodríguez
Analista Químico
LABICER – UNI

M.Sc. Otilia Acha de la Cruz
Jefe de Laboratorio
Firmado por:
Ing. Sebastián Lazo Ochoa
CIP 742362

El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.