

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**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 CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA JOSÉ VALLEJO LÓPEZ

SANGOLQUÍ, 9 DE ENERO DEL 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

María José Vallejo López

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Paéz

Sangolquí, 9 de enero del 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. María José Vallejo López como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

9 de enero del 2012

Fecha

B.Sc Karina Ponce

Dra. Blanca Naranjo

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelitos: Emma Lucila Mayorga† (2002) y Angel Polivio López† (2011), por su amor incondicional y sabio ejemplo. Mi amor perdura a pesar de la distancia. No los he olvidado, todos los días los recuerdo, espero se sientan orgullosos de mi. Siempre los extrañaré.

María José Vallejo López

AGRADECIMIENTO

Tengo una lista extensa de agradecimientos: en primer lugar quiero agradecer a Dios porque sin él, nada soy. A mi mami, Lupita quien es mi apoyo constante, mi confidente simplemente mi mejor amiga. A mi papi, Numa René, mi fan número uno, el pilar de mi vida, la paz en medio de mis tormentas. A ellos solo puedo decirles Dios le pague por su amor sin límites, espero no haberlos defraudado. A mi hermano Vinicio, por cuidarme, quererme y creer siempre en mí. A Pablo Andrés, amor de mi vida, compañero de metas y sueños, aliciente inquebrantable. Gracias por estar siempre a mi lado y construir juntos nuestra historia.

Agradezco también a: la Agencia Ecuatoriana del Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) por la oportunidad brindada para desarrollar este trabajo en el laboratorio de Inocuidad Alimentaria. A la directora y codirectora de esta investigación, BSc. Karina Ponce y Dra. Blanca Naranjo, por su valiosa orientación y apoyo para la conclusión de la misma. A la Escuela Politécnica del Ejército, a mis maestros, a mis maravillosas amigas (Lita, Nidiecilla, Ana B, Ana K, Stephy y Priss), al personal de AGROCALIDAD y a todas las personas que en el transcurso de estos 5 años han formado parte de mi vida y me han ayudado a formarme como una buena profesional pero sobretodo como un buen ser humano.

María José Vallejo López

Índice de Contenido

CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	A
1.1 Formulación del problema	A
1.2 Justificación del problema	A
1.3 Objetivos de la investigación	B
1.3.1 Objetivo Principal	B
1.3.2 Objetivos Específico	B
1.4 Marco Teórico.....	C
1.4.1 Antecedentes.....	C
1.4.2 Características generales	D
1.4.3 Localización y Desarrollo.....	F
1.4.4 Mecanismo de Acción.....	H
1.4.5 Toxicología	I
1.4.6 Toxicidad aguda.....	J
1.4.7 Toxicidad crónica.....	K
1.4.8 Incidencia en Alimentos	M
1.4.9 Ingesta Diaria.....	N
1.4.10 Identificación de los hongos	P
1.4.11 Descontaminación/Detoxificación	Q
1.5 Sistema de hipótesis:	R
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	S
2.1 Participantes.....	S
2.2 Localización Geográfica.....	S
2.3 Periodo de Tiempo de investigación	S
2.4 Procedimientos y Equipos	T
2.4.1 Protocolo de Muestreo.....	T
2.4.2 Protocolo de Curva de Calibración	W
2.4.3 Protocolo de Extracción, Purificación y Cuantificación	Z
2.4.4 Protocolo de Descontaminación	DD
2.4.5 Estándares de Aflatoxinas	EE
2.4.6 Manifold	EE
2.4.7 Rotavapor.....	FF
2.4.8 Columnas de Inmunofinidad.....	FF

2.4.9 HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)	GG
2.4.10 Kobra Cell (Derivatizador post-columna)	GG
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	II
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	XX
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	DDD
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	FFF
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	GGG

Listado de Tablas

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1: Estructura molecular de las aflatoxinas	5
Tabla 1.2: Valores de DL ₅₀ (mg/kg) dependiendo de la especie animal.	12
Tabla 1.3: Incidencia de las aflatoxinas en maíz.	14
Tabla 1.4: Niveles permisibles de aflatoxinas en USA.	15
Tabla 1.5: Niveles permisibles de aflatoxinas en la Unión Europea.....	16

Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2.1: Subdivisión de lotes en sublotes dependiendo del producto y del peso del lote.	22
Tabla 2.2: Número de muestras incrementales a tomar dependiendo del peso del lote de cereales y productos de cereales.	23
Tabla 2.3: Valores correspondientes a M (masa molecular relativa de la aflatoxina) y (absortividad molar promedio) en solución de tolueno:acetonitrilo	26
Tabla 2.4: Preparación de soluciones estándares de trabajo	27
Tabla 2.5: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el HPLC	30

Capítulo 3: RESULTADOS

Tabla 3.1: Resultados de la concentración de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ en µg. Kg ⁻¹ presentes en 11 muestras provenientes de supermercados.	36
Tabla 3.2: Resultados de la concentración de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ en µg. Kg ⁻¹ presentes en 32 muestras provenientes de Minoristas.....	39
Tabla 3.3: Resultados de la concentración de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ en µg. Kg ⁻¹ presentes en 7 muestras provenientes de minoristas	42
Tabla 3.4: Intervalos de confianza con una probabilidad del 95% para la concentración de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ clasificadas según su lugar de procedencia.....	49

Listado de ilustraciones y gráficos

Ilustración 1.1: Mecanismo de acción de la aflatoxina B ₁	9
Ilustración 1.2: Colonias típicas del género <i>Aspergillus</i>	17
Ilustración 2.1: Manifold	33
Ilustración 2.2: Rotavapor BUCHI.....	33
Ilustración 2.3: Columnas de Inmunofinidad AflaStar.....	34
Ilustración 2.4: HPLC y detector de fluorescencia	34
Ilustración 2.5: Kobra Cell y Derivatización de las aflatoxinas B ₁ y G ₁	35
Gráfico 3.1: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados	37
Gráfico 3.2: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados... ..	37
Gráfico 3.3: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados	37
Gráfico 3.4: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados	38
Gráfico 3.5: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas	40
Gráfico 3.6: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas	40
Gráfico 3.7: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas	41
Gráfico 3.8: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas	41

Gráfico 3.9: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.....	43
Gráfico 3.10: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados	43
Gráfico 3.11: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados	43
Gráfico 3.12: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global	44
Gráfico 3.13: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global.....	45
Gráfico 3.14: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global	45
Gráfico 3.15: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global.....	45
Gráfico 3.16: Diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B ₁ (Superior) y B ₂ (Inferior) en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ según su lugar de procedencia.....	47
Gráfico 3.17: Diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G ₁ (Superior) y G ₂ (Inferior) en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ según su lugar de procedencia.....	48

Listado de Anexos

Anexo1: Inventario de locales minoristas, supermercados y mercados	A
Anexo 2: Concentración de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ en 50 muestras de harina de maíz.	D
Anexo 3: Tasa de incidencia de Cáncer de hígado del Hospital SOLCA.....	F
Anexo 4: Análisis estadístico.....	H
Anexo 5: Fundamento estadístico.	O
Anexo 6: Glosario.....	T
Anexo 7: Cromatogramas modelo	V

RESUMEN.

La ocurrencia de aflatoxinas en gramíneas es relativamente alta en las zonas templadas y climas subtropicales. En Ecuador no existe una normativa de regulación para aflatoxinas ni un programa sistemático de vigilancia y monitoreo sobre la contaminación por hongos micotoxigénicos en alimentos de consumo humano o animal. Este trabajo se realizó para establecer los niveles reales de contaminación de aflatoxinas en harina de maíz, datos con los que sea posible definir directrices de regulación a nivel gubernamental para la comercialización de harina de maíz. Para esto, se tomaron 50 muestras de locales minoristas (32), supermercados (11) y mercados (7) en el sector valle de Tumbaco, las que se analizaron por duplicado mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC y columnas de inmunoafinidad IAC. Coincidiendo con lo reportado a nivel mundial para muestras de maíz, se encontró que los niveles de contaminación por aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ posiblemente cancerígenas, están por debajo del nivel máximo permisible por la Unión Europea (8 µg. Kg⁻¹) siendo la de mayor incidencia la aflatoxina B₁, sustancia cancerígena de nivel 1, detectada en el 78% del total de las muestras, superando las normativas internacionales en 13 de ellas, el subgrupo minoristas fue el que presentó los mayores niveles de contaminación para AFB₁. Estos resultados indicaron que la harina de maíz analizada constituye una amenaza para la salud pública y debe ser regulada por las leyes ecuatorianas de inocuidad alimentaria.

ABSTRACT.

Presence of aflatoxins in grains is relatively high in temperate and tropical regions. Government regulations for aflatoxins or a systematic program of surveillance and monitoring of micotoxins for human or animal consumption are not available in Ecuador. This study was conducted to determine the real levels of contamination in corn flour in order to provide the basis for government regulations for its commercialization. 50 samples divided in retail trades (32), supermarkets (11) and local markets (7) of corn flour in the Tumbaco valley were analyzed for aflatoxin using High Performance Liquid Chromatography HPLC and immunoaffinity columns IAC. As reported worldwide in corn samples, this investigation found that levels of contamination were below the maximum international ($8 \mu\text{g. Kg}^{-1}$) allowed for likely carcinogenic aflatoxins B₂, G₁ and G₂. In the other hand, the level 1 carcinogenic substance, aflatoxin B₁ had the highest incidence and was detected in 78% of the total samples, above the European regulation in 13 of them. The subgroup of retail trades presented the maximum levels of contamination for AFB₁. These results indicate that corn flour represent hazard for human's health and must be regulated with food safety laws.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 Formulación del problema:

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos de varias especies del género *Aspergillus*, cuyos efectos fisiopatológicos incluyen: daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores, disminución de la eficacia del sistema inmunológico, teratogénesis, excreción por la leche y acumulación en tejidos (Bodega, 2010).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2011) es primordial la protección de los consumidores contra los peligros que para la salud pública tienen los alimentos contaminados por aflatoxinas, sin embargo en el Ecuador no existen parámetros de control dentro de la norma INEN para ningún tipo de producto susceptible a contaminación, ni investigaciones referentes a la incidencia de aflatoxinas en los productos de consumo humano. Esta investigación se realizó en maíz (Harina) ya que es más susceptible a la presencia de aflatoxinas junto a los cacahuates, pistachos, nueces del Brasil y semillas de algodón (Soriano del Castillo, 2007).

1.2 Justificación del problema:

Las aflatoxinas son sustancias muy tóxicas productoras de cáncer en animales de laboratorio (FAO, 2011), por esto es fundamental su estudio para determinar sus causas, efectos, rutas metabólicas y así empezar a normar y estandarizar los límites permisibles para las condiciones ambientales, sociales y geográficas tanto para la producción y el consumo local como la exportación e importación de materia prima o subproductos del maíz.

Actualmente, existen numerosas investigaciones para evaluar el efecto de las aflatoxinas en la salud de animales domésticos, entre estas se han encontrado: baja ganancia de peso, desarrollo lento, problemas en la reproducción, diarrea, desórdenes respiratorios, hemorragias, reducción en la producción de leche y huevos, así como la alteración del sistema inmunológico e incluso ocasiona la muerte de los animales (Moreno, Vázquez, & Facio, 2000). Esto afecta

considerablemente a la agroindustria ecuatoriana, generando millones de dólares en pérdidas. Sin embargo, no solo los animales se ven afectados, sino los seres humanos, existen evidencias que relacionan la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas y el desarrollo de cáncer (Gong, Egal, Hounsa, Turner, & Hall, 2003).

Hoy en día, la investigación de las aflatoxinas se la realiza en todo el mundo, sin embargo el Ecuador no posee ningún registro de los niveles de contaminación presente en los alimentos nacionales o alguna normativa de regulación propia. Por este motivo esta investigación es pionera en determinación de aflatoxinas en harina de maíz de consumo local, estableciendo una línea base de regulación para la producción y comercialización de maíz. Aportando así al plan de Seguridad Alimentaria e Inocuidad de los alimentos impulsada por el Gobierno Nacional.

1.3 Objetivos de la investigación:

1.3.1 Objetivo Principal:

- Determinar la presencia de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en 50 muestras de harina de maíz en el Sector de Tumbaco mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Definir la línea base de muestreo en el sector de Tumbaco para la investigación sobre la contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en harina de maíz.
- Recopilar 50 muestras de harina de maíz en los diferentes comercios minoristas de los barrios: El Arenal, Tola Grande, Tola Chica, La Morita, Buena Esperanza, Tumbaco Central.
- Efectuar el protocolo de extracción, purificación y determinación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en las muestras de harina de maíz.
- Establecer los niveles de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz en el sector de Tumbaco.

- Analizar los resultados para definir los límites permisibles de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz.
- Definir las recomendaciones necesarias para evitar la contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en harina de maíz.
- Documentar los resultados obtenidos en la investigación sobre la contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en harina de maíz en el sector de Tumbaco.

1.4 Marco Teórico:

1.4.1 Antecedentes:

Dentro del dominio *Eukarya*, se encuentran los hongos, organismos que carecen de clorofila son filamentosos poseen un conjunto de hifas ramificadas denominado micelio verdadero o unicelulares (Carrillo, 2003); producen metabolitos secundarios que no son fundamentales para su crecimiento vegetativo y usualmente se observan cuando la biomasa ha llegado a su fase estacionaria de crecimiento, dentro de este grupo están: los antibióticos y las micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Las micotoxinas (*mikes* = hongo y *toxina* = veneno) se relacionan con la diferenciación y esporulación de los hongos en su fase estacionaria, pueden contaminar los alimentos, piensos y materias primas de consumo humano y animal (Soriano del Castillo, 2007). Son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico, formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones deficientes y estrés (Robledo, Marín, & Ramos, 2001), la formación de micotoxinas refleja que el moho ha alcanzado algún grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica, por esto poseen diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas (Carrillo, 2003). Los hongos productores de micotoxinas pertenecen en su mayoría a la división *Ascomycota* con más de 30.000 especies (Soriano del Castillo, 2007).

A lo largo de la historia se han documentado varios casos de micotoxicosis por contaminación del pan con hongos del género *Claviceps*

como: “El fuego de San Antonio, Edad media” en Francia donde murieron millares de personas y “Las brujas de Salem, 1692” en Estados Unidos donde se detectó LSD (dietilamina del ácido lisérgico) y 21 personas fueron ahorcadas al considerarlas brujas producto de las alucinaciones con LSD (Cornell University, 2008).

A comienzos de 1960, más de 100.000 pavos jóvenes en granjas de aves en Inglaterra murieron en el transcurso de unos meses debido a una enfermedad nueva, llamada “la enfermedad X del pavo”. Con el tiempo se determinó que esta enfermedad no estaba asociada únicamente con los pavos sino que pollos y faisanes jóvenes fueron también afectados con una alta tasa de mortalidad (Bodega, 2010). Esta enfermedad se atribuyó a la presencia de toxinas de *Aspergillus flavus* en harina de maní importada de Sudamérica (FAO, 2011), tomando así el nombre de aflatoxinas (A: referente al género *Aspergillus* y AFLA: referente a la especie *flavus*), simultáneamente en California se observó una aparición masiva de hepatomas en las truchas arcoíris de varias piscifactorías comerciales que habían consumido pienso con semillas de algodón contaminado por aflatoxinas. En esa misma década existieron números informes de tumores hepáticos en animales de crianza en Europa y América, por esta razón son las micotoxinas más conocidas e intensamente estudiadas en el mundo (Cornell University, 2008).

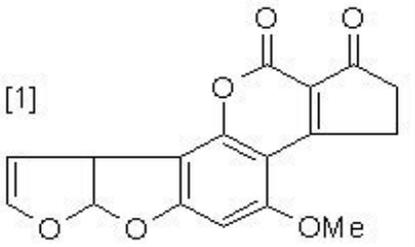
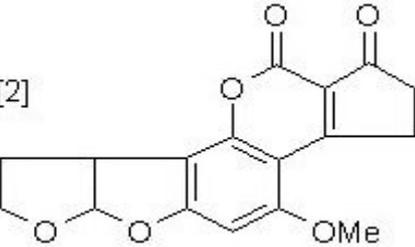
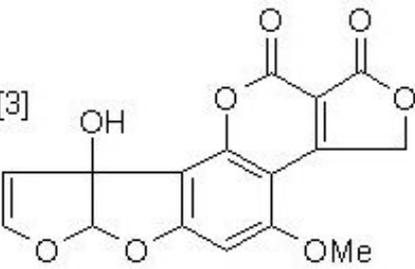
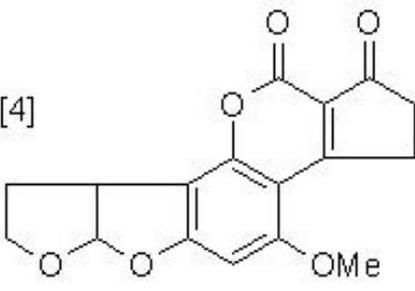
1.4.2 Características generales:

Las aflatoxinas son producidas por dos géneros de hongos filamentosos *Aspergillus* y *Penicillium*, estos representan el crecimiento típico de los hongos microscópicos. Las especies productoras son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium puberalis* y *Aspergillus oryzae*. En 1967, Nulik y Holiday reportaron también a las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus gruber*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium variable* y *Penicillium citrinum* (Bolet & Socarrás, 2004).

Varios estudios han revelado que las cuatro aflatoxinas más importantes: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), están directamente relacionadas

con la contaminación de alimentos y cultivos, poseen una estructura similar entre ellas y forma un único grupo de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados (Cornell University, 2008). Sus estructuras moleculares fueron deducidas alrededor de 1962 por el grupo ASOA, se describen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Estructura molecular de las Aflatoxinas. Adaptado de: (*European Mycotoxins Awareness Network, 2010*).

AFLATOXINA	FÓRMULA		P.MOLECULAR (g/mol)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[1] 	312,3
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[2] 	314,3
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[3] 	328,3
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[4] 	330,3

“Las Aflatoxinas están relacionadas químicamente con las cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona, común en todas ellas. Son bifurano cumarinas derivadas de un decacétido, por la vía biosintética de los policétidos, son poco solubles en agua, termorresistentes y estables en un rango de pH entre 3 y 10. Poseen puntos de fusión superiores a los 250°C.” (Soriano del Castillo, 2007).

Los procedimientos analíticos para su determinación se basan en su fluorescencia y su extracción se realiza con solventes orgánicos moderadamente polares como el metanol, se han identificado 18 tipos de aflatoxinas de las cuales seis son contaminantes de alimentos, del grupo B, G, M (Soriano del Castillo, 2007).

La denominación de aflatoxinas B₁ y B₂ son resultado de la exhibición de fluorescencia de color azul bajo la luz ultravioleta mientras que la designación G₁, G₂ se refiere a la fluorescencia verde-amarillo de estas estructuras bajo la luz ultravioleta (European Mycotoxins Awareness Network, 2010).

Las aflatoxinas B₁ y G₁ son carcinogénicas y mutagénicas debido a que en su estructura poseen un epóxido muy reactivo en la posición 8,9 del anillo furano terminal que se une en forma covalente con los ácidos nucleicos (Cornell University, 2008).

1.4.3 Localización y Desarrollo:

Según Bolet & Socarrás, la ocurrencia de aflatoxinas es influenciada por ciertos factores ambientales como:

- **Dimensión:** Su tamaño entre 3 y 20 micras facilitan su dispersión a través del aire y se establecen en diversos sustratos donde pueden crecer.
- **Factores físicos:** humedad, agua disponible, temperatura, zonas de microflora e integridad física del grano.

- Factores químicos: composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno.
- Factores biológicos: presencia de vectores.

Por lo tanto la extensión de la contaminación por aflatoxinas varía según la localización geográfica, prácticas de agricultura y susceptibilidad de los alimentos a la infestación fúngica durante la pre-cosecha, almacenamiento y período de procesamiento (Cornell University, 2008). El crecimiento del hongo y la contaminación por aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, huésped y ambiente, una apropiada combinación de estos factores determina la infestación y colonización del sustrato, tipo y cantidad de aflatoxinas a producir. Sin embargo los factores precisos que inician la formación de las toxinas todavía no están completamente claros (U.S. Food and Drug Administration, 2011).

Según Soriano del Castillo, las condiciones óptimas de crecimiento para *A. flavus* y *A. parasiticus* son:

- Temperatura: 25-30°C.
- Humedad relativa: 88-95%.
- pH: 3,5–5,5.
- CO₂: 20%.

Sin embargo se ha encontrado que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas entre: 10-43°C con una actividad de agua alta $\approx 0,99$. *A. parasiticus* con una actividad de agua entre 0,83 y 0,87 y temperatura 30°C-28°C.

Las aflatoxinas son detectadas en leche, quesos, maíz, maní, algodón, nueces, almendras, higos secos, especias y una variedad de otros alimentos y cultivos. Siendo, los commodities con mayor riesgo de contaminación: el maíz, maní y algodón (FAO, 2011). El maíz probablemente es el de mayor preocupación mundial porque crece en climas donde puede existir contaminación perenne por aflatoxinas (Cornell University, 2008).

1.4.4 Mecanismo de Acción.

El mecanismo de acción de las aflatoxinas en 1966 se develó e incluía: la inhibición del DNA, RNA, mitosis, producción de alteraciones cromosómicas, lo que evidenció su efecto carcinogénico, teratogénico y mutagénico (Bolet & Socarrás, 2004).

La aflatoxina B₁ se absorbe en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas hacia el hígado a través de la vena porta. En las células hepáticas la toxina entra y se metaboliza en el retículo endoplasmático, donde es hidroxilada y transformada en las aflatoxinas P₁, M₁, Q₁. También se produce la toxina B₁-8,9-epóxido que puede ser detoxificada por una transferasa inducible formando un conjugado con el glutatión en su forma tiólica (GSH), sin embargo este epóxido es afín a diversas macromoléculas como ácidos nucleicos y proteínas a las cuales se une de forma covalente causando disrupciones en la transcripción y traducción, respectivamente. Se forma un aducto de ADN denominado: Aflatoxina B₁-guanina, eliminado en la orina y un aducto proteico: Aflatoxina-B₁-lisina utilizado como biomarcador en suero (Soriano del Castillo, 2007). En la figura 1 se esquematiza el mecanismo de acción de la AFB₁.

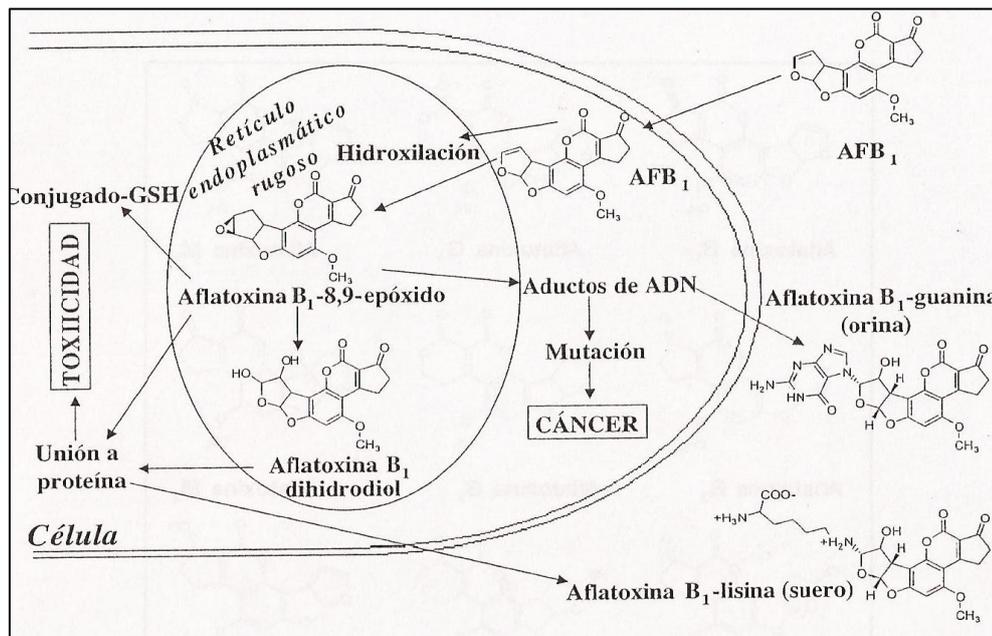


Ilustración 1.1: Mecanismo de acción de la aflatoxina B₁. Tomado de: (Soriano del Castillo, 2007).

Actualmente, la investigación en aflatoxinas se enfoca a la detección y cuantificación en diferentes granos, su incidencia en ellos, los mecanismos de regulación de síntesis y ecología de los hongos en campo y almacenamiento (Guzmán de Peña, 2010).

1.4.5 Toxicología.

The International Agency for Research on Cancer (IARC) en el año de 1988, adjuntó a la aflatoxina B₁ a la lista de carcinógenos humanos, por su acción como factor de inducción de neoplasia en el hombre, apoyado por una serie de estudios epidemiológicos en Asia y África que han demostrado una asociación positiva entre las aflatoxinas provenientes de los alimentos y el cáncer de hígado (FAO, 2011). Adicionalmente, se encontró que la expresión de las aflatoxinas relacionadas con enfermedades humanas se ve influenciada por diversos factores como: edad, sexo, estatus nutricional y exposición a agentes virales como la hepatitis o infestación por parásitos (Cornell University, 2008).

1.4.6 Toxicidad aguda.

Las micotoxinas presentan una elevada toxicidad para el hombre y animales, que puede variar desde el desarrollo de actividades carcinógenas, teratógenas o mutágenas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina (Bolet & Socarrás, 2004). Se han realizado diversos estudios con animales de laboratorio respecto a las aflatoxinas demostrando que son un potente carcinogénico extremadamente tóxico para los humanos y animales. Existe evidencia en países del tercer mundo de aflatoxicosis en humanos, este síndrome se caracteriza por vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, convulsiones, coma, muerte con edema cerebral y falla en el hígado, riñones y corazón (Cornell University, Department of Animal Science, 2008).

Según Soriano del Castillo, los síntomas de una intoxicación aguda se producen cuando se ingiere grandes cantidades de aflatoxinas, estas se absorben en el intestino delgado y llegan al hígado donde se produce una infiltración de lípidos que origina una necrosis hepática. Las enzimas oxidasas transforman a las aflatoxinas en metabolitos secundarios altamente reactivos que se unen al ADN, ARN y proteínas, generando inhibición de síntesis proteica y metabolismo de carbohidratos y lípidos. Se ha observado falta de apetito, depresión, ictericia, diarrea y fotosensibilización, siendo letal en el caso de animales en un período entre 12 y 27 días con efectos citotóxicos como la peroxidación lipídica en el hígado (daño oxidativo de los hepatocitos). Además, la aflatoxina B₁ puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales (Bolet & Socarrás, 2004).

Un caso de aflatoxicosis aguda se registró en el noroeste de la India en 1974, donde alrededor de 150 poblados se vieron afectados por un brote epidémico de hepatitis cuya tasa de mortalidad sobrepasó el 25% con 108 fallecimientos de un total de 397 personas intoxicadas. La fuente básica de su alimentación era el maíz, cuya cosecha fue afectada por una serie de lluvias fuera de temporada. En sus silos de almacenamiento precarios se detectó la presencia de aflatoxinas entre 6250 a 15600 µg. Kg⁻¹, se estimó que la ingesta

de la aflatoxina B₁ pudo ser mínimo de 55 µg. Kg⁻¹ de peso corporal durante un número incierto de días. Posteriormente en un estudio de seguimiento durante 10 años posteriores a la ingesta de aflatoxinas, no se encontraron secuelas en los sobrevivientes (Soriano del Castillo, 2007).

En el año 2004 en 2 distritos de Kenia se produjeron 125 fallecimientos de un total de 317 casos con una tasa de mortalidad del 39%. Allí se logró detectar niveles de aflatoxinas entre 20 y 8000 µg. Kg⁻¹. Mientras que en el año 1996 se observó un caso extremo de una mujer estadounidense que trabajaba en un laboratorio, quien intentó suicidarse mediante la ingestión de 35 mg de aflatoxina B₁ purificada, ingirió 12 µg. Kg⁻¹ de peso corporal por dos días y seis meses más tarde ingirió durante catorce días una dosis de 11 µg. Kg⁻¹ de peso corporal; aparte de una erupción macular transitoria, náuseas y cefaleas, no se observaron síntomas graves de intoxicación como lesiones hepáticas, por lo que se podrían considerar como “posibles niveles sin efectos observables (NOAEL)” (Soriano del Castillo, 2007).

Los efectos tóxicos depende de las dosis y duración de la ingestión y sobre todo del estado nutricional de la persona o animal, basándose en esa premisa esta supuesta resistencia a los efectos tóxicos de la aflatoxina B₁ se debería a que en individuos con una nutrición adecuada los efectos hepatotóxicos son menores (Soriano del Castillo, 2007).

1.4.7 Toxicidad crónica.

A través de la ingestión repetitiva de bajos niveles de aflatoxina se ha determinado diversos efectos crónicos en los humanos como: cáncer de hígado, hepatitis crónica, hepatomegalia y cirrosis (U.S. Food and Drug Administration , 2011).

La intoxicación crónica es la más frecuente se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas o meses. La sintomatología en animales no es específica se ha observado: reducción en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución de la producción de huevos y leche, mayor susceptibilidad a infecciones debido a los efectos inmunosupresores de las aflatoxinas en la células T y disminución

de la actividad fagocítica de los macrófagos (Cornell University, Department of Animal Science, 2008). En general las aves son más sensibles a las aflatoxinas que los mamíferos, el ganado bovino es menos susceptible ya que su rumen posee enzimas bacterianas que las degradan (Soriano del Castillo, 2007).

El comité Mixto FAO/WHO de expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) evaluó las aflatoxinas y determinó que el riesgo de intoxicación es entre moderado y bajo, pero se incrementa cuando se habla de efectos crónicos (FAO, 2011). La dosis letal media DL_{50} para varios animales se muestra en la tabla 1.2:

Tabla 1.2: Valores de DL_{50} ($mg.Kg^{-1}$) dependiendo de la especie animal. Tomado de: (Soriano del Castillo, *Micotoxinas en alimentos*, 2007).

ESPECIES	DL_{50} ($mg.Kg^{-1}$)
Conejo	0,30
Pato	0,43
Gato	0,55
Cerdo	0,60
Trucha	0,80
Perro	0,5-1
Oveja	1-2
Mandrill	2
Pollo	6,30
Rata	5,50-17,90
Macaco	7,80
Ratón	9
Hámster	10,20

Varias investigaciones llevadas a cabo en China y países de África han arrojado una alta incidencia de hepatitis B donde su dieta está constituida de alimentos contaminados por aflatoxinas, posteriormente se comprobó que las aflatoxinas y el virus de la hepatitis B actúan de forma sinérgica en el cáncer de hígado. Se encontró evidencia de que existe una relación dependiente de la

dosis entre la ingesta diaria de aflatoxina B₁ y la mutación en el codón p53 249^{ser} en los casos de carcinoma hepático (Soriano del Castillo, 2007).

Según Soriano del Castillo, los casos más importantes de aflatoxicosis se han producido en: Asia y África y algunas regiones de América del sur, aquí las condiciones son favorables para la contaminación y la exposición humana es alta. La población infantil es la más afectada ya que debido a su desarrollo corren mayor riesgo de sufrir efectos negativos. Se ha relacionado diversos signos y síntomas clínicos con la presencia de aflatoxinas en niños como: ictericia neonatal, encefalopatía, degeneración de grasa visceral, kwashiorkor (enfermedad del niño desplazado) una malnutrición proteica severa con presencia de aflatoxinas en los pulmones y cerebro.

1.4.8 Incidencia en Alimentos.

Las aflatoxinas son contaminantes naturales de diversos productos agrícolas y se ha confirmado su presencia en casi todas las zonas del mundo en alimentos de primera necesidad. La infección fúngica y la contaminación por aflatoxinas pueden ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde su: cultivo, recolección, transporte, almacenaje y procesamiento (European Mycotoxins Awareness Network, 2010). Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica incluyen al maíz, maní, nueces de Brasil, semillas de algodón, semillas de girasol, soya, aceites vegetales sin refinar, almendras, avellanas, nueces, pimentón, chile, pimienta, higos secos, pasa, café, cacao, en el resto de los cereales y derivados de los piensos. La presencia de aflatoxina B₁ se ha detectado en productos como huevos, carne, sangre, vísceras y leche (Soriano del Castillo, 2007).

Los alimentos con elevadas concentraciones de carbohidratos y ácidos grasos favorecen la producción de aflatoxinas como el coco y maní. Los alimentos ricos en proteínas y bajos en carbohidratos no incrementan la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* sin embargo *A. flavus* puede llegar a producir grandes cantidades de toxinas con pocos carbohidratos (Guzmán de Peña, 2010). La incidencia de aflatoxinas en maíz se resume en la tabla 1.3.

Tabla 1.3: Incidencia de las aflatoxinas en maíz. Adaptado de: (Soriano del Castillo,2007).

ALIMENTO	PAÍS	INCIDENCIA (%)	AFLATOXINA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)
Maíz	EE UU	90	B/G	10-700
	México	89	B/G	2,5-30
	Bangladesh	67	B1	33
	Costa Rica	80	B1	>20
	India	26	B1	>30
	Uganda	29	B1	1-100
	Brasil	38,3	B1	0,2-129
	China	76	B1	>20
	Corea	12	B1	26
	Nigeria	25	B1	19
	Nigeria	45	B1	25-770

1.4.9 Ingesta Diaria.

La seguridad de consumir productos libres de micotoxinas nunca podrá ser alcanzada, sin embargo muchos países han intentado limitar su exposición principalmente hacia las aflatoxinas mediante la imposición de límites regulatorios a los commodities para alimentos y cultivos (U.S. Food and Drug Administration, 2011). Cerca de 100 países alrededor del mundo poseen regulaciones y controles, el Ecuador no es uno de ellos.

Las aflatoxinas son consideradas contaminantes inevitables de los alimentos aunque se apliquen buenas prácticas agrícolas y manufactura. La Unión Europea mantiene que para este tipo de sustancias no existe ningún umbral por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos por lo tanto no considera fija una dosis diaria tolerable y ha decidido fijar los límites legales más bajos posibles (Soriano del Castillo, 2007). La FDA ha establecido parámetros específicos aceptables de los niveles de aflatoxinas tanto para comida de animales como de

seres humanos. Los límites actualmente permitidos se observan en la tabla 1.4. La Unión Europea tiene parámetros más estrictos descritos en la tabla 1.5.

Tabla 1.4: Niveles permisibles de aflatoxinas en USA. Adaptado de: (U.S. Food and Drug Administration , 2011).

AFLATOXINAS	
COMMODITY	LÍMITE PERMISIBLE ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)
ALIMENTO PARA SERES HUMANOS	
Maíz, Nueces, Pistachos, etc...	20
Leche (Aflatoxina M1)	0.5
ALIMENTO PARA ANIMALES	
Maíz y maní (Ganado)	300
Semillas de algodón (Ganado, Aves)	300
Maíz y maní (Industria Porcina)	200
Maíz, maní (Animales inmaduros)	100
Maíz, maní (Para otros animales, de uso no alimenticio)	20
Nueces de Brasil	20

Tabla 1.5: Niveles permisibles de aflatoxinas en la Unión Europea. Adaptado de: (FAO, 2011).

AFLATOXINAS	
COMMODITY	LÍMITE PERMISIBLE ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)
ALIMENTO PARA SERES HUMANOS	
Nueces, frutas secas, maíz, especias	2-8
Leche	0.5
Comida para infantes	0.025

El impacto económico de las aflatoxinas genera pérdidas en cultivos y animales. La organización de alimentos y agricultura FAO estima que cerca del 25% de los cultivos del mundo son afectados por micotoxinas, especialmente aflatoxinas, es por esta razón se buscan nuevas plantas resistentes y una mejor política de manufactura alimentaria.

1.4.10 Identificación de los hongos.

Los caracteres morfológicos son los más utilizados para la identificación por ser un método rápido y económico que junto a la información molecular sirven para la clasificación de estos microorganismos (Arango Acosta, 2010). Las características como el tipo de esporas y estructuras que los originan, presencia o ausencia de reproducción sexual, pruebas bioquímicas, perfil de metabolitos secundarios y PCR (Polymerase Chain Reaction), son la base de este proceso.

1.4.10.1 Características diferenciales del género *Aspergillus*.

Las especies del género *Aspergillus* son en su mayoría ubicuas, presentes en diversos sustratos y con mayor frecuencia en climas cálidos. Son de importancia industrial por ser agentes de biodeterioro y producción de micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007). Las colonias presentan diversas tonalidades como: blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas (Carrillo, 2003).



Ilustración 1.2: Colonias típicas del género *Aspergillus*.

Tomado de: (Soriano del Castillo, 2007).

Existen medios de cultivo que permiten ensayar la capacidad potencial de una cepa para producir micotoxinas en laboratorio como: APA (Aflatoxin Producing Ability) y CAM (Coconut Agar Medium), sin embargo su sensibilidad no es muy elevada. Las diversas técnicas cromatográficas como la TLC (Thin Layer chromatography) y cromatografía líquida entre otras presentan mayor sensibilidad. Técnicas inmunológicas como ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) no son muy sensibles debido a la falta de especificidad entre los antígenos y anticuerpos. Otros análisis son: PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriccion Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RT-PCR (Real time-PCR) y secuenciación. (Soriano del Castillo, 2007).

1.4.11 Descontaminación/Detoxificación.

1.4.11.1 Métodos físicos.

Según Soriano del Castillo, los elementos de descontaminación son:

- Extracción con disolventes: utilizando mezclas de etanol, acetona, isopropanol, hexano, acetonitrilo, sin embargo esto genera un altísimo costo y problemas con la toxicidad del extracto.
- Uso de adsorbentes: reducen la biodisponibilidad de las aflatoxinas estos son: aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados (HSCAS) cuya afinidad por la aflatoxina B₁ ha permitido una eliminación del 80%.
- Inactivación con calor: el rango efectivo de temperatura para la descomposición de la aflatoxinas es entre 237-306°C, sin embargo se debe tomar en cuenta la humedad y pH del alimento para incrementar la descontaminación del alimento.
- Irradiación: con rayos X, γ , UV, ondas radios, microondas, infrarrojas y luz visible.

1.4.11.2 Métodos Químicos.

La amoniación a los piensos es un proceso eficaz en más del 99%, se lo utiliza principalmente en maíz y harinas este procedimiento incluye la acción del amoníaco con alta presión y temperatura o presión atmosférica y temperatura ambiente para semillas enteras. Existen otros procedimientos químicos como: monometilamina o urea, cloruro de sodio-temperatura o bisulfito de sodio-temperatura, ozonización, ácido propiónico. Sin embargo en el tratamiento del maíz se produce una decoloración y los residuos de amoníaco dejan olores en el cereal (Soriano del Castillo, 2007).

1.4.11.3 Métodos Biológicos.

Los microorganismos también se han utilizado para la descontaminación como: *Flavobacterium aurantiacum* B-184 que degrada de forma irreversible las micotoxinas con un gran porcentaje de eficacia, pero los alimentos adquieren un color anaranjado por efecto de la fermentación (Soriano del Castillo, 2007).

1.5 Sistema de hipótesis:

Hipótesis Principal: Existe contaminación por Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en harina de maíz en el sector de Tumbaco, que superan los límites de las normativas internacionales de la Unión Europea.

Según las regulaciones de la Unión Europea el límite permisible de aflatoxinas en maíz es de 2-8 µg. Kg⁻¹ mientras que los parámetros máximos para los Estados Unidos es de 20 µg. Kg⁻¹, y bajo la premisa de que el crecimiento de los hongos se ve favorecido por un sustrato adecuado junto a diversos factores ambientales estimulan la producción de aflatoxinas, esta investigación espera que exista contaminación por aflatoxinas en harina de maíz que supere las normativas más estrictas es decir las de la Unión Europea ya que son sustancias cancerígenas B₁ o potencialmente cancerígenas B₂, G₁ y G₂ y su límite debe ser considerado bajo el principio ALARA (As low As Reasonably Achievable).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Participantes.

La implementación de un laboratorio de micotoxinas es un requerimiento de la entidad pública AGROCALIDAD (Agencia Ecuatoriana del Aseguramiento de la Calidad del Agro) inicialmente se requiere la elaboración de los protocolos de extracción, purificación y análisis para aflatoxinas y deoxinivalenol, es por esto que bajo la dirección del Q.F. Juan Carlos Gualotuña, analista del área Inocuidad Alimentaria y el apoyo de la Dra. Olga Pazmiño, directora del área de plaguicidas se desarrolló el proyecto “Determinación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz del sector Tumbaco mediante el uso columnas de inmunoafinidad (IAC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)”.

2.2 Localización Geográfica.

El proyecto se desarrollará en dos etapas:

Trabajo de campo (Muestreo: 50 muestras): Se realizó en el valle de Tumbaco cuya extensión es de 64.000 hectáreas, en la parroquia con el mayor número de habitantes: Tumbaco, ubicada al nororiente del cantón Quito, provincia de Pichincha.

Trabajo de laboratorio (Ensayos): Se efectuaron en los laboratorios de AGROCALIDAD, en el área de Inocuidad alimentaria, ubicado en el Valle de Tumbaco, parroquia Tumbaco (Vía Interoceánica Km 14 ½ - La Granja) al nororiente del cantón Quito, provincia de Pichincha.

2.3 Periodo de Tiempo de investigación.

Fecha de inicio: 1 de Marzo del 2011.

Fecha de Finalización: 14 de Diciembre del 2011.

2.4 Procedimientos y Equipos.

2.4.1 Protocolo de Muestreo.

Adaptado de: Procedimiento PEM /LAB-M/01: procedimiento específico de muestreo para muestras de alimento para control de micotoxinas (Solá, 2010).

El muestreo juega un rol crucial en la determinación de niveles de micotoxinas, ya que éstas se encuentran generalmente distribuidas muy heterogéneamente en granos y otros alimentos que conforman un lote. Las muestras para chequeo oficial, deben ser tomadas de modo tal que sean representativas del lote en cuestión.

El muestreo se realizó en diversos locales minoristas del sector de Tumbaco dividido en tres grupos: Grupo Supermercados (GS), Grupo Minoristas (GM) y Grupo Mercados (GE) de los que se tomaron 11, 32 y 7 muestras respectivamente (Ver anexo 1). El muestreo fue aleatorio para garantizar que cada uno de los elementos de la población tenga la misma oportunidad de ser incluidos. Se recolectaron 50 muestras de 1 kg de harina de maíz para que el estudio sea estadísticamente significativo y se analizaron por duplicado, con un total de 100 ensayos experimentales.

Comercialización al por menor: Los alimentos commodities o productos, pueden ser comercializados a granel, en contenedores, o envases individuales como sacos, bolsas, envases de venta al por menor. El procedimiento de muestreo se aplicó a todas las formas diferentes en las que se comercializan. Sin perjuicio de la provisión específica, se pudo usar la siguiente fórmula¹ como guía.

$$n = \frac{\text{Peso (Kg) del lote} \times \text{Peso(Kg) de la muestra incremental}}{\text{Peso(Kg) de la muestra agregada} \times \text{Peso(Kg) del envase}}$$

Donde:

- **n:** frecuencia de muestreo es el número de envases individuales de los que se toma una muestra incremental.

¹ (Solá, 2010)

- **Muestra incremental:** una cantidad de material tomada de un solo punto del lote o sublote. El peso debe ser de aproximadamente de 100 g (a 300 g), a menos que se defina otra cosa. En el caso de lotes en envases de venta al por menor, el peso de la muestra incremental dependerá del peso del envase de venta por menor. El número de muestras incrementales que deben tomarse dependerá del peso del lote, con un mínimo de 3 y máximo de 100. Ver tabla 2.1.
- **Muestra agregada:** la combinación total de todas las muestras incrementales tomadas del lote o sublote.
- **Lote:** una cantidad identificable del alimento commodity tomada a un tiempo y determinada por el oficial o persona encargada del muestreo, de tener características comunes como origen, variedad, tipo de envasado, consignatario o marca.

Tabla 2.1: Subdivisión de lotes en sublotes dependiendo del producto y peso del lote. Tomado de: (Solá, 2010).

Comodity	Peso del lote (tons)	Peso o número de sublotes	Número de Muestras incrementales	Peso de la muestra agregada (Kg)
Cereales y productos de cereales	≥ 1500	500 ton	100	10
	> 300 y < 1500	3 sublotes	100	10
	≥ 50 y ≤ 300	100 ton	100	10
	< 50	-----	3-100	1-10

Procedimiento de muestreo para cereales y productos de cereales para lotes de <50 tons: El plan de muestreo debió estar conformado entre 10 y 100 muestras incrementales, dependiendo del peso del lote, resultando en una muestra

agregada de 1 a 10 Kg. Para lotes muy pequeños ($\leq 0,5$ tons) las muestras fueron de al menos 1 Kg (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Número de muestras incrementales a tomar dependiendo del peso del lote de cereales y productos de cereales. Tomado de: (Solá, 2010).

	Número de muestras incrementales
≤ 0.05	3
$> 0.05 \leq 0.5$	5
$> 0.5 \leq 1$	10
$> 1 \leq 3$	20
$> 3 \leq 10$	40
$> 10 \leq 20$	60
$> 20 \leq 50$	100

El tamaño de la muestra al por menor fue de 1Kg, la que se colocó en un contenedor inerte y limpio con adecuada protección contra contaminación y daños en el manejo, para evitar cualquier cambio en la composición. Debido a que se trató de harina, la muestra ya estuvo homogenizada y no fue necesario triturarla. Se colocó una identificación a cada una:

- AFM-01 a AFM-32: Aflatoxinas Minoristas.
- AFS-01 a AFM-11: Aflatoxinas Supermercados.
- AFE-01 a AFE-07: Aflatoxinas Mercados.

Se registró la fecha y lugar de muestreo junto con cualquier información adicional que pueda ser de utilidad como fecha de expiración o elaboración. Las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura estables para evitar el crecimiento de hongos y envasadas en bolsas de papel para evitar la condensación de agua.

2.4.2 Protocolo de Curva de Calibración.

Adaptado de: Preparation of Standards for Aflatoxins AOAC Official Method 970.44 , Aflatoxin B1, and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder AOAC Official Methods 999.07 y Standars of Aflatoxins AOAC Official Method 971.22 (AOAC INTERNATIONAL, 2011).

A. Equipos.

- a. Espectrofotómetro: con capacidad de medir longitudes de onda entre 200 a 400 nm y celdas de cuarzo de 1cm.
- b. Microbalanza analítica.
- c. Vortex.

B. Reactivos.

- a. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) $\approx 0,009 M$ (Se disolvió 1 mL de ácido en 2 L de agua).
- b. Soluciones Estándar de Dicromato de potasio - Patrón primario ($K_2Cr_2O_7$).
 - i. Solución 1 $\approx 0,25 mM$: Se pesó 78 mg dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y se diluyó en 1 L de solución de ácido sulfúrico 0,009 M.
 - ii. Solución 2 $\approx 0,125 mM$: Se diluyó 25 mL de la solución 0,25 mM de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en 50 mL de la solución de ácido sulfúrico 0,009 M en un balón aforado.
 - iii. Solución 3 $\approx 0,0625 mM$: Se diluyó 25 mL de la solución 0,125 mM de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en 50 de la solución de ácido sulfúrico 0,009 M en un balón aforado.
- c. Estándares de aflatoxinas en polvo (Aldrich Chemical Co.).
- d. Tolueno-Acetonitrilo (9:1); 500 mL.

C. Preparación de soluciones madre.

En cada frasco de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ de 1mg se añadió un volumen de 2 mL de tolueno-acetonitrilo (9:1) y se agitó en el vortex por

15 min, se almacenó por 24h a -20°C. Siendo esta la concentración madre de: 0,5 mg/mL, se realizaron las soluciones de trabajo en frascos ámbar de 5 mL individuales para cada aflatoxina que contienen: 1000 B₁, 200 B₂, 1000 G₁ y 200 ng G₂ respectivamente.

D. Determinación de la concentración de aflatoxinas.

Se realizó una curva de calibración con las tres soluciones de dicromato de potasio y se midió su absorbancia en el máximo de absorción cercano a 350 nm. Se utilizó como blanco una solución de ácido sulfúrico de 0,009 M. Posteriormente se calculó la absorptividad molar (ϵ_{350}) para cada concentración, mediante la siguiente fórmula²:

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c} \cdot 1000$$

Donde:

ϵ_{350} : absorptividad molar a la longitud de onda de 350 nm de cada concentración, en: L.cm⁻¹.mol⁻¹.

A: la absorbancia medida.

b: el camino óptico (1 cm).

c: la concentración de la solución correspondiente, en mM. L⁻¹

Se halló el promedio de las tres absorptividades (ϵ_{350}), debido a que los valores individuales no difieren en más del 2 % relativo del valor promedio, en caso contrario se debería repetir la determinación. Se determinó el factor de corrección (FC) mediante la fórmula:

$$FC = \frac{3160}{\epsilon_{350}}$$

Donde:

FC: factor de corrección.

3160: valor para ϵ de las soluciones de dicromato de potasio.

ϵ_{350} : absorptividad molar promedio en L.cm⁻¹.mol⁻¹.

² (AOAC INTERNATIONAL, 2011)

El factor de corrección “FC” debió dar un valor entre 0,95 y 1,05 que indicó que el espectrofotómetro estuvo calibrado y por ende en condiciones de realizar la cuantificación de estándares.

Se determinó el espectro de absorción ultravioleta de las soluciones de cada aflatoxina entre 330 y 370 nm utilizando como blanco una mezcla de tolueno: acetonitrilo (9:1). Se midió la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción cercana a los 350 nm y luego se calculó la concentración mediante la fórmula:

$$Af = \frac{A.M.1000.FC}{\epsilon}$$

Donde:

Af: concentración de aflatoxina en la solución de referencia, en $\mu\text{g.mL}^{-1}$

FC: factor de corrección del espectrofotómetro, determinado previamente.

M: masa molecular relativa de la aflatoxina (ver tabla 2.3).

ϵ : absorptividad molar promedio de la aflatoxina en el solvente, en $\text{L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ (ver tabla 2.3).

A: absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción.

Tabla 2.3: Valores correspondientes a M (masa molecular relativa de la aflatoxina) y (absortividad molar promedio) en solución de tolueno: acetonitrilo.

Aflatoxina	Masa Molecular Relativa	ϵ Tolueno-Acetonitrilo (9:1) $\text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
B1	312	19300
B2	314	21000
G1	328	16400
G2	330	18300

Para cada toxina, se registraron los cálculos y valores obtenidos de concentración de cada estándar para mantener la linealidad de la concentración a través del tiempo.

E. Soluciones Estándar de Aflatoxinas (curva de calibración).

Después de determinar la concentración real de las soluciones madre que contienen: 1000 B₁, 200 B₂, 1000 G₁ y 200 ng G₂ respectivamente. Se preparó el master mix pipeteando exactamente 2 mL de cada aflatoxina en un balón volumétrico de 20 mL y se diluyó con tolueno: acetonitrilo (9:1) hasta la marca de envase. Se mezcló vigorosamente.

En base a esta solución “master mix” se pipetearon los volúmenes listados en la tabla 2.4 en un set de matraces volumétricos de 10 mL. Posteriormente se evaporó la solución de tolueno: acetonitrilo (9:1) bajo corriente de nitrógeno o Rotavapor. A cada balón se añadió 4 mL de metanol grado HPLC y se diluyó con agua tipo 2. Estas soluciones se debieron preparar cada vez que se realice una curva de calibración.

Tabla 2.4: Preparación de soluciones Estándares de trabajo. Tomado de: Official Method 999.07 (AOAC INTERNATIONAL, 2011).

Solución Estándar	Alícuota a tomar de la solución master mix, μL	Masa final en la concentración del estándar para curva de calibración, ng.mL^{-1}			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	40	0,400	0,080	0,400	0,080
2	120	1,200	0,240	1,200	0,240
3	200	2,000	0,400	2,000	0,400
4	280	2,800	0,560	2,800	0,560
5	360	3,600	0,720	3,600	0,720

2.4.3 Protocolo de Extracción, Purificación y Cuantificación.

Adaptado de: AFLAPREP aplicación de columnas de inmutofinidad para la preparación de muestras previo al análisis de aflatoxinas por HPLC (R-BIOPHARM

RHÔNE LTD, 2011) y Procedimiento específico de ensayo para determinación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en maíz y harinas de maíz (Solá, 2010).

A. Equipos.

- a. Licuadora con jarra de 1L de capacidad (Apta para solventes).
- b. Balanza analítica.
- c. Manifold.
- d. Equipo HPLC.
- e. Sistema de derivatización post columna con generador electroquímico de bromo (Kobracell).

B. Reactivos.

- a. Buffer fosfato (PBS) pH: 7,4. Se disolvió 0,20 g de cloruro de potasio (KCl), 0,20 g de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), 1,16 g de fosfato ácido de sodio anhidro (NaHPO₄) y 8g de cloruro de sodio (NaCl) en 900 mL de agua. Se ajustó hasta llegar al pH 7,4 con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M: se aforó a 1 L.
- b. Cloruro de sodio (NaCl).
- c. Metanol grado reactivo (CH₃OH).
- d. Agua grado HPLC.
- e. Ácido Nítrico (HNO₃) Solución 4 M.
- f. Bromuro de Potasio (KBr).
- g. Metanol grado HPLC (CH₃OH).
- h. Acetonitrilo grado HPLC (CH₃CN).

C. Método de Extracción.

Se colocó en el recipiente (1L de capacidad y resistente a solventes) para licuar: 50 g de muestra homogenizada junto a 4 g de cloruro de sodio (NaCl). Se agregó 250 mL de solvente de extracción metanol: agua (60:40) en el recipiente, y se licuó por 5 min a alta velocidad. Posteriormente se filtró aproximadamente 25-50 mL de extracto de muestra por papel filtro Whatman No.4 ó equivalente y se tomó 10 mL del filtrado con una jeringa.

D. Método de Purificación.

a. Preparación de las columnas de Inmunoadfinidad (IAC).

Las columnas de inmunoadfinidad deben estar a temperatura ambiente antes de su uso. Se retiró la tapa de la parte superior de la columna y se ajustó firmemente la columna al cuerpo de la jeringa 10 mL y se colocó en un soporte apropiado con el tapón inferior en su lugar.

b. Captura de las Aflatoxinas.

i. Se colocó las columnas de Inmunoadfinidad junto con el cuerpo de la jeringa de 10 mL en el Manifold encendido y se pasó un volumen de muestra a un flujo de 2-3mL/min.

ii. Lavado: Se colocó 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) al cuerpo de la jeringa y a través de la columna de inmunoadfinidad a 5 mL/min. Se repitió el procedimiento de lavado, eliminando todo el PBS residual.

iii. Elusión: Se colocó un vial color ámbar directamente debajo de la columna. Se pipeteó 1 mL de metanol grado HPLC en el cuerpo de la columna a un flujo de 1 gota/s y con flujo reverso con el eluyente 10 veces para que exista una completa desnaturalización del anticuerpo monoclonal y la subsiguiente liberación de las aflatoxinas a la solución. Luego de la elusión, se pipeteó 1 mL de agua destilada en el cuerpo de la columna y se colectó en el vial ámbar.

E. Método de Cuantificación.

a. Se inyectó 100 uL de cada muestra en el equipo HPLC con las condiciones de la tabla 2.5, se cuantificó la concentración de las aflatoxinas comparando las áreas de los picos con la curva de calibración de estándares en el software del equipo EMPOWER.

Tabla 2.5: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el HPLC.

CONDICIONES UTILIZADAS DEL HPLC	
Kobra Cell	Seteo a 200 Ma
Columna Analítica	Waters 4,6 × 25 cm, 5 μm ODS-2
Pre Columna	Pre Columna Waters ODS-2
Fase móvil	60:20:20 v/v/v agua: metanol: acetonitrilo +119 mg de bromuro de potasio + 350 μl de ácido nítrico 4M
Velocidad. de flujo	1.0 mL/min
Detector de Fluorescencia:	Excitación: 360 nm Emisión: 420 nm
Horno:	30°C
Volumen de Inyección	100 μL

- b. Cálculos: Se identificó los picos en el cromatograma por comparación de los tiempos de retención con los correspondientes estándares de referencia y se extrapola la cantidad de aflatoxina de la curva de calibración que corresponda al área del pico de la muestra.

Para calcular la concentración de cada aflatoxina en la muestra se aplicó la siguiente relación: Dato puntual [(concentración de aflatoxina (ug/mL; eje y) contra área del pico (unidades, eje x)] de los experimentos de calibración en una tabla, usando regresión lineal de la curva de calibración. Se utilizó la función resultante ($y = ax + b$) para calcular la concentración de aflatoxina en la solución medida. La calibración lineal, describe la correlación entre la señal detectada (x) y una función de x [$y = f(x)$]. La constante a es el valor correspondiente a la pendiente de la función lineal, mientras b es el valor donde la función intercepta el eje x. Este cálculo fue realizado por el software del cromatógrafo EMPOWER.

Finalmente, para determinar la concentración de aflatoxinas en la muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$Cont (ng/g) = \frac{C_{smp} (ng \cdot mL^{-1}) \times solvente(mL) \times elución(mL)}{Wt(g) \times alícuota (mL)}$$

Donde:

Wt (g): porción de muestra tomada para el análisis (50g).

Solvente (mL): solvente para la extracción (250 mL).

Alícuota (mL): alícuota tomada para la IAC (10 mL).

Elución (mL): volumen final colectado al eluir la IAC (2 mL).

C_{smp} (ng/mL): concentración de aflatoxina calculada por regresión lineal.

Cont (ng/g \approx μ g. Kg⁻¹): contaminación de la muestra con aflatoxina.

Signal smp (units): área del pico de aflatoxina obtenido para la solución medida.

2.4.4 Protocolo de Descontaminación.

A. Reactivos.

- a. Hipoclorito de sodio (NaOCl) aprox. 5% (p/p).
- b. Ácido Sulfúrico (H₂SO₄). Solución 2 M.

B. Proceso de Descontaminación.

El material de vidrio utilizado en la extracción y purificación de aflatoxinas fue sumergido durante 24 h en una solución de hipoclorito de sodio 5% (NaOCl). Al siguiente día, se enjuagó el material y se añadió una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 M por 24 h. Finalmente se lavó con agua destilada. El material desechable se descartó en fundas rojas etiquetado como material peligroso y los desechos líquidos se descartaron en envases apropiados para solventes.

2.4.5 Estándares de aflatoxinas.

Los estándares de aflatoxinas Aflatoxin Kit fueron de marca Sigma-Aldrich, y contuvieron 1mg sólido de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y se mantuvieron almacenadas en congelación. Su clasificación y etiquetado de acuerdo con las directivas de la Unión Europea fueron:

- a. Indicación de peligro: muy tóxico.
- b. Frases r: 45-46-26/27/28.
Puede causar cáncer. Puede provocar alteraciones genéticas hereditarias. Muy tóxico en caso de inhalación, contacto con la piel o ingestión.
- c. Frases s: 53-45.
Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes del uso. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (Sigma-Aldrich, 2011).

2.4.6 Manifold.

Bomba peristáltica multicabezal de Agilent Technologies denominado: Agilent SampliQ12 and 20-Position SPE Manifold. Permite una típica extracción en fase sólida SPE (acondicionar, cargar, lavar y eluir el analito de interés) hasta en 20 cartuchos en paralelo. Está constituido por vidrio, polietileno, polipropileno y componentes Delrin, contiene un manómetro que permite revisar el nivel de presión dentro de la cámara junto con válvulas que permiten controlar individualmente el flujo de cada posición (Agilent Technologies, 2010).



Ilustración 2.1: Manifold.

2.4.7 Rotavapor.

Evaporador rotativo de laboratorio para matraces de evaporación de hasta 1L marca BUCHI modelo R-210. Posee un baño calefactor inalámbrico para agua con indicador digital para un intervalo de calentamiento de 20 a 180 °C y una librería con los diversos puntos de ebullición de los solventes orgánicos a diferentes presiones (BUCHI, 2011).



Ilustración 2.2: Rotavapor BUCHI.

2.4.8 Columnas de Inmunoadfinidad.

AflaStar R- Inmunoadfinidad Columns de Romer Labs están diseñadas para una rápida y fácil purificación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ de extractos de alimentos. Contiene anticuerpos monoclonales para las aflatoxinas que se unen de forma covalente a las partículas de gel. Las columnas de Inmunoadfinidad atrapan a las aflatoxinas y separan a otras sustancias del extracto, posteriormente se aíslan las aflatoxinas eluyéndolas con metanol (Romer Labs, 2011).

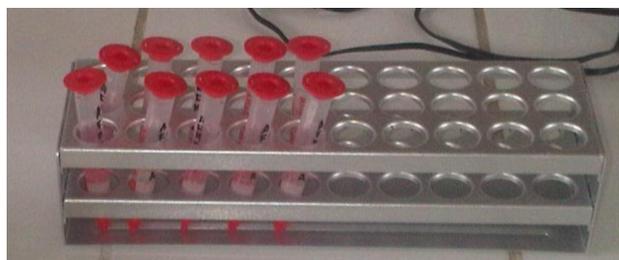


Ilustración 2.3: Columnas de Inmunoadfinidad AflaStar.

2.4.9 HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).

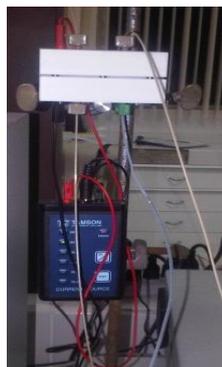
El equipo The Alliance[®] e2695 HPLC System de Waters posee un sistema de manejo integrado de solventes y muestras que permiten un alta reproducibilidad en su performance, está completamente integrado con el software para control instrumental y procesamiento de datos Empower, posee detectores UV/Vis y de fluorescencia. El detector de fluorescencia 2475 Multi-Wavelength Fluorescence Detector es multicanal de alta sensibilidad y selectividad incluso monitoreando concentraciones muy bajas. Opera entre 200 a 900 nm con diversos modos de detección en 2D, 3D que permite un barrido espectral eficiente. (WATERS, 2011).



Ilustración 2.4: HPLC y detector de fluorescencia.

2.4.10 Kobra Cell (Derivatizador post-columna).

Kobra Cell es una celda para la derivatización electroquímica de aflatoxinas B₁ y G₁ incrementando su fluorescencia natural y facilitando su detección. La reacción de derivatización ocurre rápidamente 4 s a temperatura ambiente y no utiliza agentes derivatizantes.



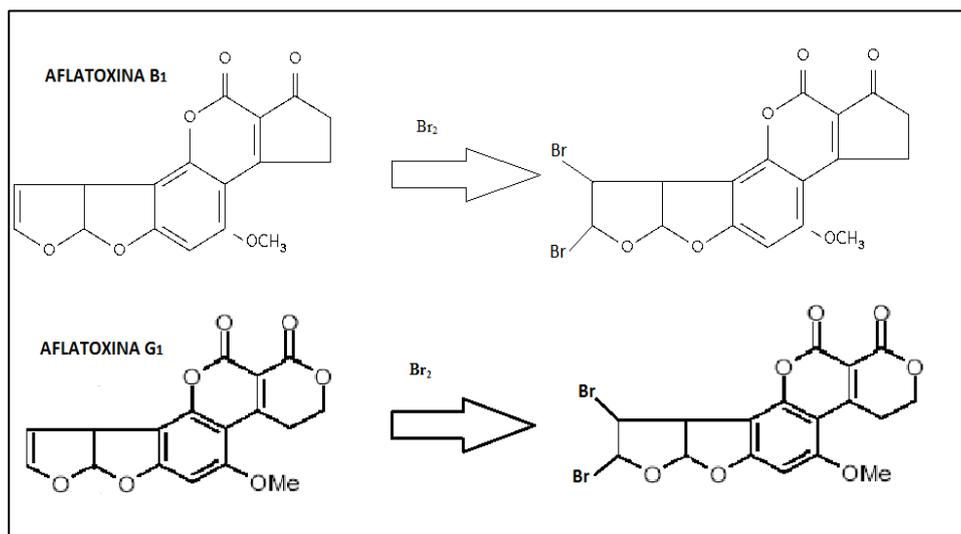


Ilustración 2.5: Kobra Cell y Derivatización de las aflatoxinas B₁ y G₁.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS.

El muestreo de harina de maíz en el sector de sector de Tumbaco se dividió en tres grupos: Supermercados, Minoristas y Mercados de los que se tomaron 11, 32 y 7 muestras respectivamente. Su fundamento teórico experimental se encuentra en el anexo 2, 3 y 4.

Grupo supermercados.

Tabla 3.1: Resultados de la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en 11 muestras provenientes de supermercados.

CÓDIGO	[B ₁] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[B ₂] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[G ₁] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[G ₂] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)
AFS-01	0,18	0,02	0	0
AFS-02	0	0	0	0
AFS-03	0	0	0	0
AFS-04	0,97	0,08	0	0
AFS-05	0,44	0,04	0	0
AFS-06	3,48	0,13	0,44	0,06
AFS-07	0	0	0	0
AFS-08	0	0	0	0
AFS-09	0,5	0	0	0
AFS-10	1,88	0,19	0	0
AFS-11	0	0	0	0

Los estadísticos generales de las 11 muestras tomadas en 2 supermercados pertenecientes al valle de Tumbaco, revelaron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz fue: 0,68; 0,04; 0,04; 0,01 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ respectivamente. Al contrastarlas con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de 20 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ se estableció que no existe contaminación superior a los límites permisibles.

En los histogramas de los gráficos 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 para la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se observa un sesgo a la derecha o asimetría positiva que difiere con una distribución normal. En el caso de las aflatoxinas B₁, B₂ se ajustaron a una distribución exponencial con un valor p igual a 15,04 y 12,33 %, sin embargo

G_1 y G_2 no se ajustaron a esta tendencia debido a que existieron numerosas muestras cuyo nivel de contaminación fue nulo.

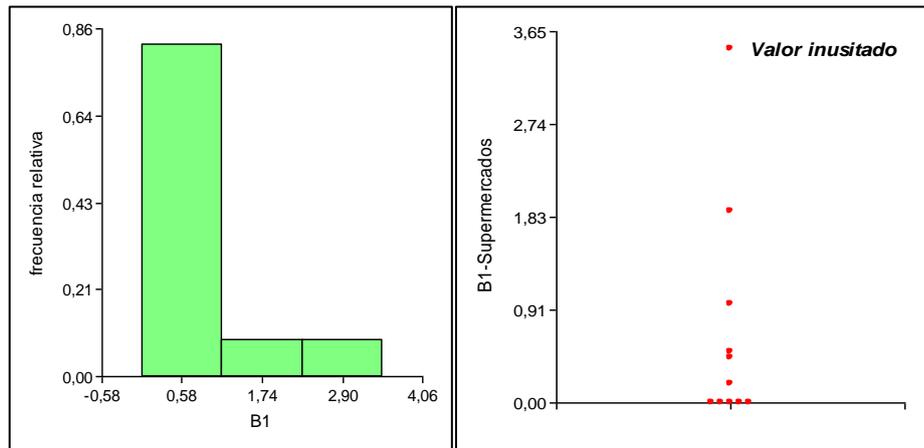


Gráfico 3.1: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B_1 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

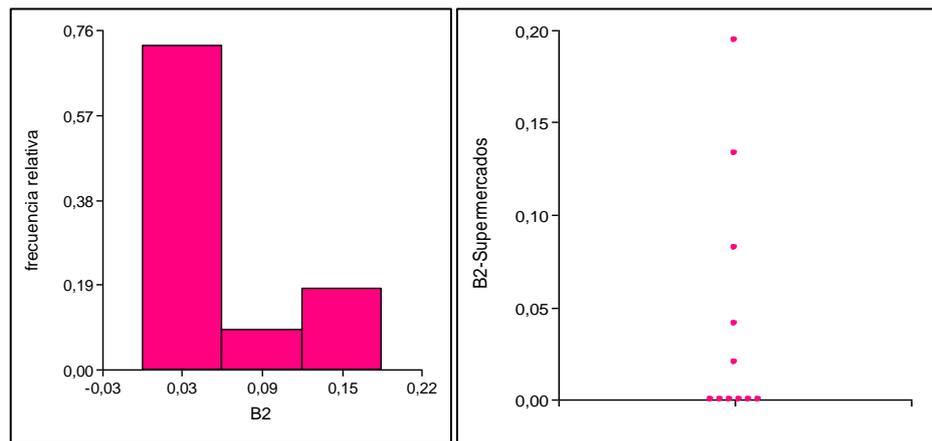


Gráfico 3.2: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B_2 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

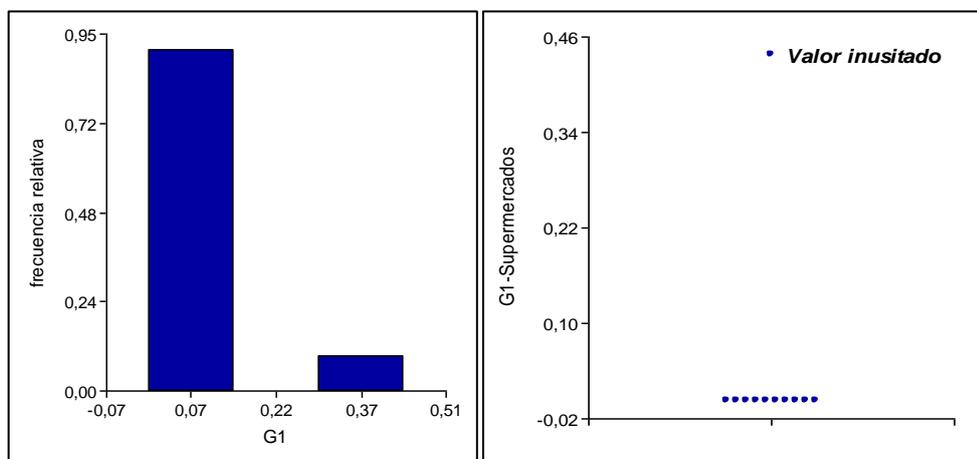


Gráfico 3.3: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₁ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

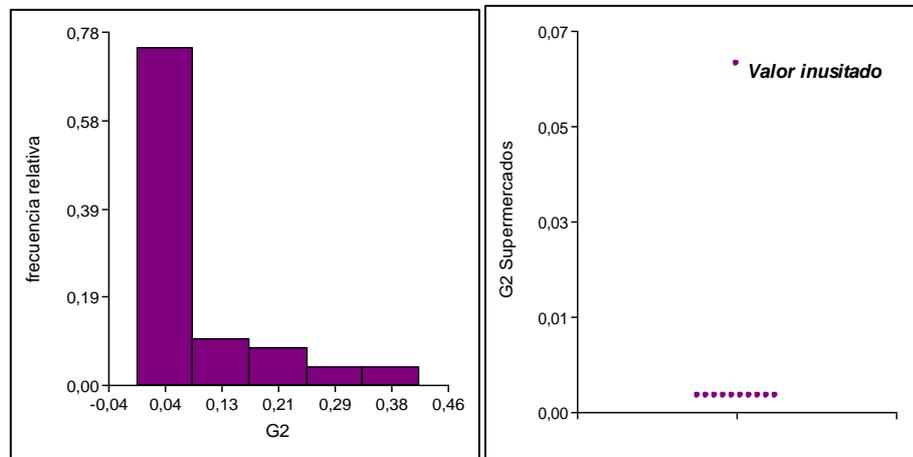


Gráfico 3.4: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

Se observa en los histogramas que existió contaminación por aflatoxinas B₁, B₂ y G₂ decreciente en frecuencia en todos los intervalos de clase analizados con excepción de G₁ que no presenta datos de contaminación en el intervalo de clase correspondiente a $0,03 \mu\text{g. Kg}^{-1}$.

En los diagramas de puntos de los gráficos 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se determinó que los datos son dispersos y existen valores inusitados, para las concentraciones de aflatoxinas B₁, G₁ y G₂ correspondientes a 3,48; 0,44 y $0,06 \mu\text{g. Kg}^{-1}$. Al calcular los diversos estadísticos generales sin estos valores inusitados se encontró que la concentración media de B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz correspondieron a 0,361; 0,042; 0,040; $0,005 \mu\text{g. Kg}^{-1}$ inferiores a las normativas de control internacional.

Grupo minoristas.

Tabla 3.2: Resultados de la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en 32 muestras provenientes de Minoristas.

CÓDIGO	[B ₁] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[B ₂] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[G ₁] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[G ₂] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)
AFM-01	20,81	1,06	2,38	0,19
AFM-02	0,40	0,05	0	0,02
AFM-03	0,19	0	0	0
AFM-04	0,74	0,04	0	0,02
AFM-05	4,16	0,51	0	0,08
AFM-06	0	0	0	0
AFM-07	0	0	0	0
AFM-08	1,93	0,06	0	0,04
AFM-09	28,10	1,32	2,32	0
AFM-10	27,89	0,78	1,22	0,32
AFM-11	22,98	0,64	0	0,42
AFM-12	8,85	0,26	0	0,07
AFM-13	9,87	0,29	0	0
AFM-14	38,61	1,22	0	0,17
AFM-15	3,28	0,15	0	0,06
AFM-16	17,72	0,75	0	0,21
AFM-17	7,59	0,22	0	0,12
AFM-18	0	0	0	0
AFM-19	18,99	0,62	0	0,17
AFM-20	62,04	1,02	4,08	0
AFM-21	1,01	0,05	0	0,02
AFM-22	3,35	0,16	0	0,05
AFM-23	2,34	0,09	1,02	0,03
AFM-24	10,96	0,65	1,39	0,17
AFM-25	4,27	0,42	0,33	0,09
AFM-26	1,79	0,17	0	0,05
AFM-27	2,44	0,14	0	0
AFM-28	3,82	0,28	0	0
AFM-29	0,61	0,03	0	0
AFM-30	12,64	0,53	0,81	0,07
AFM-31	13,13	0,39	0,55	0,12
AFM-32	15,48	0,51	0	0,34

Los estadísticos generales de las 32 muestras del grupo minoristas definieron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz fue de 10,81; 0,39; 0,44 y 0,09 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ respectivamente. Al verificarlos con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ o los parámetros

máximos para los Estados Unidos de $20 \mu\text{g. Kg}^{-1}$ se encontró que únicamente la concentración media de B_1 $10,81 \mu\text{g. Kg}^{-1}$ superó la normativa europea mientras que las demás B_2 , G_1 y G_2 no presentaron contaminación superior a los límites permisibles.

En los gráficos 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 para la concentración de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 se observó una asimetría positiva en los histogramas que no cumplen con la ley de normalidad. En el caso de B_1 , B_2 , G_1 , G_2 se ajustaron a una distribución exponencial con un valor p igual a 66,21, 49,82, 6,46 y 15,73 %. Existió contaminación por B_1 , B_2 y G_2 decreciente en frecuencia en todos los intervalos de clase analizados excluyendo AFG_1 que no presentó datos de contaminación en el intervalo de clase asignado a $2,86 \mu\text{g. Kg}^{-1}$.

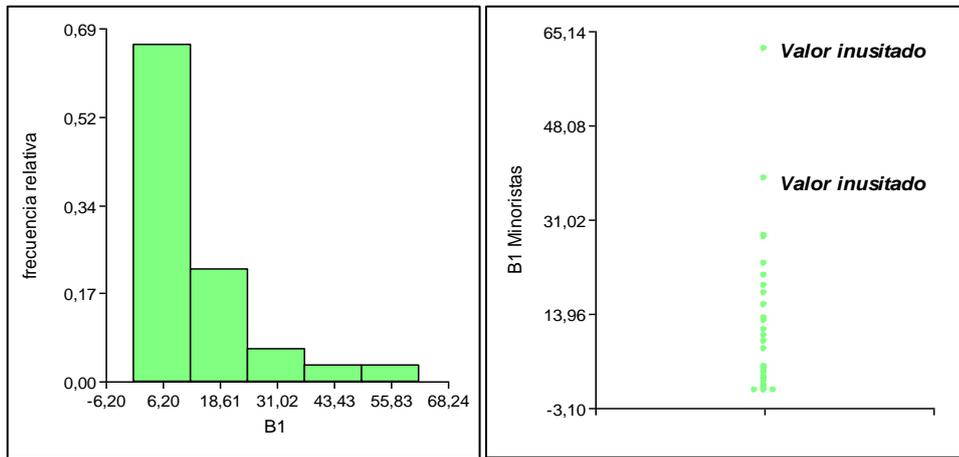


Gráfico 3.5: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B_1 en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

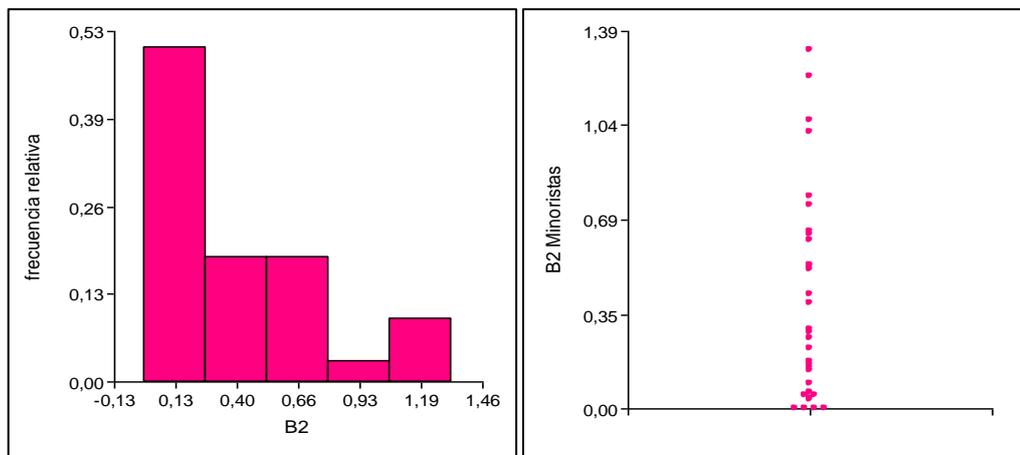


Gráfico 3.6: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B_2 en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

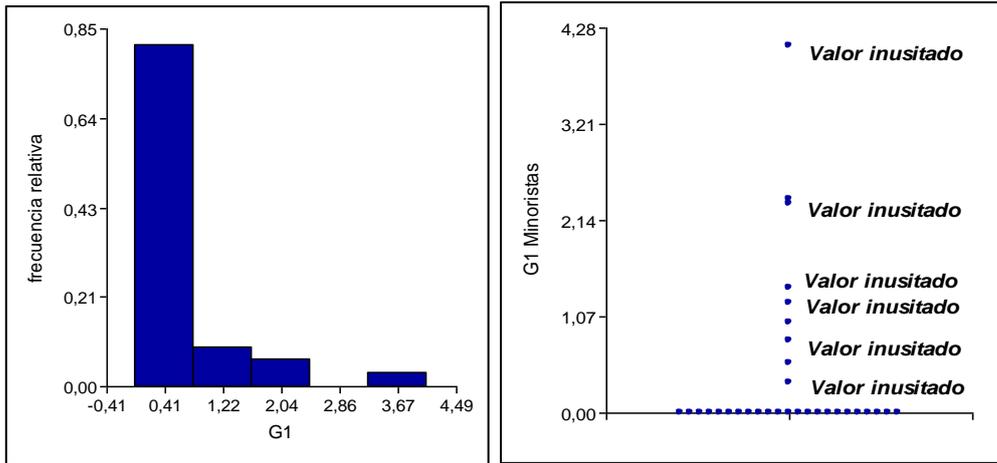


Gráfico 3.7: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G_1 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

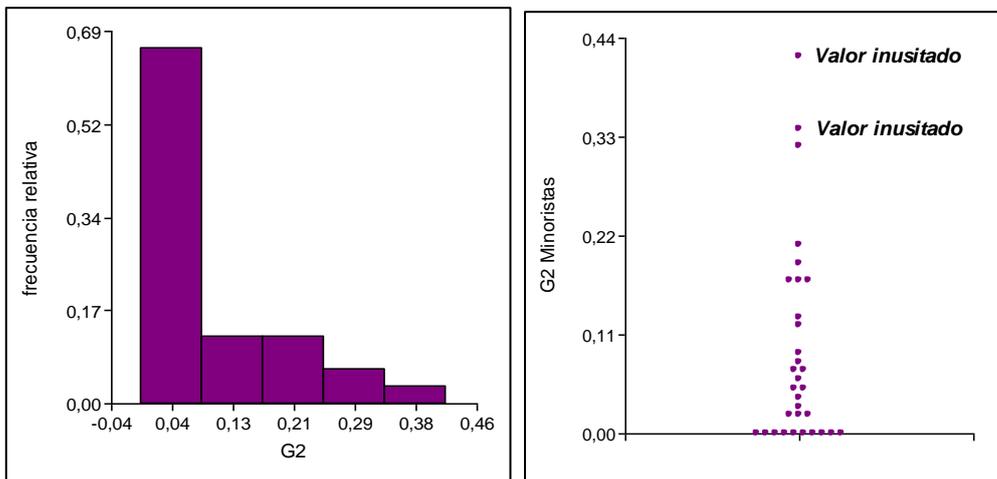


Gráfico 3.8: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G_2 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

En los diagramas de puntos de los gráficos 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se deduce que los datos están dispersos. Existen valores inusitados para las concentraciones de aflatoxinas B_1 iguales a $38,61$ y $62,04 \mu\text{g. Kg}^{-1}$, el caso de G_1 corresponde a: $2,38$; $2,32$; $1,22$; $4,08$; $1,02$; $1,39 \mu\text{g. Kg}^{-1}$ y para G_2 son: $0,42$ y $0,34 \mu\text{g. Kg}^{-1}$. Al cuantificar los diversos estadísticos generales sin estos valores inusitados se encontró que la concentración media aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 presentes en harina de maíz correspondieron a $7,667$; $0,388$; $0,053$; $0,06 \mu\text{g. Kg}^{-1}$ logrando así que el valor medio de contaminación para aflatoxina B_1 se encuentre entre los límites permitidos por las normativas europeas.

Grupo mercados.

Tabla 3.3: Resultados de la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en 7 muestras provenientes de minoristas.

CÓDIGO	[B ₁] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[B ₂] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[G ₁] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)	[G ₂] ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$)
AFE-01	25,54	0,81	0	0,34
AFE-02	1,22	0,06	0	0,03
AFE-03	9,65	0,61	0	0,11
AFE-04	0	0	0	0
AFE-05	0	0	0	0
AFE-06	0	0	0	0
AFE-07	0,14	0	0	0

Los estadísticos generales de las 7 muestras del grupo mercados revelaron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂ y G₂ presentes en harina de maíz fue de 5,22; 0,21 y 0,07 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ respectivamente. Al comprobarlas con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de 20 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ se estableció que no existe contaminación superior a los límites permisibles. En el caso de G₁ no se encontró contaminación en ninguna muestra por lo tanto estos parámetros no fueron calculados.

Los histogramas de los gráficos 3.9, 3.10 y 3.11 para la concentración de aflatoxinas B₁, B₂ y G₂ poseen una asimetría positiva alejada de la normalidad. En el caso B₁, B₂ y G₂ se ajustaron a una distribución exponencial con un valor p igual a 9,03, 13,90 y 7,25 %. Existe contaminación por B₂ y G₂ decreciente en frecuencia en casi todos los intervalos de clase analizados exceptuando a 0,42 y 0,17 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$. La contaminación por aflatoxina B₁ se observó en todos los intervalos.

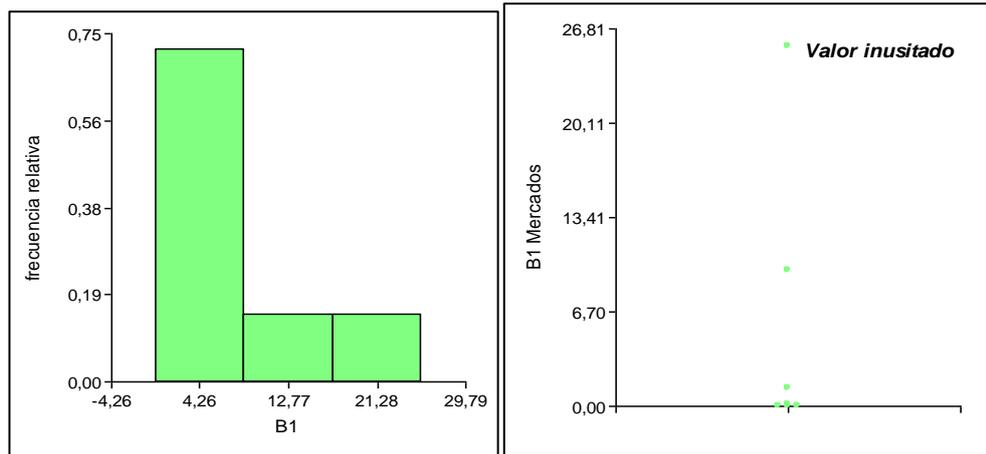


Gráfico 3.9: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.

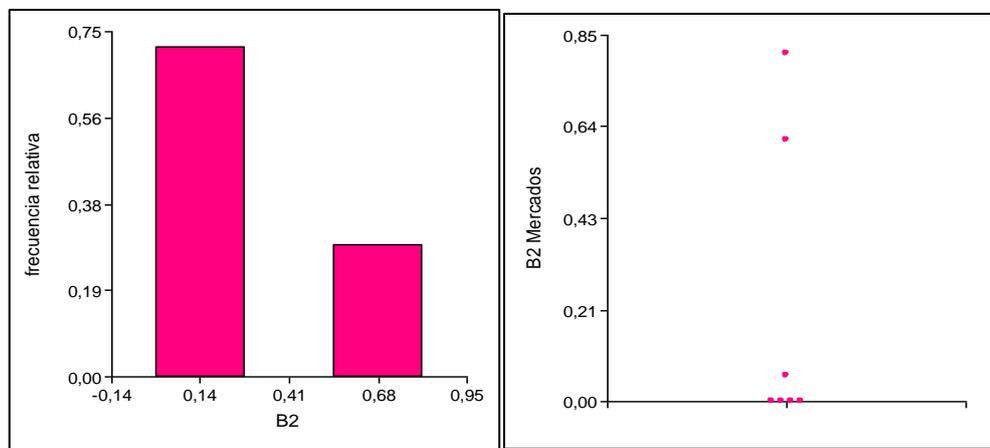


Gráfico 3.10: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.

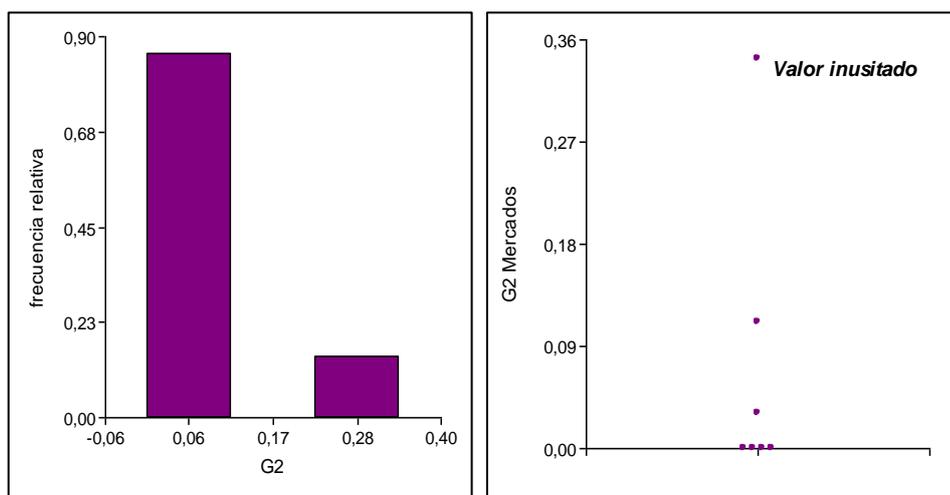


Gráfico 3.11: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.

De los diagramas de puntos de los gráficos 3.9, 3.10 y 3.11 se infiere la gran dispersión de los datos. Los valores inusitados para las concentraciones de aflatoxinas B₁ y G₂ fueron: 25,54 y 0,34 µg.Kg⁻¹. Sin estos, se encontró que la concentración media de B₁, B₂ y G₂ presentes en harina de maíz correspondió a 1,573; 0,211; 0,020 µg.Kg⁻¹ cumpliendo con las normativas internacionales.

Muestra Global (Grupo supermercados-minoristas-mercados).

Los estadísticos generales para todo el universo muestral sin clasificar por lugar de procedencia, indicaron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz fue de 7,80; 0,29; 0,29 y 0,07 µg.Kg⁻¹ respectivamente. Al compararlas con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 µg. Kg⁻¹ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de 20 µg. Kg⁻¹ se observó que no existe contaminación superior a los límites permisibles.

Los gráficos 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15 para la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ poseen una asimetría positiva alejada de la normalidad. En el caso de B₁, B₂ y G₂ se ajustaron a una distribución exponencial con un valor p igual a 5,34, 6,41 y 8,80 %. Sin embargo, no se determinó que este tipo de ajuste se adapta para G₁. En base a la información de los histogramas la contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ fue decreciente en frecuencia en todos los intervalos de clase sin particularidades.

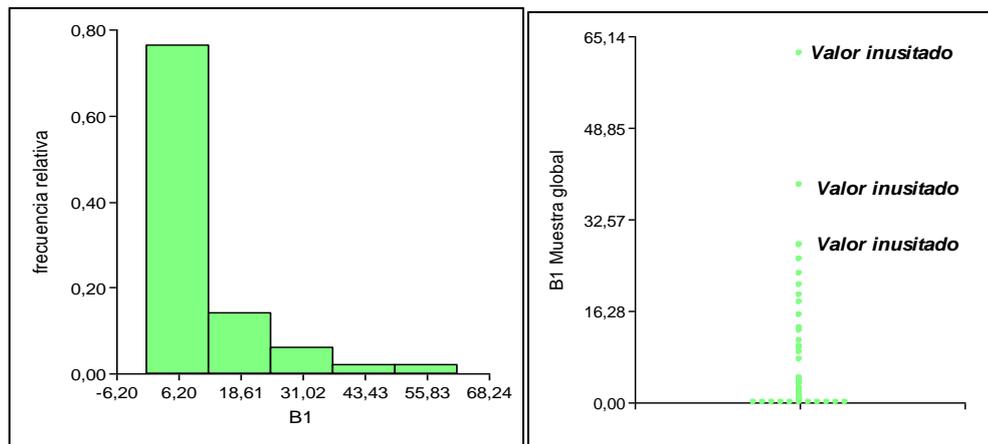


Gráfico 3.12: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ en µg.Kg⁻¹ presentes en la muestra global.

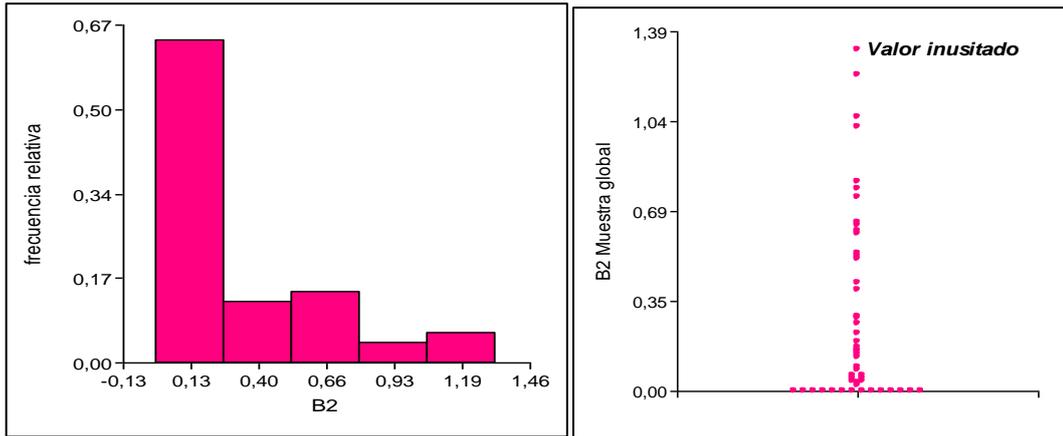


Gráfico 3.13: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₂ en µg.Kg⁻¹ presentes en la muestra global.

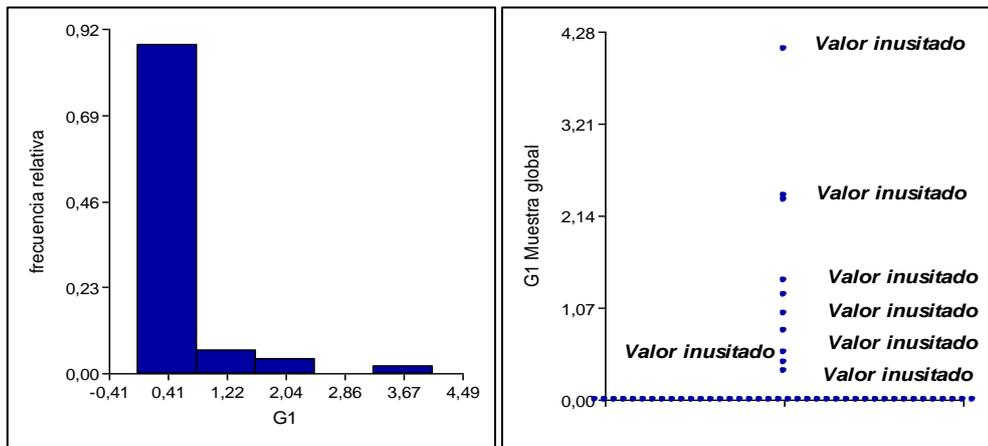


Gráfico 3.14: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₁ en µg.Kg⁻¹ presentes en la muestra global.

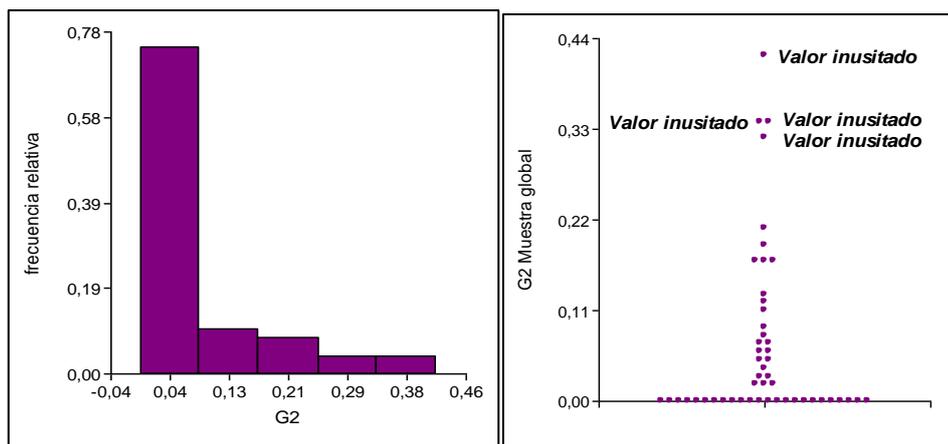


Gráfico 3.15: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₂ en µg.Kg⁻¹ presentes en la muestra global.

Los diagramas de puntos de los gráficos 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15 indicaron una gran variabilidad en la dispersión de los datos. Los valores inusitados para las concentraciones de AFB₁ fueron: 27,88; 28,104; 38,613 y 62,037 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$, para B₂ es 1,323 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$, AFG₁: 0,44, 0,548; 0,807; 0,332; 1,389; 1,015; 4,080; 1,221; 2,325 y 2,377 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ y AFG₂: 0,335; 0,420; 0,317 y 0,339. Al analizar los diversos estadísticos generales sin los valores inusitados se encontró que la concentración media de B₁, B₂ y G₂ presentes en harina de maíz fue: 4,667; 0,261; 0,039 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ y no existió contaminación para G₁ cuya media es 0 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$; por lo tanto no superaron los parámetros internacionales de control.

Análisis comparativo.

A partir de las muestras obtenidas en el muestreo y su posterior análisis en el laboratorio (cromatogramas modelo en el anexo 5) se construyeron gráficas comparativas según el lugar de procedencia sean: supermercados, locales minoristas o mercados para cada aflatoxina. En base a la gráfica 3.16 comparando las desviaciones estándar entre los 3 grupos de datos para las concentraciones de aflatoxinas B₁ y B₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, se identificó que los datos con mayor dispersión respecto a su media muestral son procedentes del grupo minoristas con una desviación estándar de 13,70 y 0,38 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ respectivamente, mientras que los datos pertenecientes a los supermercados presentan la menor dispersión.

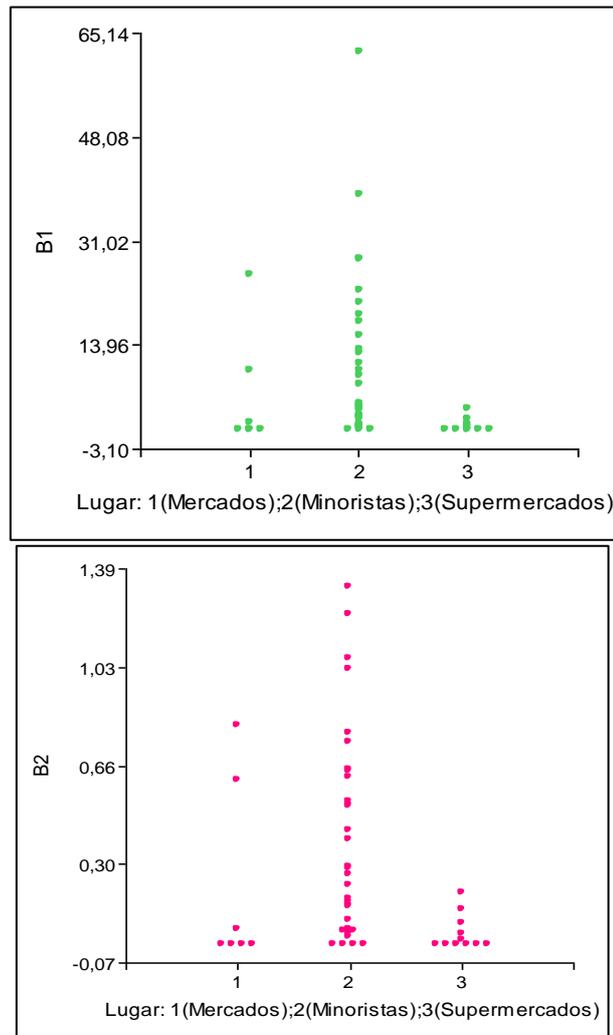


Gráfico 3.16: Diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ (Superior) y B₂ (Inferior) en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ según su lugar de procedencia.

Con pruebas de hipótesis adecuadas se establecieron intervalos de confianza (Tabla 3.4) para la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz, es decir, que con un 95% de confianza se determinó la concentración media real de aflatoxinas en las muestras.

Tabla 3.4: Intervalos de confianza con una probabilidad del 95% para la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ clasificadas según su lugar de procedencia.

Intervalos de confianza			
B ₁	G. Supermercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B1} < 1,41 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	Cumple normativas de la unión europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
	G. Minoristas	$[5,87 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B1} < 15,75 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	Exceden las normativas de la unión europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
	G. Mercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B1} < 14,2 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
	Muestra Global	$[4,34 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B1} < 11,26 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
B ₂	G. Supermercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B2} < 0,08 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	Cumplen las normativas de la unión europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
	G. Minoristas	$[0,25 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B2} < 0,53 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
	G. Mercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B2} < 0,53 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
	Muestra Global	$[0,19 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{B2} < 0,39 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
G ₁	G. Supermercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G1} < 0,13 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	Cumplen las normativas de la unión europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
	G. Minoristas	$[0,10 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G1} < 0,78 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
	Muestra Global	$[0,07 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G1} < 0,51 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
G ₂	G. Supermercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G2} < 0,02 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	Cumplen las normativas de la unión europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
	G. Minoristas	$[0,05 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G2} < 0,13 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
	G. Mercados	$[0,0 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G2} < 0,18 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	
	Muestra Global	$[0,04 \mu\text{g. Kg}^{-1} > \mu_{G2} < 0,10 \mu\text{g. Kg}^{-1}]$	

En la tabla 3.4 se determinó que la concentración media de aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ no superó el límite permisible por la Unión Europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$). Sin embargo la concentración de aflatoxina B₁ superó estas normativa, excepto para el grupo de supermercados.

En el caso particular de B₁ que se ajustó a una distribución exponencial y presenta contaminación superior a los límites permisibles se calculó que existe un 38 % de posibilidades de encontrar una muestra con niveles de aflatoxina B₁ mayor a 8 µg.Kg⁻¹.

Los resultados de un intervalo de confianza proporcional estableció que existe entre un 13,84% a 39,16% de la población global contaminada por B₁ en niveles superiores a las normativas de la Unión Europea. Las pruebas de chi² *MV-G*² para las concentraciones de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ cuyo valor p fue: 1,55%; 0,01%; 0,01% y 0,01% indicaron que la contaminación está directamente relacionada con el sector de procedencia y localidad. Por lo tanto, estadísticamente, todas las muestras de harina de maíz del Valle de Tumbaco presentan contaminación por aflatoxinas.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, hasta el año 2010 el Ecuador poseía 413.809 hectáreas de maíz duro, maíz suave, choclo y maíz seco lo que corresponde al 18,5% del total de la superficie productiva del país cuyo consumo anual proyectado para el 2011 es de 801.000 toneladas (MAGAP/ III CNA/SIGAGRO/ INEC, 2011), sin embargo la inexistencia de un programa sistemático de vigilancia de la contaminación de los alimentos por micotoxinas destinados al consumo humano o animal, producidos localmente o de importación; ha imposibilitado estimar la exposición de estas sustancias a la población ecuatoriana (Solá, 2010).

Esta investigación permitió definir los niveles de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz en el sector de Tumbaco formando una línea base para su posterior regulación en la producción y comercialización del maíz. En los resultados, se encontró que existe contaminación por aflatoxina B₁ superior a los límites permisibles por la Unión Europea en un 26% del total de muestras de harina de maíz provenientes del sector de Tumbaco, cuyos valores oscilaron entre: [4,34 µg.Kg⁻¹; 11,26 µg.Kg⁻¹]. Para el subgrupo de muestras del sector minoristas, los valores se encontraron entre: [5,87 µg.Kg⁻¹; 15,75µg.Kg⁻¹] y el subgrupo de mercados estuvieron entre: [0,0 µg.Kg⁻¹; 14,2µg.Kg⁻¹]. La excepción se localizó en el subgrupo de muestras del sector supermercados, que no presentó contaminación por AFB₁ superior a las normativas internacionales. Esta versatilidad se debe a que tanto en campo como almacenamiento, los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir un desarrollo fúngico significativo sin encontrarse la cantidad de aflatoxinas esperadas (Carrillo, 2003).

En los resultados obtenidos en la muestra global y los subgrupos: supermercados minoristas y mercados de las tablas 3.1, 3.2 y 3.3 respectivamente, las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ no fueron detectadas en niveles superiores a los parámetros regulatorios europeos. Para el subgrupo mercados, no existió la presencia de AFG₁, validando así la premisa anterior de Carrillo que afirma una gran variabilidad en la incidencia de aflatoxinas, influenciada por factores climáticos como: temperatura, acidez, humedad presencia de microflora competidora, actividad de agua, pH, concentraciones de CO₂ (Soriano del Castillo, 2007).

Según Carrillo, las interacciones con insectos (vectores) que producen un daño físico al maíz como la presencia de otros microorganismos, afectan la producción de aflatoxinas, *Brevibacterium linens* y *Streptococcus lactis*, inhiben su síntesis mientras que *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter aceti* la estimulan; así también cuando los hongos de *Aspergillus* crecen en un cultivo mixto con *Penicillium oxalicum* u otros hongos, se reduce la producción de aflatoxinas. Esta interacción con otros microorganismos afirma que: la diversidad en los niveles de B₁, B₂, G₁ y G₂ se debe a las múltiples interacciones entre el género *Aspergillus* y su entorno biótico y abiótico.

En base a los diagramas 3.16 y 3.17 de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ según su lugar de procedencia, se observó que el grupo con los mayores niveles de contaminación fue el subgrupo de minoristas para todas la aflatoxinas, mientras que los niveles menores se presentaron en el subgrupo de supermercados excepto para G₁ que no se detectó en ninguna muestra del subgrupo mercados. Esto se debe a las condiciones inadecuadas de almacenamiento como alta temperatura y humedad (FAO, 2011) presentes en los locales minoristas mientras que en los supermercados estos son factores controlados (Solá, 2010).

Como parte de los resultados de esta investigación, se encontró que el grupo con mayor contaminación para AFB₁ fue el subgrupo de minoristas con $62 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, este caso extremo fue un ejemplo ideal de una interacción perfecta entre el hongo y sustrato que posee altos niveles de hidratos de carbono y el medio ambiente que facilitaron la producción de grandes cantidades de aflatoxina B₁ (Robledo, Marín, & Ramos, 2001). En la muestra AFM-20 de la tabla 3.2, se evidenció un almacenamiento inadecuado con presencia de telas de araña y humedad en la harina.

En la tabla 3.4, se observó que AFB₁ no excede los límites permisibles en el subgrupo de supermercados, ya que al tener condiciones de almacenamiento adecuadas la proliferación fúngica se detiene temporalmente. La concentración promedio de AFB₁ fue de $0,67 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, sin embargo por ser una sustancia cancerígena el límite permisible debería ser cero (FAO, 2011).

En resumen, se determinó que la aflatoxina B₁ supera las normativas internacionales de control, mientras que B₂, G₁ y G₂ no las superan. Esto indica que los hongos del género *Aspergillus* poseen condiciones óptimas de crecimiento, en variables como: Temperatura entre 25 y 35°C, humedad relativa entre 88 y 95%, actividad de agua alrededor de 0,99. pH óptimo entre 3,5 y 5,5 y concentraciones de CO₂ del 20%.

Estos, parámetros muy diversos son difíciles de controlar, afectan el crecimiento fúngico y limitan la producción de ciertas aflatoxinas. Estimulando la producción de otras que posiblemente posean una ruta biosintética más sencilla que el resto (Soriano del Castillo, 2007).

Igualmente, los diagramas de densidad de puntos 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15 indican numerosos valores inusitados (“outlier u observación atípica”), que se debieron a múltiples factores y desigualdad en sus condiciones de almacenamiento (Dutra Caldas, Cardoso Silvab, & Nascimento Oliveira, 2002) afectan la producción de aflatoxinas de forma única en cada muestra (Diaz, 2005). No obstante, al analizar los datos sin estos valores inusitados, los resultados revelaron la ausencia de contaminación superior a las normativas europeas (< 8 µg. Kg⁻¹) para B₁, B₂, G₁ y G₂, pero estos no serían 100% acertados ya que se descartan las muestras que presentaron mayor contaminación y afectan significativamente la media del grupo de datos.

La heterogeneidad en la contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en harina de maíz se evidencia plenamente en la tabla 3.4 y se ajustan a un modelo exponencial, excepto G₁ y G₂ en sus subgrupos debido a que existen muy pocos datos cuyo valor es diferente de cero y afectan el ajuste (Ruiz, Barón, Sanchez, & Parra, 2000).

La aflatoxina de mayor incidencia fue B₁, sustancia cancerígena tipo I según la IARC convirtiéndose en un riesgo permanente para la salud humana y animal, concordando con otros autores que encontraron altos niveles de la misma en: maíz, trigo, avena, cebada, arroz, oleaginosas e incluso snacks en Colombia (Diaz, 2005) y en maní, maíz y algodón en Venezuela (Izquierdo, Rojas, Rangel, & Márquez, 2003).

A partir de la premisa que la aflatoxina B₁ es un agente carcinogénico, con evidencia suficiente de su potencial neoplásico en humanos y animales de

experimentación (International Research of Cancer, 2011), este análisis determinó la presencia de 13 muestras contaminadas por AFB₁ en niveles superiores al rango permitido por la Unión Europea, siendo un claro indicativo de que en la zona de Tumbaco existe comercialización de harina de maíz contaminada; demostrando la presencia y la proliferación de hongos productores de aflatoxinas del género *Aspergillus* en campo y/o en almacenamiento.

Los datos estadísticos resumidos en la tabla I- Anexo 3 del libro “Epidemiología del cáncer en Quito 2003-2005”, obtenidos del Hospital “Sociedad de lucha contra el cáncer” (SOLCA) mediante su sistema de vigilancia epidemiológica entre los años de 1986 al 2005, muestran un incremento en la incidencia de cáncer de hígado en el Ecuador paulatino, tanto en hombres como en mujeres residentes de la ciudad de Quito (SOLCA/MSP/INEC, 2009). Definiendo que los factores de riesgo del cáncer de hígado son: hepatitis A y B, cirrosis, alcoholismo y aflatoxinas (Vassallo & Barrios, 2003). Esta investigación encontró que el 78% de las muestras estaban contaminadas en algún grado por AFB₁ constituyéndose en una causa potencial de este incremento relativo ya que el consumo crónico es frecuente y con síntomas inespecíficos de diagnóstico tardío (Soriano del Castillo, 2007).

Según Soriano del Castillo, los efectos tóxicos de la exposición a AFB₁ dependen de: dosis, duración de la ingestión, edad y estado nutricional. En los datos obtenidos se observó que 26% de las muestras analizadas superan los límites permisibles de contaminación de AFB₁ lo que hace presumir que a mayor tiempo de exposición incluso con concentraciones mínimas, la probabilidad de presentar cáncer de hígado aumenta. Esta premisa se ve fortalecida al analizar las estadísticas de la tabla II- Anexo 3 adaptada de la epidemiología del cáncer en Quito (SOLCA/MSP/INEC, 2009), que presenta la mayor incidencia de cáncer de hígado en el grupo de más de 75 años con un promedio anual de 48 hombres y 44 mujeres con cáncer de hígado por cada 100.000 habitantes.

En este documento se determinó la existencia de aflatoxinas AFB₂, AFG₁, AFG₂ en muestras de harina de maíz, AFB₁ fue la de mayor incidencia y la única que presentó contaminación superior a los 8 µg. Kg⁻¹, tornándose una amenaza silenciosa para la salud humana. A partir de la tabla III- Anexo 3 adaptada de la epidemiología del cáncer

en Quito (SOLCA/MSP/INEC, 2009), de los tumores malignos localizados en el hígado el 57,02% corresponde a hepatocarcinomas y al no existir información específica de su origen, se presume que al menos una fracción corresponde a la mutación en el codón p53 249^{ser} por la ingesta de AFB₁ o por la correlación entre el virus de la hepatitis B e ingestión de AFB₁ (Hussain, Schwank, Staib, Wang, & Harris, 2007).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2011) en su análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point) para aflatoxinas; establece procedimientos de control y verificación para mantener la elaboración de un producto higiénicamente aceptable. La aplicación del HACCP es de utilidad para controlar la presencia de las mismas y disminuir el riesgo en la salud humana y animal, sin embargo, el peligro de la contaminación no desaparece ya que ésta puede ocurrir en cualquier punto de la cadena de producción, aunque se controle el almacenamiento y transporte de los productos.

En el Ecuador no existe una normativa de control para aflatoxinas ni se aplica un análisis de peligros y puntos críticos de control HACCP, pero en la Constitución Ecuatoriana en los derechos del buen vivir, el artículo 13 prescribe que *“las personas y las colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales, para lo cual el Estado deberá promover la soberanía alimentaria (Asamblea Nacional, 2010)”*. Sin embargo los resultados de este estudio, indican que existe entre un 13,84% a 39,16% de la población global contaminada por aflatoxina B₁ (sustancia carcinogénica) en niveles superiores a las normativas de la Unión Europea por lo tanto el acceso a alimentos sanos y nutritivos no se cumple a cabalidad.

La ley de soberanía alimentaria en el Capítulo IV: Sanidad e inocuidad alimentaria en el artículo 24, indica que: *“la sanidad e inocuidad alimentarias tienen por objeto promover una adecuada nutrición y protección de la salud de las personas; y prevenir, eliminar o reducir la incidencia de enfermedades que se puedan causar o agravar por el consumo de alimentos contaminados (Asamblea Nacional, 2010)”*. En consecuencia, esta investigación aportó a la sanidad e inocuidad alimentaria del Ecuador, al demostrar la existencia de harina de maíz contaminada por aflatoxinas B₁,

B_2 , G_1 y G_2 no apta para el consumo humano o animal y su límite debe ser considerado basándose en el principio ALARA (As low As Reasonably Achievable).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.

- Esta investigación encontró mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) que 26% de 50 muestras de harina de maíz sin categorizar por localización presentó contaminación por AFB₁ en niveles superiores a los permitidos por la Unión Europea (2-8 µg.Kg⁻¹). El subgrupo minoristas mostró los niveles de contaminación más altos con una media de 10,81 µg.Kg⁻¹. Los subgrupos: supermercados, mercados y la muestra global cumplieron con los parámetros de control europeos para B₁, B₂, G₁ y G₂. En el subgrupo mercados AFG₁ no fue detectada.
- Se precisó la línea base de muestreo en el sector de Tumbaco en los diferentes grupos: supermercados, minoristas y mercados localizados en los barrios: El Arenal, Tola Grande, Tola Chica, La Morita, Buena Esperanza, Tumbaco Central, de los cuales se recopilaron 50 muestras de harina de maíz de 1kg divididas en 11 grupo supermercados (AFS), 32 grupo minoristas (AFM) y 7 para mercados (AFE).
- Se definieron los niveles medios de concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz en el Sector de Tumbaco para la muestra global sin clasificar según su procedencia fueron: 7,79; 0,28; 0,29 y 0,06 µg.Kg⁻¹ respectivamente. Para el grupo supermercados: 0,67; 0,04; 0,04 y 0,005 µg.Kg⁻¹; grupo de comercios minoristas: 10,81; 0,38; 0,44; 0,08 µg.Kg⁻¹ y grupo mercados, los niveles de B₁, B₂, y G₂ fueron: 5,22; 0,21 y 0,06 µg.Kg⁻¹.
- Se estableció el protocolo de extracción, purificación y determinación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, mediante el uso de columnas de Inmunoafinidad (IAC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), validado por los laboratorios de AGROCALIDAD.
- Este análisis estableció una línea base de regulación para la posterior producción y comercialización de harina de maíz y otros productos derivados, aportando así al

plan de Soberanía Alimentaria e Inocuidad de los alimentos impulsada por el Gobierno Nacional.

- La harina de maíz analizada en el presente trabajo representa una amenaza tanto para la salud pública como el sector pecuario ya que es un riesgo latente y constante debido a la presencia en algún grado de AFB₁ sustancia cancerígena, en el 78% de las muestras analizadas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.

- En una segunda etapa de esta investigación se recomienda tomar muestras de harina de maíz producida y almacenada en zonas climatológicamente críticas en diferentes épocas del año, además conjuntamente con el área microbiológica, se debería comprobar la existencia de especies productoras de aflatoxinas en las muestras de harina de maíz en las que se detectó contaminación previamente, lo que permitirá ampliar el horizonte de conocimientos sobre la problemática de estos metabolitos secundarios.
- El cambio climático afectará considerablemente la contaminación de los alimentos por aflatoxinas, ya que un incremento en la temperatura favorece el crecimiento de los hongos de *Aspergillus*, por lo que se debería implementar un programa sistemático de vigilancia de la contaminación de los alimentos no solo para aflatoxinas sino para las micotoxinas en general.
- Realizar un Análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP Hazard Analysis Critical Control Point) para aflatoxinas en maíz y otros alimentos aplicando la norma ISO 22000 que establece los requisitos para los sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos (SGIA) para facilitar el control de la inocuidad alimentaria.
- Instaurar mecanismos efectivos de control de calidad e inocuidad de los productos como la aplicación de: Buenas prácticas agrícolas (BPA), Buenas prácticas de almacenamiento (BPAL) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que junto a los principios del sistema HACCP permitirán controlar los peligros que puedan afectar a la calidad de los alimentos susceptibles a aflatoxinas.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.

- Sigma-Aldrich. (2011). *Sigma-Aldrich*. Recuperado el 15 de Julio de 2011, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>. Estados Unidos.
- WATERS. (2011). *Waters HPLC*. Recuperado el Julio de 15 de 2011, de http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514248&locale=en_US. Estados Unidos.
- Agilent Technologies. (2010). *Agilent SampliQ12 and 20-Position SPE Manifold Instructions*. Recuperado el 11 de Julio de 2011, de <http://www.home.agilent.com/agilent/home.jspx?cc=EC&lc=eng>. Estados Unidos.
- AOAC INTERNATIONAL. (2011). *Official Methods of Analysis*. Recuperado el 12 de Julio de 2011, de <http://www.aoac.org/>. Estados Unidos.
- Arango Acosta, G. J. (2010). *Introducción al metabolismo secundario*. Colombia: Universidad De Antioquia.
- Asamblea Nacional. (2010). *Ley Reformatoria a la Ley Orgánica de Soberanía Alimentaria*. Ecuador: Asamblea Nacional.
- Bodega, J. L. (2010). *Diplodiosis, enfermedad causada por micotoxinas en maíz. Hongos en los rastrojos de maíz, problemas en las vacas*. Recuperado el 23 de Enero de 2011, de <http://www.produccion-animal.com.ar>. Argentina.
- Bogantes, P. (2004). *Aflatoxinas*. Recuperado el 18 de Marzo de 2010, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S000160022004000400004&script=sci_arttext. Costa Rica.

- Bolet, M., & Socarrás, M. M. (2004). Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. Cuba.
- Broggi, L., Pacin, A., Gasparovic, A., Sacchi, C., Rothermel, A., Gallay, A., y otros. (3 de Febrero de 2007). *Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Ríos Province, Argentina*. Luján, Argentina.
- BUCHI. (2011). *Rotavapor® R-210/R-215*. Recuperado el 15 de Julio de 2011, de http://www.buchi.com/rotary-evaporator_rotavapor.4695.0.html. Estados Unidos.
- Bucio Villalobos, C. M., Peña Cabriales, J. J., & Guzmán, D. (2001). Producción de aflatoxinas en maíz in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 218-222. México.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola. Capítulo 6*. Recuperado el 23 de Enero de 2010, de <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf>. Argentina.
- CESCO. (1995). *Estudio de aflatoxinas en maíz y tortilla en tres regiones piloto de Tegucigalpa 1990 - 1991*. Honduras.
- Cornell University, Department of Animal Science. (2008). *Plants Poisonous to Livestock*. Recuperado el 16 de enero de 2011, de <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html#Introduction>. Estados Unidos.
- CropLife Asia. (2010). *Biotechnology Glossary*. Recuperado el 18 de Marzo de 2010, de <http://www.croplifeasia.org/biotechnology-glossary.html>. Estados Unidos.
- Diaz, G. J. (Mayo de 2005). *Micotoxinas y micotoxicosis de importancia*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2011, de <http://www.-unal.-edu.-co>. Colombia.

- Dutra Caldas, E., Cardoso Silvab, S., & Nascimento Oliveira, J. (2002). *Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health* . Brasilia, Brasil.
- European Mycotoxins Awareness Network. (2010). *Aflatoxins*. Recuperado el 16 de Enero de 2011, de <http://www.mycotoxins.org/>. Unión Europea.
- FAO. (2011). *Organización de las naciones unidas para la Agricultura y Alimentación FAO*. Recuperado el 16 de Enero de 2011, de http://www.fao.org/index_es.htm. Estados Unidos.
- Fernandes de Oliveira, C. A., & Leal Germano, P. M. (1997). *Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma*. *Rev. Saúde Pública*, 417-24 . Brasilia, Brasil.
- Gobierno Nacional Ecuatoriano. (2010). *Plan nacional para el buen vivir*. Ecuador.
- Gong, Y., Egal, S., Hounsa, A., Turner, P., & Hall, A. (2003). *Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning*. Estados Unidos.
- Guzmán de Peña, D. (2010). *Mitos y realidades de las aflatoxinas, Avance y Perspectiva*. España: Díaz de Santos.
- Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, W., & Harris, C. (2007). *TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer**TP53 mutations and HCC*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2011, de <http://www.nature.com/onc/journal/v26/n15/full/1210279a.html>. Estados Unidos.

- International Research of Cancer. (2011). *IARC*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2011, de <http://www.iarc.fr/>. Francia.
- Investorwords. (2011). *Investorwords*. Recuperado el 18 de Marzo de 2011, de <http://www.investorwords.com/&rurl=translate.google.com.ec&anno=2&usg=ALkJrhjgPNPzbcRBDKseM6jLo1msu5yYsg>. Estados Unidos.
- Izquierdo, C., Rojas, L., Rangel, S., & Márquez, S. (Enero de 2003). *Presencia de aflatoxinas en algunos alimentos*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2011, de http://www.euskadi.net/r3309/es/contenis/informacion/sanidad_alimentari_1247.pdf. Venezuela.
- MAGAP/ III CNA/SIGAGRO/ INEC. (2011). *Principales cultivos del Ecuador*. Recuperado el 2011 de Septiembre de 2011, de <http://www.-magap.-gob.-ec>. Ecuador.
- Mazzani, C., Borges, O., Luzón, V., Barrientos, S., & Quijada, P. (2000). *Fusarium moniliforme, fumonisinas y Aspergillus flavus en granos de híbridos de maíz en el Estado Guárico, Venezuela*. *Rev. Fac. Agron.*, 185-195.
- Medical-dictionary. (2010). Recuperado el 18 de Marzo de 2011, de <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/thin-layer+chromatography>. Estados Unidos.
- Medicinenet. (2010). *MedTerms Medical Dictionary* . Recuperado el 29 de Abril de 2011, de <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=9100>. Estados Unidos.
- Moreno, E., Vázquez, M., & Facio, F. (2000). *Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz*. México: UNAM.

- Pozas, R., & Abad, J. (2010). *Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros*. Cataluña-España: EPSEVG.
- Primo Yúfera, E. (1996). *Química orgánica básica y aplicada*. España: Reverte.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (1992). *Biología de las plantas*. España: Reverte.
- R-BIOPHARM RHÔNE LTD. (2011). *AFLAPREP®: aplicación de columnas de inmunoafinidad para la preparación de muestras previo al análisis de aflatoxinas por HPLC*. Recuperado el 13 de Julio de 2011, de <http://www.r-biopharm.com/>. Alemania.
- Robledo, M. d., Marín, S., & Ramos, A. (2001). *Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit*. *Revista Iberoamericana de Micología*. México.
- Romer Labs. (2011). *Columnas de Inmunoafinidad Star®*. Recuperado el 18 de Marzo de 2011, de http://www.engormix.com/romer_labs_columnas_inmunoafinidad_s_products2022-1825.htm. Brasil.
- Ruiz, Barón, Sanchez, & Parra. (2000). *Bioestadística*. España: Reverte
- Solá, I. (2010). *Procedimiento PEE /LAB-M/01: procedimiento específico de ensayo para determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en maíz y harina de maíz*. Quito.
- SOLCA/MSP/INEC. (2009). *Epidemiología del cáncer en Quito 2003-2005*. Quito.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Díaz de Santos.

- U.S. Food and Drug Administration. (2011). *U.S. Food and Drug Administration*. Recuperado el 16 de Enero de 2011, de <http://www.fda.gov/default.htm>. Estados Unidos.
- Vassallo, J., & Barrios, E. (2003). *Actualización Ponderada de los Factores de Riesgo del Cáncer*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2011, de Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer: http://www.urucan.org.uy/uilayer/ve/factores_riesgo/factores_riesgo_6.pdf. Uruguay.