

EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ Y G₂ EN MAÍZ AMARILLO DURO

ASSESSMENT OF AFLATOXIN B₁, B₂, G₁ AND G₂ CONTAMINATION IN KERNELS OF MAIZE

Iván Rodrigo Samaniego Maigua¹, Herlinda Susana Espín Mayorga¹, Jean Paúl Villavicencio Linzán², Bladimir Efraín Ortíz Ramos¹, José Luis Zambrano Mendoza³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad. Panamericana Sur km. 1, Quito-Ecuador.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Pichilingue, Programa de Maíz. Km5 vía Quevedo-El Empalme, Quevedo-Ecuador.

³Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Maíz. Panamericana Sur km. 1, Quito-Ecuador.

Correo: jose.zambrano@iniap.gob.ec

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar la ocurrencia natural de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en maíz duro procedente de la provincia de Los Ríos, Ecuador, aplicando una metodología previamente validada en el laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del INIAP. Para esto se empleó columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con derivatización electroquímica post-columna. La evaluación de los parámetros de validación permitió establecer que el método analítico propuesto es selectivo y no mostró interferencias para el análisis de los cuatro tipos de aflatoxinas. El método presentó límites de detección de 0,25; 0,36; 0,17 y 0,23 µg/kg, y límites de cuantificación de 0,83; 1,20; 0,29 y 0,75 µg/kg, para aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂, respectivamente. La precisión y exactitud del método se evaluó empleando muestras de maíz artificialmente contaminadas con tres niveles de aflatoxinas por triplicado en tres días diferentes, estableciéndose que el método aplicado tuvo un porcentaje de desviación estándar de repetibilidad (DSr) entre 1,14 y 2,31%. La reproducibilidad (DSR) fue de 2,66 a 10,90%, con una exactitud como porcentaje de recuperación de 71,41; 74,92; 75,82 y 76,87% para aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂, en ese orden. La evaluación de aflatoxinas se realizó en 61 muestras de grano tomadas directamente del campo de productores. El 50% de las muestras presentó contaminación por aflatoxina B₁, con rangos de 1,03 a 193,54 µg/kg; el 12% de las muestras estuvo contaminado por aflatoxina B₂, con rangos de 1,24 a 8,26 µg/kg. La incidencia de aflatoxinas G₁ fue del 5%, con rangos de 1,25 a 7,57 µg/kg. En las muestras evaluadas no se encontró contaminación por Aflatoxina G₂.

Palabras clave: Inocuidad, Micotoxinas, Alimentos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the natural occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in kernels of maize from the province of "Los Ríos", Ecuador, applying a previously methodology validated in the laboratory of "Analysis Service and Food Research" from INIAP. For the purpose, immunoaffinity columns and High Performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical post column derivatization was used. The evaluation of the parameters of validation established that the proposed analytic method is selective and did not showed interference in analyzing the four types of aflatoxins. The detection limits of the method were 0.25, 0.36, 0.17 y 0.23 µg/kg, and the quantification limits were 0.83, 1.20, 0.29 y 0.75 µg/kg, for aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂, respectively. The precision and accuracy of the method was evaluated using samples of maize artificially contaminated with three levels of aflatoxins in triplicate in three different days, showing that the applied method has a Repeatability standard deviation percentage from 1.14 to 2.31%. The reproducibility ranged from 2.66 to 10.90%, with an accuracy as a percent recovery of 71.41, 74.92, 75.82, and 76.87 for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, respectively. The aflatoxins were evaluated to 61 kernel samples taken directly from farmers' fields. 50% of the samples showed aflatoxin B₁ contamination ranged from 1.03 to 193.54 µg/kg; 12% showed aflatoxin B₂ contamination ranged from 1.24 to 8.26 µg/kg. The incidence of G₁ Aflatoxin was of 5% ranged from 1.25 to 7.57 µg/kg. The samples did not show contamination with aflatoxin G₂.

Keywords: Innocuousness, Mycotoxins, Food.



Recibido: 18 de enero de 2018

Aceptado: 18 de mayo de 2018

ESPAMCIENCIA 9(1): 13-21/2018

INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los rubros agrícolas más importantes del Ecuador. Según datos oficiales, en el Ecuador se cosechan 306 095 ha de maíz duro seco, con una producción de 1 091 108 t, siendo Los Ríos la provincia que representa el 40% de la producción nacional (INEC, 2016). La producción de esta variedad de maíz está destinada en un 70% a la industria de alimentos de uso animal, el 22% del grano se destina a la exportación y el 8% restante se destina al consumo humano y semilla. Esta variedad de maíz constituye entre el 50 a 70% de las dietas para animales, esto marca su importancia dentro de la elaboración de productos como: carne (pollo y cerdos), huevos y la necesidad de producir con estándares de calidad e inocuidad para satisfacer la demanda local (Baca-Guerrero, 2016).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por algunas especies de hongos que pueden afectar a la salud de las personas y animales (Abbas *et al.*, 2006; Accinelli *et al.*, 2014). Las aflatoxinas son un tipo de micotoxinas producidas por algunas especies de hongos del tipo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides*, así como, hongos de tipo *Alternaria* y *Penicillium* (Alam y Deng, 2017). Existen cuatro grupos principales de aflatoxinas: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂), las B₁ y B₂ son producidas por *A. flavus* (Bianco *et al.*, 2012; Al-Zoreky y Saleh, 2017). Este grupo de micotoxinas poseen una estructura similar entre ellas formando un único grupo de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados que presentan toxicidad aguda y crónica; incluyendo efectos cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos en varios organismos (Muscarella *et al.*, 2009; Atehnkeng *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2017). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó a las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ dentro del grupo I de carcinógenos humanos (Bianco *et al.*, 2012; Frehse *et al.*, 2015; Al-Zoreky y Saleh, 2017).

Las micotoxinas contaminan productos tales como el cacao, frutos secos, carnes y cereales (maíz, trigo, cebada y arroz) (García-Villanova *et al.*, 2004; Atehnkeng *et al.*, 2014). Se ha establecido que el almacenamiento de estos productos en condiciones de alta humedad relativa y temperaturas (25 a 30°C) genera condiciones ideales para la ocurrencia natural de aflatoxinas (Lee *et al.*, 2015; Ng'ang'a *et al.*, 2016). El clima y la genética del material del maíz también influyen en la presencia de micotoxinas (Acuña *et al.*, 2005). En la actualidad, varios organismos como: el Codex Alimentarius y la Unión Europea han establecido criterios para evitar que se comercialicen productos que puedan ocasionar daño a la salud, para esto han planteado límites máximos permisibles para la presencia de este tipo

de contaminantes en diferentes productos tanto para consumo humano y animal (Atehnkeng *et al.*, 2014; Frehse *et al.*, 2015; Murashiki *et al.*, 2017).

Los productos que ingresan a la Unión Europea (UE) deben presentar un nivel máximo (MLR) de 2 µg/kg de AFB₁ y 4 µg/kg de aflatoxinas totales (B₁, B₂, G₁ y G₂) en frutos secos, fruta y cereales secos destinados a consumo humano directo. En alimentos para bebe se han establecido límites más restrictivos, estableciéndose como límite máximo 0,10 µg/kg de AFB₁ (European Commission, 2004). De acuerdo a la normativa europea (European Commission, 2003; Italian Ministerial Decree, 2004) en cereales para consumo animal el límite máximo de residuos es de 20 µg.kg⁻¹ para AFB₁ (Chan *et al.*, 2004; Muscarella *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015; Murashiki *et al.*, 2017).

Debido a los riesgos significativos que representa para la salud la presencia de aflatoxinas en los alimentos y la necesidad de satisfacer los requisitos legales rigurosos para la comercialización de productos secos, es importante contar con técnicas eficientes para la detección de aflatoxinas en los alimentos y piensos para animales. Se han desarrollado varios métodos para la determinación de aflatoxinas como los métodos inmunológicos, basados en ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (Molina-García *et al.*, 2012; Chauhan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015), métodos cromatográficos basados en RP-HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa, por sus siglas en inglés) y detección por fluorescencia (FLD; por sus siglas en inglés) con derivatización química pre-columna o post-columna (Holcomb y Thompson, 1991; Chan *et al.*, 2004; García-Villanova *et al.*, 2004; Ibáñez-Vea *et al.*, 2011; Ok *et al.*, 2016) y métodos con derivatización electroquímica en línea (Ok *et al.*, 2016).

El objetivo de la investigación fue validar una metodología analítica para determinar los contenidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en maíz duro seco utilizando purificación con Columnas de Inmunoafinidad (IAC) y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a detector de fluorescencia y derivatización electroquímica post-columna; y evaluar la ocurrencia de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en maíz duro producido en la provincia de Los Ríos-Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se efectuó en dos fases; en la primera se realizó la adaptación de la metodología analítica para la determinación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un Detector de Fluorescencia (FLD) y derivatiza-

ción electroquímica post-columna. Para realizar la adaptación y posterior validación de la metodología analítica se tomó como referencia al método desarrollado por Ok *et al.* (2016), trabajando con estándares certificados de aflatoxinas y muestras de maíz contaminadas artificialmente. La segunda fase consistió en la evaluación y cuantificación de la contaminación por aflatoxinas en muestras de maíz colectadas en campo de agricultores. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad en la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Metodología analítica

Los estándares de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ de pureza > 98% se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis Missouri, USA), los solventes acetonitrilo y metanol grado HPLC fueron obtenidos de Merck (KGaA, Darmstadt Germany), los reactivos Cloruro de Sodio, Hidróxido de Sodio (≥99%), Bromuro de Potasio (≥99%), Cloruro de Potasio (≥99%), Hidrógeno fosfato disódico dihidratado (≥99%), se obtuvieron de Merck (KGaA, Darmstadt Germany). Se utilizó en todo el procedimiento agua purificada de conductividad 18,2 MΩ. Cm a 25°C. Para el análisis se preparó una solución stock de 2500 µg/mL inyectando 4 mL de solución de Tolueno: Acetonitrilo (9:1, v/v) en los viales que contenían 10 mg de cada aflatoxina y se agitó hasta disolución completa, esta solución se almacenó a temperatura de -20°C por un año. La solución estandar de trabajo (2500 ng/mL) y la solución de calibración (10 ng/mL) se prepararon por dilución de la solución stock en metanol grado HPLC y se almacenaron a -20°C por 1 mes. La solución Buffer Fosfato Salino (PBS) se preparó disolviendo 0,2 g de Dihidrogeno fosfato de potasio, 1. g hidrógeno fosfato disódico dihidratado, 8 g de cloruro de sodio, 0,2 g de cloruro de potasio en un litro de agua purificada.

Extracción

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

Purificación de la muestra

La muestra diluida en PBS (25 mL) fue purificada en columnas de inmutafinidad (EASI-EXTRACT AFLATOXIN, R-Biopharm Rhône Ltd. UK) a un flujo de 2 a 3 mL/min. La columna fue lavada con 20 mL de PBS y las toxinas se elu-

yeron desde la columna con 3 mL de metanol grado HPLC.

Cuantificación por HPLC

La identificación y cuantificación se realizó en un sistema HPLC (Agilent technologies 1100/1200 series, Waldbronn, Germany), constituido de una bomba binaria (G1312A), detector de fluorescencia (FLD G1321A) (λ excitación 362 nm y λ emisión de 425 nm), auto-inyector (G1329A), derivatizador electroquímico post-columna tipo KOBRA CELL (R-Biopharm Rhone. Ltd, Glasgow, Scotland) y controlado por el software Chemstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). La separación fue realizada en una columna de fase reversa C18 (150x4.6 mm, 5µm) (Agilent Zorbax SB C18, United States). Para la determinación se inyectó 20 µL de extracto en la columna a un flujo de 1 mL/min. La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de agua/metanol/ acetonitrilo (60:20:20, v/v/v) con 119 mg de bromuro de potasio y 350 µL de ácido nítrico 4M. La cuantificación se realizó por comparación de áreas obtenidas para las muestras en una curva de calibración de cada aflatoxina.

La linealidad del método se evaluó relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de aflatoxinas, para lo cual se preparó un set de estándares con concentraciones de 0,42; 0,84; 1,67; 5,00; y 10,00 ng/mL, en triplicado durante tres días. Las muestras se inyectaron en el HPLC (Agilent technologies 1100/1200 series, Waldbronn, Germany) y se registró la respuesta para cada concentración.

Con los resultados obtenidos se realizó el estudio de regresión lineal, y se evaluó los siguientes parámetros: coeficiente de correlación (r^2), pendiente (a), intercepto (b), desviación de la pendiente (Sa), desviación del intercepto (Sb), error típico ($S_{y,x}$) y los límites de confianza para el intercepto y la pendiente.

Límite de detección y cuantificación

El Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) se calcularon en base a la curva de calibración promedio obtenida del estudio de regresión lineal (Ecuación 1), utilizando el valor del intercepto (b) y la pendiente (a) mediante las relaciones $LD= 3b/a$ y el $LC=6b/a$

$$y = ax + b \quad (1)$$

Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

El estudio de repetibilidad y reproducibilidad del método se realizó utilizando muestras artificialmente contaminadas con aflatoxinas en niveles de contaminación de 1,25, 5,01 y 30,00 µg/kg, por triplicado y en tres días diferentes. Los resultados se evaluaron mediante un análisis de

varianza; determinándose la desviación estándar de la repetitividad (RSD_i) y la desviación estándar de la reproducibilidad (RSD_R) en porcentaje. La validación de resultados se realizó en base a los criterios establecidos en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas y la ecuación de Horwitz, estableciéndose valores de $RSD_i \leq 20\%$ y $RSD_R \leq 30\%$ para métodos de análisis de micotoxinas.

Exactitud

La exactitud se calculó como porcentaje de recuperación de cada aflatoxina en cada uno de los tres niveles de contaminación evaluados (Ecuación 2).

$$\%R = C_o C_e \times 100 \quad (2)$$

Dónde:

%R: es el porcentaje de recuperación

C_o : es el resultado obtenido en el análisis de la muestra contaminada

C_e : es el valor teórico de contaminación de la muestra

Para la validación del método se aceptó valores de recuperación entre 70 y 110% en los tres niveles de contaminación para cada Aflatoxina.

Evaluación de la contaminación por aflatoxinas en maíz duro

En el mes de mayo y junio, durante la cosecha de maíz correspondiente a la época lluviosa del 2015, se colectaron 61 muestras de grano en campo de productores escogidos aleatoriamente, antes de su comercialización en los centros de acopio. Las muestras fueron obtenidas en los siguientes cantones de la provincia de Los Ríos: Mocache, Ventanas, Vincas, Pueblo Viejo y Quinsaloma. El muestreo se realizó mediante toma de muestras incrementales de 100 a 200 gramos por saco y se formó una muestra compuesta. Luego de esto se homogenizó y se tomó 2 kg para los análisis en el laboratorio. En cada sitio de muestreo se tomó los datos de latitud y longitud geográfica mediante un Sistema de Posicionamiento Satelital (GPS, por sus siglas en inglés) para facilitar su referencia y ubicación posterior.

Preparación de la muestra y análisis

Las muestras se molieron utilizando un molino ultra centrífugo Restch modelo ZM, 200 (Haan, Germany) hasta

obtener un polvo fino de tamaño de partícula < 1 mm y se almacenaron en un congelador a -20°C hasta la fecha de análisis. Los análisis de contaminación por aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 se realizaron utilizando la metodología previamente indicada.

Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de incidencia de cada aflatoxina, mediante la Ecuación 3.

$$\%incidencia = N^{\circ} \text{ Muestras} \frac{\text{contaminadas}}{N^{\circ} \text{ total de muestras}} * 100 \quad (3)$$

Posteriormente, seleccionando el grupo de muestras que presentaron contaminación, se estimó la media, mínimo y máximo para establecer el nivel de contaminación de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación de la metodología analítica

La curva de calibración se realizó inyectando soluciones estándar en 5 diferentes concentraciones de cada aflatoxina (0,42; 0,84; 1,67; 5,00 y 10,00 ng/mL) por triplicado en 5 días diferentes. Se graficó el área de los picos correspondientes a cada concentración y se realizó un estudio de regresión lineal. Como resultado se obtuvo un coeficiente de correlación lineal (r^2) entre 0,99 a 1. Se demostró que existe una alta correlación lineal entre la concentración de cada micotoxina y el área de los picos correspondiente a cada concentración. De igual manera, se comprobó que existe una correlación lineal significativa aplicando una prueba t-student a dos colas con un nivel de confianza (α) del 5%. Con los resultados obtenidos durante las cinco repeticiones se estableció la curva promedio y se procedió a calibrar el equipo. Estos resultados concuerdan con el trabajo desarrollado por Ok *et al.* (2016), quienes reportaron coeficientes de correlación entre 0,9966 y 1 para este método.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se calcularon en base a la curva de calibración promedio obtenida del estudio de regresión lineal ($y=ax+b$), empleando estándares puros de cada aflatoxina. Posteriormente se evaluó estos parámetros con muestras artificialmente contaminadas para evaluar el efecto matriz, los resultados se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC) de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ en maíz utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplados a un detector de fluorescencia y derivatización electroquímica.

Parámetros	AFLA B ₁ µg/kg	AFLA B ₂ µg/kg	AFLA G ₁ µg/kg	AFLA G ₂ µg/kg
LLD	0,20* 0,25**	0,23* 0,36**	0,19* 0,17**	0,21* 0,23**
LLC	0,66* 0,83**	0,77* 1,20**	0,37* 0,29**	0,69* 0,75**

* LD y LC: Calculado con curva de calibración

**LD y LC: Calculado con muestras contaminadas

El LD y LC en todos los casos se incrementan al realizar los ensayos con muestras artificialmente contaminadas, observándose un efecto matriz por las interferencias que acompañan a los analitos. Los límites de detección obtenidos concuerdan con los resultados presentados por Lutfullah y Hussain (2012), quienes reportaron valores de LD obtenidos en análisis de varios cereales de 0,5 µg/kg para AFLA B₁ y AFLA G₁ y de 1,0 µg/kg para AFLA B₂ y AFLA G₂.

Precisión

La repetibilidad y reproducibilidad del método se realizó utilizando muestras de maíz amarillo artificialmente contaminadas con aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en tres niveles (1,26; 5,01 y 30 µg/Kg), con tres repeticiones y en tres días diferentes. Se calculó el % DS_r (Desviación estándar de repetibilidad) y el % DS_R (Desviación estándar de reproducibilidad), observándose que los valores obtenidos por nivel en todos los casos fueron inferiores al 11% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados del estudio de precisión para el método de análisis de aflatoxinas en maíz utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia y derivatización electroquímica.

Aflatoxina	Nivel de contaminación (µg/kg)	Repetitividad DS _r (%)	Reproducibilidad DS _R (%)
AFLA B ₁ *	1,26	1,55	2,66
	5,01	1,39	6,08
	30,00	1,79	9,37
AFLA B ₂ *	1,26	1,35	3,78
	5,01	1,65	5,17
	30,00	1,75	5,01
AFLA G ₁ *	1,26	2,31	10,85
	5,01	1,14	10,90
	30,00	1,58	8,10
AFLA G ₂ *	1,26	2,29	7,16
	5,01	2,24	9,17
	30,00	1,84	5,66

*Número de muestras (n) = 9 por nivel.

Los resultados reportados para las cuatro aflatoxinas en el cuadro 1 se ajustan a la precisión y exactitud establecida para métodos de análisis de micotoxinas en productos alimenticios. Los valores de % DS_r y % DS_R establecidos son < 20% y < 30%, respectivamente. De igual manera, la estimación del coeficiente de variación en función de la ecuación de Horwitz permitió determinar que el método tiene la precisión establecida para una concentración medida en µg/kg (European Commission, 2002; European Commission, 2006).

Exactitud

En cada nivel de contaminación propuesto se determinó la exactitud como porcentaje de recuperación, estableciéndose que el método presenta un promedio de 71,41; 74,92; 75,82 y 76,87% de recuperación para el análisis de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ respectivamente (Cuadro 3). Los resultados obtenidos se ajustaron a la exactitud (70-100%) establecida para métodos de análisis de micotoxinas en productos alimenticios (European Commission, 2003; European Commission, 2004).

Cuadro 3. Resultados del estudio de Exactitud para el método de análisis de aflatoxinas en maíz utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia y derivatización electroquímica.

Aflatoxina	Nivel de contaminación (µg/kg)	Nivel medido (µg/kg)	Recuperación (%)	Promedio (%)
AFLA B1*	1,26	0,91	72,22	71,41
	5,01	3,52	70,26	
	30,00	21,32	71,73	
AFLA B2*	1,26	0,97	77,30	74,92
	5,01	3,79	75,73	
	30,00	22,57	75,24	
AFLA G1*	1,26	1,01	80,16	75,82
	5,01	3,61	72,06	
	30,00	22,26	74,20	
AFLA G2*	1,26	1,01	80,41	76,87
	5,01	3,81	75,99	
	30,00	23,13	77,09	

*Número de muestras (n) = 9 por nivel.

Evaluación de la contaminación por aflatoxinas en maíz duro

Se analizaron en laboratorio 61 muestras tomadas en diferentes localidades de la provincia de Los Ríos, estableciéndose los porcentajes de incidencia de las aflatoxinas y los niveles de contaminación de cada una de ellas (Cuadro 4).

El análisis de incidencia realizado en las muestras de maíz duro permitió establecer que el 50% de las muestras presentaron contaminación por aflatoxina B₁, con un prome-

dio de 22,61 µg/kg, y de estas, el 30% (4 µg/kg) y el 5% (50 µg/kg) de las muestras superaron el límite máximo permitido por la Unión Europea para contaminación por aflatoxinas en alimentos para consumo humano y animal, res-

pectivamente. La mayoría de las muestras procedentes de Mocache, Ventanas y Vinces presentaron niveles de contaminación por aflatoxina B₁ superiores a 20 µg/kg (datos no mostrados).

Cuadro 4. Cuantificación de la contaminación por aflatoxinas en muestras de maíz procedentes de cinco cantones de la provincia de Los Ríos.

Aflatoxina	Muestras contaminadas (%)	Nivel promedio de contaminación (µg/kg)	Rango de contaminación (µg/kg)	Muestras contaminadas que exceden normativa (4 µg/kg)* (%)	Muestras contaminadas que exceden normativa (50 µg/kg)** (%)
AFLA B ₁	50	22,61	1,03 – 193,54	30	5
AFLA B ₂	12	3,08	1,24 – 8,26	3	0
AFLA G ₁	5	3,57	1,25 – 7,57	2	0
AFLA G ₂	0	0,00	0,00 – 0,29	0	0
Totales	50	23,97	1,03 – 201,80	30	5

* Límite máximo permitido de contaminación con aflatoxinas en cereales para consumo humano, según normativa de la Unión Europea, Comisión de Regulación No. 1126/2007.

** Límite máximo permitido de contaminación con aflatoxinas en cereales para consumo animal, según normativa de la Unión Europea, Comisión de Regulación No. 1126/2007.

De acuerdo a la regulación Europea para el control de niveles de aflatoxinas en cereales, se admite un límite máximo entre 2 y 4 µg/kg para AFB₁ y aflatoxinas totales, respectivamente. En países como Rusia (5 µg/kg), China y Japón (10 µg/kg) se aceptan límites superiores para este tipo de micotoxinas.

La incidencia para aflatoxina B₂ fue del 12%. El 3% de las muestras contaminadas por AFB₂ presentaron niveles de contaminación superiores al máximo permitido por la Unión Europea para consumo humano, mientras que ninguna de las muestras contaminadas superó el límite máximo de contaminación permitido para consumo animal. Las muestras que presentaron contaminación por aflatoxina B₂ provienen de los cantones Mocache, Ventanas y Vinces.

El análisis de laboratorio estableció que el 5% de las muestras presentaron contaminación por aflatoxina G₁, con un promedio de 3,57 µg/kg, y de estas, el 2% superó el límite máximo permitido por la Unión Europea para contaminación por aflatoxinas en alimentos para consumo humano, mientras que ninguna muestra superó el límite máximo permitido para alimentos destinados para consumo animal. La muestra que presentó la mayor contaminación por aflatoxina G₁ proviene del cantón Vinces. Los análisis realizados permitieron establecer que no existió aflatoxina G₂ en las muestras de maíz evaluadas.

Estos resultados confirman estudios realizados por Soriano (2007) quien reportó niveles de incidencia de aflatoxina B1 de 12 al 90% en maíz proveniente de la India, Nigeria, Brasil, Uganda, Chile, Costa Rica, Estados Unidos y México con niveles de contaminación en el rango de 0,2

a 700 µg/kg. En el Ecuador existen reportes de aflatoxinas encontrados en maíz almacenado que superan los 20 µg/kg (Sandoval, 2013; Fon-Fay *et al.*, 2016), lo que confirma la presencia de aflatoxinas con niveles elevados en el grano de maíz que se comercializa, existiendo incluso reportes de aflatoxinas en productos derivados como la harina de maíz (Vallejo, 2012).

En función de los resultados obtenidos se puede establecer que la presencia de aflatoxinas constituye un problema importante en la inocuidad del maíz amarillo de la provincia de Los Ríos, Ecuador, pues los niveles obtenidos superan a los establecidos por varios países en el mundo (El tawila *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

El estudio permitió adaptar una metodología analítica para la determinación de la contaminación por aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂ utilizando derivatización electroquímica, método que no utiliza reactivos altamente tóxicos en el laboratorio.

La validación del método analítico demuestra que la técnica desarrollada es sensible y robusta, alcanzando límites de cuantificación ≤ a 1,2 µg/kg. La exactitud del método está en el rango de 71 a 77% de recuperación para los cuatro tipos de micotoxinas y la precisión estuvo entre el 2 al 11% en los tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) validado para cada aflatoxina, cumpliendo con las exigencias para técnicas de análisis de micotoxinas en productos alimenticios.

Existe contaminación por aflatoxinas en el maíz duro que

se produce en la provincia de Los Ríos. El 50% de las muestras analizadas presentaron contaminación, con un nivel promedio de aflatoxinas totales de 23,97 µg/kg, siendo AFLA B₁ quien presenta el mayor nivel de contaminación, superando en ciertos casos, lo establecido en varios países

como límite máximo para consumo humano y animal. De igual manera, el estudio demostró que existe incidencia menor de aflatoxinas AFLA B₂ y AFLA G₁. No se detectó la presencia de aflatoxina AFLA G₂ en esta zona del Litoral Ecuatoriano.

LITERATURA CITADA

- Abbas, H. K., Cartwright, R. D., Xie, W., y Thomas Shier, W. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*. 25(1):1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.02.009>
- Accinelli, C., Abbas, H. K., Vicari, A., y Shier, W. T. 2014. Aflatoxin contamination of corn under different agro-environmental conditions and biocontrol applications. *Crop Protection*. 63: 9-14. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.021>
- Al-Zoreky, N. S., y Saleh, F. A. 2017. Limited survey on aflatoxin contamination in rice. *Saudi Journal of Biological Sciences*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.010>
- Alam, S. S., y Deng, Y. 2017. Protein interference on aflatoxin B1 adsorption by smectites in corn fermentation solution. *Applied Clay Science*. 144:36-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2017.04.024>
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Cotty, P. J., y Bandyopadhyay, R. 2014. Field efficacy of a mixture of atoxigenic *Aspergillus flavus* Link:Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin contamination in maize (*Zea mays* L.). *Biological Control*. 72:62-70. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.009>
- Baca Guerrero, L. A. 2016. La producción de maíz amarillo en el Ecuador y su relación con la soberanía alimentaria. (Economista), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12652>
- Bianco, G., Russo, R., Marzocco, S., Velotto, S., Autore, G., y Severino, L. 2012. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon*, 59(6), 644-650. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.010>
- Chan, D., MacDonald, S. J., Boughtflower, V., y Brereton, P. 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1059(1):13-16. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.096>
- Chauhan, Y., Tatnell, J., Krosch, S., Karanja, J., Gnonlonfin, B., Wanjuki, I., Wainaina, J., y Harvey, J. 2015. An improved simulation model to predict pre-harvest aflatoxin risk in maize. *Field Crops Research*. 178:91-99. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2015.03.024>
- El tawila, M., Neamatallah, A., y Serdar, S. A. 2013. Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the holy city of Mekkah. *Food Control*. 29(1):121-124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.004>
- European Commission. 2003. Directive (EC) (Vol. No. 100/2003. 31, pp. 33-37): Off J Eur Union.
- European Commission. 2004. April amending Directive No. 683/EC laying down the sampling methods and the method of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs Official Journal of European Communities (Vol. 683/2004, pp. 3-5).

- Fon-Fay, V. F., Barzola, S. y Morán, J. 2016. La prevalencia de *Aspergillus* spp. y aflatoxinas en *Zea mays* L.(-maíz) almacenado en silos, en Ecuador. *Revista Publicando*. 3(7):189-202.
- Frehse, M. S., Martins, M. I., Ono, E. Y., Bracarense, A. P., Bissoqui, L. Y., Teixeira, E. M., Santos, N. J., y Freire, R. L. 2015. Aflatoxins ingestion and canine mammary tumors: There is an association? *Food and Chemical Toxicology*. 84:74-78. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.004>
- Garcia-Villanova, R. J., Cordon, C., Gonzalez Paramas, A. M., Aparicio, P., y Garcia Rosales, M. E. 2004. Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. *Journal Agricultural of Food Chemistry*. 52(24):7235-7239. doi: 10.1021/jf048882z
- Guo, B., Ji, X., Ni, X., Fountain, J. C., Li, H., Abbas, H. K., Lee, R. D., y Scully, B. T. 2017. Evaluation of maize inbred lines for resistance to pre-harvest aflatoxin and fumonisin contamination in the field. *The Crop Journal*. 5(3):259-264. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cj.2016.10.005>
- Holcomb, M., y Thompson, H. C. 1991. Analysis of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in rodent feed by HPLC using postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(1):137-140. doi: 10.1021/jf00001a026
- Ibáñez-Vea, M., Corcuera, L. A., Remiro, R., Murillo-Arbizu, M. T., González-Peñas, E., y Lizarraga, E. 2011. Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. *Food Chemistry*. 127(1): 351-358. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.157>
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2016. Información de superficie, producción y rendimiento. Retrieved 20/11, 2017, from <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/estructura-de-costos-de-produccion>
- Italian Ministerial Decree. 2004. Aflatoxinas (Vol. 149/2004, pp. 14–18): Ital Off J.
- Lee, K.-M., Davis, J., Herrman, T. J., Murray, S. C., y Deng, Y. 2015. An empirical evaluation of three vibrational spectroscopic methods for detection of aflatoxins in maize. *Food Chemistry*. 173:629-639. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.099>
- Lutfullah, G., y Hussain, A. 2012. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. *Food Control*, 23(1), 32-36. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.004>
- Molina-García, L., Córdova, M. L. F.-d., y Ruiz-Medina, A. 2012. Indirect determination of aflatoxin B1 in beer via a multi-commuted optical sensor. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 29(3):392-402.
- Murashiki, T. C., Chidewe, C., Benhura, M. A., Maringe, D. T., Dembedza, M. P., Manema, L. R., Mvumi, B. M., y Nyanga, L. K. 2017. Levels and daily intake estimates of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in maize consumed by rural households in Shamva and Makoni districts of Zimbabwe. *Food Control*. 72:105-109. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.040>
- Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Magro, S. L., Palermo, C., Centonze, D., y Palermo, D. 2009. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B(1), B(2), G(1) and G(2) in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 26(10): 1402-1410.
- Ng'ang'a, J., Mutungi, C., Imathiu, S., y Affognon, H. 2016. Effect of triple-layer hermetic bagging on mould infection and aflatoxin contamination of maize during multi-month on-farm storage in Kenya. *Journal of*

Stored Products Research. 69:119-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2016.07.005>

- Ok, H. E., Jung, H., Lee, S.-E., Peak, O., y Chun, H. S. 2016. Three liquid chromatographic methods for the analysis of aflatoxins in for different corn (*Zea mays*) matrices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 54:20-26. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.010>
- Sandoval, G. J. 2013. Determinación de aflatoxinas totales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (Químico de Alimentos), Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Soriano, J. M. 2007. *Micotoxinas en Alimentos* (Ediciones Días Santos Ed.). Madrid, España.
- Vallejo, M. J. 2012 Determinación de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentes en harina de maíz del sector Tumbaco mediante el uso de columnas de inmutioafinidad (IAC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). (Ingeniería en Biotecnología), Universidad de Fuerzas Armadas ESPE Sangolquí, Ecuador.