

## ***Aspergillus* sp. y aflatoxinas en plantas medicinales y Té Comercial**

[*Aspergillus* sp. and aflatoxins in medicinal plants and commercial tea]

**José Carlos RODRÍGUEZ TITO, Edgar PUENTE ZAPATA, Dayana MARÍN SÁNCHEZ,  
Neida PÉREZ GARRIDO, Dagmara FERRER SALAS & Narvis CEDEÑO SOULARIT**

**Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Autopista Nacional Km 1 1/2 Código Postal 90 400, Apartado Postal 4033.  
Santiago de Cuba, Cuba.**

**Contactos / Contacts: José Carlos RODRÍGUEZ TITO - E-mail address: [tito@medired.scu.sld.cu](mailto:tito@medired.scu.sld.cu)**

---

### **Abstract**

The objective of this work is to determine the incidence of *Aspergillus* sp. (aflatoxins's typesetters) fungus species in medicinal plants and bags for infusions, as well as to evaluate the relationship between the appearance of these fungi and their toxins in such substrata. A sample of 24 medicinal plants and 20 small bags of infusion used by the Cuban population were processed in order to determine the incidence of *Aspergillus* sp. (aflatoxins's typesetters) fungus species, as well as aflatoxins's production. A microbiological test by means of Agar Malta for culture, and aflatoxins's determination by means of High Precision Thin Layer Chromatography were made. Out of the sample studied, *Aspergillus ustus*, *A. flavus* and *A. parasiticus* appeared in 48 %, but the concentration of aflatoxins B<sub>1</sub> detected did not exceed the maximum values of 10 parts per billion (ppb), already established worldwide. Taking into account the increasing use of medicinal plants and the results stated in this work, new regulations for the sake of controlling the appearance of these fungi and their toxins are required, although it becomes necessary to validate fast and specific analytical methods.

**Keywords:** *Aspergillus* sp., Aflatoxin, tea, medicinal plants, HPTLC, mycotoxin

### **Resumen**

El objetivo de este trabajo es determinar la incidencia de especies de hongos del genero *Aspergillus* sp. (formadores de aflatoxinas) en plantas medicinales y bolsas para infusiones, así como evaluar la relación entre la aparición de estos hongos y sus toxinas en dichos sustratos. Se procesaron 24 muestras de plantas medicinales y 20 bolsitas de infusión utilizadas por la población cubana, para determinar la incidencia de especies de hongos del genero *Aspergillus* sp. así como la producción de aflatoxinas. Se realizó análisis microbiológico utilizando Agar- Malta como medio de cultivo, y se realizó la determinación de aflatoxinas por Cromatografía de Capa Delgada de Alta Precisión. De las muestras estudiadas, aparecieron *Aspergillus ustus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* en el 48 %, pero la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> detectada no excedió los valores máximos establecidos internacionalmente de 10 ppb. Teniendo en cuenta el creciente uso de las plantas medicinales y los resultados expuestos en este trabajo, se hace necesario establecer nuevas regulaciones en aras de controlar la aparición de estos hongos y sus toxinas en las mismas, aunque para ello se hace necesario validar métodos analíticos rápidos y específicos.

**Palabras Clave:** *Aspergillus* sp., Aflatoxina, té comercial, plantas medicinales, HPTLC., micotoxina

---

**Recibido | Received:** 11 de Enero de 2010.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 8 de Febrero de 2012.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Mayo de 2012.

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** José C. Rodríguez-Tito, Edgar Puente-Zapata, Dayana Marín-Sánchez, Neida Pérez-Garrido, Dagmara Ferrer-Salas, Narvis Cedeño-Soularit. 2012. *Aspergillus* sp. y aflatoxinas en plantas medicinales y té comercial. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 11(3): 218 – 222.

## INTRODUCCIÓN

Las condiciones climáticas son fundamentales para el desarrollo y crecimiento de hongos productores de micotoxinas. Estos se encuentran distribuidos por todo el mundo, y pueden aparecer durante la cosecha o en el almacenamiento, siendo los principales sustratos los cereales, oleaginosas y productos derivados de estos. Existen muy pocos reportes sobre la presencia de hongos y sus toxinas en plantas medicinales, ya que no es frecuente la aparición, porque deben estar dadas las condiciones ideales de temperatura y humedad para su desarrollo (Abou-Arab *et al.*, 1999, Aziz *et al.*, 1998, Romagnoli *et al.*, 2007)

En Cuba, por las elevadas temperaturas y el alto grado de humedad presente, es muy frecuente la aparición de estos hongos y sus toxinas en numerosos sustratos, sin embargo solo existen normas y regulaciones para el control de aflatoxinas totales y la aflatoxina B<sub>1</sub>, esta última clasificadas, por la Agencia internacional de investigaciones en cáncer (IARC, siglas en ingles) (IARC, 1993) en el grupo 1 “como carcinogénico para humanos” debido a la asociación encontrada entre la ingestión estimada de aflatoxinas y la aparición de cáncer primario de hígado. Se han realizado algunos estudios relacionados con la determinación química e inmunoquímica del grupo de las aflatoxinas y ocratoxinas. (Escobar *et al.*, 1997a, Escobar *et al.*, 1997b), destacándose además en los últimos años la determinación de Fumonisina B<sub>1</sub>. (Rodríguez *et al.*, 2003)

El objetivo de este trabajo es determinar la incidencia de especies de hongos del genero *Aspergillus sp.* (formadores de aflatoxinas) en plantas medicinales y bolsas para infusiones, así como evaluar la relación entre la aparición de estos hongos y sus toxinas en dichos sustratos.

## MATERIALES AND METODOS

### *Materia prima de origen vegetal.*

Se procesaron 24 muestras de plantas medicinales utilizadas etnobotánicamente en la población, estudiando 4 muestras de cada una de las especies: *Aloysia citriodora* Palau, *Peumus boldus* Molina, *Cnicus benedictus* L., *Equisetum giganteum* L., *Lepidium sativum* L. y *Ruta graveolens* L. El resto de las muestras que se procesaron fueron 20 bolsitas de infusión (de 1 a 1,4 g cada una), estudiando 4 muestras de cada concentrado de las especies *P. boldus*, *A. citriodora*, *Matricaria recutita* L., *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y *Justicia Pectoralia jacq.*

### *Análisis Microbiológico*

Se colocaron 10 gramos de cada muestra en 90 mL de solución salina 0,9%, agitándose durante 20 minutos a 250 rpm. Se realizaron 3 diluciones seriadas y se inoculó 10 µL de la última, en placas Petri que contenían 15 mL de Agar Dextrosa Saboroud y Cloranfenicol 500 µg /mL de medio de cultivo para suprimir el crecimiento de bacterias. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 30° C, en oscuridad.

Se sembraron 10 µL de la tercera dilución de cada hongo aislado en el medio Agar *Aspergillus flavus* y *parasiticus* (AFAP) con similares condiciones para el crecimiento, durante 48 horas. Posteriormente se utilizaron claves taxonómicas específicas reportadas para la identificación de los hongos en este medio de cultivo y la taxonomía moderna integrada para hongos *Aspergillus* y *Penicillium*. (Samson and Pitt, 2000)

### *Determinación de aflatoxinas por Cromatografía de Capa Delgada de alta precisión (HPTLC)*

La determinación de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se realizó por cromatografía en placa delgada siguiendo el procedimiento de AOAC 26031. (AOAC, 1999)

Las toxinas fueron extraídas con 30 mL de Cloroformo en un agitador mecánico. La fase clorofórmica fue lavada con Hexano y posteriormente fue evaporada a 45° C hasta sequedad. Se resuspendió el residuo con 100 µL de Metanol. La corrida cromatográfica se realizó con Cloroformo: Acetona (9:1) como fase móvil en cromatoplasmas de Silica Gel 60. La concentración de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> fueron determinadas mediante comparación de la fluorescencia a 366nm de las concentraciones estándares utilizadas y las correspondientes a las extracciones realizadas, utilizando un espectrodensitómetro CAMAG TLC Scanner 3 y el software CATS (CAMAG).

## RESULTADOS

Existen numerosos estudios realizados a los hongos formadores de micotoxinas en productos agrícolas, pero muy pocos se han dedicado a la presencia de estos en plantas medicinales, a pesar del aumento del uso de las mismas por la población mundial. Teniendo en cuenta que las plantas medicinales no son un sustrato común para el crecimiento de hongos toxigénicos, resulta interesante que de las 44 muestras estudiadas, los hongos *Aspergillus ustus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* fueron encontrados en 14 muestras de plantas medicinales y en 7 bolsitas de infusión, lo que corresponde con el 47.7% del total de las muestras estudiadas. Estos resultados coinciden con los

obtenidos por Aziz *et al.*, (1998) donde el *A. flavus* es el principal contaminante (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1**  
**Hongos toxigénicos en las muestras de plantas medicinales estudiadas**

Muestras plantas medicinales	Total muestras por especie	Total hongos toxigénicos encontrados		
		<i>A. ustus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
<i>Aloysia citriodora</i> Palau	4	2	2	2
<i>Peumus boldus</i> Molina	4	1	2	NI
<i>Cnicus benedictus</i> L	4	NI	2	NI
<i>Ruta graveolens</i> L	4	1	NI	2
<i>Equisetum giganteum</i> L.	4	NI	NI	NI
<i>Lepidium sativum</i> L	4	NI	NI	NI
Total	24	4	6	4

NI: No identificada ninguna especie de hongo toxigénico.

**Tabla 2**  
**Hongos toxigénicos en las muestras de bolsas de infusión estudiadas**

Muestras bolsas de infusión	Total muestras por especie	Total hongos toxigénicos encontrados		
		<i>A. ustus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
<i>Peumus boldus</i> Molina	4	1	2	1
<i>Aloysia citriodora</i> Palau	4	NI	1	NI
<i>Matricaria recutita</i> L	4	NI	1	NI
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	4	NI	NI	NI
<i>Justicia pectoralis</i> Jacq.	4	NI	NI	1
Total	20	1	4	2

NI: No identificada ninguna especie de hongo toxigénico.

Los hongos fueron identificados, por sus características morfológicas de crecimiento en el medio de cultivo selectivo AFAP utilizado. En este substrato las colonias de *A. flavus* y *A. parasiticus* tienen el reverso de color amarillo anaranjado, notable después de incubar 48 hs a 30° C por la presencia de los ácidos asérgicos.

Estos dos hongos identificados son productores de aflatoxinas, lo cual puede considerarse un riesgo que podría acarrear nuevas vías de exposición, por lo que fue evaluada la capacidad de producir toxinas por los hongos detectados, utilizando un método químico cuantitativo avalado internacionalmente. (AOAC, 1999)

Es conocido, por estudios anteriores, que algunas plantas medicinales poseen aceites esenciales y compuestos químicos en su composición que afectan el crecimiento de hongos formadores de aflatoxinas, incluso se ha demostrado que la producción de aflatoxinas por *A. flavus* en determinadas plantas medicinales es mucho menor que cuando crece en cereales y otros substratos. (ElshaWe, 2002).

Los niveles de concentración de aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> presentes en las muestras de plantas medicinales y bolsas de infusión son considerablemente menores que los obtenidos comúnmente en estudios similares realizados en cereales, oleaginosas y otros substratos. Solamente fueron encontradas las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Tablas 3 y 4) con niveles de concentración del orden de 2,5 a 5 ppb, muy inferiores a los valores mínimos permisibles en muestras de *A. citriodora*, *P. boldus*, *C. benedictus*, *R. graveolens* y de bolsitas de plantas medicinales de *P. boldus* y *A. citriodora*. (ElshaWe, 2002)

## DISCUSION

En la agricultura, los hongos se clasifican teniendo en cuenta el sustrato en el que crecen por lo que son conocidos generalmente como hongos de campo y hongos de almacenamiento. Generalmente las plantas en cultivo son atacadas por hongos de campo, en su desarrollo o maduración de sus frutos, fundamentalmente del género *Alternaria*, *Fusarium*, and *Cladosporium*, por lo que existen numerosos reportes de la presencia de estos en plantas

medicinales (Roy y Chourasia, 1990, Chourasia, 1995, Halt, 1998)

**Tabla 3**

**Concentraciones de Aflatoxinas B<sub>1</sub> en las determinaciones realizadas en plantas medicinales.**

Muestras	Total muestras por especie	Concentración aflatoxina B <sub>1</sub> (ppb)			
		2,5±0,5	5±0,5	10 ±0,5	20±0,5
<i>Aloysia citriodora</i> Palau	4	1	3	ND	ND
<i>Peumus boldus</i> Molina	4	2	ND	ND	ND
<i>Cnicus benedictus</i> L	4	1	1	ND	ND
<i>Ruta graveolens</i> L	4	2	ND	ND	ND
<i>Equisetum giganteum</i> L.	4	ND	ND	ND	ND
<i>Lepidium sativum</i> L	4	ND	ND	ND	ND

ND: No detectada concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> (Límite de detección 1ppb)

**Tabla 4**

**Concentraciones de Aflatoxinas B<sub>1</sub> en las determinaciones realizadas en bolsas de infusión**

Muestras	Total muestras por especie	Concentración aflatoxina B <sub>1</sub> (ppb)			
		2,5±0,5	5±0,5	10±0,5	20±0,5
<i>Peumus boldus</i> Molina	4	2	1	ND	ND
<i>Aloysia citriodora</i> Palau.	4	1	ND	ND	ND
<i>Matricaria recutita</i> L	4	ND	ND	ND	ND
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	4	ND	ND	ND	ND
<i>Justicia pectoralia</i> Jacq.	4	ND	ND	ND	ND

ND: No detectada concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> (Límite de detección 1ppb)

Sin embargo, una vez que las plantas medicinales son cosechadas y almacenadas, aumentan las posibilidades de la aparición de hongos de almacenamiento, como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, que son los mas frecuentes y su crecimiento depende fundamentalmente de la humedad relativa y la temperatura. (Chourasia, 1995, Halt, 1998)

Particularmente el hongo *A. flavus* fue el mas frecuente en las muestras estudiadas de plantas medicinales y en bolsitas de infusión, del cual es muy común aislar las aflatoxinas, al igual que de *A. parasiticus*, coincidiendo con otros estudios donde ambos son los que aparecen con mayor abundancia. (Halt, 1998; Aziz et al., 1998)

Las especies de plantas medicinales que fueron contaminadas mas fácilmente por estos hongos fueron la *A. citriodora* y *P. boldus*, lo cual concuerda con otros resultados anteriores. (Rizzo et al., 2004) (Tablas 1 y 2)

La aparición de hongos *Aspergillus sp.* productores de aflatoxinas es cercana al 50% de las muestras estudiadas, lo cual sugiere que las condiciones ambientales eran propicias para el crecimiento de estos hongos y la producción de sus toxinas. Teniendo en cuenta que aparece comúnmente expresado en la literatura que las plantas medicinales

poseen aceites esenciales que impiden la formación de las aflatoxinas, (Ahmed et al., 1994, Bartine y Tantaoui-Elaraki, 1997) estas fueron determinadas, y los resultados reflejan que aparecen en concentraciones mas pequeñas que cuando son detectadas, en condiciones ambientales parecidas, en sustratos como maíz, alimentos para ganado avícola, etc. (Tablas 3 y 4)

Como puede observarse las concentraciones máximas de aflatoxina B<sub>1</sub> detectadas son de 5 ppb en el caso de las muestras de *A. citriodora*, en ningún otro caso pudo observarse que excediera esta concentración, este resultado podría sugerir que en algunas plantas medicinales, podría aparecer algún compuesto químico que inhibe la producción de aflatoxinas, (ElshaWe, 2002) aunque no inhibe la proliferación de los hongos que las producen, lo cual constituye un riesgo que debe ser caracterizado, particularizando en cada planta medicinal, para evaluar el riesgo real al que esta expuesta la población que hace uso común de estas.

Esta afirmación esta avalada por el resultado que arrojó el estudio realizado a la *M. recutita* y la *J. pectoralia* donde fueron detectados los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente y en ninguno

de los casos fue detectada la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub>. (Tablas 2 y 4)

Es conocido que los factores que predominan en la aparición de los hongos pueden ser de carácter ambiental y/o de los constituyentes del sustrato donde crecen. En Cuba existen condiciones ambientales ideales para el crecimiento de los hongos del género *Aspergillus* provocando que sean muy comunes estos, por lo que se realiza el control de las aflatoxinas en alimentos almacenados.

Dado el creciente uso de las plantas medicinales, se hace necesario establecer nuevas regulaciones en aras de controlar la aparición de estos hongos y sus toxinas en plantas medicinales y los productos elaborados a partir de estas. Esto constituye un nuevo reto en la industria farmacéutica y la seguridad alimentaria, ya que deben adoptarse límites de concentración máxima permisible en estos sustratos, lo cual exigiría un mayor cumplimiento de buenas prácticas de manufactura en la producción farmacéutica, aunque para ello se hace necesario validar métodos analíticos rápidos y específicos.

## CONCLUSION

Este estudio brinda una nueva perspectiva sobre el peligro que representan los hongos formadores de micotoxinas (*Aspergillus sp.*), específicamente de aflatoxinas, ya que su aparición en plantas medicinales y bolsas de infusión, puede constituir un riesgo para la población que las consume, por lo que debe ser caracterizado y evaluado el mismo, para establecer límites de concentración máxima permisible y normativas para su control.

## REFERENCIAS

- Abou-Arab AAK, Soliman Kawther M, El Tantawy ME, Ismail Badea R, Khayria N. 1999. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chem** 67: 357 - 363.
- Ahmed FH, Al-Badri AA, Ibrahim MM, Al-Ashahed AS, El-Khalafawy HM, 1994. Comparative studies of antifungal potentialities for some natural plant oils against different fungi isolated from poultry. **Grasas y Aceites** 45: 260 - 264.
- Aziz NH, Youssef YA, El-Fouly MZ, Moussa LA. 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. **Bot Bull Acad Sin** 39: 279 - 281.
- Bartine H, Tantaoui-Elaraki A, 1997. Growth and toxigenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** 16: 61 - 65.
- Chourasia HK. 1995. Mycobiota and mycotoxins in herbal drugs of Indian pharmaceutical industries. **Micol Res** 99: 697 - 703.
- ElshaWe AE, Al-Rashdi TA, Al-Bahry SN, Bakheit CS, 2002. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. **Mycopathologia** 155: 155 - 160.
- Escobar A, González M, Díaz E. 1997. Desarrollo de una metodología para la separación y purificación de la aflatoxina B<sub>1</sub> a partir de un cultivo de *Aspergillus parasiticus*. **Rev Salud Anim** 19: 89 - 98.
- Escobar A, Margolles E, Uffo O, Alvarez MT. 1997. Desarrollo y validación de un método inmunoenzimático de Aflatoxina B<sub>1</sub> en orina. **Rev Salud Anim** 19: 99 - 112.
- Halt M, 1998. Moulds and Mycotoxins in herb tea and medicinal plants. **Eur J Epidemiol** 14: 269 - 274.
- IARC, 1993. **Aflatoxins**. In IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. WHO and International Agency for Research on Cancer, Vol. 56, Washington, USA.
- AOAC. 1999. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence, Washington, USA.
- Rizzo I, Vedoya G, Maurutto S, Haidukowski M, Varsavsky E. 2004. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. **Microbiol Res** 159: 113 - 120
- Rodríguez JC, Marín D, Pérez N, Escobar A. 2003. First report of fumonisin B<sub>1</sub> in animal feed in Cuba. **Rev Salud Anim** 25: 215 - 216
- Romagnoli B, Menna V, Gruppioni N, Bergamini C. 2007. Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. **Food Control** 18: 697 - 701.
- Roy AK, Chourasia HK. 1990. Mycoflora, mycotoxin producibility and mycotoxins in traditional herbal drugs from India. **J Gen Appl Microbiol** 36: 295 - 302.
- Samson RA, Pitt JI, 2000. **Integration of modern taxonomic methods for penicillium and aspergillus clasification**. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherland.