



---

FACULTAD DE POSGRADOS

---

EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE AFLATOXINAS EN MAÍCES DE LA  
SIERRA ECUATORIANA

---

AUTOR

Margarita Susana García Gavilánez

---

AÑO

2020



**FACULTAD DE POSGRADOS**

**EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE AFLATOXINAS EN MAÍCES DE LA  
SIERRA ECUATORIANA**

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Magíster en Agroindustria con mención en Calidad y  
Seguridad Alimentaria

Profesor Guía

PhD. Héctor Abel Palacios Cabrera

Co-Director

PhD. Iván Rodrigo Samaniego Maigua

Autor

Margarita Susana García Gavilánez

Año

2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de la incidencia de aflatoxinas en maíces de la sierra ecuatoriana, a través de reuniones periódicas con el estudiante Margarita Susana García Gavilánez, en el semestre 202000, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



---

Héctor Abel Palacios Cabrera  
Doctor en Tecnología de Alimentos  
C.I. 0912277480

## DECLARACIÓN DEL CO-DIRECTOR

"Declaro haber co-dirigido el trabajo, Evaluación de la incidencia de aflatoxinas en maíces de la sierra ecuatoriana, a través de reuniones periódicas con el estudiante Margarita Susana García Gavilánez, en el semestre 202000, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



-----  
Iván Rodrigo Samaniego Maigua

Doctor en Química – Máster en Nutrición y Agrovalorización

C.I. 0602791345

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado el trabajo, Evaluación de la incidencia de aflatoxinas en maíces de la sierra ecuatoriana, del estudiante Margarita Susana García Gavilánez, en el semestre 202000, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



---

Valeria Clara Almeida Streitwieser

Master of Science

C.I. 1709603078

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi (nuestra) autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

A handwritten signature in blue ink, reading "Susana García P." with a stylized flourish at the end.

---

Margarita Susana García Gavilánez

C.I. 1709380222

## AGRADECIMIENTOS

Al PhD. Héctor Palacios por su importante aporte y apoyo en esta investigación.

A la MSc. Valeria Almeida por todo el soporte, guía y enseñanzas a lo largo de este camino.

A mis compañeros de clase, por todo el aprendizaje y el tiempo compartidos.

A mi familia por su apoyo incondicional e incansable comprensión.

## DEDICATORIA

A mi hijo, Reynaldo, por ser mi mayor inspiración y compañía en cada paso que doy.

A mis padres, Margarita y Reinaldo, por siempre empujarme a ser mejor y enseñarme que el trabajo y dedicación lo vencen todo.

A mis hermanas, Ingrid y Gabriela, porque nunca han soltado mi mano y siempre han apoyado cada decisión que he tomado.



## RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos químicos secundarios clasificados como contaminantes en una serie de alimentos y productos. Se producen principalmente por los hongos *Aspergillus* spp. En Ecuador no hay información suficiente que haya permitido establecer con datos locales los límites máximos de aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> en granos secos de maíz suave en las provincias de la región sierra; siendo que, el maíz suave constituye en la sierra un producto básico en la alimentación, y por otro lado la afectación a la salud a causa de la exposición a aflatoxinas, puede desencadenar en problemas crónicos como cáncer al hígado. Es así, que el presente estudio tiene como objetivo evaluar la incidencia de aflatoxinas en granos secos de maíz (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua. Para esto, se tomaron muestras compuestas en las provincias indicadas, las mismas que fueron acondicionadas y analizadas en dos laboratorios para cuantificar las aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>. Como parte del estudio, se determinaron los datos de humedad del grano en cada muestra al momento del acondicionamiento, en el laboratorio se determinó también la actividad de agua y se identificó los hongos presentes con su porcentaje de infección. Los resultados indicaron que la humedad del grano de maíz en ocho muestras compuestas (19-1364; 19-1363; 19-1362; 19-1361; 19-1360; 19-1359; 19-1358; 19-1357) cumplió con las especificaciones de la norma ecuatoriana que establece un máximo de 13%. Respecto a la presencia de aflatoxinas, los análisis señalan que no hay incidencia de aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> en ninguna de las muestras, todos los valores reportados fueron menores al límite de cuantificación (<LC) de 0.54 µg/kg, cumpliendo con los parámetros de las normativas internacionales que establecen límites máximos de 4 µg/kg. En relación a la identificación de hongos y el porcentaje de infección, cuatro muestras (19-1362; 19-1359; 19-1357; 19-1356) presentaron un 100% de infección, todas con mayor presencia de *Aspergillus* spp. que es el principal productor de las aflatoxinas; una característica en común en tres de estas muestras (19-1362; 19-1359; 19-1357) con mayor infección es que se trata de maíz suave sin cáscara.

**Palabras clave:** maíz, humedad, aflatoxina, hongos micotoxigénicos

## ABSTRACT

Aflatoxins are secondary chemical metabolites classified as contaminants in a number of foods and products. They are mainly produced by fungi *Aspergillus* spp. In Ecuador, there is not enough information that has allowed establishing with local data the maximum limits of aflatoxins G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> in dry grains of soft maize in the provinces of the Andean region; being that soft maize constitutes a basic food product in the highlands, and on the other hand, the affection to health due to exposure to aflatoxins, can trigger chronic problems such as liver cancer. Thus, the objective of this study is to evaluate the incidence of aflatoxins in dry grains of maize (*Zea mays*) in the provinces of Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi and Tungurahua. For this investigation, composite samples were taken in the indicated provinces, which were conditioned and analyzed in two laboratories to quantify aflatoxins (G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>). As part of the study, the humidity data of the grain was determined in each sample at the time of conditioning. In the laboratory the water activity (Aw) was also determined and the fungi present with their percentage of infection were identified. The results indicated that the humidity of the corn grain in eleven composite samples (19-1364; 19-1363; 19-1362; 19-1361; 19-1360; 19-1359; 19-1358; 19-1357; 10; 11;12) met the specifications of the Ecuadorian standard that establishes a maximum of 13%. Regarding the presence of aflatoxins, the results indicates that there is no incidence of aflatoxins (G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>) in any of the samples, all the reported values were below the sample limit of quantification (<LC) of 0,99; 0,93; 1,45 and 0,90 µg/kg for G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> respectively, complying with the specification of international regulations that establish maximum limits of 4 µg/kg. About the identification of fungi and the percentage of infection, four samples (19-1362; 19-1359; 19-1357; 19-1356) presented 100% infection, all with a higher presence of *Aspergillus* spp. that is the main producer of aflatoxins; a common feature in these samples (19-1362; 19-1359; 19-1357) with the highest infection is that they are soft shelled corn.

**Key words:** corn, humidity, aflatoxin, mycotoxigenic fungi

## ÍNDICE

<b>1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 ANTECEDENTES .....	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN ....	2
1.3 OBJETIVOS.....	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1 EL CULTIVO DE MAÍZ ( <i>Zea mays</i> ) .....	4
2.1.1 ORIGEN Y TAXONOMÍA.....	4
2.1.2 TIPOS DE MAÍZ .....	6
2.1.3 EL MAÍZ EN EL ECUADOR.....	7
2.2 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN EL MAÍZ.....	9
2.3 HONGOS MICOTOXIGÉNICOS .....	10
2.3.1 <i>Aspergillus</i> spp. ....	14
2.3.2 <i>Fusarium</i> spp.....	16
2.3.3 <i>Penicillium</i> spp.....	17
2.4 AFLATOXINAS.....	19
2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	19
2.4.2 MODODE ACCIÓN.....	22
2.4.3 MECANISMO DE ACCIÓN.....	22
2.4.4 INCIDENCIADE AFLATOXINAS EN LATINOAMÉRICA .....	23
2.4.5 MARCO NORMATIVO.....	24
2.5 ESPECIFICACIONES DE INOCUIDAD Y CALIDAD PARA EL MAÍZ .....	25
<b>3. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 LOCALIZACIÓN .....	27
3.1.1 LOCALIZACIÓN DE TOMA DE MUESTRAS .....	27
3.1.2 LOCALIZACIÓN PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE HUMEDAD .....	27
3.1.3 LOCALIZACIÓN PARA ANÁLISIS DE AFLATOXINAS .....	27

3.1.4	LOCALIZACION PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....	28
<b>3.2</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.2.1	MÉTODO DE MUESTREO.....	28
3.2.2	ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	30
3.2.2.1	ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS.....	30
3.2.2.2	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	30
3.2.3	ANÁLISIS DE AFLATOXINAS .....	32
3.2.4	IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....	33
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
4.1	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	33
4.2	ANÁLISIS DE AFLATOXINAS .....	36
4.3	IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....	37
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>41</b>
5.1	CONCLUSIONES.....	41
5.2	RECOMENDACIONES .....	42
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>44</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>1</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.....	6
Tabla 2. Tipo de maíz cultivado en la sierra ecuatoriana .....	7
Tabla 3. Datos de producción maíz duro 2014-2017.....	8
Tabla 4. Datos de producción maíz suave 2016-2017 .....	8
Tabla 5. Hongos y micotoxinas de importancia que producen .....	12
Tabla 6. Actividad de agua óptima y temperaturas para la producción de micotoxinas .....	14
Tabla 7. Taxonomía de Aspergillus .....	15
Tabla 8. Taxonomía de Fusarium.....	16
Tabla 9. Taxonomía de Penicillium .....	18
Tabla 10. Incidencia de aflatoxinas en Latinoamérica .....	24
Tabla 11. Especificaciones de inocuidad y calidad para el maíz.....	26
Tabla 12. Características geo referenciales y ambientales de provincias de la sierra .....	27
Tabla 13. Datos de humedad en muestras de granos secos de maíz de provincias de la sierra.....	34
Tabla 14. Resultados de la cuantificación de aflatoxinas G1, B1, G2, B2 de los análisis realizados en dos laboratorios para las muestras de granos secos de maíz.....	36
Tabla 15. Infección fúngica en granos secos de maíz de la Sierra Ecuatoriana .....	38
Tabla 16. Hongos identificados en muestras de maíz en la sierra ecuatoriana. ....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fases de crecimiento del moho y síntesis de micotoxinas. Tomado de Soriano Del Castillo, 2007. ....	11
<b>Figura 2.</b> Conidióforos de <i>Aspergillus</i> spp. Tomado de Alcalá, Muñoz, Peláez & Bouza, 199. ....	16
<b>Figura 3.</b> Conidióforos de <i>Aspergillus</i> spp. Tomado de Carrillo, 2015. ....	17
<b>Figura 4.</b> Aspecto de <i>Penicillium</i> spp. Tomado de Carrillo, 2015. ....	18
<b>Figura 5.</b> Estructura química de algunas de las aflatoxinas de mayor interés. Tomado de Soriano Del Castillo, 2007. ....	20
<b>Figura 6.</b> Biosíntesis de las aflatoxinas. Tomado de Yu, 2012 ....	21
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción de aflatoxina B <sub>1</sub> . Tomado de Soriano Del Castillo, 2007. ....	23
<b>Figura 8.</b> Provincias donde se realizó el muestreo de granos secos de maíz. 29	
<b>Figura 9.</b> Partes del equipo AgraTronix MT-16. Tomado de AgraTronix, 2019. ....	31
<b>Figura 10.</b> Humedad promedio en granos secos de maíz en muestras de la sierra comparadas con el límite máximo permitido en la norma NTE INEN 187:2013 de Ecuador. ....	35
<b>Figura 11.</b> Humedad promedio en granos secos de maíz en muestras de la sierra comparadas con el límite máximo permitido en Codex Alimentarius. ....	35
<b>Figura 12.</b> Infección fúngica en las muestras de maíz en la sierra ecuatoriana. ....	39
<b>Figura 13.</b> Correlación entre humedad y actividad de agua en maíz suave. ...	39
<b>Figura 14.</b> Incidencia de hongos por muestra. ....	41

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES

El maíz es un alimento de consumo básico en muchos países y una un cultivo presente a lo largo de las distintas regiones del mundo(Sánchez Ortega, 2014). Se ha estimado que el 92% de las siembras mundiales son de maíz amarillo mientras que apenas un 8% corresponden a maíz blanco (Gobernación de Antioquia. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

Según INIAP, en Ecuador se cultiva maíz suave y maíz duro principalmente. El maíz duro es uno de los productos agrícolas de mayor importancia de la economía social en el Ecuador por ser principal insumo para la elaboración de alimentos concentrados destinados a la industria animal. En la sierra ecuatoriana, el cultivo del maíz suave representa uno de los cultivos de mayor importancia ya que es un complemento básico en la alimentación de la población rural (INIAP, 2014).

En el caso del maíz suave, en el Ecuador, se ha establecido que el consumo per cápita es de alrededor de 14.50 kg/año. En las provincias de la región de la sierra, es sembrado a altitudes de entre 2200 a 3000 m.s.n.m., con temperaturas que alcanzan 10 a 20°C y una precipitación de 700 a 1300 mm en todo el ciclo(INIAP, 2014).La producción de maíz, como todo cultivo, requiere de buenas prácticas agrícolas al momento de su manejo para asegurar buenos rendimientos (Quishpe Yanchaliquin, 2010). En Ecuador, la producción se ha visto afectada principalmente por las variaciones climáticas y enfermedades; en el2016 se registraron pérdidas de hasta el 50% (Banco Central Del Ecuador, 2016).



Las aflatoxinas son metabolitos secundarios pertenecientes al grupo Bis-furano-isocumarina, son producidas por algunas especies de hongos del género *Aspergillus*, como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. La presencia de estos hongos se identifica en los granos de maíz cuando estos están cubiertos de color verde olivo o gris verdoso, ya sea en las etapas de campo o en el almacenamiento (pos cosecha) (INTRAGRI - Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura, 2016).

En Ecuador se han identificado varias regiones con alta incidencia de aflatoxinas, reportándose que la concentración de aflatoxinas totales ha sobrepasado los límites máximos permitidos que han sido establecidos por las normativas internacionales (Sandoval, 2013). El consumo de maíz contaminado con aflatoxinas puede ocasionar daños irreversibles a las personas, ya que los efectos se presentan en forma sub clínica y de difícil reconocimiento (Salazar Juárez, 2008). La falta de seguridad alimentaria, entonces se refleja en el consumo de alimentos contaminados (Papini Meardi, 2014).

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En Ecuador no hay información adecuada sobre la calidad del maíz en la etapa de almacenamiento en silos (Fon-Fan, Barzola, & Morán, 2016), que den un indicador claro del porcentaje de maíz (*Zea mays*) en provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua que tengan presencia de aflatoxinas. Estudios previos, detallan la prevalencia de especies del género *Aspergillus* en variedades de maíz almacenados en silos y la posterior producción de metabolitos secundarios como las aflatoxinas (Vallejo López, 2012). De esta manera, y dependiendo de las condiciones en su almacenamiento se puede generar la perpetuidad de esporas de hongos micotóxicos (Correa, Rivera, Buriticá, Penagos, & Torres, 2017), siendo las buenas prácticas agrícolas una herramienta fundamental para identificar los

factores relacionados a la presencia de aflatoxinas. Así mismo, un gran porcentaje de las dietas para crianza de animales, están elaboradas a base de maíz amarillo por sus bondades para la nutrición (Vaca, 2016), y la calidad del alimento libre de aflatoxinas que consumen los animales tampoco ha sido estudiada a profundidad.

Con lo antes expuesto, surge la necesidad de la incidencia de aflatoxinas en el cultivo de maíz suave (*Zea mays*) en las provincias de la sierra ecuatoriana, de modo que se pueda establecer la presencia de hongos micotoxigénicos y la producción de aflatoxinas.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la incidencia de aflatoxinas en grano seco de maíz suave (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua.

#### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la presencia de aflatoxinas  $G_1$ ,  $B_1$ ,  $G_2$  y  $B_2$  en el grano seco de maíz suave (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua.
- Identificar los hongos presentes en el grano seco de maíz suave (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua.

- Determinar el grado de infección con los hongos identificados, en el grano seco de maíz suave (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua.

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 EL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays*)

#### 2.1.1 ORIGEN Y TAXONOMÍA

El maíz es uno de los alimentos de mayor consumo en muchos países del mundo además de ser un cultivo presente lo largo de todo el mundo (Sánchez Ortega, 2014). Pues es considerado un alimento de importancia en Latino América, especialmente en Centro América. Su aporte de nutrientes, calorías y también proteína han convertido al maíz en parte fundamental de la dieta de niños. Se estima que el consumo de maíz en niños se encuentra entre 64 a 120 g/día, con un aporte aproximado a la ingesta diaria del 30% y 40% de proteínas y energía respectivamente; mientras que, en adultos puede aportar en calorías hasta en un 45% de la ingesta diaria y el 59% de proteínas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993). Los detalles de su origen aún son tema de discusión; sin embargo, la bibliografía reporta que el maíz fue uno de los primeros cultivos hace 10000 a 7000 años atrás (Paliwal, Granados, Lafitte, & Violie, 2001). La bibliografía reporta que la domesticación y dispersión del maíz tuvo sus inicios en México (Ángeles Gaspar, Ortíz Torres, López, & López Romero, 2010). El maíz apareció por la mutación de una gramínea silvestre llamada Tosinte (Guacho Abarca, 2014).

Además, constituye el cultivo con mayor área de siembra, más producido y de mayor consumo a nivel mundial desde 1998, año en el que su volumen de

producción superó al del trigo (Gobernación de Antioquia. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015). De acuerdo a un estudio realizado por la Asociación Maíz y Sorgo Argentino, en el período comprendido entre los años 2002 al 2008, el maíz incrementó su producción mundial en un 39% en tanto que el trigo creció tan solo un 15% (MAIZAR - Asociación Maíz y Sorgo Argentino, 2011). Se estima que el 92% de las siembras corresponden a maíz amarillo y el 8% a maíz blanco (Gobernación de Antioquia. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015). Se dice que en Ecuador el maíz se desarrolló hace 6500 años en la Península de Santa Elena, donde los nativos de la cultura “Las Vegas” comenzaron con el cultivo de esta gramínea dando inicio a la horticultura (Guacho Abarca, 2014).

El maíz es una planta monocotiledónea anual que puede alcanzar una altura entre 60-80 cm, frondosa, de sistema radicular fibroso y sistema caulinar con pocos macollos. La inflorescencia femenina o mazorca, se forma en las yemas laterales en la axila de las hojas de la parte superior. Esta inflorescencia es cubierta por hojas las mismas que sirven de reserva. Las mazorcas son espigas cilíndricas que tienen un raquis central en el que se insertan las espiguillas en pares donde cada espiguilla está con dos flores postiladas, una es fértil y la otra es abortiva, dispuestas como hileras paralelas. Las hojas que se desprenden de los nodos son alternas, acuminadas y lanceoladas, tienen pequeñas lígulas, que nacen en los nudos de forma alternada. Cubiertos por una vaina se encuentran las yemas y los entrenudos florales. La planta en la parte superior está formada por una espiga central con ramificaciones laterales que es el lugar en el que se producen los granos de polen. La coloración de la panícula está en función de la tonalidad de las glumas y las anteras pudiendo ser amarillenta o verdosa. Las espiguillas se distribuyen a lo largo del eje central de manera polística siendo protegidas por dos glumas (inferior y superior). La lemma del flósculo estéril es ovada, sin nervios y membranosa; por su parte el flósculo fértil es orbicular y sin quilla. Ambas inflorescencias

presentan espiguillas apareadas, en la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica del maíz (Sánchez Ortega, 2014).

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica del maíz*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Orden:</b>	Poales
<b>Familia:</b>	Poaceae
<b>Genero:</b>	<i>Zea</i>

Tomado de Sánchez Ortega, 2014

### 2.1.2 TIPOS DE MAÍZ

El maíz tiene una amplia variedad en características como color del grano, textura, composición y la misma apariencia. A partir de esas características se puede clasificar al maíz según: la constitución del endospermo y del grano, el color del grano, el ambiente en que se cultiva, la madurez y por último según su uso. Por otra parte, los tipos de maíz identificados en la agricultura tropical son el duro, dentado, reventón, dulce, harinoso, ceroso y tunicado; siendo los más importantes en términos económicos el duro, dentado y harinoso; por ser cultivados para forraje o grano y ensilaje (Paliwal, Granados, Lafitte, & Violie, 2001).

En la región de la sierra ecuatoriana, los tipos de maíces que se cultivan varían en las provincias según las costumbres y las preferencias de los agricultores como se muestra en la Tabla 2. Identificándose más de 17 razas de maíz en la sierra (Yáñez G., Zambrano, Caicedo, & Heredia, 2013).

**Tabla 2***Tipo de maíz cultivado en la sierra ecuatoriana*

<b>Provincia</b>	<b>Tipo de maíz</b>
Carchi	Amarillo harinoso
Imbabura	Amarillo harinoso
Pichincha	Amarillo harinoso
Tungurahua	Blanco harinoso
Chimborazo	Blanco harinoso
Bolívar	Blanco harinoso
Cañar	Blanco amorochado
Azuay	Blanco amorochado

Adaptado de Yáñez G., Zambrano, Caicedo, &amp; Heredia, 2013

### 2.1.3 EL MAÍZ EN EL ECUADOR

En el Ecuador, si bien existen áreas de otras variedades de maíz como por ejemplo el blanco, culturalmente predomina la producción del maíz amarillo. El 60 a 75% de las dietas para crianza de animales, están constituidas por maíz amarillo ya que aporta una importante cantidad de energía y tiene un moderado aporte de proteína (Vaca, 2016).

De acuerdo al INIAP en el Ecuador se cultiva maíz suave y maíz duro. El maíz duro es uno de los productos agrícolas de mayor importancia de la economía social en el Ecuador, pues constituye el principal insumo para la elaboración de alimentos concentrados destinados a la industria animal, en especial a la avicultura comercial, las mayores áreas se concentran en la costa. Mientras que en la sierra del país el cultivo del maíz suave (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes no solo por la superficie sembrada, sino también por representar un complemento básico en la dieta de la población rural como parte fundamental de la seguridad alimentaria (INIAP, 2014).

La producción de maíz requiere de buenas prácticas agrícolas al momento de manejar el cultivo. Pues contar con terrenos apropiados, uso de semillas certificadas, programas de manejo de plagas y nutrición eficientes; son factores fundamentales para asegurar buenos rendimientos (Quishpe Yanchaliquin, 2010). En la Tabla 3 y Tabla 4, se puede observar datos de superficies sembradas, superficies cosechadas, producción y rendimiento de algunos años tanto para maíz duro como para maíz suave.

**Tabla 3**

*Datos de producción maíz duro 2014-2017*

<b>Año</b>	<b>Superficie sembrada (Ha)</b>	<b>Superficie cosechada (Ha)</b>	<b>Producción (Tm)</b>	<b>Rendimiento (Tm/ha)</b>	<b>Fuente</b>
2014	397522	378542	1533219	4.05	(INEC, 2016)
2015	439153	419427	1873525	4.47	(INEC, 2016)
2016	341254	306095	1091108(*)	3.56	(INEC, 2016)
2017	392592	362772	1452251 (*)	4.00	(INEC, 2017)

(\*) Producción se concentra en la provincia de Los Ríos (2016: 40.07%; 2017: 39.42%).

Elaborado por García, 2019

**Tabla 4**

*Datos de producción maíz suave 2016-2017*

<b>Año</b>	<b>Superficie sembrada (Ha)</b>	<b>Superficie cosechada (Ha)</b>	<b>Producción (Tm)</b>	<b>Rendimiento (Tm/ha)</b>	<b>Fuente</b>
2016	29809	26358	59623	2.26	(INEC, 2016)
2017	89890	81851	120028	1.47	(INEC, 2017)

Elaborado por García, 2019

En el caso del maíz suave, se ha estimado un consumo per cápita de alrededor de 14.50 kg/año. En la sierra del Ecuador, esta variedad de maíz es sembrada en altitudes de entre 2200 a 3000 m.s.n.m. con temperaturas que oscilan entre

los 10 a 20°C y precipitaciones de 700 a 1300 mm en todo el ciclo. El cultivo se produce en suelos profundos, ricos en materia orgánica y con buen drenaje. Entre las prácticas básicas para el establecimiento del cultivo se puede destacar la importancia de la correcta preparación del suelo previo a la siembra y del proceso de siembra como tal (INIAP, 2014). En Ecuador, la producción de maíz se ha visto afectada principalmente por las variaciones climáticas; solo en el año 2016 la sequía y las heladas en la sierra dañaron cultivos, registrándose pérdidas de hasta el 50% (Banco Central Del Ecuador, 2016).

## 2.2 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN EL MAÍZ

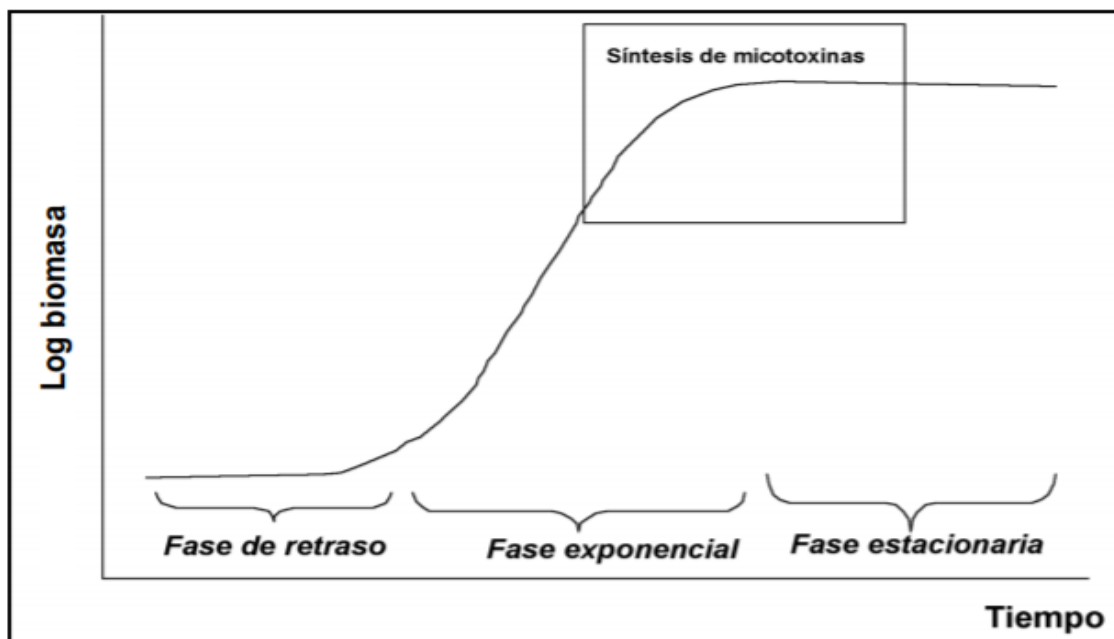
En las fases de la cadena agro productiva, el maíz puede verse afectado en su composición y en la inocuidad del mismo. Así, durante la maduración, el maíz puede llegar a modificar su composición química, pues se evidencia disminución de del contenido de nitrógeno, de la fibra cruda y la cantidad de ceniza en relación al peso seco en seco, aumentando de este modo el almidón y así como el extracto etéreo. Por otro lado, hay un rápido incremento en las proteínas solubles en alcohol y una disminución de las solubles en soluciones alcalinas y ácidas, a medida que el grano de maíz madura. Entonces, la modificación de los componentes químicos en el maíz, así como su valor nutritivo no terminan cuando este es cosechado. Pues el almacenamiento y su procesamiento, también influyen de forma evidente en la disminución de la calidad nutritiva del grano, afectando así su inocuidad y convirtiéndolo en inservible para su consumo humano, animal e incluso para su uso en procesos industriales. En la década de los noventas, en los países tropicales, las pérdidas de maíz ocasionadas por hongos, insectos y roedores oscilan del 30% en regiones húmedas tropicales y del 10-15 % en regiones templadas. Así los hongos de la especie *Aspergillus* y *Penicillium*, tienen un gran impacto no solo en el aspecto económico, sino también en la salud por efecto de las micotoxinas y aflatoxinas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993).



Destacando que las afectaciones ocasionadas por hongos, que representan una parte importante a considerar como las enfermedades de importancia en el maíz, pueden darse en distintas etapas del proceso productivo del cultivo, como en el almacenamiento de los granos (Blancas, 2007). La planta de maíz puede verse afectada en la etapa de crecimiento rápido hasta su madurez, ocasionando eliminación de plantas; y, en la etapa de madurez pueden ocasionar que los granos se pudran en la mazorca maíz, extendiéndose a las semillas y los granos de maíz almacenadas. Así, la proliferación de hongos y producción de micotoxinas es un factor importante (Nelson, 1992). Las micotoxinas son compuestos que se producen de forma natural a partir de hongos que crecen en una serie de alimentos como cereales, frutos secos y especias, y su formación puede llevarse a cabo antes o después de la cosecha, durante el almacenamiento o en el mismo alimento cuando este se encuentra en ambientes húmedos y cálidos (Organización Mundial de la Salud, 2018)

### 2.3 HONGOS MICOTOXIGÉNICOS

Las micotoxinas, palabra derivada del griego *mikes toxina* (hongo veneno), son compuestos que pueden formarse al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho como se muestra en la Figura 1. Están asociados a menudo con la diferenciación y esporulación; y, en su gran mayoría, estos metabolitos secundarios tienen su origen en la ruta policetónica (Soriano Del Castillo, 2007) . Las micotoxinas son sustancias químicas tóxicas producidas por los hongos, y por lo tanto son consideradas contaminantes químicos de origen biológico. Siendo los alimentos y piensos los productos de mayor riesgo donde estos proliferan (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1982).



**Figura 1.** Fases de crecimiento del moho y síntesis de micotoxinas. Tomado de Soriano Del Castillo, 2007.

Los niveles de micotoxinas elevados en la dieta, a causa de alimentos que los posean, pueden generar efectos adversos tanto agudos como crónicos en la salud humana y en una gran cantidad de especies de animales (Soriano Del Castillo, 2007). Los efectos de ciertas micotoxinas que están presentes en alimentos pueden manifestarse rápidamente tras consumir productos contaminados, en otros casos se ha relacionado con enfermedades como inmunodeficiencia y cáncer. Sin embargo, unas doce de los cientos de micotoxinas que se han identificado a la fecha, son las que más han llamado la atención por estar relacionadas con efectos adversos al hombre y por la frecuencia con que se encuentran en los alimentos (Organización Mundial de la Salud, 2018). Los principales hongos que los producen pertenecen al género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Stachybotrys* (Nelson, 1992). En la Tabla 5 se detalla el tipo de micotoxina que producen ciertos hongos y los cultivos de principal preocupación donde pueden presentarse (European Food Safety Authority, 2020).

**Tabla 5***Hongos y micotoxinas de importancia que producen*

<b>Especie de hongo</b>	<b>Micotoxina producida</b>	<b>Cultivos de principal preocupación</b>
<b><i>Aspergillus spp.</i></b>		
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina A	Uvas, pistachos
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Esterigmatocistina	Maíz, arroz, uvas, sorgo, nueces
<i>Aspergillus niger</i>	Ocratoxina A, Aflatoxina B2	Uvas, sorgo, nueces
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	Arroz, uvas, nueces
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Esterigmatocistina	Maíz, nueces
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Ocratoxina A	Sorgo
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina	Arroz
<b><i>Fusarium spp.</i></b>		
<i>Fusarium armeniacum</i>	T-2, HT-2	Arroz
<i>Fusarium avenaceum</i>	Enniatinas, Moniliformina	Trigo, cebada, avena, uvas
<i>Fusarium culmorum</i>	Deoxinivalenol, Acetildeoxinivalenol, Nivalenol, Zearalenona	Maíz, trigo, cebada, avena
<i>Fusarium equiseti</i>	Zearalenona	Maíz, trigo, cebada, avena
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Fumonisina B1, Moniliformina, Ácido Giberélico	Arroz
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol, Acetildeoxinivalenol, Nivalenol, Zearalenona	Maíz, trigo, cebada, avena, arroz
<i>Fusarium incarnatum</i>	Zearalenona	Sorgo
<i>Fusarium langhsethiae</i>	T-2, HT-2	Maíz, trigo, cebada, avena
<i>Fusarium nivale</i>	Nivalenol	Trigo, cebada, avena
<i>Fusarium oxysporum</i>	Enniatinas, Moniliformina, Beauvericina	Uvas
<i>Fusarium poae</i>	Nivalenol, T-2, HT-2, Deoxinivalenol, Acetildeoxinivalenol, Diacetoxiscirpenol, Enniatinas	Trigo, cebada, avena

<i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisina, Beauvericina, Fusaproliferina, Moniliformina	Maíz, trigo, cebada, avena, arroz, uvas, sorgo
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	Deoxinivalenol	Trigo, cebada, avena
<i>Fusarium pseudonygamai</i>	Fumonisina	Sorgo
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	T-2, HT-2	Maíz, trigo, cebada, avena, uvas
<i>Fusarium subglutinans</i>	Beauvericina, Fusaproliferina, Moniliformina	Maíz, arroz
<i>Fusarium temperatum</i>	Fumonisina, Beauvericina, Fusaproliferina, Moniliformina, Enniatinas	Maíz
<i>Fusarium thapsinum</i>	Zearalenona	Sorgo
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisina	Maíz, uvas, sorgo
<b>Penicillium spp.</b>		
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Ácidopenicílico	Arroz
<i>Penicillium citreonigrum</i>	Citreoviridina	Arroz
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Arroz
<i>Penicillium commune</i>	Ácido cilopiazónico	Arroz
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina, Citrinina	Uvas
<i>Penicillium islandicum</i>	Cicloclorotina, Uteoskirina	Arroz
<i>Penicillium rugulosum</i>	Rugulosina	Arroz
<i>Penicillium verrucosum</i>	Citrinina, Ocratoxina A	Trigo, arroz, uvas
<b>Alternaria spp.</b>		
<i>Alternaria alternata</i>	Toxinas de alternaria	Uvas
<i>Alternaria infectoria</i>	Toxinas de alternaria	Arroz
<i>Alternaria tenuissima</i>	Toxinas de alternaria	Arroz
<b>Claviceps spp.</b>		
<i>Claviceps africana</i>	Alcaloides de Ergot	Sorgo
<i>Claviceps purpurea</i>	Alcaloides de Ergot	Trigo, cebada, avena
<i>Claviceps sorghi</i>	Alcaloides de Ergot	Sorgo
<i>Claviceps sorghicola</i>	Alcaloides de Ergot	Sorgo

Tomado de European Food Safety Authority, 2020.

Una característica importante para la proliferación de hongos así como para la producción de micotoxinas es su relación con la actividad de agua en el producto y la temperatura a la que se encuentre, como se muestra en la Tabla 6 (FAO / OIEA, 2003).

**Tabla 6**

*Actividad de agua óptima y temperaturas para la producción de micotoxinas*

<b>Micotoxina</b>	<b>Actividad de agua (Aw) (min.-max.)</b>	<b>Temperatura (°C) (min.-max.)</b>
Aflatoxinas	0,82-0,998	15-37
Desoxinivalenol	0,90-0,99	24-26
T-2	0,88-0,99	-2 – 35
Zearelenona	0,90-0,99	24-26
Fumonisima B <sub>1</sub>	0,87-0,99	2,5-27
Ocratoxina A	0,80-0,86	0-31

Tomado de FAO/OIEA, 2003.

De acuerdo a la Organización Mundial de Salud (2018), el Codex Alimentarius ha establecido niveles máximos de micotoxinas en alimentos, siendo estos valores muy bajos por su toxicidad. Un ejemplo es el límite máximo de aflatoxinas establecido por el Codex Alimentarius en un rango de entre 0,5 – 15 µg/kg para algunos frutos secos, higos secos, leche y granos. Mientras que, la Unión Europea, ha armonizado reglamentos que contemplan protocolos para muestreo y análisis para micotoxinas en las raciones (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2004).

### 2.3.1 *Aspergillus* spp.

Este género fue descrito en 1979 por primera vez por P. A. Micheli que comprobó que la cabeza en forma de conidio era parecida a un “aspergillum” que era la herramienta que se utilizaba para esparcir el agua bendita (Alcalá, Muñoz, Peláez, & Bouza, 1997). Los mohos *Aspergillus* spp. son los causantes del deterioro de alimentos y sus subproductos. Estos producen la inhibición de

la germinación, así como el calentamiento, cambio en el color, apelmazado y hasta la pudrición de semillas. Los mohos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* son empleados en procesos industriales de fermentación de alimentos (Carrillo, 2015). La familia de los Aspergillaceae está formada por cerca de 180 especies, de las cuales entre 5 a 6 han sido clasificadas como patógenos oportunistas. Viven como saprófitos en vegetales en descomposición, suelo y cualquier tipo de materia orgánica (Rodríguez, 2016). En la tabla 7 se encuentra la información taxonómica de *Aspergillus*.

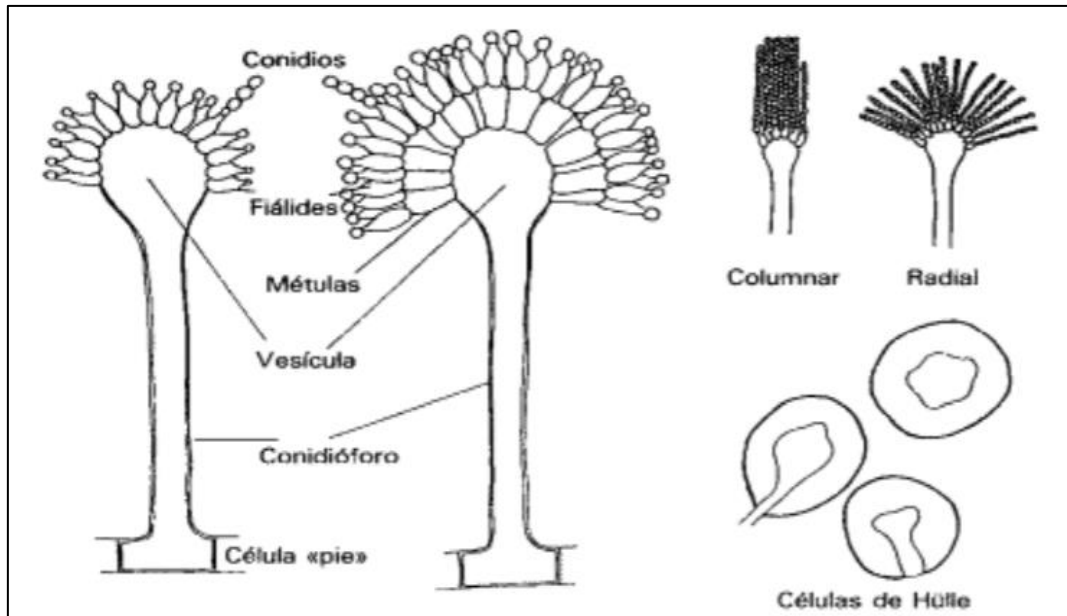
**Tabla 7**

*Taxonomía de Aspergillus*

<b>División:</b>	<b>Ascomycota</b>
<b>Clase:</b>	Eurotiomycetes
<b>Orden:</b>	Eurotiales
<b>Familia:</b>	Trichocomaceae
<b>Genero:</b>	<i>Aspergillus</i>

Tomado de Rodríguez, 2016.

La característica principal a nivel macroscópico para identificar los grupos de aspergilos, es el color. Los colores incluyen una gama de tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, negro y gris. Bajo el microscopio, las cabezas conidiales se presentan en las siguientes formas: globosa, radiada, columnar o claviforme; las más grandes pueden parecer diminutos alfileres a simple vista sobre los sustratos (Carrillo, 2015). En la Figura 2 se observan los conidióforos de *Aspergillus* spp.



**Figura 2.** Conidióforos de *Aspergillus* spp. Tomado de Alcalá, Muñoz, Peláez & Bouza, 199.

### 2.3.2 *Fusarium* spp.

La variabilidad de sus características morfológicas y fisiológicas, justifican la capacidad de colonizar distintos productos a nivel mundial. Esta distribución ampliada, es atribuida a la capacidad de crecimiento que tienen en un sin número de sustratos y también por el mecanismo de dispersión eficaz que tienen (Monzón & Rodríguez Tudela, 2000). En la Tabla 8 se muestra la taxonomía de *Fusarium*.

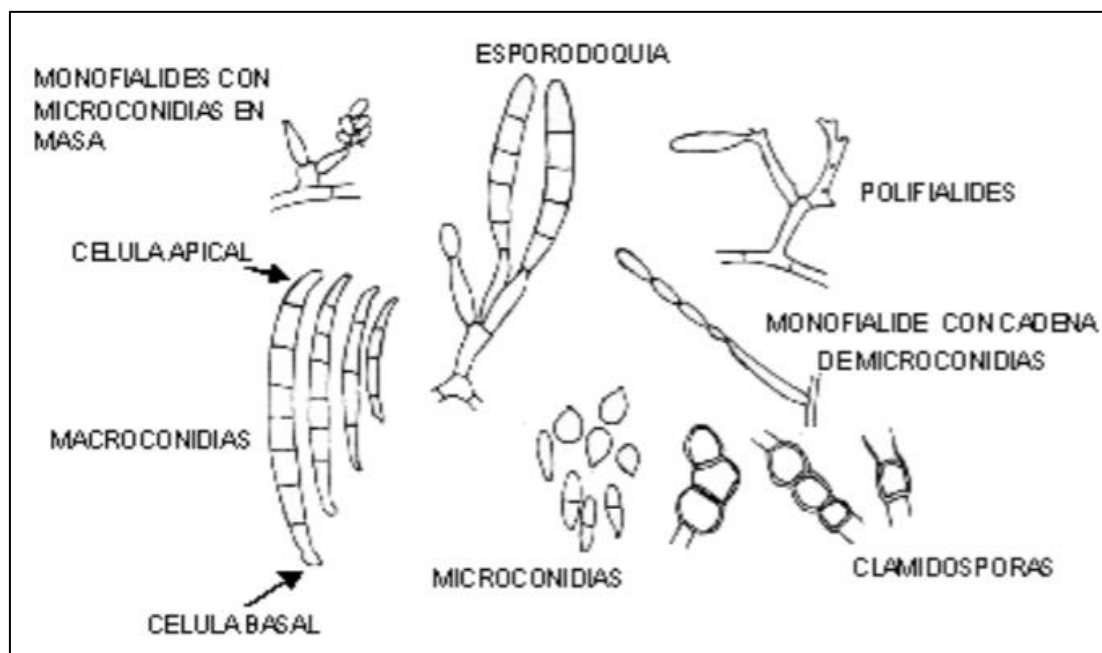
**Tabla 8**

*Taxonomía de Fusarium*

<b>División:</b>	<b>Ascomycota</b>
<b>Clase:</b>	Euascmycetes
<b>Orden:</b>	Hypocreales
<b>Familia:</b>	Hypocreaceae
<b>Genero:</b>	<i>Fusarium</i>

Tomado de Monzón & Rodríguez Tudela, 2000.

Las características que ayudan al reconocimiento de estos mohos son la forma y tamaño de las esporas. Las esporas se encuentran dispersas en el micelio aéreo o en esporodocio. Otra característica de este género, es que, en los macroconidios, se puede evidenciar que existe una célula basal en forma de pie, como se muestra en la Figura 3 (Carrillo, 2015).



**Figura 3.** Conidióforos de *Aspergillus* spp. Tomado de Carrillo, 2015.

### 2.3.3 *Penicillium* spp.

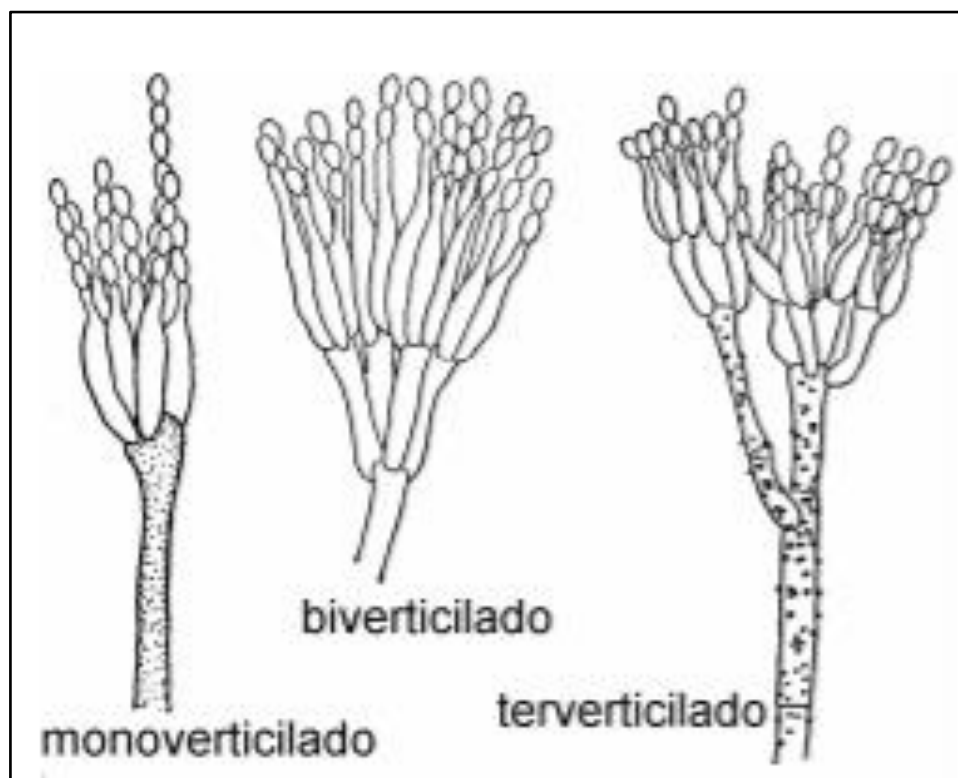
El género *Penicillium* es considerado de los mohos más comunes por desarrollarse sobre una amplia diversidad de sustratos como frutos, granos, entre otros (Carrillo, 2015). También representan una importancia a nivel médico, pues algunas especies (*Penicillium notatum*) se utilizan en la elaboración de antibióticos como la penicilina, y otros (*Penicillium roqueforti*) se utilizan en la agroindustria para elaborar quesos. De forma general esta especie causa pudrición de frutos cítricos principalmente (Subero, 2011). En la Tabla 9 se detalla la taxonomía de *Penicillium*.



**Tabla 9***Taxonomía de Penicillium*

<b>División:</b>	<b>Ascomycota</b>
<b>Clase:</b>	Euascmycetes
<b>Orden:</b>	Eurotiales
<b>Familia:</b>	Trichomaceae
<b>Genero:</b>	<i>Penicillium</i>

Este género, se divide en subgéneros según la morfología de los “pinceles” y su velocidad de crecimiento. Sus conidios se forman en estructuras ramificadas, dando la forma de un pincel; y, termina con células conidiógenas denominadas fiálides (Carrillo, 2015). En la Figura 4, se muestra el aspecto de los penicilios.



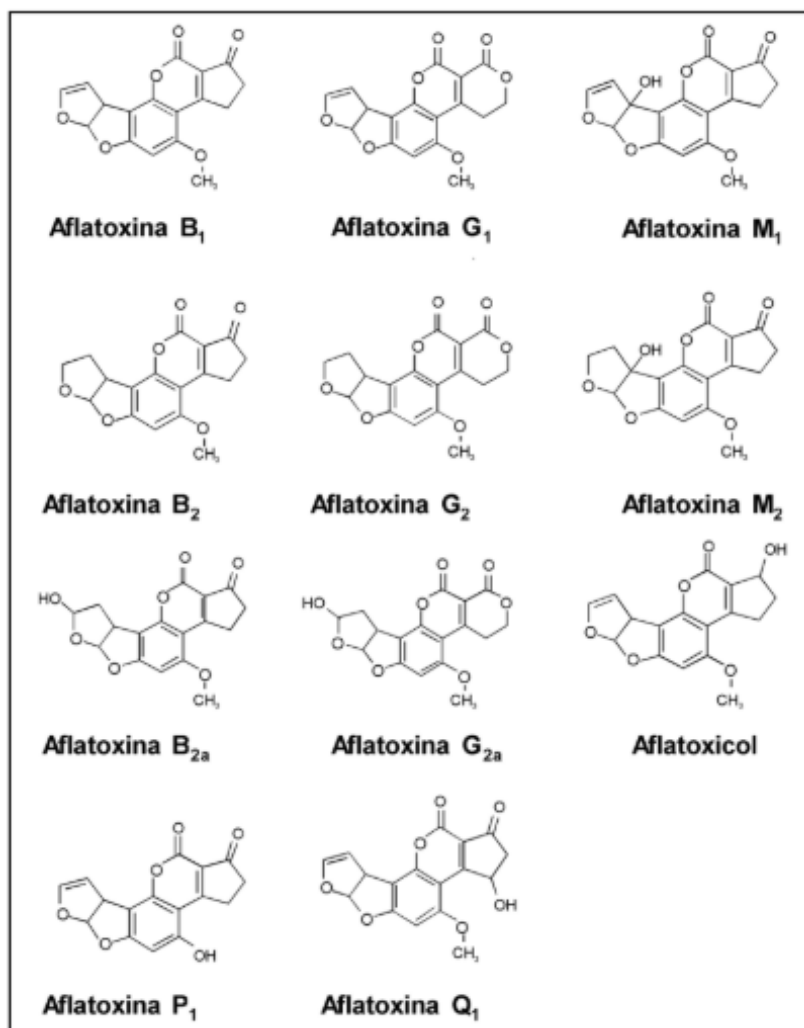
**Figura 4.** Aspecto de *Penicillium* spp. Tomado de Carrillo, 2015.

## 2.4 AFLATOXINAS

### 2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

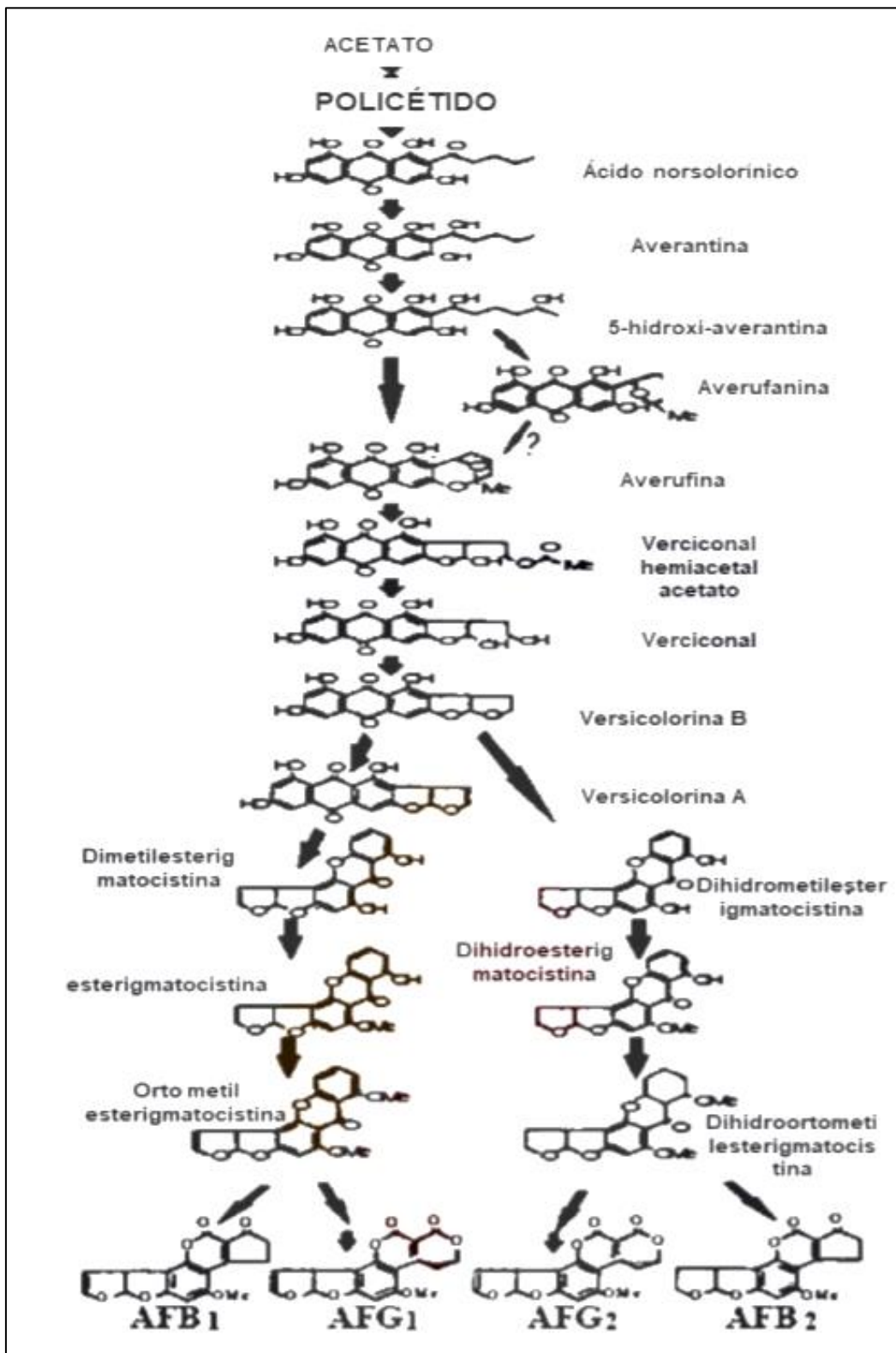
Las aflatoxinas son metabolitos secundarios del grupo Bis-furano-isocumarina, son compuestos orgánicos no proteicos con bajo peso molecular y producidos por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nonius*, (metabolito de la aflatoxina B<sub>1</sub>) (Martínez, Vargas del Río, & Gómez, 2014). Se han identificado más de 18 tipos de aflatoxinas; sin embargo, seis son consideradas contaminantes de alimentos, estas son las aflatoxinas de los grupos B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>), G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y M (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>). Las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> son resultado del metabolismo de hongos micotoxigénicos y las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son obtenidas a partir de las primeras cuando están en medios que son ácidos fuertes. Las aflatoxinas M, son derivados hidroxilados de los grupos B y G. (Soriano Del Castillo, 2007).

Las letras utilizadas en la denominación para las aflatoxinas de los grupos B y G hacen referencia al color de la fluorescencia que presentan cuando estas se exponen a radiación ultravioleta de onda larga, las del grupo B presentan un tono azul (Blue) y las del grupo G un tono verde (Green). Mientras que los números que las acompañan (1 y 2) está relacionada con la movilidad cromatográfica relativa. Es así que la determinación de las aflatoxinas se realiza mediante métodos analíticos basados en su fluorescencia y su extracción realizada con solventes orgánicos de moderada polaridad como es el metanol (Soriano Del Castillo, 2007). En la Figura 5 se describe la estructura química de ciertas aflatoxinas.



**Figura 5.** Estructura química de algunas de las aflatoxinas de mayor interés. Tomado de Soriano Del Castillo, 2007.

Las cepas de *Aspergillus parasiticus* producen las aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>; en tanto que, *Aspergillus flavus* produce solo aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Bogantes Ledezma, 2004). Una serie de estudios realizados en humanos y en animales han permitido que la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer – IARC, clasifique a las aflatoxinas en el Grupo 1 – carcinógeno para humanos. Destacando que la exposición a aflatoxinas es responsable de cáncer al hígado (International Agency for Research on Cancer - IARC, 2015). La exposición a las aflatoxinas se da en el consumo de alimentos y productos contaminados (Instituto Nacional del Cáncer, 2018). En la Figura 6 se muestra la biosíntesis de las aflatoxinas (Yu, 2012).



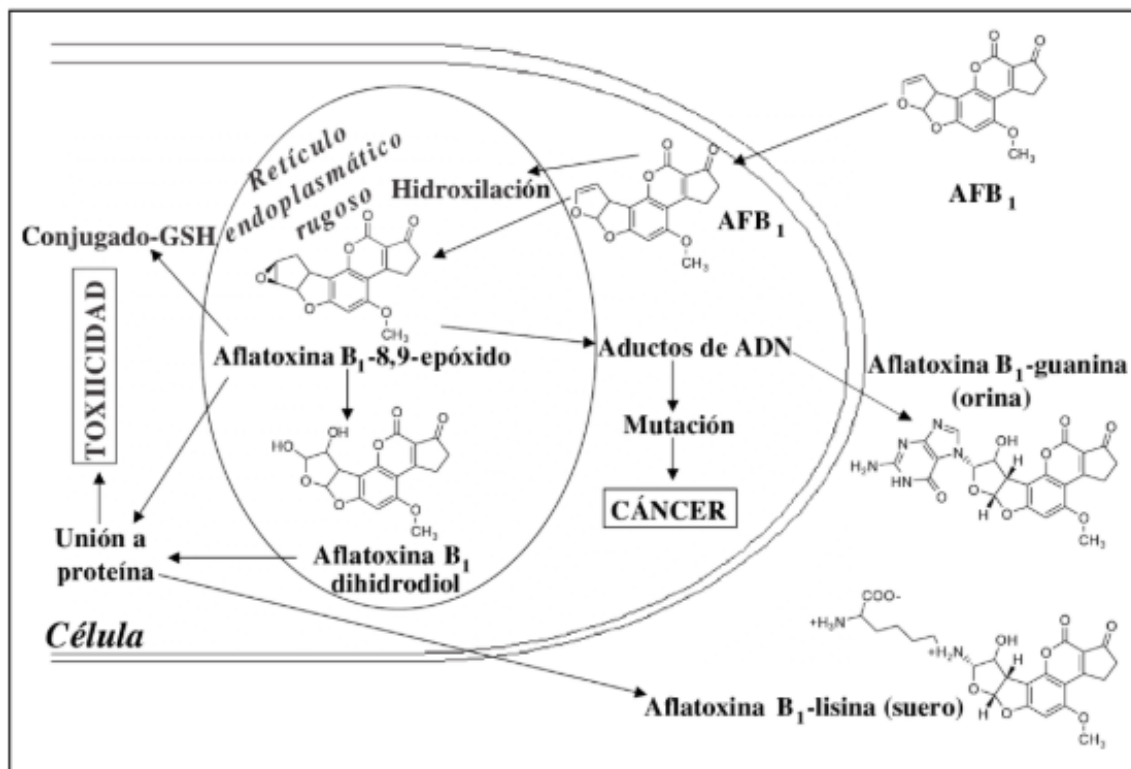
**Figura 6.** Biosíntesis de las aflatoxinas. Tomado de Yu, 2012

#### 2.4.2 MODODE ACCIÓN

El modo de acción de las aflatoxinas es mediante la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos y de proteínas. Además, modifican no solo el metabolismo de los lípidos, sino también la vía de respiración mitocondrial (López Naranjo, 2013). El crecimiento fúngico y su metabolismo primario producen poco o nada de aflatoxina; al paso del tiempo, los compuestos como el nitrógeno, fosfato y trazas de otros elementos son limitadas, de modo que el crecimiento primario se ve reducido. A continuación, se acumulan algunos metabolitos primarios, como el malato, acetato, piruvato y aminoácidos que no solo causan el desarrollo, sino que generan el estímulo e inducen la actividad enzimática de su metabolismo secundario mediante la ruta de biosíntesis de los poliketidos, provocando así la biosíntesis de las aflatoxinas en la biosíntesis de ácidos grasos en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bogantes Ledezma, 2004).

#### 2.4.3 MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de las aflatoxinas incluye la inhibición del ADN, ARN, mitosis y alteraciones cromosómicas, evidenciando el efecto carcinogénico, mutagénico y teratogénico (Vallejo López, 2012). Se considera que la aflatoxina B<sub>1</sub> es la más importante, pues es la que aparece normalmente con más frecuencia y en mayor concentración que las demás aflatoxinas dependiendo del hongo, sustrato y condiciones en el ambiente. La aflatoxina B<sub>1</sub> se absorbe en el intestino delgado y a continuación se transporta a través de los glóbulos rojos y proteínas del plasma hasta llegar al hígado mediante la vena porta hasta llegar al hígado donde causa el daño (Soriano Del Castillo, 2007). En la Figura 7 se aprecia el mecanismo de acción de la Aflatoxina B<sub>1</sub>.



**Figura 7.** Mecanismo de acción de aflatoxina B<sub>1</sub>. Tomado de Soriano Del Castillo, 2007.

#### 2.4.4 INCIDENCIA DE AFLATOXINAS EN LATINOAMÉRICA

Las aflatoxinas identificadas como G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> se encuentran en una serie de cultivos, principalmente en cereales como el maíz, frutos secos y leguminosas; mientras que, la aflatoxina M<sub>1</sub> se ha identificado en la leche de animales que han sido consumido alimentos contaminados con la aflatoxina B<sub>1</sub>. (International Agency for Research on Cancer - IARC, 2015). Las inadecuadas condiciones de almacenamiento así como la contaminación de los cereales en el campo, se asocian con la presencia de aflatoxinas en estos cultivos y sus subproductos; cuya contaminación se ve afectada por factores como la tensión durante el crecimiento de la planta, poblaciones de insectos, daños por otros hongos y sobre todo la cantidad de esporas inoculadas (Bogantes Ledezma, 2004). En la Tabla 10 se detallan datos de estudios en los que se ha podido determinar la

incidencia de aflatoxinas en Latinoamérica para ciertos productos y cultivos usados como alimentos.

**Tabla 10**

*Incidencia de aflatoxinas en Latinoamérica*

Alimentos	País	Incidencia (%)	Aflatoxinas	Concentración (µg/kg)
Maní tipo japonés, nueces, jengibre, comino semilla, sésamo, curri, semillas de lupino, maní salado y maní pelado	Chile	10,5	Totales	23 – 173,3
Harina de maíz	Ecuador	26	B <sub>1</sub>	4,34 – 11,26
Maíz	Argentina	8,23 – 15,52	Totales	9,75 – 15,52
Maíz y arroz	Colombia	12,5	Totales	9,2
Maíz blanco		16,6 – 33,3	B <sub>1</sub>	3 – 10
Leche		20	M <sub>1</sub>	15,6
Queso		67	M <sub>1</sub>	240
Alimentos de consumo infantil		10	B <sub>1</sub>	18,42 – 71,25
Maíz	Perú	82	Totales	4,2
Maíz amarillo	Venezuela	16,6	Totales	20
Trigo, harina de maíz, harina de soya		43	Totales	0,25 – 34,2
Trigo, harina de maíz		43	Totales	0,25 – 34,2
Maíz	México	33,1	Totales	1 – 18
Maíz	Panamá	2,8	B <sub>1</sub>	1290
Maíz	Guatemala	28,57	Totales	-

Adaptado de Martínez, Vargas del Río, & Gómez, 2014.

#### 2.4.5 MARCO NORMATIVO

Existe una serie de reglamentos y normativas a nivel mundial que se aplican a la fecha para establecer los límites máximos permitidos de aflatoxinas en los alimentos. El Codex Alimentarius (2019), ha establecido un límite máximo 4 µg/kg de aflatoxinas totales (G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>) en maíz. Por otra parte, regiones

como Australia/ Nueva Zelanda, aplican límites máximos comunes de aflatoxinas totales en maní, nueces de árbol y ergot. El MERCOSUR, definió límites comunes para aflatoxinas totales en maní, maíz y sus derivados. La Asociación de Naciones del Sudeste de Asia (ANSEA) no cuenta con normativas armonizadas y cada país miembro aplica sus reglamentos específicos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2004).

La Unión Europea, a través de la EFSA (European Food Safety Authority) ha determinado límites máximos de 2 µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> y un límite máximo de 4 µg/kg de aflatoxinas totales para cereales, a excepción del maíz que tiene para aflatoxina B<sub>1</sub> un límite máximo de 5 µg/kg y para aflatoxinas totales un máximo de 10 µg/kg (European Commission, 2010).

En el Ecuador, la *“Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 185:95. Segunda Revisión. Granos y Cereales. Maíz en Grano. Requisitos”* señala que el límite máximo de aflatoxinas para maíz en grano debe ser de 20 µg/kg (Instituto Ecuatoriano de Normalización - INEN, 1995). Sin embargo, esta normativa fue reemplaza por la *“Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 187:2013. Tercera revisión. Cereales y leguminosas. Maíz en grano. Requisitos”*; en la que se establece como requisitos microbiológicos que el maíz debe cumplir con un índice máximo permisible de hongos de 10<sup>2</sup> para ser considerado de buena calidad y un índice máximo permisible de hongos de 10<sup>5</sup> para ser considerado de calidad aceptable (Instituto Ecuatoriano de Normalización - INEN, 2013).

## 2.5 ESPECIFICACIONES DE INOCUIDAD Y CALIDAD PARA EL MAÍZ



El Codex Alimentarius (2019), ha establecido especificaciones de los parámetros mínimos de inocuidad y calidad con los que debe cumplir el maíz como lo muestra la Tabla 11.

**Tabla 11**

*Especificaciones de inocuidad y calidad para el maíz*

<b>Parámetro</b>	<b>Especificación</b>	<b>Observación</b>
<b>Factores de calidad específicos</b>		
Contenido de humedad	15.5 % m/m máximo	Pueden requerirse límites más bajos, según el destino, clima, duración de transporte y almacenamiento.
Materias extrañas	No presencia	Incluye componentes orgánicos e inorgánicos que no sean maíz; granos rotos, otros granos y suciedad.
Suciedad	0,1 % m/m máximo	Impurezas de origen animal, incluidos insectos muertos.
Otras materias orgánicas extrañas	1,5 % m/m máximo	Componentes orgánicos que no sean granos de cereales comestibles como por ejemplo tallos, semillas extrañas, entre otros.
Materias inorgánicas extrañas	0,5 % m/m máximo	Componentes inorgánicos que incluyen piedras, polvo, entre otros.
<b>Contaminantes</b>		
Metales pesados	No presencia	Metales pesados en cantidades que representen peligro para la salud humana.
Residuos de plaguicidas	Límites máximos de residuos establecidos por Codex Alimentarius	Límites disponibles en Codex Alimentarius para el producto.
Aflatoxinas	Máximo 4 µg/kg Aflatoxinas totales (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> )	
<b>Características del grano</b>		
Granos de otras formas	Maíz de grano duro o dentado: 5.0 % máximo	En peso de maíz de otras formas.
Granos defectuosos	7.0 % máximo	Dañados por insectos o gusanos, manchados, infectados, descoloridos, germinados.

Adaptado de Codex Alimentarius 2019.

### 3. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 LOCALIZACIÓN

#### 3.1.1 LOCALIZACIÓN DE TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó en mercados mayoristas de las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua bajo las condiciones georeferenciales y ambientales descritas en la Tabla 12.

**Tabla 12**

*Características georeferenciales y ambientales de provincias de la sierra*

Características	Localidad 1	Localidad 2	Localidad 3	Localidad 4	Localidad 5	Localidad 6	Localidad 7
Provincia	Azuay	Cotopaxi	Bolívar	Chimborazo	Pichincha	Carchi	Tungurahua
Cantón	Cuenca	Pujilí	Guaranda	Riobamba	Quito	Tulcán	Ambato
Altitud (m.s.n.m.)	2545	2955	3600	2740	2789	2900	2500
Temperatura (°C)	7.8 - 24.5	6.1 - 20.5	7 - 19	6.7 - 22.6	10.7 - 22	-5 - 30	3.17 - 24
Humedad Relativa	91%	90%	95%	70%	71%		82%
Longitud	79°0'16.3" O	78°41'46.9" O	79°0.059' O	78°38'49.6" O	78°31'29.82" O	77°43'2.2" O	78°37'0.3" O
Latitud	2°54'2" S	0°57'27.3" S	1°35'33.5" S	1°40'15.5" S	0°13'47.6" S	0°48'42.7" N	1°14'56.7" S

#### 3.1.2 LOCALIZACIÓN PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

El acondicionamiento (codificación y empaque) de las muestras para los distintos análisis, así como la determinación de humedad de las mismas, se ejecutó en el laboratorio de agroindustria de la Universidad de Las Américas – Campus Queri en Quito, bajo condiciones ambientales controladas (temperatura 22 °C a 24 °C).

#### 3.1.3 LOCALIZACIÓN PARA ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

Las muestras acondicionadas se prepararon y analizaron en dos laboratorios:

- a. Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos, del Departamento de Nutrición y Calidad del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en la estación Experimental Santa Catalina.
- b. Laboratorio de Microbiología de Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul en Brasil.

#### 3.1.4 LOCALIZACION PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Para la identificación de hongos, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología de Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul en Brasil.

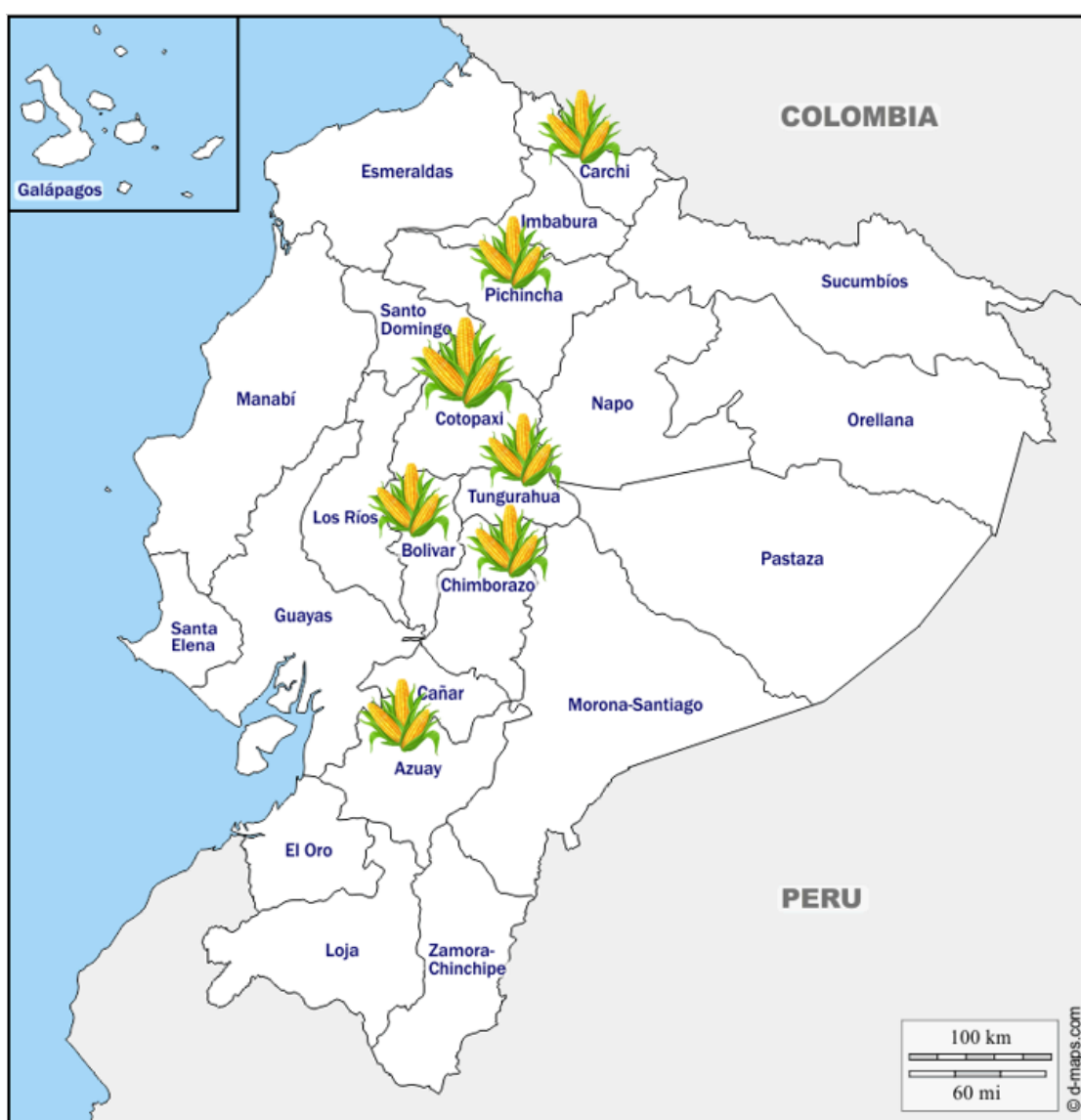
### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 MÉTODO DE MUESTREO

Material vegetal muestreado: granos secos de maíz suave (*Zea mays*).

El Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura- INTAGRI(2016) señala que, debido a que las aflatoxinas se producen desuniformemente en los granos, se recomienda tomar muestras compuestas, lo que consiste en tomar submuestras en una unidad de granos para luego combinarlas y formar una sola muestra.

Para el estudio, se tomaron muestras de 2 kilogramos de granos secos de maíz en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua. Las muestras fueron recolectadas en los puestos de ventas de los mercados mayoristas de las provincias que se muestran en la Figura 3. Para tal efecto, en cada lugar, se recogieron 10 submuestras de 200 gramos cada una, del mismo material de diferentes locales y sacos, para completar así los 2 kilogramos que forman cada muestra compuesta. En la Figura 8 se señalan las provincias donde se realizaron los muestreos.



**Figura 8.** Provincias donde se realizó el muestreo de granos secos de maíz.

### 3.2.2 ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

#### 3.2.2.1 ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

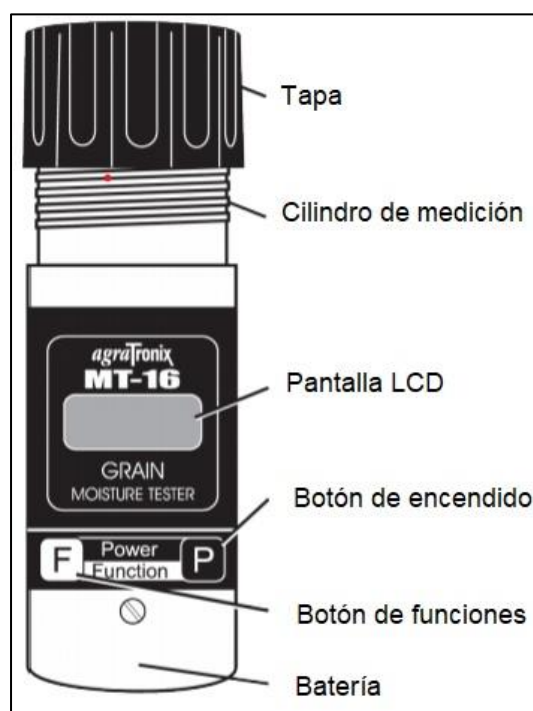
Para el acondicionamiento de las muestras, se empleó fundas de papel para muestreo, fundas de aluminio para muestras de material vegetal con cierre para sellado, balanza de precisión.

Una vez ingresadas las muestras en el laboratorio, se procedió mezclar las 10 submuestras y a separar 1 kilo de cada una en fundas de papel, para los análisis de aflatoxinas en laboratorio del INIAP; el otro kilo, se lo separó en 2 fundas de aluminio con 500 gramos cada una para los análisis de aflatoxinas y para el análisis e identificación de hongos en el laboratorio de la UFSM en Brasil; a continuación, las muestras fueron identificadas se muestra en el Anexo 1.

#### 3.2.2.2 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Para la determinación de la humedad de los granos que componen las muestras se empleó el principio de capacitancia, que consiste en determinar las variaciones de la capacidad eléctrica de un condensador, en el que se ha usado un grano de un producto agrícola como dieléctrico para determinar de manera indirecta el contenido de humedad de este (Ospina Machado, 2001). El método se ejecutó con el equipo AgraTronix™ MT-16 Grain Moisture Taster, que cuenta con un circuito de capacitancia de alta frecuencia que mejora la precisión de los datos, arrojando resultados de manera automática para determinar la humedad del maíz en un rango entre 5 a 40% (AgraTronix, 2019).

El ensayo se realizó a temperatura entre 22-24°C llenando el cilindro de medición con los granos de la muestra hasta que estos lleguen al borde de forma nivelada. A continuación, se cierra con la tapa, girando hasta que la misma cubra uniforme y completamente el cilindro de llenado para asegurar una densidad uniforme dentro del cilindro. Con el botón de funciones, se selecciona el número “1” que corresponde a los granos de maíz y aparecerá la palabra “Ejecutar” en la pantalla, esto mientras el equipo determina el porcentaje humedad de los granos, la temperatura del cilindro de medición y mientras calcula la temperatura de compensación para de manera inmediata mostrar en la pantalla el valor de la humedad en porcentaje (%). Se realizaron tres mediciones por cada muestra, para luego obtener el valor promedio de humedad de estas. En la Figura 9 se muestra el equipo y las partes del mismo.



**Figura 9.** Partes del equipo AgraTronix MT-16. Tomado de AgraTronix, 2019.

### 3.2.3 ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

- a) El laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos, del Departamento de Nutrición y Calidad del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)(2019), con la finalidad de asegurar que los resultados obtenidos sean confiables se realizó un proceso de adaptación de la metodología analítica propuesta, para lo cual se evaluó la linealidad del método, la precisión mediante un ensayo de repetibilidad y la exactitud mediante un ensayo de recuperación, para lo cual se utilizaron muestras artificialmente contaminadas con aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> en tres concentraciones diferentes. Estableciendo límites de detección (LD) de 0,45, 0,30, 0,27 y 0,28 µg/kg para aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> respectivamente; mientras que los límites de cuantificación (LC) obtenidos para los estándares fueron de 0,91, 0,59, 0,54 y 0,56 µg/kg para aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Demostrando que el método tiene alta sensibilidad y por ende permite cuantificar valores menores de 1 µg/kg de cada tipo de aflatoxina. El método completo se detalla en el Anexo 2.
- b) El laboratorio de Microbiología de Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul en Brasil; utilizó para el análisis de aflatoxinas el método descrito en el Anexo 3. El mismo utiliza un solo paso de extracción seguido de cromatografía líquida con ionización por electropulverización espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC / ESI-MS / MS) sin la necesidad de ninguna limpieza. El método está diseñado para identificar 39 micotoxinas en trigo y maíz. Los 39 analitos empleados en el método incluyen tricotecenos A y B (incluyendo desoxinivalenol-3-glucósido), zearalenona y derivados relacionados, fumonisinas, enniatinas, alcaloides del cornezuelo de centeno, ocratoxinas, flatoxinas y moniliformina. Se obtuvieron coeficientes de variación del proceso global de <5.1% y <3.0% para trigo y maíz, respectivamente de acuerdo a los datos de calibración lineal. Los límites de detección (LD)

variaron de 0.03 a 220 mg / kg (Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2006)

### 3.2.4 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Para la identificación de hongos, el laboratorio de Microbiología de Universidade Federal de Santa Maria (UFMS), Rio Grande do Sul en Brasil; utilizó un método adaptado. Para esto, los granos de maíz se desinfectaron por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0,4% durante 1 minuto. A continuación, se colocaron un total de 10 granos en 3 placas de Petri que contenían agar Dicloran Glicerol al 18% (DG18) con cloranfenicol. Luego, las placas se incubaron a 25 ° C durante 7 días. Pasado el período de incubación, se examinaron las placas, se contaron los granos que mostraron desarrollo de hongos y los resultados se expresaron como un porcentaje de granos infectados internamente, de acuerdo con la metodología de Pitt & Hocking (Pitt & Hocking, 2009). Los hongos presentes se aislaron primero en placas que contenían extracto de Czapek-levadura (CYA) para luego identificarse mediante protocolos específicos para cada género y calculando su frecuencia de aparición en cada muestra (Laboratorio de Microbiología de Universidade Federal de Santa Maria (UFMS), 2019).

## 4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

De acuerdo a las especificaciones establecidas en el CODEX ALIMENTARIUS (2019), el maíz en grano debe tener una humedad máxima del 15.5%; señalando que estas especificaciones pueden variar por ejemplo de acuerdo al destino del grano. En Ecuador la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 187:2013, establece un valor máximo de humedad granos de maíz de 13%



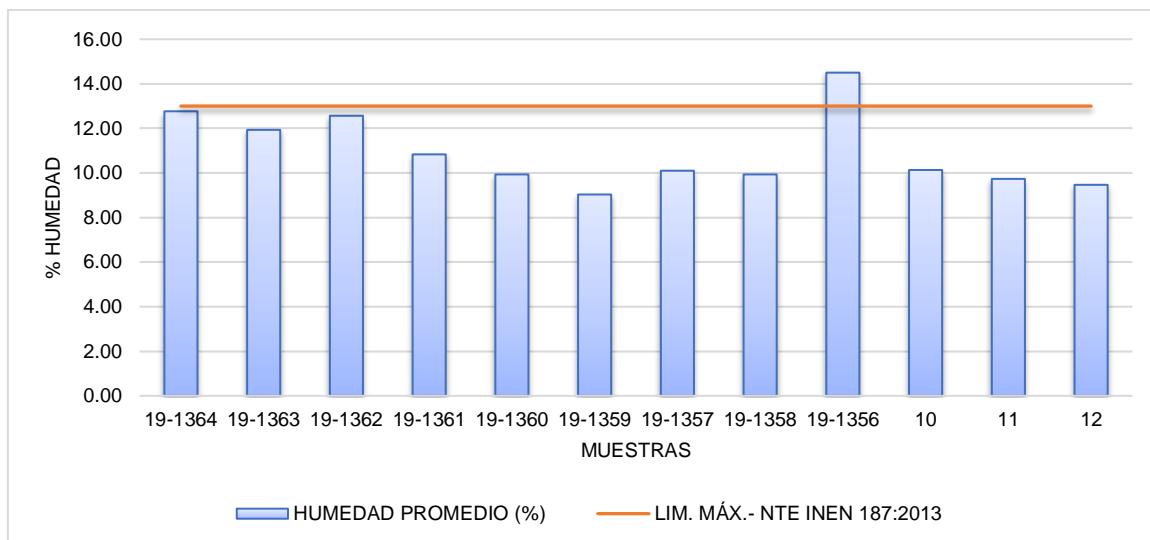
(Instituto Ecuatoriano de Normalización - INEN, 2013). Los resultados de las mediciones de humedad realizadas a las nueve muestras de granos secos de maíz en las provincias de la sierra ecuatoriana se reflejan en la Tabla 13.

**Tabla 13**

*Datos de humedad en muestras de granos secos de maíz de provincias de la sierra*

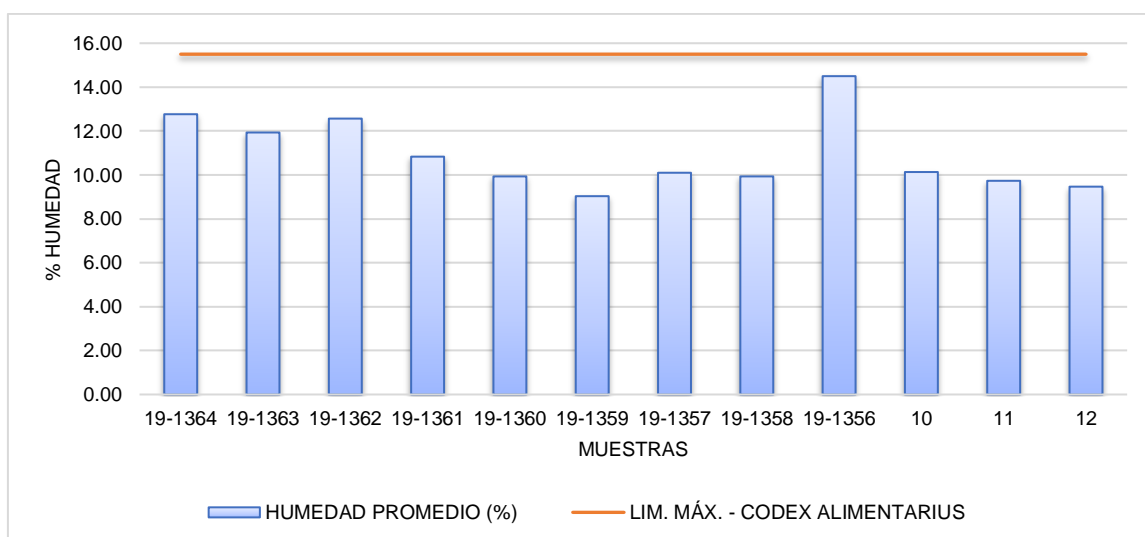
DATOS DE LA MUESTRA			RESULTADOS DE HUMEDAD (%)				
Código	Provincia	Identificación	1	2	3	Suma	Promedio
19-1364	Azuay	Maíz suave con cáscara	13,3	12,8	12,2	38,30	12,77
19-1363	Azuay	Maíz suave Cuzco	11,8	12,9	11,1	35,80	11,93
19-1362	Azuay	Maíz suave sin cáscara	12,9	12,3	12,5	37,70	12,57
19-1361	Cotopaxi	Maíz Para tostado	10,7	11,1	10,7	32,50	10,83
19-1360	Cotopaxi	Maíz Mishka	10,4	9,4	10,0	29,80	9,93
19-1359	Bolívar	Maíz suave sin cáscara	8,5	9,5	9,1	27,10	9,03
19-1357	Chimborazo	Maíz suave sin cáscara	10,1	9,8	10,4	30,30	10,10
19-1358	Chimborazo	Maíz suave con cáscara	9,8	9,4	10,6	29,80	9,93
19-1356	Chimborazo	Maíz con defectos	14,2	14,4	14,9	43,50	14,50
10	Pichincha	Maíz chillo	10,3	10,0	10,1	30,40	10,13
11	Carchi	Maíz suave	10,1	9,5	9,6	29,20	9,73
12	Tungurahua	Maíz suave INIAP 1603	9,1	9,5	9,8	28,40	9,47

Apegándonos al valor más restrictivo, que es la especificación ecuatoriana en este caso, se puede identificar que once muestras están por debajo del máximo permitido, y la muestra de maíz con defectos (19-1356) se encuentra con un valor superior a la especificación de Ecuador como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Humedad promedio en granos secos de maíz en muestras de la sierra comparadas con el límite máximo permitido en la norma NTE INEN 187:2013 de Ecuador.

Sin embargo, si comparamos los resultados con el límite máximo establecido por el Codex Alimentarius, se evidencia que todas las muestras cumplen con la especificación como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Humedad promedio en granos secos de maíz en muestras de la sierra comparadas con el límite máximo permitido en Codex Alimentarius.

## 4.2 ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

Los resultados de los análisis realizados para cuantificar Aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> tanto en el laboratorio del INIAP – Ecuador como en el laboratorio de la Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul en Brasil; se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14**

*Resultados de la cuantificación de aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> de los análisis realizados en dos laboratorios para las muestras de granos secos de maíz.*

DATOS DE LA MUESTRA			AFLATOXINAS (ug/ kg)				
Código	Provincia	Identificación	G <sub>1</sub> <sup>(a)</sup>	B <sub>1</sub> <sup>(a)</sup>	G <sub>2</sub> <sup>(a)</sup>	B <sub>2</sub> <sup>(a)</sup>	Promedio <sup>(b)(c)</sup>
19-1364	Azuay	Maíz suave con cáscara	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1363	Azuay	Maíz suave Cuzco	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1362	Azuay	Maíz suave sin cáscara	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1361	Cotopaxi	Maíz Para tostado	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1360	Cotopaxi	Maíz Mishka	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1359	Bolívar	Maíz suave sin cáscara	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1357	Chimborazo	Maíz suave sin cáscara	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1358	Chimborazo	Maíz suave con cáscara	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
19-1356	Chimborazo	Maíz con defectos	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
10	Pichincha	Maíz chillo	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
11	Carchi	Maíz suave	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
12	Tungurahua	Maíz suave INIAP 1603	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC

(a) Representan los resultados de los análisis ejecutados en el laboratorio del INIAP y en el laboratorio de la Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)-Brasil.

(b) Los límites de cuantificación (LC) de las muestras de acuerdo al método empleado por el INIAP- Ecuador son: G<sub>1</sub>=0,99; B<sub>1</sub> = 0,93; G<sub>2</sub>1,45 y B<sub>2</sub> 0,90 (todos en µg/kg).

(c) Los límites de cuantificación (LC) no están establecidos en el método utilizado por el laboratorio de la Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)-Brasil.

En el Ecuador no existen a la fecha límites máximos establecidos para la presencia de aflatoxinas de ningún tipo en granos de maíz. Siendo las aflatoxinas contaminantes de interés para la salud, se adoptan los límites establecidos por el Codex Alimentarius, que señalan un máximo permitido de 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totales ( $G_1$ ,  $B_1$ ,  $G_2$ ,  $B_2$ ) en maíz (CODEX ALIMENTARIUS, 2019). Mientras que, la Unión Europea, ha de definir para maíz un límite máximo de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxina  $B_1$  y un máximo de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totales (European Commission, 2010). La FDA - Food and Drug Administration (2019), en Estados Unidos, ha establecido un límite máximo de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en maíz de uso en alimentos para animales.

Los resultados de la cuantificación de aflatoxinas  $G_1$ ,  $B_1$ ,  $G_2$ ,  $B_2$  han sido reportados por debajo del límite de cuantificación (<LC); lo que indica que probablemente no había presencia de aflatoxinas en las muestras o a su vez que las cantidades estaban por debajo del límite de cuantificación definidos en 0,91, 0,59, 0,54 y 0,56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  respectivamente. En ambos casos, se puede evidenciar que las muestras de granos secos de maíz cumplen con las especificaciones de las normativas internacionales tanto de Codex Alimentarius como de la Unión Europea que tienen límites máximos de aflatoxinas totales de 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente.

#### 4.3 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Los resultados evidencian que cuatro de las nueve muestras (19-1362; 19-1359; 19-1357; 19-1356) presentan un 100% de infección fúngica como se puede observar en la Tabla 15. Mientras que en una muestra (11) no se identifica infección fúngica. Una característica en común en tres de estas muestras (19-1362; 19-1359; 19-1357) que tienen el 100% de infección fúngica es que se trata de maíz suave sin cáscara en las provincias de Azuay, Bolívar y Chimborazo. Es importante mencionar que el porcentaje de infección no

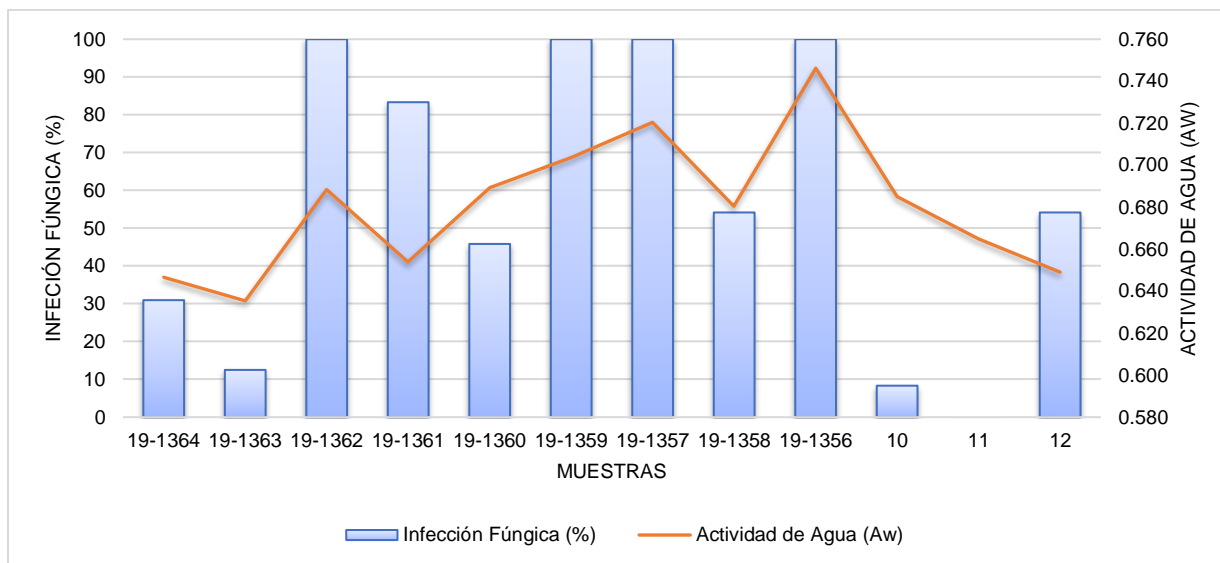
significa que el grano está en mal estado; potencialmente puede estar si no se mantienen las condiciones (temperatura y humedad) adecuadas principalmente durante el almacenamiento pos cosecha de los granos. Así mismo, a excepción de la muestra 19-356, las demás no presentaban ninguna característica sensorial de defectos (aspecto dañado, color no característico, olores desagradables, granos quebrados, etc) y todas las muestras estaban secas.

**Tabla 15**

*Infección fúngica en granos secos de maíz de la Sierra Ecuatoriana*

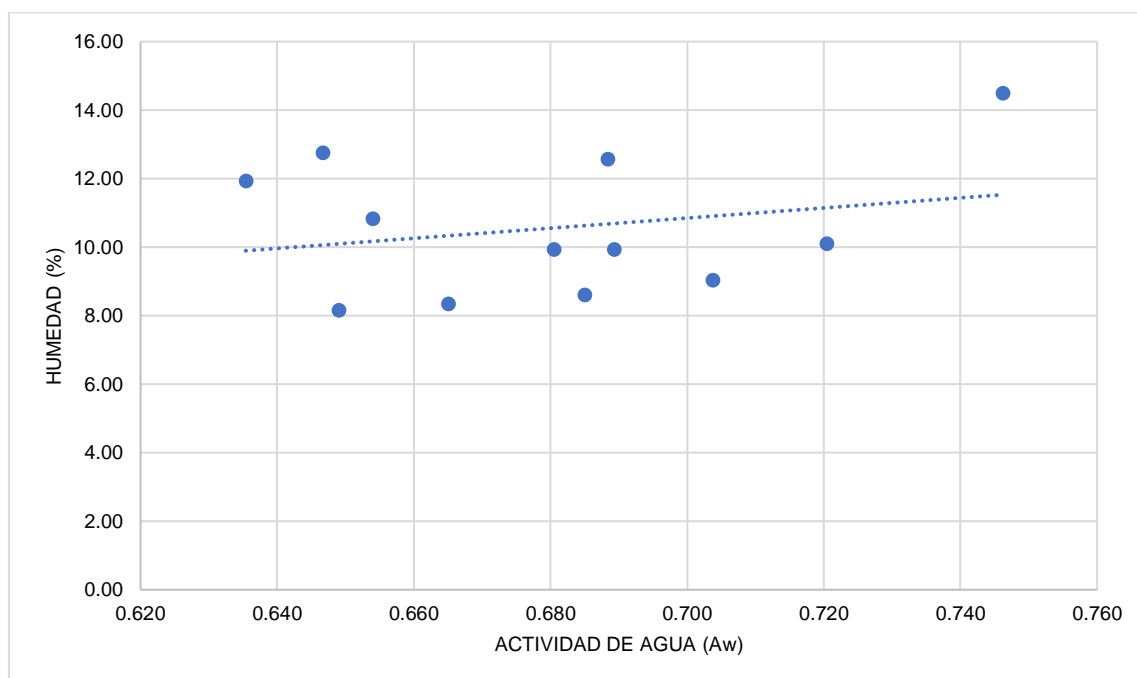
DATOS DE LA MUESTRA			ACTIVIDAD DE AGUA (Aw)	INFECCIÓN FÚNGICA TOTAL (%)
19-1364	Azuay	Maíz suave con cáscara	0,647	31
19-1363	Azuay	Maíz suave Cuzco	0,635	13
19-1362	Azuay	Maíz suave sin cáscara	0,688	100
19-1361	Cotopaxi	Maíz Para tostado	0,654	83
19-1360	Cotopaxi	Maíz Mishka	0,689	46
19-1359	Bolívar	Maíz suave sin cáscara	0,704	100
19-1357	Chimborazo	Maíz suave sin cáscara	0,720	100
19-1358	Chimborazo	Maíz suave con cáscara	0,681	54
19-1356	Chimborazo	Maíz con defectos	0,746	100
10	Pichincha	Maíz chillo	0,685	8
11	Carchi	Maíz suave	0,665	0
12	Tungurahua	Maíz suave INIAP 1603	0,649	54

Por otro lado, si bien la actividad de agua reportada al momento del análisis no es la óptima para la producción de micotoxinas como se muestra en los datos bibliográficos reportados en la Tabla 6; se observa que precisamente las cuatro muestras (19-1362; 19-1359; 19-1357; 19-1356) que presentan un 100% de infección fúngica, son las que tienen los valores de actividad de agua (Aw) más altos como se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Infección fúngica en las muestras de maíz en la sierra ecuatoriana.

Así mismo, en la Figura 13 se puede observar la relación que existe entre la actividad de agua ( $A_w$ ) y la humedad (%) de las muestras.



**Figura 13.** Correlación entre humedad y actividad de agua en maíz suave.

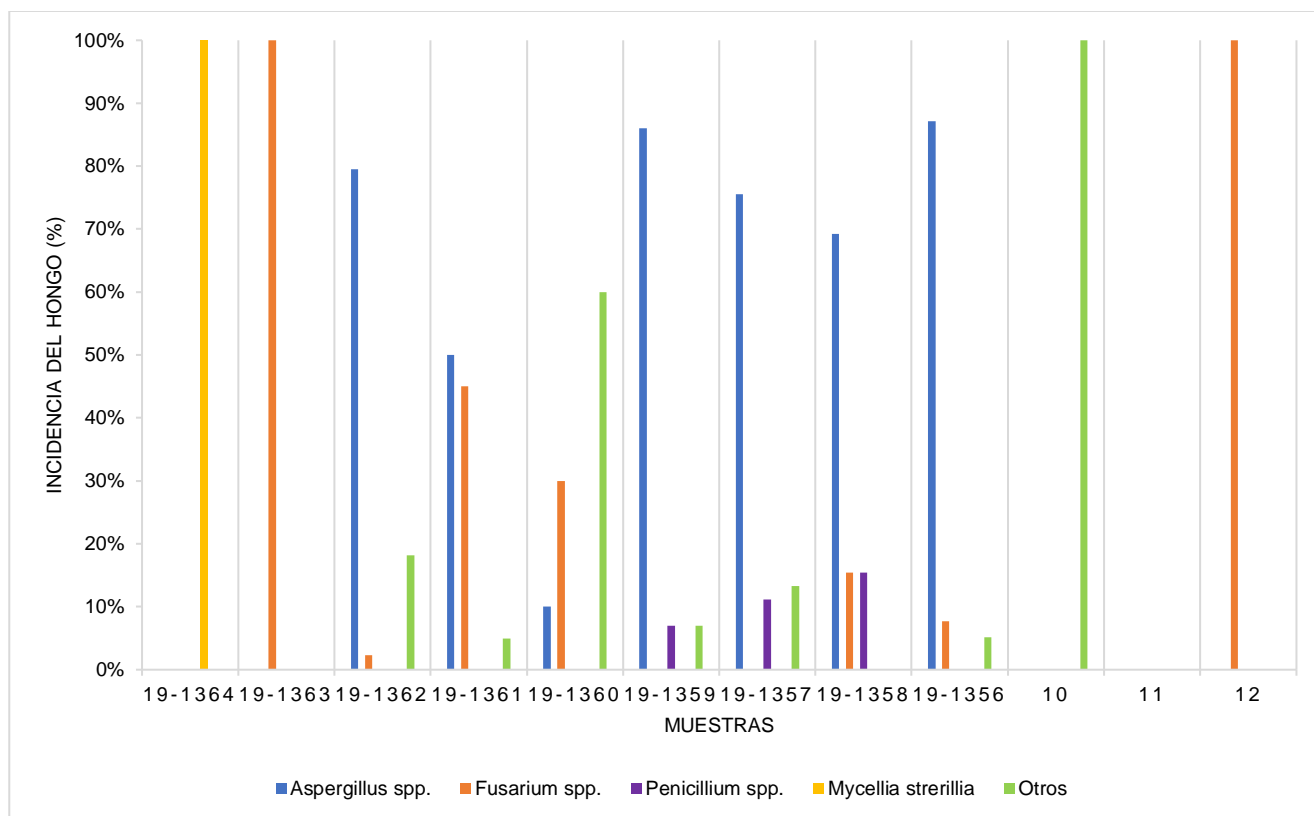
Los hongos identificados en las muestras de granos secos de maíz suave de la sierra ecuatoriana fueron *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Mycelia sterilia*. Se reporta como “Otros” la incidencia que corresponde a lo que no se pudo identificar como se muestra en la Tabla 16.

**Tabla 16**

*Hongos identificados en muestras de maíz en la sierra ecuatoriana.*

DATOS DE LA MUESTRA			INCIDENCIA DE HONGOS (%)				
Código	Provincia	Identificación	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Mycelia sterilia</i>	Otros
19-1364	Azuay	Maíz suave con cáscara	0%	0%	0%	100%	0%
19-1363	Azuay	Maíz suave Cuzco	0%	100%	0%	0%	0%
19-1362	Azuay	Maíz suave sin cáscara	80%	2%	0%	0%	18%
19-1361	Cotopaxi	Maíz Para tostado	50%	45%	0%	0%	5%
19-1360	Cotopaxi	Maíz Mishka	10%	30%	0%	0%	60%
19-1359	Bolívar	Maíz suave sin cáscara	86%	0%	7%	0%	7%
19-1357	Chimborazo	Maíz suave sin cáscara	76%	0%	11%	0%	13%
19-1358	Chimborazo	Maíz suave con cáscara	69%	15%	15%	0%	0%
19-1356	Chimborazo	Maíz con defectos	87%	8%	0%	0%	5%
10	Pichincha	Maíz chillo	0%	0%	0%	0%	100%
11	Carchi	Maíz suave	0%	0%	0%	0%	0%
12	Tungurahua	Maíz suave INIAP 1603	0%	100%	0%	0%	0%

Se observa además que, *Aspergillus* spp. estuvo presente en siete muestras con incidencias que oscilaban entre al 10% hasta el 86%. Seguidos de *Fusarium* spp. presente en siete muestras con incidencias que van desde el 2% al 100%, *Penicillium* spp. presente en tres muestras con incidencias del 7% al 15% y *Mycelia sterilia* se encontró en una muestra con el 100% de incidencia. Es importante resaltar que a excepción de la muestra 11, en todas las demás muestras se identificó la presencia de al menos uno de los hongos productores de micotoxinas como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Incidencia de hongos por muestra.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados de los análisis efectuados en granos secos de maíz (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Carchi y Tungurahua; se concluye que no hay incidencia de ninguna de las aflatoxinas ( $G_1$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_2$ ). Pues los resultados de la cuantificación de aflatoxinas en el grano seco de maíz suave (*Zea mays*) se reportaron por debajo de los límites de cuantificación (<LC) de las muestras en el método de 0,99; 0,93; 1,45 y 0,90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para las aflatoxinas  $G_1$ ,  $B_1$ ,  $G_2$  y  $B_2$  respectivamente. Lo que indica que el maíz



suave de la Sierra Ecuatoriana cumple con las especificaciones de las normativas internacionales de Codex Alimentarius y Unión Europea.

- Las muestras de grano seco de maíz suave (*Zea mays*) en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha y Tungurahua tenían la afectación de varios hongos, entre los que se identificaron *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Mycelia sterilia*. Mientras que el maíz suave de la provincia del Carchi, no presentó afectación.
- Los hongos con mayor incidencia en la investigación fueron *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Mycelia sterilia*; presentes en las muestras de las provincias de Azuay, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo y Tungurahua. Resaltando que todas las muestras evidencian la presencia de al menos un género de hongos productores de micotoxinas.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos en las provincias de sierra ecuatoriana con alcance a productos elaborados a base de maíz, como, por ejemplo: harinas para consumo humano o balanceado para animales; ya que, si bien la cuantificación e incidencia de aflatoxinas en granos secos de maíz fue cero, se identificó la presencia de hongos de la cepa *Aspergillus* spp que en condiciones favorables pueden proliferar y producir aflatoxinas.
- Efectuar un estudio de trazabilidad donde se pueda identificar el punto crítico a controlar para asegurar la cadena productiva de maíz en la sierra. Considerando parámetros que permitan establecer la relación que pueda existir entre los factores ambientales (humedad y temperatura) en las

distintas fases del proceso productos al ser comparadas con propiedades del producto (humedad, actividad de agua).

- Realizar un análisis ampliado con mayor cobertura a nivel nacional con la finalidad de levantar información y una línea base para trabajar en normativas locales para la determinación de límites máximos de aflatoxinas en maíz en pro de la seguridad alimentaria del país.
- Desarrollar una investigación específica en maíz que presente incidencia de *Fusarium* spp. para identificar producción de micotoxinas a partir de este género. Pues se conoce que, las micotoxinas identificadas como fumonisinas, se producen a partir de algunas especies del género *Fusarium*, siendo las del grupo B las más comunes, y dentro de estas la B1 clasificada como "*posible carcinógeno para el ser humano*" (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2019).

## REFERENCIAS

- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. (2019). Fumonisinias. Obtenido de <http://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Fumonisinias>
- AgraTronix. (2019). *MT-16 Operating Instructions grain moisture tester*. Obtenido de [https://www.agratronix.com/wp-content/uploads/2016/11/DOCU-M0113\\_Manual\\_11-16.pdf](https://www.agratronix.com/wp-content/uploads/2016/11/DOCU-M0113_Manual_11-16.pdf)
- Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., & Bouza, E. (1997). *Aspergillus y aspergilosis. Control Calidad SEIMC*. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/asperguillus.pdf>
- Ángeles Gaspar, E., Ortiz Torres, E., López, P. A., & López Romero, G. (2010). Caracterización y rendimiento de poblaciones de maíz nativas de Molcaxac, Puebla. *Revista Fitotécnica Mexicana*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802010000400006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000400006)
- Banco Central Del Ecuador. (2016). Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario. N°89-III-2016. Obtenido de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201603.pdf>
- Blancas, M. B. (2007). Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención. *XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA*. Obtenido de <http://www.bioline.org.br/pdf?la07050>
- Bogantes Ledezma, P. (2004). Aflatoxinas. *Acta médica Costarricense*, 46(4). Obtenido de [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022004000400004](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004)
- Carrillo, L. (2015). Los hongos de los alimentos y forrajes. 4. *Aspergillus. Microbiota*, 44-60. Obtenido de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/4aspergilos.pdf>
- Carrillo, L. (2015). Los hongos de los alimentos y forrajes. 5. *Penicillium. Microbiota*, 61-69. Obtenido de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5penicilios.pdf>
- Carrillo, L. (2015). Los Hongos de los alimentos y forrajes. 6. *Fusarium. Microbiota*, 70-80. Obtenido de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/6fusarios.pdf>
- CODEX ALIMENTARIUS. (2019). *Norma para el Maíz. CXS 153-1985. Adoptada en 1985. REvisada en 1995. Enmendada en 2019*. Obtenido de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252>

Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B153-1985%252FCXS\_153s.pdf

- Correa, Y., Rivera, J., Buriticá, M., Penagos, J., & Torres, I. (2017). Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 60-64.
- European Commission. (2010). *Commission Regularion (EU) N° 165/2010 amending Regularion (EC) N° 1881/2006 settign maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins*. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/165/oj>
- European Food Safety Authority. (2020). Mycotoxin mixtures in food and feed: holistic, innovative, flexible risk assessment modelling aproach. *External Scientific Report*. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1757
- FAO / OIEA. (2003). *Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de preligros y puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas*. Roma. Obtenido de <http://www.fao.org/3/y1390s/y1390s00.htm#Contents>
- Fon-Fan, F., Barzola, S., & Morán, J. (2016). La prevalencia de *Aspergillus* spp. y aflatoxinas en *Zea mays* L.(maíz) almacenado en silos, en Ecuador. *Revista Publicando*, 3(7), 189-202.
- Food and Drug Administration - FDA. (2019). *Section 683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Food. Compliance policy guide*. Obtenido de <https://www.fda.gov/media/121202/download#:~:text=In%201969%2C%20FDA%20set%20an,to%20the%20lowest%20possible%20level>.
- Gobernación de Antioquia. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2015). *Manual Técnico del Cultivo de Maíz bajo Buenas Prácticas Agrícolas*. Colombia. Obtenido de <https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20%20MAIZ.pdf>
- Guacho Abarca, E. F. (2014). *Caracterización Agro-Morfológica del Maíz (Zea mays L.) de la localidad San José de Chazo*. Riobamba: Ecuador. Obtenido de <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/3455/1/13T0793%20.pdf>
- INEC. (2016). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. ESPAC 2016. Ecuador. Obtenido de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2016/Presentacion%20ESPAC%202016.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2016/Presentacion%20ESPAC%202016.pdf)

- INEC. (2017). Índice de publicación ESPAC 2017. Obtenido de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac\\_2017/Indice\\_de%20publicacion\\_ESPAC\\_2017.xlsx](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Indice_de%20publicacion_ESPAC_2017.xlsx)
- INIAP. (2014). Programa Cereales: Maíz duro. Obtenido de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mcereal/rmaizd>
- INIAP. (2014). Programas: Cereales - Maíz suave. Obtenido de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mcereal/rmaizs>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización - INEN. (1995). *Norma Técnica Ecuatoriana. NTE INEN 187:95. Segunda Revisión. Granos y Cereales. Maíz en grano. Requisitos*. Quito.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización - INEN. (2013). *Norma Técnica Ecuatoriana NTN INEN 187:2013. Cereales y leguminosas. Maíz en grano. Requisitos*.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2018). *Sustancias en el ambiente que causan cáncer: Aflatoxinas*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/sustancias/aflatoxinas/aflatoxinas>
- International Agency for Research on Cancer - IARC. (2015). Control de las micotoxinas en los países de ingresos bajos y medios. En *IARC: Informes de grupos de trabajo N°9* (págs. 1-55). Obtenido de <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Working-Group-Reports/Control-De-Las-Micotoxinas-En-Los-Pa%C3%ADses-De-Ingresos-Bajos-Y-Medios-2015>
- INTRAGRI - Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura. (2016). *Aflatoxinas en Maíz*.
- Laboratorio de Microbiología de Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). (2019). *Avaliação fúngica em milho*. Rio Grande do Sul, Brasil.
- Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos, del Departamento de Nutrición y Calidad. (2019). *Método de análisis de aflatoxinas (adaptado)*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- López Naranjo, L. M. (2013). *Principales micotoxinas asociadas al consumo de maíz y sus subproductos*. Antioquia. Obtenido de [http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1039/1/Principales\\_micotoxinas\\_asociadas\\_consumo\\_maiz\\_subproductos.pdf](http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1039/1/Principales_micotoxinas_asociadas_consumo_maiz_subproductos.pdf)
- MAIZAR - Asociación Maíz y Sorgo Argentino. (2011). *El maíz primero en el munto*. Obtenido de <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=392>

- Martínez, M. M., Vargas del Río, L. M., & Gómez, V. M. (2014). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 89-109. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v12n2/v12n2a08.pdf>
- Monzón, A., & Rodríguez Tudela, J. L. (2000). Infecciones causadas por el género *Fusarium*. *Control Calidad SEIMC*. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>
- Nelson, P. (1992). *Taxonomy and biology of Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1513371/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1982). *Perspectiva sobre micotoxinas*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/AM811S/AM811S.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Roma. Obtenido de <http://www.fao.org/3/t0395s/T0395S05.htm#Clasificacion%20de%20la%20calidad%20del%20grano>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004). *Estudio FAO Alimentación y Nutrición: Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. Roma. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Micotoxinas*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Ospina Machado, J. E. (2001). *Características Físico Mecánicas y Análisis de Calidad de Granos*. Bogotá. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=2DWmqb6xP3wC&pg=PA9&lpg=PA9&dq=m%C3%A9todo+de+determinaci%C3%B3n+de+humedad+con+equipo+agratonix&source=bl&ots=IBGjSkKadx&sig=ACfU3U1BeKe2Koxp4K6S-hcccM9SGqOokA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj82-Wk-vDpAhWlmeAKHbsTDBUQ6AEwAXoEC>
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., & Violie, A. D. (2001). *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2435/1/iniapscg96.pdf>
- Papini Meardi, C. A. (2014). *Exposición a las aflatoxinas en el maíz. Sector Pacanal, Nahualá, Sololá*. Guatemala.
- Pitt, J., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Professional*.
- Quishpe Yanchaliquin, B. L. (2010). *Evaluación de la producción de 2 variedades experimentales en etapa fenológica (choclo) y seco, de maíz*

*(Zea mays)* de grano blanco harinos, y un híbrido simple, frente al testigo local. Loja, Ecuador.

- Rapid Communication in Mass Spectrometry. (2006). Development and validation of a liquid chromatography / tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. 20:2649-2659. doi:10.1002/rcm.2640
- Rodríguez, B. (2016). *Aspergillus* spp. *Atlas de identificación micológica*. Obtenido de <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/06/22/aspergillus-spp/>
- Salazar Juárez, L. (2008). *Determinación de la presencia de aflatoxinas en granos de maíz producidos en peten y distribuidos en la central de mayoreo de la ciudad capital, y elaboración de un análisis de peligros y puntos de control críticos*.
- Sánchez Ortega, I. (2014). Maíz I (*Zea mays*). La especie: aspectos botánicos (taxonomía). *REDUCA (Biología). Serie Botánica*, 7(2), 151-171. Obtenido de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1739/1776>
- Sandoval, G. (2013). Determinación de aflatoxinas totales, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en matriz de cereales: maíz y cebada. *PUCE*, 20.
- Soriano Del Castillo, J. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Subero, L. (2011). Los hongos: su morfología, reproducción y fisiología. *InfoAgro*. Obtenido de [http://www.infoagro.net/sites/default/files/migrated\\_documents/attachment/6\\_Los\\_hongos\\_morfologia\\_reproduccion.pdf](http://www.infoagro.net/sites/default/files/migrated_documents/attachment/6_Los_hongos_morfologia_reproduccion.pdf)
- Vaca, L. A. (2016). *La producción de maíz amarillo en el Ecuador y su relación con la soberanía alimentaria*. Quito. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12652/La%20produccion%20de%20ma%C3%ADz%20amarillo%20en%20el%20Ecuador%20y%20su%20relacion%20con%20la%20soberania%20alimentaria%20-%20Luis%20Al.pdf?sequence=1>
- Vallejo López, M. J. (2012). Determinación de aflatoxinas b1, b2, g1 y g2 presentes en harina de maíz del sector tumbaco mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (iac) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
- Yáñez G., C., Zambrano, J. L., Caicedo, M., & Heredia, J. (2013). *Guía de Producción de Maíz para pequeños agricultores y agricultoras*. Guía No. 96. INIAP, Programa de Maíz, Quito, Ecuador.






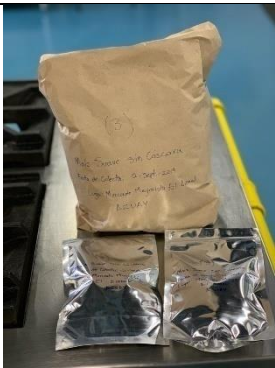
Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 1024-1057. doi:10.3390/toxins4111024











# **ANEXOS**

ANEXO 1

IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

N°	Fecha de muestreo	Descripción de la muestra	Material vegetal	Acondicionamiento de muestras
1.	12/09/2019	Azuay –Maíz suave con cáscara		
2.	12/09/2019	Azuay -Maíz suave Cuzco		
3.	12/09/2019	Azuay - Maíz suave sin cáscara		

4.	19/09/2019	Cotopaxi - Maíz para tostado		
5.	19/09/2019	Cotopaxi - Maíz Mishka		
6.	19/09/2019	Bolívar -Maíz suave sin cáscara		
7.	19/09/2019	Chimborazo - Maíz suave sin cáscara		

8.	19/09/2019	Chimborazo - Maíz suave con cáscara		
9.	19/09/2019	Chimborazo - Maíz suave con defectos		



## ANEXO 2

### MÉTODO DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS ADAPTADO - UTILIZADO POR EL LABORATORIO DEL INIAP

#### METODO DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

**ADAPTADO POR:** Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos, del Departamento de Nutrición y Calidad del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (2019).

#### **Extracción**

Para la extracción se pesó 50 g de muestra (maíz molido) y se licuó con 100 mL de solución de metanol: agua (80:20, v/v) por 3 minutos a alta velocidad. El extracto fue centrifugado durante 10 minutos a 4000 rpm y filtrado a través de papel filtro cualitativo y membrana de fibra de vidrio. Se tomó una alícuota de 2 mL de filtrado y se diluyó con 25 mL de solución buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés).

#### **Purificación de la muestra**

La muestra diluida en PBS (25 mL) fue purificada en columnas de inmunoafinidad (EASI – EXTRACT AFLATOXIN, R-Biopharm Rhône Ltd. UK) a un flujo de 2 a 3 mL•min<sup>-1</sup>. La columna fue lavada con 20 mL de PBS y las toxinas se eluyeron desde la columna con 3 mL de metanol grado HPLC.

#### **Cuantificación por HPLC**

La identificación y cuantificación se realizó en un sistema HPLC (Agilent technologies 1100/1200 series, Waldbronn, Alemania), constituido de una bomba binaria (G1312A), detector de fluorescencia (FLD G1321A) ( $\lambda$  excitación 362 nm y  $\lambda$  emisión de 425 nm), auto-inyector (G1329A), derivatizador electroquímico post-columna tipo KOBRA CELL (R-Biopharm Rhone .Ltd, Glasgow, Escocia) y controlado por el software Chemstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación fue realizada en una columna de fase reversa C18 (150x4,6 mm, 5 $\mu$ m) (Agilent Zorbax SB C18, EE UU). Para la determinación se inyectó 20  $\mu$ L de extracto en la columna a un flujo de 1 mL•min<sup>-1</sup>. La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de agua/ metanol/ acetonitrilo (60:20:20, v/v/v) con 119 mg de bromuro de potasio y 350  $\mu$ L de ácido nítrico 4M. La cuantificación se realizó por

comparación de áreas obtenidas para las muestras en una curva de calibración de cada aflatoxina. La linealidad del método se evaluó relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de aflatoxinas, para lo cual se preparó un set de estándares con concentraciones de 0,42; 0,84; 1,67; 5,00; y 10,00 ng•mL<sup>-1</sup>, en triplicado durante dos días. Las muestras se inyectaron en el HPLC (Agilent technologies 1100/1200 series, Waldbronn, Alemania) y se registró la respuesta para cada concentración.

### **Reactivos químicos**

Los estándares de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> de pureza > 98% se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis Missouri, USA), los solventes acetonitrilo y metanol grado HPLC fueron obtenidos de Merck (KGaA, Darmstadt Germany), los reactivos Cloruro de Sodio, Hidróxido de Sodio (≥99%), Bromuro de Potasio (≥99%), Cloruro de Potasio (≥99%), Hidrógeno fosfato disódico dihidratado (≥99%), se obtuvieron de Merck (KGaA, Darmstadt Germany). Se utilizó en todo el procedimiento agua purificada de conductividad 18,2 MΩ. Cm a 25°C.

### **Preparación de Estándares**

Para el análisis se preparó una solución stock de 2500 µg•mL<sup>-1</sup> inyectando 4 mL de solución de Tolueno: Acetonitrilo (9:1, v/v) en los viales que contenían 10 mg de cada aflatoxina y se agito hasta disolución completa, esta solución se almacenó a temperatura de -20°C. La solución estandar de trabajo (2500 ng•mL<sup>-1</sup>) y la solución de calibración (10 ng•mL<sup>-1</sup>) se prepararon por dilución de la solución stock en metanol grado HPLC y se almacenaron a -20 °C.

### **Adaptación de la metodología analítica para análisis de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.**

Con la finalidad de asegurar que los resultados obtenidos sean confiables se realizó un proceso de adaptación de la metodología analítica propuesta, para lo cual se evaluó la linealidad del método, la precisión mediante un ensayo de repetibilidad y la exactitud mediante un ensayo de recuperación, para lo cual se utilizaron muestras artificialmente contaminadas con aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en tres concentraciones diferentes.



La curva de calibración se realizó inyectando soluciones estándar en 5 diferentes concentraciones de cada aflatoxina (0,42, 0,84, 1,67, 5 y 10 ng•mL<sup>-1</sup>) por triplicado en 2 días diferentes. Se graficó el área de los picos correspondientes a cada concentración y se realizó un estudio de regresión lineal. Como resultado se obtuvo un coeficiente de correlación lineal entre r=0,99 a 1. Estos resultados concuerdan con el trabajo desarrollado por Ok *et al.* (2016); Samaniego *et al.* (2018), quienes reportaron coeficientes de correlación entre 0,9966 y 1 para este método.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se calcularon en base a la curva de calibración promedio obtenida del estudio de regresión lineal, empleando estándares puros de cada aflatoxina. Posteriormente se evaluó estos parámetros con muestras artificialmente contaminadas para evaluar el efecto matriz. Se estableció que el método presenta límites de detección de 0,45, 0,30, 0,27 y 0,28 µg/Kg para AFLA B1, B2, G1 Y G2 respectivamente. Los límites de cuantificación obtenidos fueron de 0,91, 0,59, 0,54 y 0,56 µg/Kg para AFLA B1, B2, G1 Y G2 respectivamente. Estos resultados demostraron que el método es muy sensible permitiendo cuantificar menos de 1 µg/Kg de cada aflatoxina.

La precisión del método se evaluó mediante un ensayo de repetibilidad, utilizando muestras de maíz artificialmente contaminadas con aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en tres niveles (2,5, 15 y 30 µg/Kg), con tres repeticiones. Se calculó el % DSr (Desviación estándar de repetitividad), observándose que los valores obtenidos por nivel en todos los casos fueron inferiores al 11%, lo que demostró que el método se ajusta la precisión establecida para metodologías de análisis de micotoxinas en productos alimenticios (valores de %DSr <20%) (European Commission, 2002, 2006).

En cada nivel de contaminación propuesto en el ensayo de precisión se determinó la exactitud como porcentaje de recuperación, estableciéndose que el método presenta un promedio de 89,81, 90,87, 87,98 y 93,07 % de recuperación para el análisis de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> respectivamente. Los resultados obtenidos se ajustaron a la exactitud (70 - 100 %) establecida para métodos de análisis de micotoxinas en productos alimenticios (European Commission, 2002, 2006).

### ANEXO 3

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EN EL LABORATORIO DEL INIAP

