

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Validación microbiológica de un método rápido para la
cuantificación de hongos en harina de maca (*Lepidium
meyenii* W.) OSS (Organic Sterilization System)**

Tesis para optar el Título de Profesional de Licenciado en Biología

Anthony Yuri Dueñas Prado

Lima, Perú

2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la oportunidad de poder darme grandes motivaciones como la de mi hija la cual la tengo siempre presente, mis padres que es por ellos que soy una persona de principios, a mis hermanas con su apoyo incondicional, a mi gran compañera e infidente de mil aventuras que me ayudo en todo momento, a mis amigos por sus consejos y un agradecimiento especial al Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña que ha sido un guía y un amigo en todo este camino, asimismo a toda la familia de Peruvian Nature, al área de Control de Calidad en el apoyo incondicional y comprensibilidad del caso.

No ha sido sencillo el camino hasta el momento, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa alegría y optimismo han hecho que todo este camino haya sido fácil. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	5
ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y DIAGRAMAS	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Planteamiento del problema	10
1.2 Justificación de la Investigación.....	10
II. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo General:	12
2.2 Objetivos Específicos:	12
III. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	13
3.1 Maca (<i>Lepidium meyenii</i> W.)	13
3.2 Etimología	13
3.3 Descripción Botánica.....	13
3.4 Ubicación Geográfica.....	14
3.5 Clasificación Taxonómica:.....	16
3.6 Composición nutricional	16
3.7 Comercialización.....	18
3.8 Control de Calidad.....	18
3.9 Calidad microbiológica	18
3.10 Mohos y levaduras.....	19
3.10.1 Descripción:.....	19
3.10.2 Hábitat:	20
3.10.3 Reproducción:.....	20
3.10.4 Micotoxinas	20
3.11 Tratamiento de conservación del producto.....	21
3.12 Placas Petrifilm™ para el recuento de mohos y levaduras	23
IV. HIPÓTESIS	24

4.1 Hipótesis General:	24
4.2 Hipótesis Específicas	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Lugar de la experimentación.	25
5.2 Tipo de investigación	25
5.3 Diseño de investigación.....	25
5.4 Variables.....	26
5.4.1 Variable Independiente.....	26
5.4.2 Variable dependiente	26
5.5 Instrumentos de investigación	26
5.5.1 Material Biológico.....	26
5.6 Procedimiento.....	26
5.6.1 Preparación del diluyente (Solución buffer Fosfato).....	26
5.6.2 Preparación de la muestra:.....	27
5.6.3 Recuento por el método N° 1 (AOAC Official Method 2014.05 Enumeration of Yeast and Mold in Food):	27
5.6.4 Recuento por el método N°2 (AOAC official method 997.02 Yeast and Mold Counts in Food Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm Method) y método rápido))	
29	
5.6.5 Recuento por el método 3 ICMSF (Método tradicional): Yeasts. Molds and Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Mold in Food - Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line. FDA 8 th Ed. Rev. A / 1998. Revised: April 2001, Chapter 18.....	30
5.7 Análisis de datos.....	32
5.8 Aspecto ético	33
VI. RESULTADOS	36
VII. DISCUSIÓN.....	47
VIII. CONCLUSIONES.....	48
IX. RECOMENDACIONES	49
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía N°1 Raíz de Maca (<i>Lepidium meyenii</i> W.).....	13
Fotografía N°2 Placa Petrifilm 3M™ para el recuento rápido de mohos y levaduras	44
Fotografía N°3 Placa Petrifilm 3M™ Recuento de mohos y levaduras.....	45
Fotografía N°4 Recuento de mohos y levaduras en placa tradicional para el recuento de mohos y levaduras	46

ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y DIAGRAMAS

Cuadro N°1 Producción de maca a nivel nacional.....	15
Cuadro N°2 Clasificación taxonómica.....	16
Cuadro N°3 Composición química de la maca (100g parte comestible)	17
Cuadro N°4. Recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	25
Diagrama de flujo de proceso N°1 Método Petrifilm 3M™ para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras	33
Diagrama de flujo de proceso N°2 Método Petrifilm 3M™ para el Recuento de Mohos y Levaduras.....	34
Diagrama de flujo de proceso N°3 Método tradicional para el Recuento de Mohos y Levaduras.....	35
Tabla N°1. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	36
Tabla N°2. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	36
Tabla N°3. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	37
Tabla N°4. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	37
Tabla N°5. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	38
Tabla N°6. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	38
Tabla N°7. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	39
Tabla N°8. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	39
Tabla N°9. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.	40

Tabla N°10. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.....	40
Tabla N°11. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.....	41
Tabla N°12. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.....	41
Tabla N°13. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.....	42
Tabla N°14. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.....	42
Tabla N°15. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.....	43
Tabla N°16 Métodos microbiológicos para el recuento de mohos y levaduras y resultados	43

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en la validación de un método de recuento rápido en Placa Petrifilm 3M™ para la cuantificación de hongos en harina de Maca OSS (ORGANIC STERILIZATION SYSTEM) comparando con el método de recuento convencional en Placa Petrifilm 3M™ para Recuento de Hongos y Levaduras, y el método tradicional descrito en la metodología oficial BAM de la FDA 2001 – 8va Edición. Se realizó el estudio de 15 muestras de productos de Maca OSS que fueron sometidas al mismo tratamiento térmico de 9 minutos, se validó microbiológicamente el método de recuento rápido de hongos en Placa Petrifilm 3M™ y al realizar la Prueba de Chi-cuadrado entre las tres metodologías, se obtuvo un valor de significancia de 0,389 para el recuento de mohos y levaduras. Respecto a la Placa Petrifilm 3M™ Recuento Rápido de Mohos y Levaduras ofrece la ventaja de fácil uso, disminución de tiempo en preparación y emisión de resultados y personal, aumentando la productividad laboral por lo que su uso podría considerarse como método alternativo para el recuento de mohos y levaduras para productos de maca.

Palabras clave: Maca *Lepidium meyenii* W., Tratamiento térmico OSS, Recuento de mohos y levaduras, Placas Petrifilm 3M™.

ABSTRACT

The objective of the present study was to validate a Petrifilm fast plate counting method for the quantification of fungi in Maca OSS (ORGANIC STERILIZATION SYSTEM) flour comparing with the conventional counting method in 3MTM PetrifilmMR Plate for Yeast and Mushural Count And the traditional method described in the official methodology BAM of the FDA 2001 - 8th Edition. A study was carried out on 15 samples of Maca OSS products, which were subjected to the same 9-minute heat treatment, microbiologically validated the method of rapid counting of fungi in Petrifilm Plate 3MTM and performed the Chi-square test between the three methodologies, A significance value of 0.389 was obtained for the counts of molds and yeasts. Regarding Petrifilm Plate 3M™ Rapid Contamination of Molds and Yeasts offers the advantage of easy use, reduced time in the preparation and emission of results and personal, increasing labor productivity so its use can be considered as the alternative method for the Mohos and yeast counts for maca products.

Key words: Maca *Lepidium meyenii* W., heat treatment OSS, Mold and yeast counts, Petrifilm 3M™ Plates.

I. INTRODUCCIÓN

La maca es un producto de alta demanda por el mercado nacional e internacional, alcanzando a exportar 688,363 Kg. con un crecimiento anual de 34% en el 2015 con respecto al año anterior, siendo los principales destinos de exportación Hong Kong con U\$ 4.7 millones (77% del total), seguido de China con U\$ 696 mil (11%) y Vietnam U\$ 235 mil (4%)-fuente de la SUNAT. Es por ello que el objetivo de esta investigación es validar un ensayo microbiológico de un método rápido para la cuantificación de hongos en Harina de Maca OSS, que reduzca el tiempo de análisis comparado con el método tradicional cumpliendo los niveles de seguridad alimentaria normalizados en la legislación alimentaria a nivel mundial.

1.1 Planteamiento del problema

Ante el constante desarrollo del sector agroalimentario, la presión comercial de los exportadores por conseguir análisis más rápidos, coherentes y precisos, junto con el incremento de las normativas de higiene y seguridad, hacen necesario desarrollar técnicas de ensayos que sustituyan las necesidades de los clientes y garanticen la calidad e inocuidad reduciendo costos y aumentando la productividad.

1.2 Justificación de la Investigación

Los ensayos microbiológicos suelen ser una labor que consume gran cantidad de tiempo y trabajo, de ahí la necesidad de implementar métodos rápidos, sencillos para detectar microorganismos, indicadores de calidad, emitir resultados rápidos, que permitan tomar decisiones para la liberación de productos alimentarios para la exportación y el mercado nacional.

Para esta investigación, se realizó un estudio de análisis de tipo comparativo de 3 ensayos microbiológicos entre el método N°1 Recuento rápido de mohos y levaduras (AOAC Official Method 2014.05 Enumeration of Yeast and Mold in Food), método N°2 Recuento de mohos y levaduras (AOAC official method 997.02 Yeast and Mold Counts in Food Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm Method)) y método N°3 Recuento tradicional de mohos y levaduras (Yeasts, Molds and Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Mold in Food - Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line.) El desarrollo de la investigación implicó pruebas de laboratorio orientadas al análisis de una misma muestra de Harina de Maca OSS, empleando inicialmente la técnica tradicional como punto de referencia para hacer la comparación en términos de sensibilidad, selectividad, resultados y desempeño con los productos de recuento rápido incluyendo Placa Petrifilm 3M™. Asimismo, el estudio incluirá las regulaciones nacionales e internacionales y certificaciones de calidad que tienen las Placas Petrifilm 3M™, para determinar su impacto a nivel competitivo y definir que la metodología es válida para el producto harina de maca.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

- Determinar microbiológicamente un método de recuento rápido para la cuantificación de hongos en Harina de maca (*Lepidium meyenii walp.*) polvo OSS (Organic Sterilization System) con tratamiento térmico de 9 minutos.

2.2 Objetivos Específicos:

- Validar el recuento de hongos con el ensayo microbiológico método N°1 Recuento Rápido de Mohos y Levaduras para la Harina de Maca.
- Validar el recuento de hongos para el ensayo microbiológico método N°2 Recuento de Mohos y Levaduras para la Harina de Maca.
- Validar el recuento de hongos para el ensayo microbiológico método N°3 Recuento Tradicional de Mohos y Levaduras para la Harina de Maca.
- Validar los tres ensayos microbiológicos método N°1 Recuento rápido de mohos y levaduras, método N°2 Recuento de mohos y levaduras y método N° 3 Recuento tradicional de mohos y levaduras para la cuantificación de hongos en Harina de Maca.

III. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1 Maca (*Lepidium meyenii* W.)

Fotografía N°1 Raíz de Maca (*Lepidium meyenii* W.)



3.2 Etimología

El nombre de la maca, según Pulgar Vidal (1985), proviene de dos voces de la lengua Chibcha: Ma, que indica originario de altura, y Ca, que significa alto, excelso, comida buena que fortalece. (Espinoza, 2001).

En el periodo Pre-inca, tuvo gran importancia y se convirtió en una de las primeras raíces que el poblador peruano consumió. Durante la época incaica no sólo se convirtió en alimentos de nobles, sino que servía también de ofrenda a los dioses. A la llegada de los españoles, la maca era un producto de mucha importancia entre los pobladores del Imperio Incaico; fue usada por los conquistadores para mejorar la fertilidad de las yeguas y cerdos. (Espinoza, 2001).

3.3 Descripción Botánica

La maca (*Lepidium meyenii* W.) es una planta herbácea anual, de porte arrosetado, raíz napiforme, tuberosa, de consistencia dura que es la parte

comestible, con gran contenido de féculas de forma redondeada, de 4 a 7 cm. de longitud y de 3 a 5 cm. de diámetro, en la parte más ensanchada. (Ruíz, 2002). Los ecotipos más importantes son de color amarillo, negro, rojo y morado. (Obregón, 1998). Las semillas de la maca son ovoides, de color rojizo gris, de 2 a 2,5 ms., los hipocótilos que son la parte comestible de la planta varía de 2 y 5 cm. en tamaño. La pulpa es blanca – perla y tiene apariencia marmórea. Se compone de dos partes regulares bien definidas: una región exterior y una cilíndrica central. La sección exterior es rica en azúcares, la sección interior es firme y rica en almidones. Las hojas son arrosietadas y compuestas, presenta flores hermafroditas, actinoformas, muy pequeñas, de color verde claro. El fruto es silicua, con una sola semilla en cada celda. (CONCYTEC, 2001).

3.4 Ubicación Geográfica

La especie *Lepidium meyenii* Walp. sin nombre vernacular se encuentra en diferentes países de América, inclusive en el Perú (Chacón, 1997). Crece en hábitats entre los 3500 y 4500 msnm, y tiene su origen en la sierra central donde se cultiva desde hace más de 2000 años (González *et al.*, 2009; INDECOPI, 2002).

Cuadro N°1 Producción de maca a nivel nacional

DEPARTAMENTO	RUBRO	AÑOS										
		1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
JUNÍN	HAS.	10,00	15,00	20,00	30,00	50,00	55,00	60,00	100,00	180,00	760,00	800,00
	TM.FCO	40,00	60,00	90,00	150,00	275,00	330,00	520,00	700,00	1350,00	6080,00	6400,00
	TM.SECO	10,00	15,00	22,00	37,50	68,50	72,50	100,00	175,00	337,50	1520,00	1600,00
PASCO	HAS.	4,00	6,00	10,00	20,00	30,00	35,00	60,00	70,00	120,00	600,00	1000,00
	TM.FCO	16,00	20,00	45,00	100,00	165,00	210,00	390,00	490,00	900,00	1800,00	8000,00
	TM.SECO	4,00	5,00	11,25	25,00	41,25	52,50	97,50	122,50	225,00	1200,00	2000,00
HUANCAVELICA	HAS.						10,00	10,00	20,00	30,00	50,00	70,00
	TM.FCO						40,00	40,00	100,00	210,00	400,00	560,00
	TM.SECO						10,00	10,00	25,00	52,50	100,00	140,00
AYACUCHO	HAS.									5,00	10,00	25,00
	TM.FCO									20,00	80,00	200,00
	TM.SECO									5,00	40,00	50,00
APURÍMAC	HAS.								10,00	5,00	10,00	15,00
	TM.FCO								40,00	25,00	80,00	120,00
	TM.SECO								10,00	6,25	20,00	30,00
PUNO	HAS.									2,00	5,00	100,00
	TM.FCO									8,00	10,00	800,00
	TM.SECO									2,00	10,00	200,00
ANCASH	HAS.									3,00	5,00	15,00
	TM.FCO									12,00	40,00	120,00
	TM.SECO									3,00	10,00	30,00
HUÁNUCO	HAS.									5,00	10,00	15,00
	TM.FCO									20,00	40,00	120,00
	TM.SECO									5,00	20,00	30,00
TOTAL	HAS.	14,00	20,00	30,00	50,00	80,00	100,00	150,00	200,00	350,00	1450,00	2040,00
	TM.FCO	56,00	80,00	135,00	250,00	440,00	580,00	950,00	1330,00	2545,00	8630,00	16320,00
	TM.SECO	14,00	20,00	33,75	62,50	109,75	135,00	207,50	332,50	636,25	2920,00	4080,00

Fuente: (PRONAMACHS, 2000)

TM. FCO: TONELADAS MÉTRICAS

EN FRESCO

3.5 Clasificación Taxonómica:

Cuadro N°2 Clasificación taxonómica

División	ANGIOSPERMAE
Clase	DICOTYLEDONEAE
Subclase	ARCHICHLAMIDEAE
Orden	PAPAVERALES
Familia	BRASSICACEAE
Género	<i>Lepidium</i>
Especie	<i>Lepidium meyenii Walpers</i>
Nombre vulgar	Maca, maca maca

Fuente: De acuerdo al sistema de clasificación de Engler & Prantl, modificado por Melchior en 1964 (CONCYTEC, 2001).

3.6 Composición nutricional

En la raíz de maca existen 18 o 19 aminoácidos, resaltando que 7 de ellos son esenciales y su contenido es más alta que en las papas y zanahorias. El contenido de ácidos grasos insaturados, como linoleico y oleico es de 52,7% a 60,3% de ácidos grasos totales (Dini *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007). Los minerales encontrados por 100 g de materia seca de maca destacan: calcio 247 mg, fósforo 183 mg y hierro 14,7 mg (García *et al.*, 2009).

Estudios fitoquímicos efectuados en la raíz han revelado la presencia de alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos y saponinas. El análisis del extracto metanólico de la raíz de maca contiene uridina, ácido málico y sus derivados benzólicos además de glucosinolatos (glucotropaelina y m-metoxiglucotropaelina) (Orellana *et al.*, 2005; Canales *et al.*, 2000; Marín-Bravo, 2003; Rondán-Sanabria y Finardi-Filho, 2009); estos últimos, tienen importancia en la formación de isotiocianatos que inhiben el desarrollo de tumores al incrementar la actividad de las enzimas, además inhiben la mitosis y estimulan la muerte celular de las células tumorales. (Johnson, 2002).

En la raíz de maca (*Lepidium meyenii* W.) en polvo deshidratado se puede observar en la tabla 1, donde los carbohidratos están compuestos 23,4% de sacarosa, 1,55% de glucosa, 4,56% de oligosacáridos y 30,4% de polisacáridos (Dini *et al.*, 1994; Valentová *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Cuadro N°3 Composición química de la maca (100g parte comestible)

DETERMINACIONES	1 Morfotipos de maca			2 Maca		3 Maca	4 Maca
	Amarillo	Rojo	Negro	Fresca	Harina	seca	seca
Humedad, g	9,71					10,4	5-19,62
Proteínas, g	17,99					14,00	10-18,25
Grasa, g	0,82					2,2	0,2-2,2
Fibra, g	5,30					7,45	51,81-76,05
Cenizas, g	3,49					4,9	3,46-6,43
Carbohidratos, g	62,69	62,6	63,82	21,9	24,6	68,75	3,85-8,5
N₂ total, g	2,87	2,76	2,42	-	-	-	-
N₂ no prot, g	1,55	1,16	1,36	-	-	-	-
Proteína pura, g	8,25	9,97	7,7	-	-	-	-
Almidón, g	37,86	37,52	38,18	-	-	-	-
Az.sol.red.Di, g	6,17	6,03	7,02	-	-	-	-
Az.sol.red.Ind, g	16,52	17,26	17,10	-	-	-	-
VITAMINAS (mg)							
Caroteno	-	-	-	-	0,8	-	0,07
Riboflavina	0,61	0,5	0,76	0,11	-	0,39	0,31-0,76
Tiamina	0,42	0,52	0,43	0,05	-	1,17	0,15-0,17
Niacina	43,03	37,27	39,06	-	-	-	37,27-43,03
Ac, Ascórbico	3,52	3,01	2,05	0,8	-	2,86	0,8-3,52
SALES MINERALES (mg)							
Potasio	1130	1180	1000	-	-	2050	1000-2050
Sodio	20	20	40	-	-	18,7	18,7-40
Magnesio	70	80	80	-	-	-	70-114,63
Calcio	190	200	240	72	227	294,42	150-650,35
Fósforo	320	290	280	53	328	183,33	183-329
OLIGOELEMENTOS							
mg/100g	ppm					mg	
Cobre	6	6	8	-	-	5,9	5,90
Zinc	32	30	30	-	-	3,8	2,8-6,12
Manganeso	22	20	22	-	-	0,8	0,8
Hierro	80	62	86	4,3	9,9	21,23	9,93-24,37
Boro	12	24	26	-	-	-	-
Selenio	-	-	-	-	-	-	0,27-0,30

Nota: N₂ total = nitrógeno total, N₂ no prot. = nitrógeno no protéico
(-) No reportado

Az.sol.red.Di, g = azúcares solubles reductores directos
Az.sol.red.Ind, g = azúcares reductores indirectos

Fuente: Ruíz, R. (2002) Obtención y Caracterización de una bebida en polvo en base de maca (*Lepidium meyenii* W.), Kiwicha (*Amarantus candatus*), y cacao (*Theobroma cacao* L.)

3.7 Comercialización

Estados Unidos encabeza el ranking de envíos de exportación de harina de maca, el segundo es Japón, seguido de Alemania, Francia, Australia, Reino Unido, Canadá, República de Corea y Países Bajos, entre otros de un total de 40 destinos. (Asociación de exportadores, 2009).

3.8 Control de Calidad

La presencia de microorganismos en los alimentos no representa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior en estos productos, más si se tiene en cuenta que la gran mayoría contiene naturalmente levaduras, mohos y otros microorganismos inocuos. La mayor parte de los alimentos se convierten potencialmente peligrosos solo después de que se han violado los principios de higiene, limpieza y desinfección. La puesta en evidencia de estos riesgos se basa en el análisis de muestra de alimentos en busca de los propios agentes causales o indicadores de una contaminación no admisible. Uno de los problemas en la comercialización de alimentos es la carga microbiana, relacionado a la inocuidad y salubridad. (ICMSF, 2000).

3.9 Calidad microbiológica

En la maca se han encontrado altos niveles de aerobios mesófilos y hongos como principal desventaja en la comercialización de estos productos a mercados donde las regulaciones son exigentes. (Carrión *et al.*, 2009).

En un estudio realizado (Orellana *et al.*, 2005). Se determinó que la prevalencia de hongos en la harina de *Lepidium peruvianum* «maca» en un total de 60 muestras procedentes de los mercados de Andahuaylas, Ica y Cañete. Las muestras fueron procesadas mediante el método de diluciones sucesivas y sembradas en superficie en Agar Papa Dextrosa (APD). El 96,7% del total de muestras estaban contaminadas; identificándose 9 géneros y un total de 14 especies de mohos filamentosos, incluyendo uno clasificado como *Mycelia sterilia*. El recuento general de colonias va desde 33×10^4 a 61×10^4 UFC/g., no existiendo diferencia significativa entre los centros de expendio. Los géneros con mayor incidencia fueron *Penicillium* y *Fusarium*. Las altas prevalencias de hongos contaminantes en la harina de maca sugieren continuar estudios destinados a evaluar el efecto y riesgo sanitario que representa su consumo para la salud humana.

3.10 Mohos y levaduras

3.10.1 Descripción:

Los hongos y levaduras son microorganismos eucariotas, pueden ser unicelulares o pluricelulares. La mayoría de hongos, sin embargo, son pluricelulares, o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (sexuales y asexuales). (Alexopoulos, 1966).

Las levaduras son hongos con forma oval (5-20 μ m) inmóviles y que se dividen por diversos mecanismos, especialmente por gemación. Deben considerarse como hongos que han perdido su forma filamentosa y se han convertido en organismos unicelulares. (Tortora, 1993)

3.10.2 Hábitat:

Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal, como por ejemplo *Candida albicans*, que es una levadura y puede comportarse como oportunista y resultar patógena cuando se produce una disminución en los mecanismos de resistencia del individuo. (Anderson y Calderón, 1999).

3.10.3 Reproducción:

Estos hongos están clasificados en el subreino fúngico Deuteromycotina, cuya producción es por esporas asexuales conocidas como conidios. En estos tres géneros, los conidios se forman a partir de las células especializadas (fiálides), en las que tiene lugar la mitosis, y a partir de los cuales se generan los conidios en grandes cantidades. (ICMSF, 1996).

3.10.4 Micotoxinas

Otras especies de hongos pueden producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas como, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, que es un hongo filamentoso. Por otra parte, algunos hongos son difásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras como levaduras. (Anderson y Calderón, 1999)

Algunos hongos toxigénicos están omnipresentes y en algunos casos tienen una evidente relación ecológica con las provisiones de alimentos humanos. La flora fúngica natural que coexiste con la producción de alimentos está dominada por tres géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. (ICMSF, 1996).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que tienen efectos adversos en seres humanos, animales y cultivos que resultan en enfermedades y pérdidas económicas. La contaminación mundial de alimentos y piensos con micotoxinas es un problema significativo. Aflatoxinas, ocratoxinas, tricótesenos, zearalenona, fumonisinas, toxinas tremorgénicas y alcaloides del cornezuelo de centeno son las micotoxinas de

mayor importancia agro-económico. Algunos hongos son capaces de producir más de una micotoxina y algunas micotoxinas son producidas por más de una especie de hongos. A menudo, más de una micotoxina se encuentra en un sustrato contaminado. Las micotoxinas son más frecuentes en las zonas con un clima cálido y húmedo, favorable para el crecimiento de mohos, que también se encuentran en las zonas templadas. (Zain, 2011).

En un estudio sobre 91 muestras de plantas medicinales, se encontró una variedad de microorganismos, con 90% pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, de los cuales el 22% tenía la posibilidad de generar aflatoxinas. (Sánchez, 2006).

3.11 Tratamiento de conservación del producto

Muchos productos naturales necesitan ser desinfectados, pasteurizados o esterilizados. Existen muchas alternativas de solución como la irradiación, óxido de etileno, ozono y UV pero “Organic Sterilization System (OSS)” con Vapor y Vacío es la única solución natural, eficiente, reconocida y permitida internacionalmente. (Peruvian Nature, 2014).

Un sistema de tratamiento térmico OSS en harina de maca con un tiempo y temperatura establecido que reduce los niveles de microorganismos aerobios, mohos y levaduras, Coliformes, *E. coli* y *Salmonella* no alterando sus aspectos nutricionales y sensoriales. (Guevara *et al.*, 2016.).

Para producir harina de espárragos por tratarse de un producto de campo se produce contaminación durante el cultivo, la cosecha y el procesamiento. Dependiendo del nivel de flora, el clima y de las prácticas agrícolas, puede encontrarse altos niveles de población microbiana de hasta 10^6 microorganismos. El secado o tratamiento térmico disminuye la contaminación, las operaciones posteriores de molienda, mezcla, envasado y almacenamiento la aumentan nuevamente, a esto habría que agregar, que la alta humedad de la costa peruana, favorecería la aparición de hongos, adicionalmente -producto del manipuleo- se podrían incorporar microorganismos patógenos. (Vargas, 2005).

Diecesiete especies de hierbas establecidas en los remedios tradicionales tailandeses eran descontaminadas microbianamente por irradiación gamma en dosis de 7.7 y 8.8 kGy. Las muestras de hierbas se recogieron al azar cuatro veces de los productores de Chiang Mai durante un período del año. Todos ellos fueron probados, cualitativa y cuantitativamente, por bacterias aerobias, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.*, Bacterias coliformes, hongos y antes y después de gamma tratamiento. Fueron los microorganismos que no se encuentran después del tratamiento gamma; y el color, aroma, y la textura de las hierbas permanecido habituales. La dosis aplicada de la irradiación gamma estaba dentro de los límites reglamentarios en Tailandia (<10 kGy) y el país de exportación principal (EE.UU.<30 kGy). La irradiación gamma es un tratamiento eficaz de descontaminación microbiana para la exportación de hierbas tailandesas. (Phianphak; Rengpipat; Cherdshewasart, 2007).

Se aplicaron diversas dosis (0-20 kGy) de radiación gamma a muestras de harina de maca (*Lepidium meyenii* W.) amarilla, blanca y morada para descontaminarlas. La dosis de radiación gamma necesaria para eliminar los aerobios mesófilos fue 12-15 kGy mientras que para eliminar hongos fue necesario 1-8 kGy, dependiendo del tipo de ecotipo. Se determinó la actividad antioxidante de las muestras irradiadas por el método de neutralización del radical DPPH. Los valores de IC50 de las muestras estudiadas indican que la radiación gamma no modifica sustancialmente la actividad antioxidante de los extractos acuosos de maca amarilla, blanca y morada. En cambio, la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de maca amarilla irradiada disminuye notoriamente, mas no así la de los otros ecotipos. (Carrión, 2009).

Según Guevara, A. (2016) la maca polvo con tratamiento térmico de 6 y 8 minutos, obtuvo reportes de mohos y levaduras por debajo de los límites establecidos <10 UFC/mL cumpliendo la Resolución Ministerial 615-2003-SA/DM (MINSA, 2003).

3.12 Placas Petrifilm™ para el recuento de mohos y levaduras

El Petrifilm 3M™ Recuento rápido de Mohos y Levaduras (RYM) es sencillo, listo para usar de detección rápida del método de cultivo cromogénico y enumeración de mohos y levaduras en productos alimenticios.

El método de recuento de Placa Petrifilm 3M™ RYM fue comparado por la U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA BAM) Chapter 18, Yeasts, Molds and Mycotoxins y el ISO 21527:2008 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Método Horizontal de enumeración de mohos y levaduras – Parte 1: Técnica de Recuento de colonias en productos con actividad de agua mayor que 0.95 y Parte 2: Técnica de Recuento de colonias en productos con actividad de agua menor o igual que 0.95 métodos de referencia de Almendras crudas y hamburguesas crudas de carne picada cruda (77% magro).

El método de Placa Petrifilm 3M™ recuento de RYM en un estudio colaborativo fue evaluado de múltiples laboratorios siguiendo las directrices actuales de validación de AOAC. Se evaluaron tres niveles de contaminación objetivo (bajo, 10-100 UFC / g, medio, 100-1000 UFC / g, alto 1000-10 000 UFC / g), así como un nivel de control no inoculado (0 CFU / g) para cada matriz. Las muestras evaluadas por el método Placa Petrifilm 3M™ RYM se prepararon por duplicado y se incubaron a 25°C y 28°C.

Las placas a ambas temperaturas se enumeraron después de 48 y 60 h de incubación. No se observaron diferencias significativas entre el Placa Petrifilm 3M™ RYM y los métodos de referencia BAM o ISO 21527 de la FDA para cada nivel de contaminación. No se observaron diferencias estadísticas entre las muestras analizadas por el método Placa Petrifilm 3M™ RYM (a 25°C o 28°C) y los métodos de referencia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la enumeración de colonias a las 48 y 60 h en el método Placa Petrifilm 3M™ RYM y los métodos de referencia. (AOAC-OMA, 2014).

IV. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis General:

- El ensayo microbiológico con el método N°1 de recuento rápido de hongos es más efectivo a menor cantidad de tiempo que el método N°2 convencional y el método N°3 tradicional de hongos.

4.2 Hipótesis Específicas

- El ensayo microbiológico del método N°1 recuento rápido de hongos es más efectivo a menor cantidad de tiempo para la cuantificación de hongos.
- El ensayo microbiológico del método N°2 recuento convencional de hongos es más efectivo para la cuantificación de hongos.
- El ensayo microbiológico del método N°3 recuento tradicional de hongos es más efectivo para la cuantificación de hongos.
- Los tres ensayos microbiológicos método N°1, 2 y 3 son efectivos para la cuantificación de hongos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de la experimentación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Control y Aseguramiento de la Calidad de Peruvian Nature, ubicada en Calle las Gardenias, Mz. I, lote 12, Praderas de Lurín

5.2 Tipo de investigación

El tipo de investigación es experimental con enfoque cuantitativo.

5.3 Diseño de investigación

Cuadro N°4. Recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTRA	METODO RECuento RÁPIDO	METODO CONVENCIONAL	METODO TRADICIONAL	REPRODUCIBILIDAD
LOTE 1	UFC/mL	UFC/MI	UFC/mL	FECHA 1
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
LOTE 15	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	FECHA 2
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	

5.4 Variables

5.4.1 Variable Independiente

Comparar tres métodos microbiológicos para el recuento de hongos.

5.4.2 Variable dependiente

Recuento de hongos

5.5 Instrumentos de investigación

5.5.1 Material Biológico.

Se utilizó 10 kilogramos de Harina de Maca (*Lepidium meyenii* W.) procedente de 15 lotes producidos en las Instalaciones de Peruvian Nature.

5.6 Procedimiento

Para el aislamiento de los hongos presentes en las muestras de Maca, se realizó lo siguiente:

5.6.1 Preparación del diluyente (Solución buffer Fosfato)

COMPOSICIÓN	CANTIDAD
Dihidrogenofosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	42.5g
Agua	1000mL

Preparación:

- Se disolvió la sal en 500mL de agua destilada, se enrazó a 1L de agua destilada.
- Se agregó 1mL de esta solución en 1L de agua destilada y homogenizar.

- Se sirvió en matraces de vidrio 225mL y autoclavó a 121°C por 15 minutos.
- Se Ajustó el pH hasta 7.2 + 0.1 a 25°C.

5.6.2 Preparación de la muestra:

- Se pesó 25g. de Harina de maca en forma aséptica y se vertió en una bolsa estéril con filtro.
- Se adicionó 225 mL de buffer fosfato.
- Se mezcló y homogenizó manualmente la muestra por 1 minuto.

5.6.3 Recuento por el método N° 1 (AOAC Official Method 2014.05

Enumeration of Yeast and Mold in Food):

(Ver Diagrama de flujo de proceso N°1)

Inoculación

- Se colocó la placa en una superficie plana y nivelada.
- Se rotuló las placas petrifilm (nombre, fecha de inicio y lote).
- Se levantó la película superior.
- Con el Pipetor se calibró 1mL, se cogió un tip y se colocó perpendicularmente 1 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Se bajó la lámina semitransparente superior
- Se colocó el dispersor correspondiente sobre la película superior, cubriendo la muestra.
- Se liberó la película superior dejando que caiga sobre la muestra.
- Se bajó la lámina semitransparente superior.
- Se colocó el aplicador referencia 6425 Placa Petrifilm 3M™ plano en el centro de la placa de recuento rápido de levaduras y mohos Placa Petrifilm 3M™.
- Se presionó firmemente en el centro de la barra 5 de separación del aplicador para distribuir la muestra uniformemente. Se extendió el inóculo sobre la totalidad de la placa de recuento rápido de levaduras y mohos 3M™

Placa Petrifilm™ por el área de crecimiento antes de que se forme el gel. No deslice la barra del aplicador a través de la película.

- Se levantó el aplicador de la placa de recuento rápido de levaduras y mohos Placa Petrifilm 3M™ dejándola en reposo durante al menos 1 minuto para que solidifique el gel.

Incubación

- Se incubó las placas rápidas de mohos y levaduras de 3M™ Placa Petrifilm™ a 25° a 28°C durante 48 ± 2 horas en una posición horizontal con la cara arriba, apiladas, pero no más de 40 placas
- Las colonias poco visibles, se dejó un período adicional de 12 horas de tiempo de incubación para mejorar la interpretación.

Interpretación

- Se leyeron los resultados del recuento de levaduras y mohos a las 48 horas. Ciertas levaduras y mohos, de crecimiento más lento, fueron pocos visibles a las 48 horas.
- Para mejorar la interpretación de estos mohos se dejó un periodo adicional de 12 horas de tiempo de incubación.

Almacenamiento

- Se almacenó los paquetes cerrados a una temperatura de < 8°C. las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente de trabajo antes de abrirlos. Las Placa Petrifilm 3M™ tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observar la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.
- Para cerrar un paquete abierto, se dobló el sobre y selló con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.

- Se mantuvieron los paquetes cerrados a temperatura <50%. Se utilizó las Placas Petrifilm máximo un mes después de abierto el paquete.

5.6.4 Recuento por el método N°2 (AOAC official method 997.02 Yeast and Mold Counts in Food Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm Method) y método rápido))

(Ver Diagrama de flujo de proceso N°2)

Inoculación

- Se colocó la placa en una superficie plana y nivelada.
- Se rotuló las placas petrifilm (nombre, fecha de inicio y lote).
- Se levantó la película superior.
- Con el pipetor se calibró 1mL, se cogió un tip y se colocó perpendicularmente 1 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Se liberó la película superior dejando que caiga sobre la muestra.
- Se bajó la lámina semitransparente superior.
- Se sostuvo la barra cruzada del dispersor para mohos y levaduras, se colocó sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.
- Se presionó suavemente el dispersor para distribuir la muestra.
- Se levantó el dispersor y esperó por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel.

Incubación

- Se incubó las placas caras arriba en grupos de hasta 20 unidades entre 20° a 25°C por 5 días.

Interpretación

- Algunos mohos crecieron rápidamente, por lo que fue útil leer y contar las placas a los 3 días, ya que las colonias más pequeñas se veían más oscuras que los mohos ya crecidos a los 5 días.

- Finalmente se realizó el conteo de las colonias con una fuente de luz amplificada.

Almacenamiento de las placas

- Se almacenó los paquetes cerrados a una temperatura de $<8^{\circ}\text{C}$. las placas se usaron antes de su fecha de caducidad. Los paquetes se atemperaron al ambiente de trabajo antes de abrirlos. Las placas Petrifilm tuvieron un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Se observó la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.
- Para cerrar un paquete abierto, se dobló el sobre y selló con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.
- Se mantuvieron los paquetes cerrados a temperatura $<50\%$. Se utilizó las Placas Petrifilm máximo un mes después de abierto el paquete.

5.6.5 Recuento por el método 3 ICMSF (Método tradicional): Yeasts. Molds and Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Mold in Food - Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line. FDA 8th Ed. Rev. A / 1998. Revised: April 2001, Chapter 18.

(Ver Diagrama de flujo de proceso N°3)

Preparación de Agar Sabouraud con cloranfenicol

- Se preparó la solución stock de Cloranfenicol por dilución de 0,1 g cloranfenicol en 40 mL de agua destilada, se añadió esta solución a 960 mL de medio Agar Sabouraud y se mezcló antes de autoclavar.
- Cuando el Cloranfenicol, así como la clorotetraciclina se utilizaron, se añadió 20 mL de la solución stock de cloranfenicol a 970 mL de medio antes de autoclavar. Luego, se preparó la solución stock de clorotetraciclina, disolviendo 0,5 g de antibiótico en 100 mL de agua destilada y se esterilizó por filtración. Se utilizó 10 mL de esta solución por cada 990 mL de medio autoclavado y temperado.

- Se refrigeró en la oscuridad y se volvió a utilizar la solución stock remanente hasta 1 mes después. La solución stock fue llevada a temperatura ambiental antes de haber sido añadido al medio temperado.
- Se refrigeró en la oscuridad y se volvió a utilizar la solución stock remanente hasta 1 mes después. La solución stock de cloranfenicol fue llevada a temperatura ambiental antes de haber sido añadido al medio temperado.
- Se mezcló antes de servir en placas.

Inoculación

Método por difusión en placa:

- Se agarró el pipeteador calibrado a 1.0 mL, se cogió un tip (punta) y se tomó 1.0 mL de la muestra homogenizada.
- Se pipeteó asépticamente 0,1 mL de cada dilución en placas de agar Sabouraud solidificado y se difundió el inóculo con una varilla curvada de vidrio estéril.

Incubación

- Se incubó las placas luego de transcurridos 5 días. En algunos casos no existió crecimiento hasta el quinto día, se re-incubaron las placas por otras 48 horas. No se efectuó el recuento a los 3 días, debido a que la manipulación de las placas ya que pudo haber producido crecimiento secundario a raíz de las esporas desprendidas, lo que hubiera invalidado el recuento efectuado al 5to día.

Interpretación

- Se realizó el recuento sobre placas.
- Se reportó los resultados en unidades formadoras de colonias UFC/mL.
- Las placas que no tuvieron colonias, se reportó el conteo de mohos y levaduras como menor de diez.

5.7 Análisis de datos

Se comparó el recuento microbiológico obtenido de los tres métodos (Método de recuento rápido, Método convencional y Método tradicional) mediante el Test F de ANOVA (o Kruskal-Wallis).

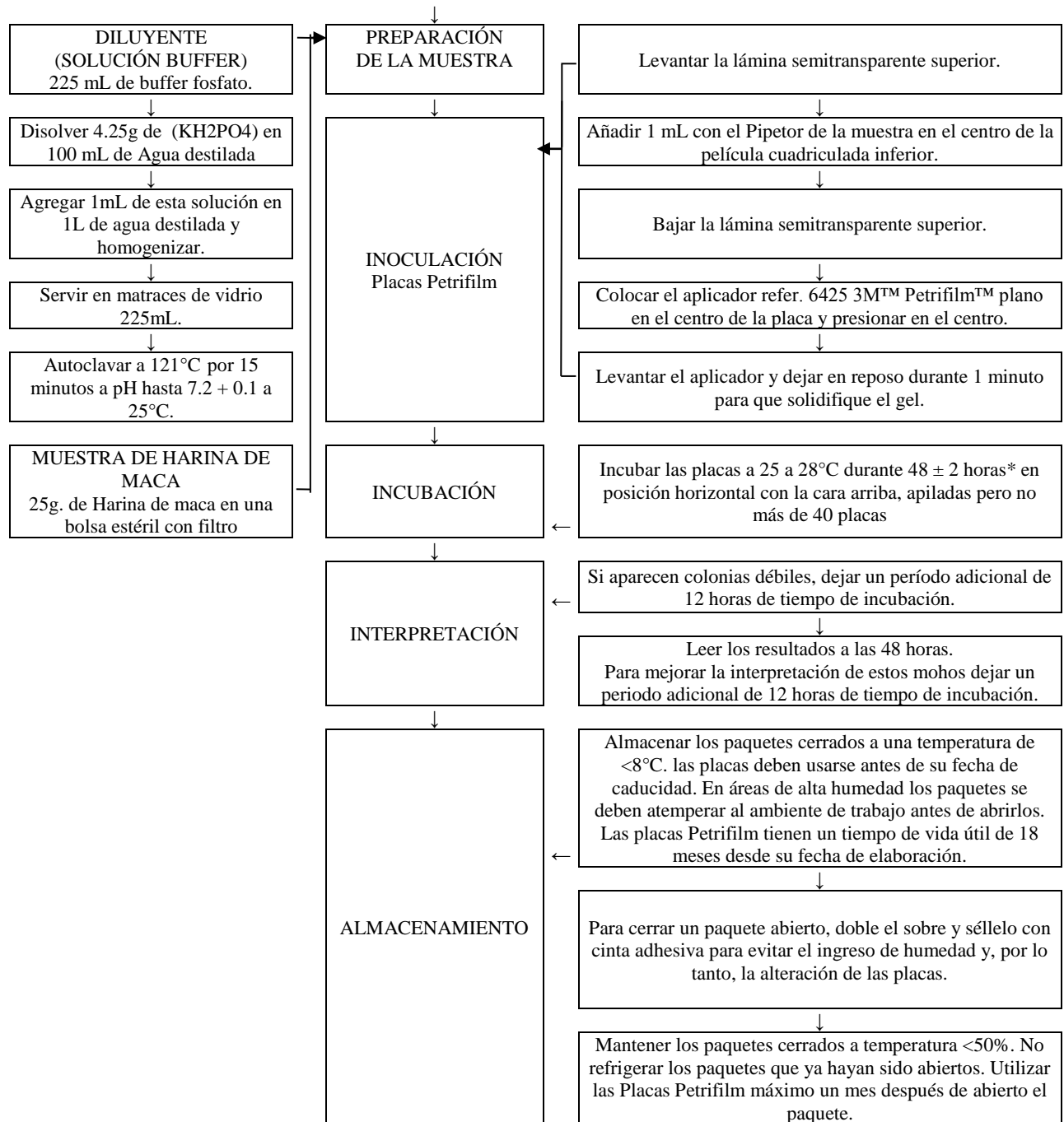
Se calcularon las estadísticas descriptivas del recuento bacteriano.

5.8 Aspecto ético

El presente estudio no tuvo ninguna implicancia ética.

Diagrama de flujo de proceso N°1

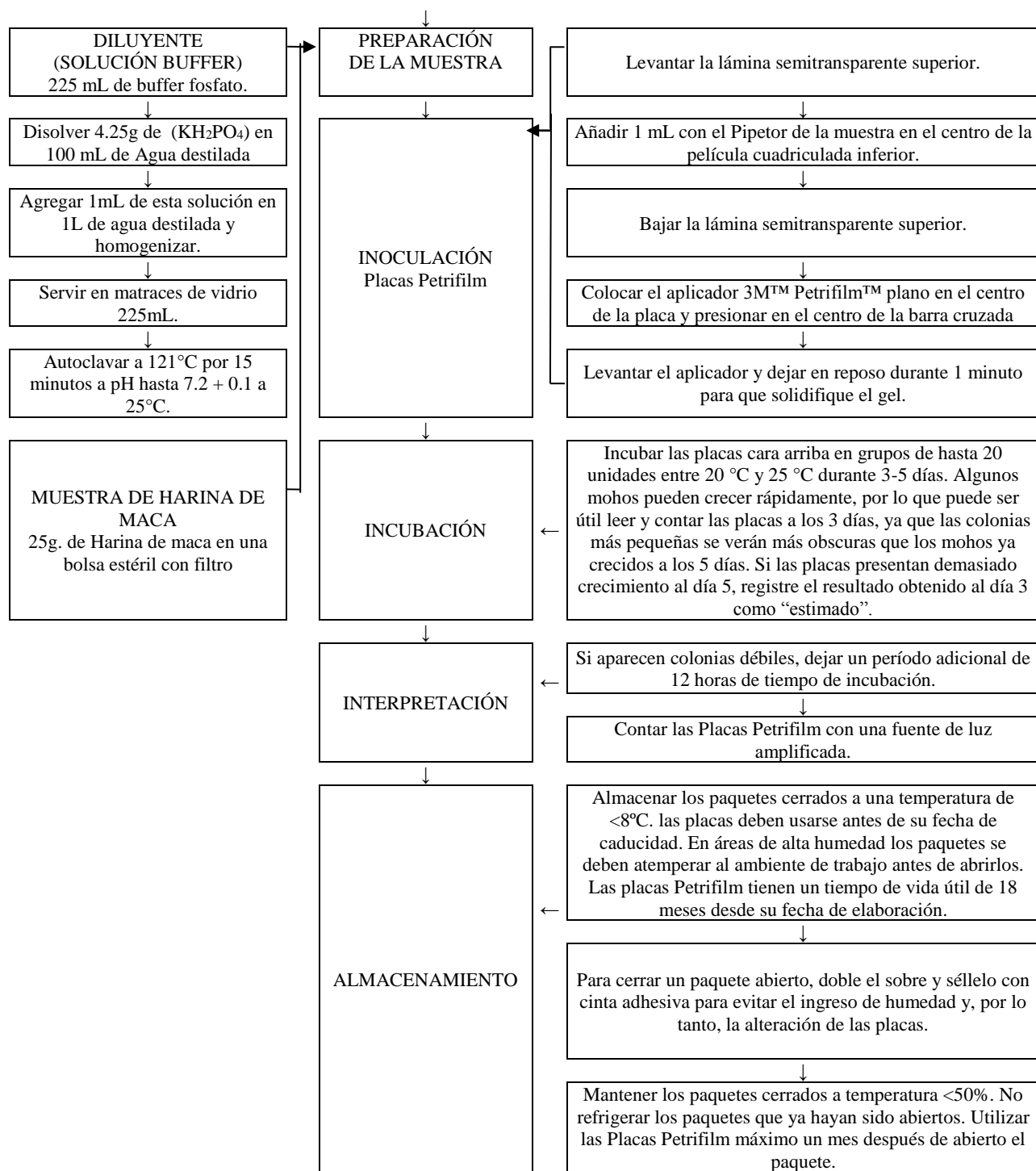
Método Petrifilm 3M™ para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras



Fuente: AOAC Official Method 2014.05 Enumeration of Yeast and Mold in Food

Diagrama de flujo de proceso N°2

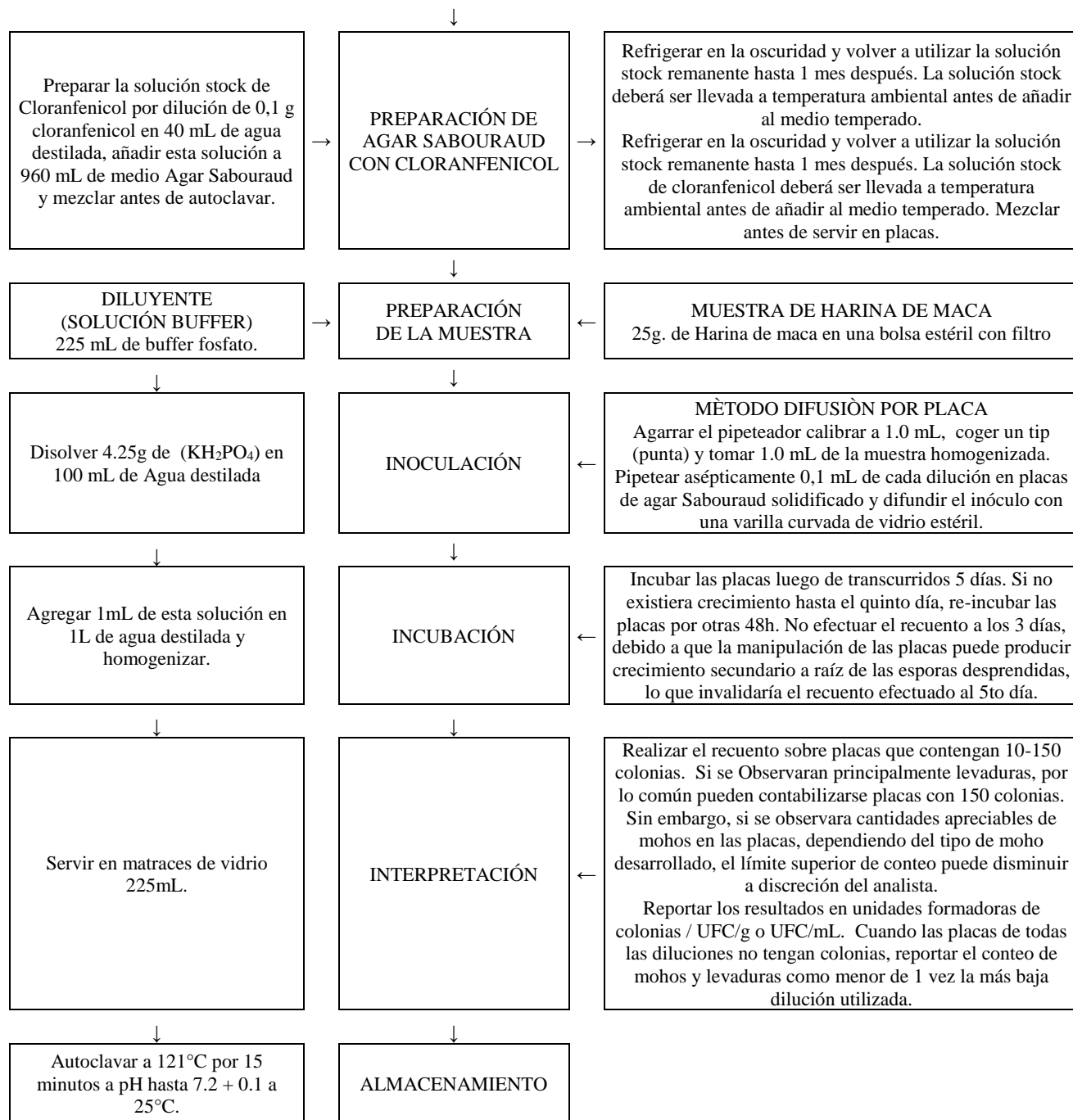
Método Petrifilm 3M™ para el Recuento de Mohos y Levaduras



Fuente: AOAC official method 997.02 Yeast and Mold Counts in Food Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm Method) y método rápido)

Diagrama de flujo de proceso N°3

Método tradicional para el Recuento de Mohos y Levaduras



Fuente: Yeasts. Molds and Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Mold in Food - Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line. FDA 8th Ed. Rev. A / 1998. Revised: April 2001, Chapter 18.

VI. RESULTADOS

Tabla N°1. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	MÉTODO RECUENTO RÁPIDO	MÉTODO CONVENCIONA L	MÉTODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 1	<10 UFC/mL	10 UFC/MI	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/MI	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/MI	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/MI	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/MI	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°1 se comparan las tres metodologías verificando que los resultados son similares en un 100%

Tabla N°2. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 2	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°2 se comparan las tres metodologías verificando que los resultados son similares en un 100%

Tabla N°3. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 3	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	20 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°3 se comparan las tres metodologías presentando un 87% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°4. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 4	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°4 se comparan las tres metodologías presentando un 93% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°5. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 5	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°5 se comparan las tres metodologías presentando un 87% de similitud en los resultados. del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°6. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 6	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	40 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	20 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°6 se comparan las tres metodologías presentando un 80% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°7. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 7	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°7 se comparan las tres metodologías presentando un 93% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°8. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 8	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°8 se comparan las tres metodologías verificando que los resultados son similares en un 100%

Tabla N°9. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 9	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N° 9 se comparan las tres metodologías presentando un 93% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°10. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 10	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	40 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	20 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°10 se comparan las tres metodologías presentando un 87% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°11. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 11	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	30 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°11 se comparan las tres metodologías presentando un 90% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°12. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 12	10 UFC/mL	20 UFC/mL	30 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	20 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°12 se comparan las tres metodologías presentando un 73% de similitud en los resultados del método recuento rápido, método convencional y método tradicional.

Tabla N°13. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 13	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°13 se comparan las tres metodologías verificando que los resultados son similares en un 100%

Tabla N°14. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 14	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

Interpretación: En la tabla N°14 se comparan las tres metodologías verificando que los resultados son similares en un 100%

Tabla N°15. Resultado de recuento de hongos en harina de Maca polvo OSS con tratamiento térmico 9 minutos.

MUESTR A	METODO RECUENTO RÁPIDO	METODO CONVENCIONA L	METODO TRADICIONA L	REPRODUCIBILIDA D
LOTE 15	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	10/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	27/08/2016
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	
	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	

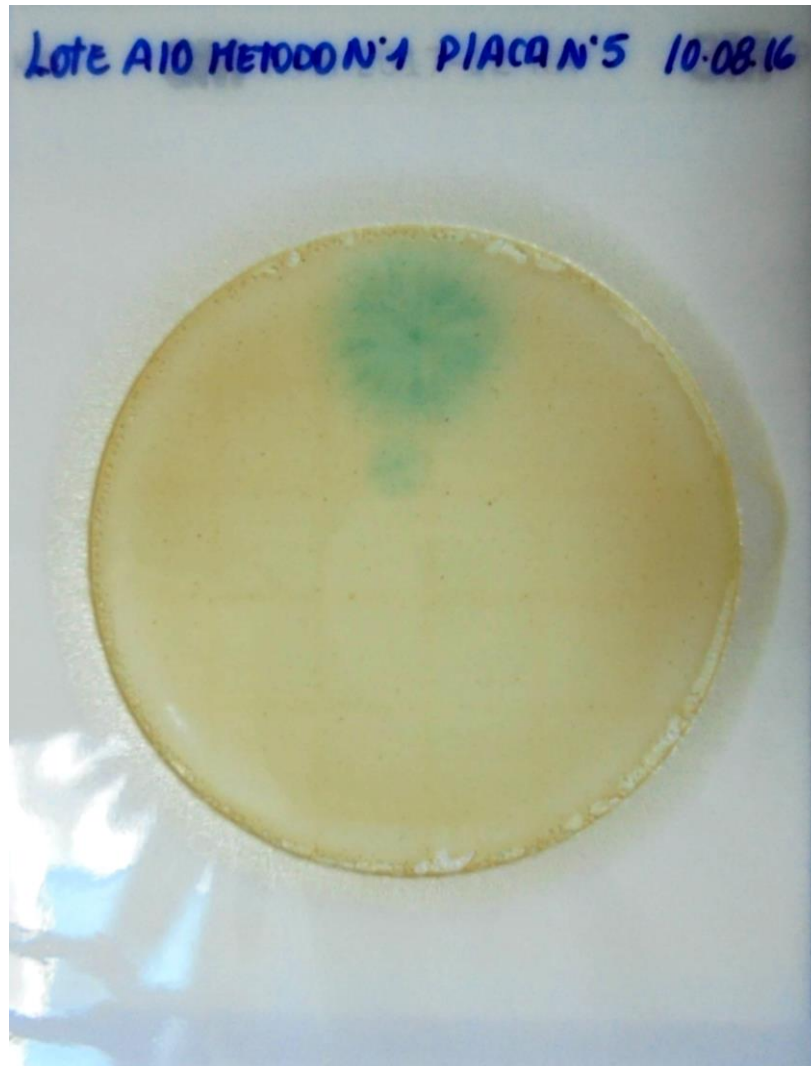
Interpretación: En la tabla N°15 se comparan las tres metodologías verificando que los resultados son similares en un 100%

Tabla N°16 Métodos microbiológicos para el recuento de mohos y levaduras y resultados

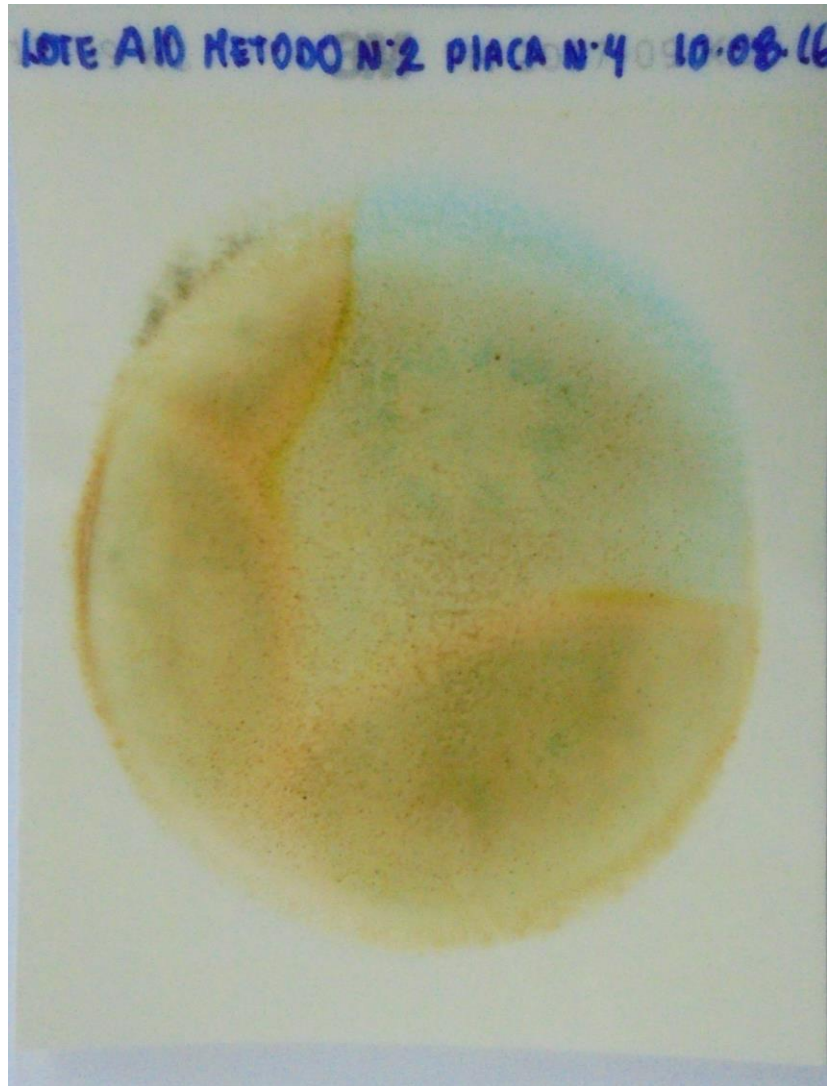
Métodos microbiológicos para el recuento de mohos y levaduras y resultados				
		Resultados		Total
		menor a 10	mayor o igual a 10	
Métodos	Método N°1 Recuento rápido petrifilm de mohos y levaduras	140 93,3%	10 6,7%	150 100%
	Método N°2 Recuento petrifilm de mohos y levaduras	134 89,3%	16 10,7%	150 100%
	Método N°3 Recuento tradicional de mohos y levaduras	134 89,3%	16 10,7%	150 100%
Total		408	42	450

El valor de $X^2_0 = 1,891$, $p\text{-valor} = 0,389$.
Interpretación: Los resultados obtenidos con estos tres métodos son similares.

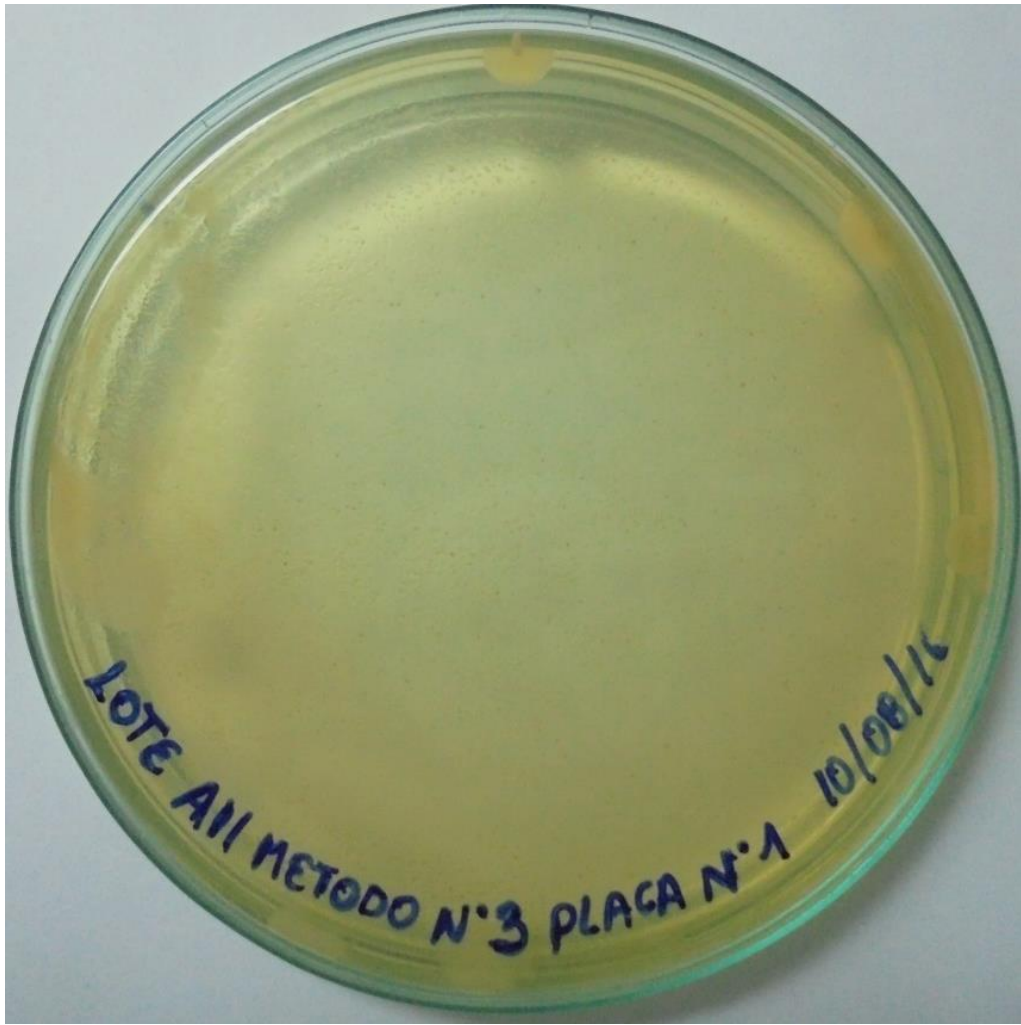
Fotografía N°2 Placa Petrifilm 3M™ para el recuento rápido de mohos y levaduras



Fotografía N°3 Placa Petrifilm 3M™ Recuento de mohos y levaduras



Fotografía N°4 Recuento de mohos y levaduras en placa tradicional para el recuento de mohos y levaduras



VII. DISCUSIÓN

En Perú se encontró que la comparación del método Petrifilm 3M™ ha sido evaluado por Ccolque R., quién menciona que los recuentos obtenidos con el sistema de placas Petrifilm y con el método tradicional para la determinación del Límite Microbiano en productos derivados de la Maca (*Lepidium meyenii W.*) no presentan diferencia significativa en los resultados microbiológicos.

Estudios realizados por Alonso L., en Colombia demuestran que las placas Petrifilm 3M™ eliminan posibles errores en la preparación de medios de cultivo tradicionales, lo cual reduce la variación en los resultados y genera una mayor exactitud y consistencia en los resultados.

Con respecto al cumplimiento de requisitos planteados por la R.M. Calidad Microbiológica de Alimentos para el Consumo Humano 2003, se obtuvo que el 100% (450 muestras) cumple con lo especificado para el Recuento de Levaduras y Mohos.

Los resultados obtenidos en el estudio realizado a la Maca polvo con tratamiento térmico de 9 minutos se observó que, de 450 muestras, 408 se encontraron debajo de los límites establecidos <10 UFC/mL y 42 mayores a 10 UFC/mL.; al ser comparados con los resultados obtenidos por Guevara (2016); se observa que los resultados obtenidos en mohos y levaduras del total de muestras analizadas fueron <10 UFC/mL.

Es importante resaltar que el método de placas Petrifilm es reconocido por la Association of Oficial Analytical Chemists (AOAC) para el recuento de hongos y levaduras.

Teniendo en cuenta los resultados de la prueba de Chi-cuadrado obtenidos, puede considerarse muy efectivo el uso de Placas Petrifilm de recuento rápido para el recuento microbiano. Ccolque R. concluye que la sencillez de su uso de las placas Petrifilm, la eliminación de la preparación de medios de cultivo, disminución de costos, tiempo, personal son las ventajas que servirían de justificación para su uso en el control microbiológico en los procesos de industrialización de Maca.

VIII. CONCLUSIONES

- Se validó microbiológicamente el método de recuento rápido para la cuantificación de hongos en Harina de maca (*Lepidium meyenii walp.*) polvo OSS (Organic Sterilization System) con tratamiento térmico de 9 minutos.
- Los resultados estadísticos muestran que no existe diferencia significativa entre el método N°1 Recuento rápido de mohos y levaduras en Placa Petrifilm 3M™ y el Método tradicional para el Recuento de Mohos y Levaduras Yeasts. Molds and Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Mold in Food - Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line., al realizar la Prueba de Chi-cuadrado, se obtuvo un valor de significancia de 0,389 para el recuento de mohos y levaduras.
- Los resultados obtenidos de la Prueba de Chi-cuadrado 0,389 en el recuento microbiano demuestran que el método alternativo de placas Petrifilm puede reemplazar al método convencional.
- El método rápido de placas Petrifilm™, otorga beneficios como el ahorro de tiempo de 2 días con respecto al método convencional de placas Petrifilm^{MR} y 4 días al método tradicional.

IX. RECOMENDACIONES

Promover el uso de Placas Petrifilm para el análisis Microbiológico en los procesos de Control de Calidad de las industrias que elaboran productos naturales de origen vegetal, debido a su fácil uso, son más económicas, no se requiere la preparación de medios de cultivo a diferencia del método convencional.

Es recomendable la introducción de las placas de Petrifilm 3M™ Rapid Yeast and Mold, en los análisis rutinarios con diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} , como parte de la estandarización de la metodología interna del laboratorio.

Tomar como muestra inicial un peso de 25 g de harina de Maca a fin de tener una porción representativa del lote y poder estar estadísticamente lo más cercano a la realidad del lote (OMA method number 2014.05).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, G. (1966). Introducción a la Micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Pg. 199-218.
- Tórtora G, Funke B, Case C. (1993). Introducción a la Microbiología. Editorial 1. Acribia, Zaragoza – España.
- Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P.; Schettino, O. (1994). Chemical composition of *Lepidium meyenii* W. Food Chemistry 49: 347–349.
- ICMSF. (1996). Microorganismos de los Alimentos-Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- Obregón Vilches, Lida. (1998). «Maca» Planta medicinal y nutritiva del Perú. Instituto de Fitoterapia Americano.
- Anderson, M. Calderón, V. (1999). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de Santos S.A. Segunda Edición. Pg. 125-138.
- ICMSF, (2000). Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en muestras de alimentos. 43pp.
- PRONAMACHS II Festival Internacional de la maca. Carhuamayo - Junín. (2000). Julio 12-16.
- Canales, M.; Aguilar, J.; Prada, A.; Marcelo, A.; Huamán, C.; Carbajal, L. (2000). Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* (maca) en ratones albinos y su descendencia. ALAN 50: 126 - 133.

- Yeasts. Molds and Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Mold in Food - Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line. FDA 8th Ed. Rev. A / 1998. Revised: April (2001), Chapter 18.
- Espinoza J, Pumacayo Z. (2001). Plantas Medicinales más comunes empleadas en el Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal
- Publicación CONCYTEC. (2001). Plantas Medicinales del valle del Mantaro. Lima.
- Ruiz R. (2002). Obtención y caracterización de una bebida en polvo a base de Maca (*Lepidium Meyenii Walpers*) Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) y Cacao (*Theobroma cacao* L.). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima Perú.
- INDECOPI. (2002). Patentes referidas al *Lepidium meyenii* (Maca): Respuestas del Perú. Ginebra 2-4.
- Johnson, I. (2002). Glucosinolatos: biodisponibilidad e importancia para la salud. International Journal for Vitamin and Nutrition Research 72: 26-31.
- Marín-Bravo, M. (2003). Histología de la Maca *Lepidium meyenii Walpers*. Revista Peruana de Biología 10: 101 - 108.
- Orellana, A.; Muchaypiña, J.; Guillermo, J. (2005). Prevalencia de hongos en harina de *Lepidium peruvianum* «Maca» en mercados de Andahuaylas, Ica y Cañete – Perú. Revista Peruana de Biología 12(3): 445-448.
- Vargas, J., Vivanco, M., Maldonado, M., Linares, M., Huamanlazo, P., & Quispe, F. (2005). Aplicaciones de la radiación gamma en frutas y hortalizas. Perspectivas agroindustriales para el espárrago peruano. Lima – Perú. IPEN. 123-128.
- Sánchez V, González A, Lurá M. (2006). Análisis microbiológico de hierbas medicinales y su contaminación por especies de aspergillus toxicogénicos. Acta Farm Bonaerense, 25(1): 89-94.

- Valentová, K.; Buckiová, D.; Kren, V.; Peknicová, J.; Ulrichová, J.; Simánek, V. (2006). The in vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts Cell Biology and Toxicology 22: 91–99.
- Phianphak W.; Rengpipat S.; Cherdshewasart, W. (2007). Gamma irradiation versus microbial contamination of Thai medicinal herbs. Journal of Science Technology 29: 158-166.
- Wang, Y.; Wang, Y.; McNeil, B.; Harvey, L.M. (2007). Maca: An Andean crop with multipharmacological functions. Food Research International 40: 783–92.
- Gonzales, G.; Gonzales C.; Gonzales-Castañeda, C. (2009). *Lepidium meyenii* (Maca): a Plant from the Highlands of Perú – from tradition to science. Res Complem Med. 16 (6): 373-380.
- Rondán - Sanabria, G.; Finardi-Filho, F. (2009). Physical–chemical and functional properties of maca root starch (*Lepidium meyenii Walpers*). Food Chemistry 114: 492 -498.
- Garcia R.M.; Gómez-Sánchez P.I.; Espinoza B.C.; Bravo R.F.; Ganoza M.L. (2009). Tablas peruanas de composición de alimentos. Lima, Perú.
- El Comercio, (2009). Exportación de harina de maca creció 18% entre enero y setiembre, reportó ADEX Disponible en:
- <http://elcomercio.pe/economia/negocios/exportacion-harina-maca-crecio-18-entre-enero-setiembre-reporto-adex-noticia-363880>.
- Carrión, J.; León, K.; Santiago, J. (2009). Actividad antioxidante de tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii walp*) tratada con radiación gamma. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química 12(2): 72-77.
- Zain, Mohamed E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 15, 129–144.

- Peruvian Nature S&S.SAC. (2014). Disponible en: <http://www.peruviannature.com/oss.html>.
- Guevara Pérez, A., Nolazco Cama, D., Cancino Chávez, K., & Oliva Cruz, C. (2016). Descontaminación microbiana de la maca (*Lepidium meyenii*) aplicando el sistema de esterilización orgánica (OSS) para preservar sus propiedades nutricionales y sensoriales. *Scientia Agropecuaria*, 7 (1) 59-66.
- Patrick Bird, Jonathan Flannery, Erin Crowley, James Agin, and David Goins. Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for the Enumeration of Yeast and Mold in Food: Collaborative Study, First Action 2014.05. 3M Food Safety Department, 3M Center – Bldg. 260-6B-01, St. Paul, MN 55144 Bird et al.: *Journal of AOAC International* Vol. 98, No. 3, 2015
- AOAC Official Method 2014.05 Enumeration of Yeast and Mold in Food 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate First Action (2014).
- AOAC official method 997.02 Yeast and Mold Counts in Food Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm Method) (2014).