Guayaquil, 23 de diciembre de 2015.

Dr.
Raúl Intriago López.
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE GRADUADOS
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.

De mis consideraciones:

Por medio de la presente comunico a Usted que he procedido a la revisión final de la tesis titulada "AFLATOXINA B1, B2, G1, G2 EN ARROZ AL GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA.2014." de la egresada de la Maestría de Microbiología de la Dra. Paulina del Rocío Escobar Hinojosa.

Del análisis realizado a la presente esta cumple con las exigencias de la Facultad de Ciencias Médicas, por lo que está lista para ser sustentada cuando lo considere su autoridad.

Atentamente,

Dr. Carlos Mosquera Martínez.
DOCENTE

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE GRADUADOS
FECHA: 04 ENE 2016
HORA: 10H32
RECIBIDO POR:

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE GRADUADOS
TELEFAX: 042-288086
Guayaquil - Ecuador

Of.EG-205-Proy

Agosto 28 de 2014

Doctora
Paulina del Rocío Escobar Hinojosa
MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA MENCIÓN INDUSTRIAL
Ciudad

Por medio del presente oficio comunico a usted, que su ***ANTEPROYECTO*** de investigación titulado:

"AFLATOXINA B1, B2, G1, G2 EN ARROZ AL GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL CUENCA 2014".

Tutor: Dra. Lourdes Jerves Andrade

Ha sido Revisado y aprobado por la Dirección de Escuela de Graduados el día **25 de agosto del 2014**, por lo tanto puede continuar con la ejecución del **Borrador final** respectivo.
Revisor: Dr. Carlos Mosquera Martínez

Atentamente,

Dr. Ernesto Cartagena Cárdenas
DIRECTOR

C. archivo

Revisado y Aprobado	Dr. Ernesto Cartagena C.
Elaborado	Nadia Guerrero V.

Guayaquil, 23 de diciembre de 2015.

CERTIFICADO DEL TUTOR

En calidad de Tutora del Trabajo de Tesis, AFLATOXINA B_1, B_2, G_1, G_2 EN ARROZ A GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA. 2014; elaborado por la **Dra. Paulina del Rocío Escobar Hinojosa,** como requisito obligatorio para optar por el Título Magíster en Microbiología, mención Industria de la Universidad de Guayaquil.

CERTIFICO QUE: he revisado y realizado las correcciones pertinentes a la tesis final presentada por la Dra. Paulina Escobar Hinojosa, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a sustentación ante el Tribunal correspondiente.

Dra. Lourdes Jerves Andrade. Msc
TUTOR DE TESIS

PROGRAMA VLIR-IUC
COOPERACIÓN UNIVERSITARIA INSTITUCIONAL
Universidad de Cuenca-Universidades Flamencas
Proyecto "Alimentación, Nutrición y Salud "

CERTIFICO

Que la Dra. Paulina del Rocío Escobar Hinojosa, con Cédula de Identidad 0103469854, estudiante de la Maestría en Microbiología mención Industrial cursada en la Universidad de Guayaquil; ha desarrollado su trabajo de tesis titulado "AFLATOXINA B_1, B_2, G_1, G_2 EN ARROZ A GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA. 2014", en las instalaciones del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC de la Universidad de Cuenca. Es todo cuento puedo certificar en honor a la verdad.

Atentamente,

Dra. Silvana Donoso M. Msc.
DIRECTORA DEL PROYECTO

Cuenca, 21 de diciembre de 2015.

Av.12 de Abril - sector El Paraíso - Facultad de Ciencias Médicas - Dirección de Investigación - Area de Salud | **Teléfono:** (593-7) 405 1000 **Ext**: 3152-4124 | **Celular:** (09)999-12958 | **silvana.donosom@ucuenca.edu.ec**
Cuenca - Ecuador

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE GRADUADOS

TÍTULO:

"AFLATOXINA B_1, B_2, G_1, G_2 EN ARROZ AL GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA. 2014"

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA MENCIÓN INDUSTRIAL

AUTORA:

DRA. PAULINA DEL ROCÍO ESCOBAR HINOJOSA.

TUTOR:

DRA. MARÍA DE LOURDES JERVES ANDRADE. Mgt.

AÑO:

2015

GUAYAQUIL – ECUADOR

DEDICATORIA

El resultado de este trabajo es el esfuerzo de cada una de las personas que me han motivado a conseguir resultados y que los frutos se los ve a veces a corto y en otros casos a largo plazo, que no importa cuántos obstáculos asomen sino la forma de encontrar una solución y continuar. He aquí mi dedicatoria para todos y cada uno de Ustedes que siempre van en mi mente y corazón, aquellos que están presentes en este mundo y aquellos con los que me volveré a encontrar.

AGRADECIMIENTOS

Al ser supremo que guía cada instante de mi vida, a mi esposo Gustavo por su fé en mí , a mis queridos Anita y Jorge quienes a más de padres han sido mis amigos y soporte , mis hermanos Diana Ju y Sebastián cuyo apoyo siempre ha estado presente y me ha permitido levantarme y seguir.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 ANTECEDENTES 1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 3
1.3 OBJETIVOS 6
1.3.1 OBJETIVO GENERAL. 6
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 6
1.4 HIPÓTESIS 6
2. MARCO TEÓRICO 7
2.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE ARROZ 7
2.2 TAXONOMÍA 7
2. 3 APORTE NUTRICIONAL 8
2.4 SUPERFICIE Y PRODUCCIÓN EN EL ECUADOR. 8
2.5 VARIEDADES CULTIVADAS EN EL ECUADOR 8
2.7 EL ARROZ Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA 9
2.8 MICOTOXINAS 10
2.8.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS 10
2.8.2 CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS 11
2.9 AFLATOXINAS 12
2.9.1 AGENTES PRODUCTORES 13
2.9.2 ESTRUCTURA QUÍMICA 13
2.9.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD 14
2.9.4 EFECTOS EN LA SALUD HUMANA 14
2.9.5 INCIDENCIA EN ALIMENTOS 15
2.9.6 NIVELES MÁXIMOS ADMITIDOS 16
3. DISEÑO Y METODOLOGÍA 17
3.1 DISEÑO Y TIPO DE LA INVESTIGACIÓN 17
3.2 UNIVERSO 17
3.3 TAMAÑO MUESTRAL 17
3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN 17
3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN 17

3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN 18
3.5 MANEJO DE ESTUDIO 18
3.5.1 ASPECTOS ÉTICOS-LEGALES 18
4. MATERIALES Y MÉTODOS 19
4.1. LUGAR Y PERIÓDO DEL ESTUDIO 19
4.2. INSTRUMENTOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS 19
4.2.1. INSTRUMENTOS 19
4.2.2.1 Tratamiento de las muestras. 19
4.2.2.2 Análisis de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 19
4.2.2.3 Preparación de la muestra 20
4.2.2.4 Análisis por HPLC 20
4.2.2.5 Preparación de la curva de calibración. 22
4.2.3 Análisis de datos 23
4.3. RECURSOS 24
4.3.1. RECURSOS HUMANOS 24
4.3.2. EQUIPOS Y REACTIVOS 24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 26
5.1 GENERALIDADES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA 26
5.2 CONTAMINACIÓN DEL ARROZ CON MICOTOXINAS 26
5.2.1. ANÁLISIS DE AFLATOXINAS 26
6. CONCLUSIONES 32
7. RECOMENDACIONES 33
8. BIBLIOGRAFÍA 34
9. ANEXOS 40
9.1 PROCOLO DE MUESTREO 40
9.2 AUTORIZACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA TESIS 45
9.3 FICHA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS 46
9.4 FICHA DE RECOLECCIÓN DE RESULTADOS 47
9.5 RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ARROZ 48
10. GLOSARIO 51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Niveles de aflatoxinas en 90 muestras de arroz al granel. 27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Prevalencia de muestras positivas en los diferentes lugares de muestreo. 28
Gráfico 2. Relación entre la concentración de aflatoxinas y el tipo de almacenamiento. 29
Gráfico 3. Relación de aflatoxinas y el tiempo de almacenamiento en el lugar de expendio 30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programa de elución tipo gradiente. 21
Tabla 2. Características del Método Analítico 22
Tabla 3. Preparación de soluciones estándares para aflatoxinas. 23

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue cuantificar los niveles de aflatoxinas en arroz que se expende a granel en tiendas, abacerías y comisariatos ubicados en el Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca, con el fin de establecer los niveles de Aflatoxina B_1, B_2, G_1, G_2; durante el periodo de recolección Julio a Diciembre y que corresponden al segundo semestre del año 2014. La metodología a aplicarse consistió en una previa selección de locales de expendio, para luego realizar una recolección de muestras representativas de arroz. La técnica de determinación utilizada en el laboratorio fue Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), comparándose los resultados obtenidos con la normativa vigente y establecida por la Unión Europea para muestras de arroz, se realizó un análisis estadístico para su interpretación. La aflatoxina de mayor incidencia fue la Aflatoxina B_1, con una media de 0,1 µg/kg siendo más baja para Aflatoxina B_2 con un 0,03 µg/kg, para Aflatoxina G_1 con el 0,01µg/kg y con valor similar para Aflatoxina G_2 con 0,01µg/kg; por lo que se encuentran dentro de los límites establecidos por la Unión Europea para este cereal con un valor promedio de $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$: 4,0 µg/kg, y para Aflatoxina B_1 de 2 µg/Kg.

Palabras clave: Micotoxinas, aflatoxinas, arroz, HPLC

ABSTRACT

The aim of this study was to quantify the levels of aflatoxins in rice that is sold in small shops, stores, markets and supermarkets located around of "El Arenal" principal market of Cuenca, in order to establish the levels of Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2; during the period July to December of 2014. The methodology applied was a pre-selection of local outlets, and then make a collection of representative samples of rice. The determination technique used in the laboratory was high-performance liquid chromatography (HPLC), comparing the results obtained with current regulations and established by the European Union for rice samples, a statistical analysis was performed for results interpretation Aflatoxin highest incidence of Aflatoxin B_1, with a mean of 0.1 mg / kg being lower for Aflatoxin B_2 with 0.03 mg / kg for Aflatoxin G_1 with 0,01µg / kg and with a similar value Aflatoxin G_2 with 0,01µg / kg; so they are within the limits set by the European Union for this cereal, and an average value of $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$. 4.0 mg / kg and for Aflatoxin B_1 of 2 mg / kg.

Keywords: Mycotoxins, aflatoxins, rice, HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Los hongos pertenecen a un grupo de organismos eucariotas y pueden ser mohos, levaduras y setas. Estos se desarrollan en diferente hábitat convirtiéndoles en organismos capaces de ser saprófitos o patógenos.

El crecimiento de hongos en huéspedes como el hombre y animales produce las enfermedades llamadas micosis; a su vez son capaces de formar sustancias tóxicas, que dependiendo del tipo de exposición, ya sea dietética, respiratoria o dérmica, estos metabolitos generan las enfermedades llamadas micotoxicosis.

A diferencia de las micosis, las micotoxicosis son ejemplos de "envenenamiento por medios naturales" y por lo tanto son análogas a las patologías causadas por la exposición a los pesticidas o residuos de metales pesados. Los síntomas de una micotoxicosis dependerán del tipo de micotoxina, la cantidad y la duración de la exposición, la edad, la salud, y el sexo, genética, estado de nutrición y las interacciones con otros tóxicos.(1)

Sobre la base de estos incidentes, los consumidores, organismos reguladores, las autoridades y la comunidad científica se han interesado en los riesgos de salud relacionados con los mohos. El enfoque se encuentra en la contaminación de los alimentos por micotoxinas, hongos microscópicos, análisis en alimentos y fluidos biológicos, así como la acumulación de estas toxinas en la cadena alimentaria.(2)

Las micotoxinas por lo general entran en el cuerpo a través de la ingestión de alimentos contaminados, pero la inhalación de las esporas toxigénicas y el contacto dérmico directo también son rutas importantes. En la actualidad, más de 400 micotoxinas se identifican en el mundo; teniendo en cuenta su estabilidad al calor, estas sustancias constituyen un riesgo potencial para humanos y animales.

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que resultan de la proliferación de los hongos durante la producción y almacenamiento de alimentos, pueden producirse como contaminantes naturales. Las propiedades químicas y biológicas de las micotoxinas son variadas y sus efectos tóxicos son extremadamente versátiles. Estos efectos son carcinogenicidad, genotoxicidad, teratogenicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y la inmunotoxicidad. Además de ser peligrosas para la salud de los consumidores, provocan el deterioro de la calidad comercial de los productos contaminados, lo que implica fuertes pérdidas económicas.(3)

Las aflatoxinas (AF) fueron descubiertas en la década de 1950 y comienzos de 1960, cuando fueron identificados como agentes causales de la enfermedad "X del pavo" una epidemia, con la muerte de numerosos pavos, patos y pollos alimentados con dietas que contienen ciertos lotes de harina de maní originarias de América el Sur contaminadas con micotoxinas. Las investigaciones revelaron que la toxicidad se asoció con la presencia de *Aspergillus flavus*, y, además, que los extractos de cultivos del hongo aislado de la comida fueron capaces de inducir el síndrome.(4)

Dependiendo de sus niveles las aflatoxinas pueden afectar gravemente el hígado y provocar cáncer en los seres humanos y animales que ingieran alimentos contaminados, representando un problema de Salud Pública.(5)

Para la ejecución de este proyecto de investigación se ha planteado la recolección de las muestras de arroz en la ciudad de Cuenca, cuya población se caracteriza por una dieta basada en alto consumo de granos y cereales, para diferentes preparaciones culturales y gastronómicas. La investigación correspondió a un diseño no experimental de corte transversal, cuantitativa y de laboratorio.

Se procura que los datos obtenidos constituyan un aporte al desarrollo del conocimiento en este tema de Salud Pública poco explorado en nuestro país, que puedan ser utilizados como insumo para futuras investigaciones y contribuyan a impulsar políticas regulatorias y de vigilancia en materia de inocuidad de alimentos, en relación a sustancias tóxicas de ocurrencia natural con impacto directo sobre la salud humana.(6)

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En su definición básica, Inocuidad Alimentaria significa la garantía de que la ingesta de alimentos no cause daño a la salud de los consumidores, esto se puede alcanzar minimizando los riesgos biológicos, químicos y físicos en los procesos producción y almacenamiento.(7)

De todas las clases de contaminantes químicos, físicos y biológicos; los que han tenido menos atención son los de origen biológico, principalmente aquellos producidos como metabolitos secundarios por algunos hongos fitopatógenos que se desarrollan en los diferentes granos, ya sea en el campo o durante el almacenamiento.

Actualmente las micotoxinas están consideradas entre los compuestos de mayor importancia por ser contaminantes ampliamente distribuidos. Estos son un ejemplo de compuestos de origen natural pero a la vez considerados contaminantes. Las micotoxinas al igual que muchos otros compuestos tóxicos, no solamente se encuentran asociados a los cereales, también se les encuentran en otros alimentos como maíz, maní, chiles, café, leguminosas, frutas, alimentos deshidratados y muchos de estos constituyen la economía de varios países en desarrollo.(8)

Más de una especie de hongo puede producir la misma micotoxina y más de una micotoxina puede estar implicada en una intoxicación. Entre las muy diversas micotoxinas, las aflatoxinas han sido objeto de intensas investigaciones por su gran potencia hepatocarcinógena en ciertas especies animales, incluyendo al hombre. (9)

Actualmente existen más de 300 tipos de micotoxinas, las cuales suponen un riesgo para los consumidores humanos y son la causa de pérdidas importantes de los animales domésticos utilizados por el hombre como alimento. (10)

La mayoría de las micotoxinas son producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Aunque el número de micotoxinas caracterizadas es muy

grande, este estudio se centra en las aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 por su elevada toxicidad en hombres y animales.(11)

Existen 4 tipos de aflatoxinas (B_1, B_2, G_1, G_2). Las de tipo B fluorecen azul bajo la luz ultravioleta de onda larga y las de tipo G fluorecen verde. De todas ellas la de mayor toxicidad es la B_1. Las aflatoxinas son potentes carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos y grandes agentes destructores del hígado.(12)

El estudio de los hongos como tóxicos se inició en los años 60 con una intoxicación masiva que provocó la muerte de 100.000 aves en Inglaterra por la ingestión de pienso preparado con harina de maíz contaminada con *Aspergillus flavus*, detectándose un metabolito altamente tóxico al que denominaron aflatoxina.(13)

Existen alrededor de 150 tipos de mohos que son capaces de producir micotoxinas cuando se desarrollan en condiciones favorables. En el año 1977 la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) reportó las micotoxinas de mayor importancia: aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, zearalenona, patulina, tricotecenos y esterigmatocistina.(14)

Varios estudios han informado de niveles detectables de aflatoxinas y ocratoxina A en el arroz de diferentes países, entre ellos Cuba, Corea, Malasia, Sri Lanka , los Emiratos árabes Unidos, la India , y Costa de Marfil . Sugita-Konishi informaron de la contaminación natural de aflatoxinas y ocratoxina A en el arroz al por menor en 2004 y 2005.(15)

La importancia de este estudio radica en conocer la calidad de los alimentos que son consumidos por nuestra población, con especial atención a las aflatoxinas ya que al ser compuestos que no se observan a simple vista, pero que tienen consecuencias fatales para el organismo humano en concentraciones representativas en corto tiempo o la ingestión de bajas concentraciones pero en periodos prolongados; podrían desarrollar efectos cancerígenos, hepatotóxicos, mutagénicos y teratogénicos.

Debido a que la presencia de aflatoxinas en alimentos para consumo humano y animal representa un grave problema de Salud Pública, además de afectar sensiblemente la producción agropecuaria, es necesario aportar soluciones que permitan disminuir los efectos nocivos en la población expuesta por medio de la evaluación de los niveles de contaminación en tales alimentos.(16)

En la actualidad, el mundo está invadido de enfermedades causadas por el cáncer, lo que, sin lugar a dudas, afecta a los seres humanos de una forma muy drástica sin importar edad, sexo o raza.

Además afecta también a los animales que son criados para el consumo propio del hombre.
El cáncer es un problema de salud pública que puede ser causado por problemas genéticos, agentes externos carcinógenos, productos químicos, radiaciones o ciertos agentes infecciosos.

Este estudio se centra en determinar la presencian y los rangos de concentraciones de aflatoxinas, con el fin de sugerir mejor control sanitario en el proceso de almacenamiento de los establecimientos que se encargan de su comercialización y distribución. Así como sugerir el establecimiento de rangos y límites permisibles de aflatoxinas en este cereal.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la presencia y niveles de aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2 en arroz al granel en el Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca; durante los meses de Julio a Diciembre y que corresponden al segundo semestre de 2014.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Cuantificar los niveles de aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2 en arroz al granel comercializado en el Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca; durante los meses de Julio-Diciembre de 2014 mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Establecer el grado de cumplimiento de los criterios normativos internacionales en relación a los niveles máximos permitidos de aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2 en arroz, establecidos por la Unión Europea Nº 165/2010 .

1.4 HIPÓTESIS

Las muestras de arroz a granel recolectadas durante el segundo semestre del año 2014, que sean expendidas en el Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca presentan niveles de aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2 iguales o menores en relación a los límites establecidos en alimentos por la Unión Europea Nº 165/2010.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE ARROZ

El arroz de nombre científico ***Oryza sativa***, es una especie de la familia de las Gramíneas, subfamilia *Poaceae*, originaria de Asia y África, se trata de una planta herbácea anual cultivada en condiciones casi permanentes de inundación, con raíz delgada, fibrosa y fasciculada con abundantes pelos absorbentes, tallos rectos, huecos, adosados y nudosos, su macollamiento es en forma de candelabro, las hojas son angostas adheridas a los nudos dispuestas a lo largo del tallo, flores en panícula, y cuyo fruto comestible son los granos que constituyen la base de la dieta de la población mundial.(17)

En términos de cultivo y consumo, el arroz (*Oriza sativa*) es el cereal más cultivado después del trigo y principal alimento del 50 % de la población mundial. Los principales países productores son Cote d´Ivoire, Filipinas, Irán, Arabia Saudita, Brasil, Senegal, Japón e Indonesia .(18)

2.2 TAXONOMÍA

El género Oryza pertenece a la tribu de *Oryzeae* de la familia *Poaceae*. Hay 12 géneros dentro de la tribu *Oryzeae*. El género *Oryza* contiene aproximadamente 22 especies de las cuales 20 son especies silvestres y dos de ellas: *O. sativa* y *O. glaberrima*, se cultivan a nivel mundial.

En la variedad asiática se han seleccionado y buscado granos de mayor tamaño hasta obtener la especie *Oryza sativa*, que dio origen a tres razas diferentes: Índica, Japónica y Javánica. Los actuales cultivos de *Oryza sativa* se obtienen a través de cruzamientos y combinaciones interraciales y se distribuyen por todo el mundo. La variedad africana, *Oryza glaberrima*, que presenta una menor diversidad, se obtuvo a partir de la mezcla de dos especies silvestres. (19)

2. 3 APORTE NUTRICIONAL

Este cereal suministra el 20% de energía alimentaria, es decir, por cada 100 g de arroz hay un aporte de 360 kcal, su nutriente principal son los hidratos de carbono 79%, 7% de proteínas, 1% de grasas, y en arroz integral destaca 0,1-0,9% de fibra; también minerales y vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina). No obstante, se están realizando nuevos sistemas de procesamiento industrial del arroz descascarillado y nuevas especies transgénicas que preserven y añadan nutrientes.(20)

2.4 SUPERFICIE Y PRODUCCIÓN EN EL ECUADOR.

El arroz es el cultivo más extenso del Ecuador, ocupa más de la tercera parte de la superficie de productos transitorios del país. Según el Censo Nacional agropecuario del 2013, la superficie sembrada corresponde a 414.146 hectáreas, la superficie cosechada de 396.770 hectáreas y una producción anual de 1´516.045 toneladas métricas. Dando un rendimiento promedio anual de 3,82 Tm/ha. En la provincia del Guayas se concentra la mayor producción de arroz con el 69,96% del total nacional. (21)

2.5 VARIEDADES CULTIVADAS EN EL ECUADOR

En Ecuador el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) se encarga de la investigación y el desarrollo de nuevas y mejores variedades de arroz. Estas mejoras genéticas se basan en los requerimientos de agricultores y de los consumidores, tales como mayor rendimiento o mejor calidad. Actualmente hay muchas variedades como el INIAP 415 (CIAT, 1979), INAP11 (CIAT, 1989), INAP12 (CIAT, 1994), INIAP14 (IRRI, 2000), INIAP15 (INIAP, 2006), INIAP16 (INIAP, 2007) y la más reciente es la INIAP17 (INIAP, 2010). En general, cada nueva variedad representa una mejora significativa durante al menos un rasgo clave en la parte superior de los logros ya alcanzados.

Más que tener una mejor molienda y cualidades de cocción, estas variedades mejoradas tienen cada vez una mayor resistencia a las plagas locales, tales como virus hoja blanca y las condiciones climáticas adversas; también algunas variedades autóctonas como Donato y 1001, y las variedades que han sido importadas de países vecinos, como conejo, F-50 y Carvajal. (22)

2.6 CONSUMO EN EL ECUADOR

El arroz es un alimento básico para los ecuatorianos y la mayoría de la producción del Ecuador se consume localmente. Se espera que el consumo total puede llegar a 725 mil toneladas métricas (TM), en respuesta al aumento de la población.

El consumo per cápita en el Ecuador es de aproximadamente 5 TM por mes. Al igual que con el trigo y otras fuentes de hidratos de carbono, el consumo parece estar disminuyendo ligeramente entre la población ecuatoriana debido a consideraciones dietéticas. Las ventas de arroz se comercializan tradicionalmente a través de mayoristas en sacos de cien libras (45 kg) o a través de pequeñas tiendas por libras. Los precios varían dependiendo del canal de comercialización. Por ejemplo, el precio oficial mayor del saco de 100 libras es de $ 36 a 38, mientras que las ventas de la libra puede hacer crecer el precio a $ 50 por saco. Aproximadamente el 80 por ciento de las ventas de arroz se hacen en sacos o por la libra.

Además, como resultado de la expansión de supermercados en las principales ciudades de Ecuador, los hábitos de compra han cambiado hacia la compra de bolsas de marca de 2 o 5 kg. Se estima que 15 a 20 por ciento de las ventas totales de arroz ahora se realiza a través de los supermercados en estas presentaciones. Ecuador también está experimentando un aumento de la gama de variedades de arroz disponible para la compra. Las variedades de arroz son el arroz basmati, arroz salvaje, risotto, y el arroz de sushi pero las cantidades importadas son aún muy limitadas.(23)

2.7 EL ARROZ Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

El arroz constituye el componente más importante del régimen alimentario humano por lo que es necesario que sea seguro y de calidad aceptable para el consumidor. Deben aplicarse prácticas agrícolas adecuadas cuando se cultiva el arroz y se controlan las plagas. Después de la cosecha, la elaboración, el almacenamiento y la distribución eficientes en el lugar de producción se debe garantizar que la calidad. Por ejemplo, el secado inadecuado de los granos puede ocasionar el crecimiento de hongos.

Se estima que el cultivo y elaboración del arroz es también la fuente principal de empleo e ingresos para unos 2 000 millones de personas a nivel mundial. Los pequeños agricultores de los países en desarrollo producen y consumen aproximadamente el 90 por ciento del arroz mundial. En buena parte de los países más pobres de Asia, el 60 por ciento de las tierras de cultivo se dedican al arroz y los segmentos más pobres de la población gastan entre el 20 y el 40 por ciento de sus ingresos en dicho producto. (24)

2.8 MICOTOXINAS

El término de micotoxinas se refiere a una variedad de compuestos altamente tóxicos que son el resultado de un metabolismo secundario de origen fúngico y que son producidos en diferentes sustratos bajo ciertas condiciones climatológicas. La mayoría han sido identificadas como metabolitos secundarios de los *Fungi imperfecti*, entre los que cabe destacar particularmente los del género *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Claviceps, Alternaria, Neotyphodium, Stachybotrys, Myrothecium, Phoma* y *Diploidia*.

Las micotoxinas, que derivan de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente, son compuestos que tiene lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación.(25)

Las especies de aflatoxinas son conocidas por ser mutagénicas, cancerígenas y teratogénicas. La principal fuente de aflatoxinas para el ser humano y animales es la ingestión a través de la alimentación. Recientemente se ha identificado que la colonización de hongos producen compuestos de bajo peso molecular llamados metabolitos secundarios o micotoxinas, las cuales son moléculas muy largas pero no volátiles.(26)

2.8.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS

La clasificación considera aspectos basados en los mecanismos moleculares o activación biológica, así como la afinidad por organelos celulares, definiendo entonces, características toxicológicas y transformaciones metabólicas.

Según este criterio las micotoxinas se clasifican en:

a. Inhibidores de la producción de energía. Actúan inhibiendo la actividad de los adenosintrifosfatasa (ATPasa), inhibiendo en consecuencia, la fosforilación oxidativa celular y otros como citreoviridinas; luteoskirina, ergocromos, etc.

b. Inhibidores de síntesis de proteínas: Actúan inhibiendo ya sea al inicio de la síntesis, tricotecenos tipo I (ej.: verrucarina A, fusarenona-X, nivalenol, etc…), o inhibiendo la elongación y término de la proteína, tricotecenos tipo ET (ej.: deoxinivalenol, crotocina, verruvarol, etc…). Otras micotoxinas inhiben en forma competitiva la actividad de la fenilalanil-t RNA sintetasa (ej.: Ocratoxina A).

c. Modificador de citoesqueleto. Actúan modificando las funciones de los microfilamentos y microtúbulos celulares. Ejm: griseofulvina, citocalasinas, cloropeptido.

d. Micotoxinas estrógenicas. Provocan respuestas de crecimiento de masa en el útero y de alteración de niveles circulantes de hormonas. Ejm: zearalenona.

e. Generadores de temblor (tremorgenos) Actúan sobre el sistema nervioso central induciendo temblores generalizados en animales. Ejm: penitrem A.

f. Micotoxinas cancerígenas. Provocan desarrollo de tumores en hígado y en corteza renal. Ejm: aflatoxinas, esterigmatocistina. (27)

2.8.2 CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

En general los hongos pueden crecer y producir toxinas en un amplio rango de sustratos. Las especies fúngicas toxicogénicas que se encuentran más frecuentemente en los alimentos pertenecen a los géneros *Aspergillus, Fusarium y Penicillium.* El contenido en humedad, pH, temperatura, presencia de oxígeno y tiempo para el crecimiento fúngico son los factores ambientales más críticos que determinan la producción de micotoxinas en un sustrato. (28)

Además otros factores importantes son la constitución del sustrato, la integridad del grano, el daño mecánico térmico, cantidad de inóculo de hongo, la cepa de hongo, así como la acción e interacción del hongo con el sustrato.

La presencia de un hongo toxicogénico en un alimento indica un posible peligro potencial, pero el diagnóstico final se puede realizar por la identificación de la toxina específica, ya que la presencia del hongo no indica por sí misma que haya evidencia de producción de toxinas. Una determinada toxina puede persistir en el sustrato aunque el

hongo que la ha producido no subsista mucho tiempo; un determinado hongo puede ser capaz de producir más de una toxina, y una determinada toxina puede estar producida por hongos de diferentes géneros. La mayoría de los productos agrícolas pueden ser susceptibles de contaminación casi en cualquier momento, desde su producción en el campo, durante la cosecha, en el transporte y almacenamiento. (29)

Los rangos de temperatura mínima para el crecimiento de *A. parasiticus* es 6.8° C, el máximo es de 44-46° C, y el óptimo es de 25-35° C. *A. flavus* puede producir aflatoxinas en una amplia gama de temperatura entre 12° C y 34° C e inhibir la producción de aflatoxina a 36 ° C mientras que la producción máxima es a una temperatura de 28-30° C. Hay muchos factores que afectan el crecimiento de los hongos del género Aspergillus y el nivel de contaminación por aflatoxinas en los alimentos. Los factores que afectan a la contaminación por aflatoxinas son el clima de la región, el genotipo del cultivo plantado, tipo de suelo, temperaturas mínimas y máximas diarias, y la evaporación neta diaria. La contaminación por aflatoxinas también es promovido por el estrés o daño a la cosecha debido a la sequía antes de la cosecha, la actividad de insectos, mal momento de la cosecha, fuertes lluvias en la cosecha y poscosecha, y el secado inadecuado antes de su almacenamiento; sumado a ello la humedad, temperatura, aireación durante el secado y el almacenamiento siguen siendo los factores más importantes. (30)

2.9 AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son las micotoxinas de más amplia distribución en el mundo, contaminantes en muchos tipos de alimentos, por lo que son las más estudiadas *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son los agentes más frecuentemente implicados en la contaminación por aflatoxinas.(31)

Las especies de *Aspergillus* son capaces de crecer en una variedad de sustratos y bajo una variedad de condiciones ambientales. Por lo tanto, la mayoría de los alimentos son susceptibles a los hongos aflatoxigénicos, en alguna etapa de la producción, procesamiento, transporte y almacenamiento.(32)

2.9.1 AGENTES PRODUCTORES

Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus* son los agentes más frecuentemente implicados en la contaminación por aflatoxinas. *Aspergillus flavus* puede ser dividido en dos morfotipos distintos, las cepas S y L. Cada morfotipo está compuesto por linajes clonales (Grupos vegetativos compatibles GVC) definida por un sistema de compatibilidad vegetativa que limita el flujo de genes entre individuos similares. Ambos morfotipos y GVC difieren en varias características; y más frecuentemente estudiado por su capacidad de producción de micotoxinas. La cepa S, en promedio, produce concentraciones mucho más altas de aflatoxinas que la cepa L. En consecuencia, si la cepa S comúnmente infecta un cultivo vulnerable, este morfotipo es un objetivo primordial de la gestión de la contaminación por aflatoxinas. Miembros de diferentes cepas L-GVC varían ampliamente en su capacidad de producir aflatoxinas. Algunos miembros de la cepa L-GVC produce grandes cantidades de aflatoxinas y otras escasa cantidad. Los morfotipos aislados que no producen aflatoxinas se denominan "atóxicas". (33)

2.9.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

Constituyen un grupo de compuestos fluorescentes químicamente relacionados con estructuras de difuranocumarinas. Las más importantes son las aflatoxinas B_1 (AFB_1), B_2 (AFB_2), G_1 (AFG_1) y G_2 (AFG_2), que son halladas frecuentemente unidas en diferentes proporciones en los alimentos contaminados. La AFB_1 es la más frecuente y tóxica. Su nomenclatura está basada en sus propiedades físico-químicas, ya que las B presentan fluorescencia azul (*blue*) y las G fluorescencia verde *(green)* cuando se observan bajo la luz ultravioleta. El subíndice 1 indica mayor movilidad cromatográfica que el 2.(34)

Actualmente, se han identificado 18 tipos diferentes de AF, de las cuales solo 6 tienen significación como contaminantes de los alimentos: las AF del grupo B (B_1 y B_2), G (G_1 y G_2) y M (M_1 y M_2). La numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa. Las AF del grupo M son metabolitos del grupo B. La aflatoxina B_1 (AFB_1), al igual que la G_1 (AFG_1), es resultado del metabolismo de los hongos micotoxigénicos. Las aflatoxinas B_2a y G_2a (AFB_2a y AFG_2a) se forman a partir de B_1 y G_1, respectivamente, en medios fuertemente ácidos.(4, 35)

2.9.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD

Las aflatoxinas son absorbidas en el tractogastrointestinal debido a su alta liposolubilidad, son biotransformadas en el hígado por enzimas microsomales de la superfamilia del citocromo P450 entre las que se encuentran CYP1A2, 3A4, 3A5 y 3A7. Las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP3A4 que interviene en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ_1. La CYP1A2 forma en su mayoría la forma endoepóxido y la AFM_1. En humanos adicionalmente se producen otros metabolitos como son aflatoxicol, AFP_1, AFB2á y $AFB_{1\text{-}2,2}$ dihidrodiol, el tiempo de vida media plasmática para la AFB_1 es de 36.5 minutos, su volumen de distribución 14 por ciento del peso corporal y el aclaramiento de la dosis total de AFB_1 se excreta en una semana. La AFM_1 se excreta en las 48 horas siguientes a la ingestión y representa entre el 1-4 por ciento de la AFB_1 ingerida.(36)

Los cuadros hemorrágicos asociados con las aflatoxinas se explican por la estructura de la molécula de AFB_1 (un dihidrofurano con una estructura cumarínica), que inhibe los factores de coagulación dependientes de la vitamina K, además, está implicada en la disminución en la síntesis de fibrinógeno y otros aspectos de la coagulación a nivel hepático.(31)

Las dosis altas de aflatoxinas producen daño hepático severo, mientras que dosis bajas prolongadas provocan reducida tasa de crecimiento y agrandamiento del hígado. En los brotes de corto plazo, las muertes se producen después de un corto período de falta de apetito. Los vasos sanguíneos se rompen, causando una hemorragia interna, y la ictericia a menudo se desarrolla. Brotes menos graves son más habituales, y condiciones como debilidad, pérdida de apetito. Dificultades respiratorias a menudo se desarrollan, y la respuesta al tratamiento es generalmente pobre.(37)

2.9.4 EFECTOS EN LA SALUD HUMANA

Dentro del grupo de aflatoxinas la de mayor importancia en salud pública es la aflatoxina B_1, ésta se relaciona con el desarrollo de carcinoma hepatocelular en poblaciones que consumen alimentos contaminados. Su mecanismo de acción tóxica, involucra la formación de ligandos entre uno de sus metabolitos, producido en el hígado luego de la ingestión de la toxina, con el ADN de los hepatocitos, causando alteraciones

en su replicación, está clasificada dentro del grupo I según la IARC, por su efecto carcinogénico para humanos y animales.(38)

Cada año en el mundo se presentan 250 mil casos nuevos de cáncer hepático, de los cuales más de 190 mil ocurren en países en desarrollo, principalmente África y China. En América Latina, se registra el cáncer de hígado en el cuarto lugar de muerte por cáncer, sin que esto se asocie a altas tasas de hepatitis B, cirrosis u otras enfermedades hepáticas. A pesar de que más del 60 por ciento se codifica como cáncer de hígado no especificado como primario ni como secundario, con frecuencia el cáncer secundario por metástasis se diagnostica y luego se codifica como primario cuando en realidad se trata de lesiones malignas producto de una lesión de origen no determinado de diagnóstico tardío.(36)

En nuestro país las investigaciones que se han efectuado sobre la presencia de aflatoxinas en los alimentos y su efecto en la salud humana son muy pocos. Sobresalen los trabajos del Dr. Gonzalo Sierra Briones (Universidad Agraria), que en 1994 comprueba que en algunas muestras de alimentos tomados al azar en un mercado de carnes, vísceras y alimentos procesados había *Aspergillus flavus*. También el Dr. Ramón Lazo (Universidad de Guayaquil), a partir de 1965 hace estudios investigativos no solo de *Aspergillus* sino de otras micotoxinas provenientes de otros géneros de hongos y su incidencia en la salud humana. Así mismo encontramos diversos trabajos del Dr.Jefferson Aragundi (Universidad de Quevedo) y de los Ingenieros L. Arauja, J. Delgado y F. Maza (Universidad de Machala) que observan la presencia de aflatoxinas tanto en alimentos para animales como en alimentos de consumo humano.(39)

2.9.5 INCIDENCIA EN ALIMENTOS

Las aflatoxinas son frecuentemente aisladas de alimentos como maíz, arroz, maní y otros, que han tenido un mal manejo post-cosecha. La presencia de aflatoxinas en los cereales está asociada, tanto a las condiciones de almacenamiento inadecuadas, como a la contaminación del producto en el campo. Los factores que afectan la contaminación de los granos incluyen la cantidad de esporas inoculadas, la tensión durante el crecimiento de las plantas, las poblaciones de insectos y ácaros, los daños causados por

otros hongos, las variedades susceptibles o resistentes de las plantas, el daño mecánico, el daño por tormenta, el daño por aves, la nutrición mineral de la planta y la temperatura ambiente.(40)

2.9.6 NIVELES MÁXIMOS ADMITIDOS

El valor límite es la suma de todas las aflatoxinas con un valor promedio de $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$: 4,0 µg/kg., determinado por las normativas de la Unión Europea y para aflatoxina B_1 es de 2 µg/Kg para alimentos como cereales entre ellos el arroz.(41, 42)

3. DISEÑO Y METODOLOGÍA

3.1 DISEÑO Y TIPO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación correspondió a un diseño no experimental de corte transversal; cuantitativa y de laboratorio.

3.2 UNIVERSO

El universo estuvo constituido por los 112 locales de expendio de víveres y distribuidoras de arroz en el Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca, el cual es considerado como el principal centro de suministro de víveres tanto para la población cuencana como para otros sectores de la Provincia del Azuay. Para ellos se determinaron los locales tanto internos y externos del mercado, que tenían entre sus productos de venta esta gramínea.

3.3 TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño de la muestra estuvo compuesto por un total de 90 especímenes. Estas fueron recolectadas durante seis meses, en cada mes se analizaron 15 de ellas; cumpliendo los criterios de inclusión y exclusión, aplicando el procedimiento descrito en el Anexo (9.1).

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todas las muestras expendidas en tiendas, abarrotes y comisariatos que se encuentren dentro del área del mercado y durante el período de estudio.

Muestras con identificación de origen, número de muestra, fecha de recolección, código de identificación y correctamente embaladas.

3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Aquellas muestras que no pertenecen al universo o recolectadas fuera del periodo establecido.

Muestras que no posean identificación de origen, fecha de recolección, código de identificación y no se hallen correctamente embaladas.

3.5 MANEJO DE ESTUDIO

3.5.1 ASPECTOS ÉTICOS-LEGALES

La presente investigación no pretende afectar de ninguna manera a las marcas comerciales por lo que su mención es excluida, las muestras fueron identificadas por código y los datos manejados con absoluta confidencialidad.

Así también se cuenta con la autorización de la Dra. Silvana Donoso Moscoso, Directora del Laboratorio de Alimentos del Proyecto VLIR-IUC "Alimentación, Nutrición y Salud" ubicado en la Quinta de Balzaín de la Universidad de Cuenca para la ejecución de los análisis en el laboratorio. Anexo (9.2).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LUGAR Y PERIÓDO DEL ESTUDIO

La investigación se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Proyecto VLIR-IUC "Alimentación, Nutrición y Salud" ubicado en la Quinta de Balzaín de la Universidad de Cuenca, Calle Víctor Manuel Albornoz, en la ciudad de Cuenca, perteneciente a la Provincia del Azuay, teléfono (07)4051000 ext. 4124-3152.

Las muestras fueron recolectadas durante un periodo de seis meses que correspondieron al segundo trimestre del año 2014. Un promedio de 15 muestras mensuales fueron recolectadas el primer sábado de cada mes, ya que es el día de mayor afluencia al lugar de muestreo.

4.2. INSTRUMENTOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

4.2.1. INSTRUMENTOS

Se utilizó una ficha de recolección de datos y de resultados Anexo (9.3).Anexo (9.4).

4.2.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

4.2.2.1 Tratamiento de las muestras.

Las muestras de arroz fueron almacenadas en condiciones de temperatura y ambiente seco (20°C), dentro de fundas plásticas. Una vez recolectadas todas las muestras por cada mes, fueron finamente molidas y almacenadas en fundas de papel debidamente etiquetadas a temperatura ambiente hasta su análisis.

4.2.2.2 Análisis de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2

Los análisis se realizaron utilizando un Cromatógrafo Líquido de Alta resolución (HPLC) en fase reversa con detector de fluorescencia que permite realizar la determinación de la aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2 en la misma corrida del equipo. Para ello se utilizó el protocolo estandarizado para el análisis de aflatoxinas. (43-45)

4.2.2.3 Preparación de la muestra

- *Extracción:* en un una botella de vidrio tapa rosca se colocó 20 g. de arroz finamente molido con 40 mL de una mezcla metanol/agua (80:20, v/v). Se agitó vigorosamente por un minuto y se adicionó 2 g. de NaCl. Agitamos nuevamente por un minuto. Seguidamente, la mezcla se colocó en el agitador horizontal por 10 minutos a 300 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se filtró la mezcla (papel filtro Whatman No.1) y el filtrado fue centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm.
- *Dilución:* Se tomó 5mL del sobrenadante y se añadió 25mL de Buffer de fosfato (PBS-pH 7.4).
- *Lavado (clean-up):* la muestra diluida fue purificada por medio de cartuchos de inmunoafinidad (IAC), los cuales fueron previamente lavados con 1 mL de PBS. A continuación se hizo pasar el extracto diluido a través del cartucho a una velocidad de flujo de 2-3 mL/min. Se realizó un lavado posterior con 10 mL PBS seguido de 10 mL de H_2O tipo I, a una velocidad de flujo de 5 mL/min. Se aplicó una ligera corriente de vacío en el cartucho (10 segundos). Finalmente las aflatoxinas fueron eluídas del cartucho con 1 mL de metanol en 2 pasos de 0.5 mL cada uno dejando en contacto el metanol con el cartucho por 1 minuto antes de la elución. Finalmente, se hizo pasar por el cartucho 0.5 mL de H_2O que se recolectaron conjuntamente con el eluido. El extracto final (1.5 mL) fue evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.
- *Derivatización:* El extracto puro y seco fue redisuelto con 200 µL de hexano y se añadió 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla fue homogeneizada usando un vortex por 30 segundos. Finalmente el extracto derivatizado fue evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.

4.2.2.4 Análisis por HPLC

Para el análisis de aflatoxinas, el residuo seco fue reconstituido con 1000 µL de una mezcla metanol/agua ($MeOH/H_2O$, 1:1, v/v) y homogeneizado en un baño ultrasónico a 30°C por 10 minutos. El extracto reconstituido fue filtrado a través de un filtro de poro 0.45 µm y colocado en un vial de HPLC. Finalmente, un volumen de 5 µL fue

inyectado en el HPLC. La separación cromatográfica se realizó en una columna ZORBAX Eclipse Plus C_{18} (250 mm x 4.6 mm x 5 µm tamaño de poro). La temperatura de la columna para el análisis fue 40 °C. La separación se consiguió con una elución de tipo gradiente a una velocidad de flujo de 1,2 mL min^{-1} usando las siguientes fases móviles: (Tabla 1)

Fase móvil A. mezcla de agua/metanol/acetonitrilo (H_2O/MeOH/ACN, 89:10:1, v/v/v);

Fase movil B. acetonitrilo (ACN)

Fase movil C. metanol (MeOH).

Las aflatoxinas fueron detectadas a una longitud de onda de 365 nm de excitación y 455 nm de emisión para AFG_2 y AFB_2 y 432 nm de emisión para AFG_1 y AFB_1. El análisis tuvo una duración total de 18 minutos.

Tabla 1. Programa de elución tipo gradiente.

	Fase Móvil		
Solvente	**A**	**B**	**C**
Minutos	H2O/MeOH/ACN (89:10:1, v/v/v)	ACN	MeOH
0-1	59 %	25 %	16 %
1-10	14 %	70 %	16 %
10-13	14 %	70 %	16 %
13-13.5	59 %	25 %	16 %
18	59 %	25 %	16 %

El método estandarizado presenta las siguientes características analíticas:

Tabla 2. Características del Método Analítico

Características del método analítico de aflatoxinas					
		AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2
Límite de detección	µg/kg	0,55	0,59	0,77	0,90
Límite de cuantificación	µg/kg	1,95	1,85	1,45	1,80
Precisión intra-día (repetibilidad)	% CV	9	10	4	9
Precisión inter-día	% CV	10	15	10	19
Rango lineal	µg/kg	0,2 - 4	0,2 - 4	0,2 - 4	0,2 - 4
Linealidad (R^2)	-	0,989	0,9908	0,9947	0,9881
Recuperación (recovery)	%	75	31	67	43

4.2.2.5 Preparación de la curva de calibración.

Se prepararon soluciones estándar de aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2, a partir de una solución madre de 0.1 mg/mL. Cada estándar fue reconstituido con acetonitrilo. Para la curva de calibración de aflatoxinas se partió de una mezcla de estándares secos de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 de 100 µL , para llegar a 5000 ng/mL y se disolvió con 1000 µL de acetonitrilo (dilución 1/10) consiguiendo una solución estándar de 500 ng/mL, de la cual se prepararon las siguientes diluciones: 75, 50, 40, 25, 20, 15, 10, 7.5, 5 , 2.5, 1, 0.5 y 0.1 ng/mL (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de soluciones estándares para aflatoxinas.

Concentración (ng/µL)	Stock 500 ng/mL	MeOH/H_2O (1:1)
75	150	850
50	100	900
40	80	920
25	50	950
20	40	960
15	30	970
10	20	980
	10 ng/mL	
7.5	750	250
	50 ng/mL	
5	100	900
	5 ng/mL	
2.5	500	500
1	200	800
0.5	100	900
	1 ng/mL	
0.1	100	900

4.2.3 Análisis de datos

El cálculo del nivel de contaminación de aflatoxinas se hizo siguiendo la siguiente ecuación:

$$C\ (\text{ng/g}) = \frac{C_l\ (\text{ng/mL})}{g\ (\text{g/mL})}$$

Donde C_1 = concentración de micotoxina presente en la alícuota inyectada; g = gramos de muestra por mililitro en la inyección. Los gramos por mililitro al momento de la inyección fueron 1 g para aflatoxinas.

El análisis de los resultados incluyó estadística descriptiva para presentar las características de almacenamiento. Los resultados se presentaron con medidas de tendencia central y con tablas de contingencia. Los resultados individuales para cada muestra se indican en el Anexo (9.5).

4.3. RECURSOS

4.3.1. RECURSOS HUMANOS

El personal humano que colaboró con esta investigación fue conformado por la estudiante de tesis, directora y revisor de tesis, así como el personal de laboratorio.

4.3.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

Los equipos y reactivos se detallan a continuación:

EQUIPOS	**MARCA**	**MODELO**	**SERIE**
HPLC	AGILENT	1200	DEGASSER G1322A (S/N: JP73068385), QUAT PUMP G1311A (S7N: DE62969189), ASL G1329A (S/N: DE64771509), TCC G1316A (S/N: DE63073692), DAD G1315D (S/N: DE64260378), FLD G1321A (S/N: DE60558493)
Columna	AGILENT	ZORBAX SB-C18	884950-567
Generador de Nitrógeno	DOMNICK HUNTER	G4510 W	10LN0027
Balanza analítica	BOECO	BBL31	2240420
Purificador de agua tipo 1	BARNSTEAD	D11931	1370
Destilador de agua	FANEM	724	TAE-48874
Refrigeradora	INDURMA	RI-425	1056003380088
Vortex	VELP SCIENTIFICA	F202A0173	146526

Cámara de extracción de humos y vapores.	NOVATECH	CE-180EA	055646
Micropipeta	SUMEDIX	5-50 uL	175793
Micropipeta	SUMEDIX	100-1000 uL	334583
Centrífuga	HETTICH	EBA 20	0010263-01-00
Agitador horizontal	VWR	3500	090723008
Cámara de extracción al vacío (Manifold)	WATERS	S/N	S/N

REACTIVOS
Metanol grado HPLC
Acetonitrilo grado HPLC
Agua tipo I
Ácido Trifluoroacético grado HPLC
Cloruro de sodio grado HPLC
Buffer Fosfato salino (PBS)
Estándar de aflatoxina B_1, B_2, G_1, G_2
Columna de inmunoafinidad para aflatoxinas
Columna ZORBAZ C18 Agilent

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 GENERALIDADES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

De un total de 90 muestras de arroz que fueron analizadas utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución, 34 muestras resultaron positivas para aflatoxinas totales, para aflatoxina B_1 25/90, para B_2 9/90, G_1 y G_2 3/90 respectivamente. La población estudiada corresponde a las muestras recolectadas de tiendas, abastos y comisariatos del Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca, el mismo que está constituido por 112 locales de expendio de víveres.

El producto escogido para esta investigación fue el arroz de consumo que se expende en los diferentes locales ubicados dentro del mercado durante los meses de Julio a Diciembre del 2014.

La mayor concentración de muestras provino de las tiendas 80%, seguido de los abastos 14,44% y finalmente los comisariatos con un 5,56%, donde las condiciones como almacenamiento y ambiente influyen en la presencia de aflatoxinas en las muestras recolectadas.

5.2 CONTAMINACIÓN DEL ARROZ CON MICOTOXINAS

5.2.1. ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

Las tasas de contaminación, media, SD y todos los rangos de aflatoxinas en las muestras de arroz analizadas se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Niveles de aflatoxinas en 90 muestras de arroz al granel.

Aflatoxina	Media	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Aflatoxina B_1 (µg/kg)	0,12	0,11	1,28	0,25
Aflatoxina B_2 (µg/kg)	0,03	0,10	0,59	0,11
Aflatoxina G_1 (µg/kg)	0,01	0,23	0,45	0,06
Aflatoxina G_2 (µg/kg)	0,01	0,19	0,45	0,06
Aflatoxinas B_1,B_2, G_1, G_2 (µg/kg)	0,04	0,16	0,69	0,05

La aflatoxina de mayor incidencia fue la aflatoxina B_1, con una media de 0,12 µg/kg siendo más baja para aflatoxina B_2 con un 0,03 µg/kg, para aflatoxina G_1 con el 0,01 µg/kg y con valor similar para aflatoxina G_2 con 0,01µg/kg, información que orienta hacia una incidencia baja de aflatoxinas en este cereal, según los parámetros establecidos por la Unión Europea.

En general los datos de contaminación en el arroz de consumo fueron considerablemente bajos, sugiriendo una reducción sustancial en la contaminación de micotoxinas con el proceso de pilado o descascarado del arroz como se describe en otros estudios.(46, 47)

A nivel del país se posee escasa información en relación a los niveles de contaminación de aflatoxinas en arroz de consumo. Solo una muestra analizada presentó una concentración de 1.28 µg/kg para AFB_1, pero que no llega a sobrepasar el límite de 2 µg/kg para AFB_1 establecido por la Unión Europea para arroz.

En general los rangos de contaminación de arroz de consumo son considerablemente bajos , lo que sugiere una reducción de aflatoxinas con el proceso de pilado, tal y como se describe en otros estudios .(46, 47)

El gráfico 1 indica que una mayor presencia de Aflatoxina B_1, B_2, G_1, G_2 a nivel de las muestras recolectadas en las tiendas, seguida de los abastos con presencia para aflatoxina B_1 y B_2, y con un nivel muy bajo para los comisaritos ya que representan un número menor en proporción con otros locales.

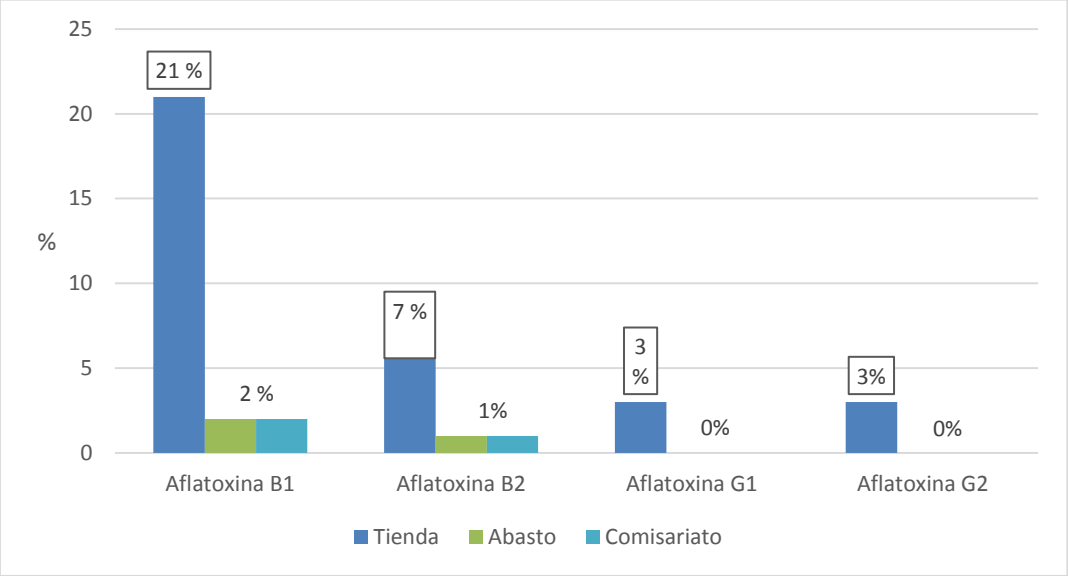


Gráfico 1. Prevalencia de muestras positivas en los diferentes lugares de muestreo.

A pesar de haberse encontrado aflatoxinas en otros tipos de alimentos; los niveles encontrados en este estudio son similares a otros realizados en Venezuela donde se evidenció la presencia de aflatoxinas en arroz con cáscara en una concentración de 0,22µg/g pero aun manteniéndose por debajo de la norma dictada por la Unión Europea. (48)

El uso de buenas prácticas de cultivo y almacenamiento de alimentos puede reducir el riesgo de contaminación por micotoxinas. Formas de prevenir la contaminación fúngica en los distintos subgrupos de arroz residen principalmente en la adopción de buenas prácticas agrícolas de secado y almacenamiento.(49)

En alimentos como el arroz posee mayor capacidad de contaminación microbiológica y por ende fúngica. El uso de fungicidas en las plantaciones de arroz podría ser una de las razones para encontrar una baja incidencia de aflatoxinas en las muestras. (50)

El Gráfico 2 indica la presencia de aflatoxinas en los diferentes contenedores donde se encuentran las muestras para la venta al público; la mayor contaminación se registró en las nuestras de fundas plásticas para la aflatoxina B_1 con un 18.89%, seguido de la aflatoxina B_2 con un 5, 56%. En los recipientes como sacos y tanques de madera se obtuvo una contaminación del 3.33% para aflatoxina B_1, mientras que para B_2 en sacos y tanques de madera fue de 1, 11% y 3,33% respectivamente. En tanques de acero inoxidable se aprecia la ausencia de aflatoxinas B_2, G_1 y G_2. Los ejemplares que se encontraban en tanques plásticos demostraron ausencia de aflatoxinas La no presencia de aflatoxina G_1 también se evidencio en las muestras recolectadas de tanques de madera.

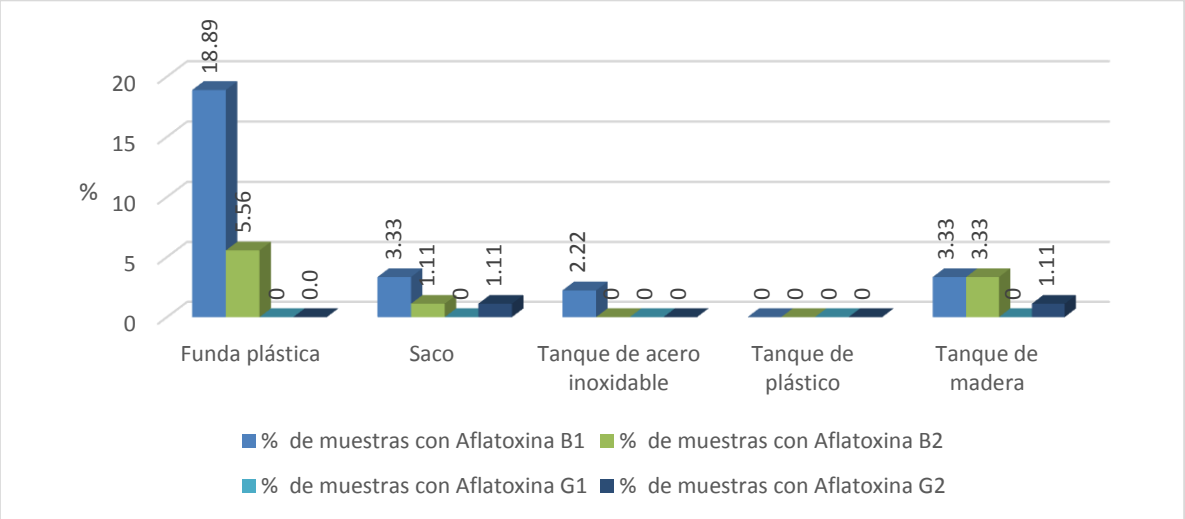


Gráfico 2. Relación entre la concentración de aflatoxinas y el tipo de almacenamiento.

En una investigación realizada se encontró que 12 de 56 muestras contaminadas con aflatoxinas provenientes de contenedores de paja de arroz tejida , ollas de barro , hierro y sacos de yute .(51)

La presencia de aflatoxinas en las muestras de arroz recolectadas de los diferentes recipientes de almacenamiento puede producirse cuando se expone el producto almacenado a diferentes temperaturas; la humedad relativa del aire que circula por el arroz almacenado tiende a equilibrarse con la humedad propia del grano; así también la cantidad de agua presente en forma de vapor puede incrementar con la temperatura,: el agua se condensa de esta forma sobre los granos y sobre las paredes de los recipientes fríos lo que puede dar paso a una nueva contaminación fúngica.(17)

En el grafico 3 la presencia de aflatoxina B_1 fue mayor durante el tiempo de almacenamiento de 0-3meses con un 20% de muestras positivas, en comparación con las muestras almacenadas durante 3-6 meses que fue del 7.78%. Las Aflatoxinas B_2, G_1 y G_2 mostraron igual comportamiento que B_1 haciendo su presencia como muestras positivas durante el tiempo de almacenamiento de 0-3 meses. Cabe destacar que el periodo de almacenamiento corresponde al tiempo que el producto permanece a la venta y que la presencia de aflatoxinas en el periodo de 0-3 meses es más alta que en el de 3-6 sin considerar el tiempo que las muestras de arroz han sido almacenadas previamente y corresponden al arroz con mayor tiempo de almacenamiento en las bodegas de las piladoras antes de ser colocadas a la venta.

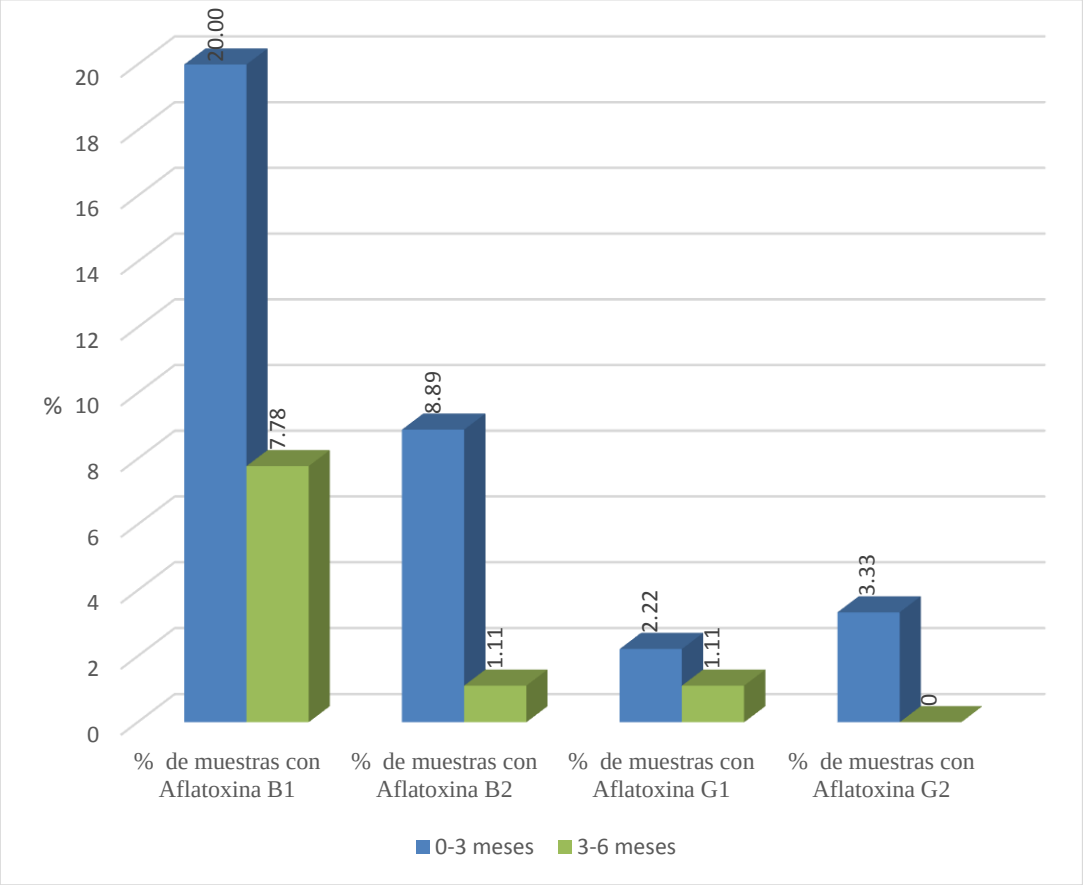


Gráfico 3. Relación de aflatoxinas y el tiempo de almacenamiento en el lugar de expendio.

En estudios realizados se ha informado de que el aumento en la formación micotoxinas puede deberse por las fuertes lluvias, retraso en el almacenamiento y altos contenidos de humedad durante el almacenamiento. (51)

En una investigación donde se evaluó la relación entre la contaminación aflatoxinas y el almacenamiento de arroz de grano entero recogidos en Liaoning en China, las muestras de arroz sin cáscara almacenadas durante 1-10 años evidenció una concentración inicial de 2,79-2,93 mg/kg y terminando con una concentración más alta de 6,23 mg/kg después de 7-8 años de almacenamiento.(52)

En otro estudio se observó cómo los métodos de secados utilizados en el proceso del arroz proporcionó altos niveles de contaminación durante el almacenamiento con aflatoxinas, medias alrededor de 13,7 mg/kg para AFB_2 y 14,5 mg/kg AFG_1, respectivamente fueron determinadas después de 6 meses de almacenamiento.(53)Se debe tomar en cuenta que las muestras analizadas no corresponden a un muestreo sistemático, ni a un monitoreo permanente de la calidad e inocuidad del arroz, sino que corresponden a un muestreo puntual. Existe la posibilidad de que los resultados presenten variaciones según la época del año, condiciones climáticas y ambientales en el lugar de toma de muestra, por lo que se debe profundizar en el estudio con muestras provenientes de otras regiones del país. |

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se reportan los niveles de aflatoxina B_1, B_2, G_1, G_2 encontrados en muestras de arroz, que fueron recolectadas en el Mercado Mayorista “El Arenal” durante el periodo de Julio-Diciembre del 2014.

La hipótesis planteada se cumplió ya que los valores encontrados en las muestras de arroz que se expenden en los locales del Mercado Mayorista “El Arenal” son menores a los límites establecidos por la Unión Europea para aflatoxinas.

La incidencia en el arroz evaluado puede suponer un potencial peligro para la Salud Pública teniendo en cuenta que los valores se acumulan en el organismo a lo largo del tiempo y sumada la importancia de su consumo en la dieta ecuatoriana.

Los resultados encontrados en la muestra estudiada, demostraron que no existe una diferencia significativa en los niveles de contaminación y que estos no guardan relación con el mes de estudio, el tiempo, tipo y el recipiente en donde es almacenado para su venta.

7. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos indicaron una baja presencia de aflatoxinas de tipo B_1, B_2, G_1, G_2 por lo que el proceso de pilado se consideraría como un método efectivo para la remoción de estos contaminantes, sin embargo, es necesario continuar con estudios que permitan garantizar disminución y ausencia de las micotoxinas.

La contaminación por aflatoxinas puede darse en cualquier fase de la cadena productiva, lo que sugiere que se tomen medidas de control que garanticen la inocuidad de los alimentos para ser consumidos.

La ampliación del estudio con un mayor número de muestras, permitirá realizar comparaciones con diferentes tipos de arroz y lugares de expendio, así como la época del año, prácticas agrícolas y en las diferentes regiones del país.

Otros alimentos deberían ser analizados con la finalidad de crear una base de datos que se dirijan a establecer regulaciones nacionales que controlen la presencia de estos contaminantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):497-516.

2. Köppen R, Koch M, Siegel D, Merkel S, Maul R, Nehls I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010;86(6):1595-612.

3. Zinedine A. Ochratoxin A in Moroccan foods: occurrence and legislation. Toxins (Basel). 2010;2(5):1121-33.

4. Bakhiet SEA, Musa AAA. Survey and determination of aflatoxin levels in stored peanut in sudan. Jordan J Biol Sci. 2011;4:13-20.

5. Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. Toxicological Sciences. 2011;120(suppl 1):S28-S48.

6. Peraica MR, Dubravka. THE IMPACT OF MYCOTOXICOSES ON HUMAN HISTORY. In: Institute for Medical Research and Occupational Health Z, editor. Power of Fungui and Mycotoxins in Health Disease; Primosten, Croatia2012.

7. Martínez Ruiz R, Rojo Martínez GE, García Gutiérrez C, Ramírez Valverde B, Jasso Mata J, Nava Pérez E, et al. Tecnologías de Granos y Semillas. 2013.

8. Pedro VV, Bernardo LF. Toxicología de los Alimentos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS, OMS México. 1986.

9. Groopman JD, Wogan GN. Aflatoxin and Hepatocellular Carcinoma. Chemical Carcinogenesis: Springer; 2011. p. 113-33.

10. Anderson MdRP. Enfermedades de origen alimentario: su prevención: Ediciones Díaz de Santos; 2005.

11. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañes FJ. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev Iberoam Micol. 2000;17:63-8.

12. Nations FaAOotU. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas2003.

13. Guzmán EMQ, Guerrero FA, Chaves JA. Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. Arch Latinoam Nutr. 2007;57:168-72.

14. Bolet Astoviza M, Socarrás Suárez M. Micotoxinas y cáncer. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2005;24(1):54-9.

15. Iqbal SZ, Asi MR, Ariño A, Akram N, Zuber M. Aflatoxin contamination in different fractions of rice from Pakistan and estimation of dietary intakes. Mycotoxin research. 2012;28(3):175-80.

16. Bejarano Rodríguez RJ, Centeno Briceño SJ. Extracto de Citrus limon para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. Rev Soc Venez Microbiol. 2009;29(1):57-61.

17. Bernis JMF, Pamies CB. Economía del arroz: variedades y mejora: Juan Carlos Martínez Coll; 2008.

18. Makun HA, Gbodi TA, Akanya OH, Salako EA, Ogbadu GH. Fungi and some mycotoxins contaminating rice (Oryza sativa) in Niger state, Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2007;6(2).

19. Office of the Gene Technology Regulator AGDoHaA. The Biology and Ecology of Rice (Oryza sativa L.) in Australia2005.

20. Nations FaAOotU. El Arroz y la Nutrición Humana2004 25 de mayo de 2015. Available from: http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf.

21. Ecuador VdEA. Cultivos Transitorios Arroz en Cáscara. In: Censos INdEy, editor. 2013.

22. Penafiel I. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Ecuador Biblioteca.

23. Childs N. Rice outlook. RCS-14A USDA-Economic Research Service. 2014.

24. FAO. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Departamento de Desarrollo Económico y Social Panorama Mundial de la Subnutrición Consultado en: http://www fao org/DOCREP/X8S/X8200SX2S00 htm—(2013): The State of Food and Agriculture Roma FAO/WHO/UNU. 2004.

25. Soriano del Castillo JM. Micotoxinas en alimentos: Ediciones Díaz de Santos; 2007.

26. Bakırdere S, Bora S, Bakırdere EG, Aydın F, Arslan Y, Komesli OT, et al. Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. Central European Journal of Chemistry. 2012;10(3):675-85.

27. Castro EA, Francisco. Micotoxinas - Rol e Importancia en Nutrición Acuicola 1994 [cited 2015 12/11/2015]. Available from: http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S13.htm.

28. Mallmann CA, Hummes R, Giacomini L. Factores de formación de las micotoxinas y sus formas de control. Universidad Federal de Santa María, Brasil. 2007:1-8.

29. Novoa JRU, Díaz GJ. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad. Rev Fac Med Univ Nac Colomb. 2006;54(2):108-16.

30. Abrar M, Anjum FM, Butt MS, Pasha I, Randhawa MA, Saeed F, et al. Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, toxicity, and remedies. Critical reviews in food science and nutrition. 2013;53(8):862-74.

31. Ledezma PB, Ledezma DB, Ledezma SB. Aflatoxinas. Acta Médica Costarricense ISSN 0001-6012. 2009;46(4).

32. Mishra H, Das C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. 2003.

33. Padrón M, Yuef H, Hernández Delgado S, Reyes Méndez CA, Vázquez Carrillo G. El Género Aspergillus y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Revista mexicana de fitopatología. 2013;31(2):126-46.

34. Bräse S, Gläser F, Kramer CS, Lindner S, Linsenmeier AM, Masters K-S, et al. Peptidic Mycotoxins. The Chemistry of Mycotoxins: Springer; 2013. p. 225-31.

35. Bianco G, Russo R, Marzocco S, Velotto S, Autore G, Severino L. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. Toxicon. 2012;59(6):644-50.

36. Urrego Novoa JR, Días GJ. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Revista de la Facultad de Medicina; Vol 54, núm 2 (2006); 108-116 2357-3848 0120-0011. 2006.

37. Albert RK, Porter RS, Kaplan JL, Homeier BP. The Merck manual home health handbook: Merck & Company; 2009.

38. Duarte-Vogel S, Villamil-Jiménez LC. Micotoxins in public health. Revista de Salud Pública. 2006;8:129-35.

39. Pesántez O. Aflatoxinas en los alimentos. Revista de la Universidad de Guayaquil. 2010;108:31-4.

40. Peña DGd. Exposure to aflatoxin B1 in experimental animals and its public health significance. Salud Publica de Mexico. 2007;49(3):227-35.

41. Communities CotE. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Off J EU Communities. 2006;70:12-34.

42. Authority EFS. Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products Parma, Italy: 2013.

43. Ulca P, Evcimen M, Senyuva H. Surveys of aflatoxin B1 contamination of retail Turkish foods and of products intended for export between 2007 and 2009. Food Additives and Contaminants: Part B. 2010;3(2):120-5.

44. Songsermsakul P, Razzazi-Fazeli E. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®. 2008;31(11-12):1641-86.

45. Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, Tanaka T, Leeman D, Toriba A, et al. Determination of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity extraction. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2010;24(16):2445-52.

46. Sales AC, Yoshizawa T. Updated profile of aflatoxin and Aspergillus section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. Food additives and contaminants. 2005;22(5):429-36.

47. Ok H, Chang H-J, Choi S-W, Cho T, Oh K, Chun H. Occurrence and intake of deoxynivalenol in cereal-based products marketed in Korea during 2007–2008. Food Additives and Contaminants. 2009;2(2):154-61.

48. Córdova J, Rodríguez I, Mazzani C, de Leal AT. INCIDENCIA DE MOHOS Y CONTENIDO DE AFLATOXINAS EN GRANOS DE ARROZ PULIDO DE DIFERENTES TIPOS Y CALIDADES EN VENEZUELA.

49. Pitt JI. A laboratory guide to common Penicillium species: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing PO Box 52, North Ryde, NSW 2113, Australia; 2000.

50. Lairon D. Nutritional quality and safety of organic food. A review. Agronomy for sustainable development. 2010;30(1):33-41.

51. Kumar V, Basu M, Rajendran T. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. Crop Protection. 2008;27(6):891-905.

52. Liu Z, Gao J, Yu J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. Journal of stored products research. 2006;42(4):468-79.

53. Prietto L, Moraes PS, Kraus RB, Meneghetti V, Fagundes CAA, Furlong EB. Post-harvest operations and aflatoxin levels in rice (Oryza sativa). Crop Protection. 2015;78:172-7.

9. ANEXOS

9.1 PROCOLO DE MUESTREO

INTRODUCCIÓN

El muestreo juega un papel crucial en la precisión del análisis de micotoxinas, las cuales están muy heterogéneamente distribuidas en un lote. La muestra tomada se analizará y servirá para juzgar al lote completo, por lo que la negligencia durante el muestreo resultaría en una evaluación inexacta y errónea.

Se aplicará una selección uniforme de muestras, en la cual la muestra final representa al promedio de toda la población. Su aplicación se resume en 4 etapas:

1. Toma de muestras se toman en pequeñas cantidades de cada sección del lote (1 Kg).

2. Reunir las muestras y mezclarlas cuidadosamente.

3. La muestra obtenida (agregada) es reducida por divisiones sucesivas en cierto número de muestras para análisis.

4. Las muestras para análisis se homogeneizarán a nivel del laboratorio y se subdividirán para el análisis.

El plan de muestreo a ser aplicado es una adaptación de la Regulación 401/2006/EC. En esta regulación se compiló y revisó las regulaciones anteriores de muestreo para aflatoxinas (98/53/EC), ocratoxina A (2002/26/EC), patulina (2003/78/EC) y toxinas de Fusarium (2005/38/EC). Se cita además el documento guía sobre el control y conformidad con la legislación de EU para aflatoxinas, cuyo objetivo es aclarar algunos artículos de la regulación 401/2006/EC. Finalmente se ha considerado la información práctica de la regulación del Codex Stan 209-Rev.1, CX/CF 08/2/10, las pautas de la FAO para el muestreo y determinación de aflatoxinas en maíz al granel para

exportación y las pautas de la FAO por muestreo, manejo y preparación de las muestras en granos y cereales.

1. DEFINICIONES

2.1. LOTE

Cantidad de un alimento, identificable en un determinado momento, del cual se ha declarado oficialmente que todo su contenido comparte características comunes como el origen, la variedad, el tipo de empaque, empaquetador o consignador.

2.2. SUBLOTE

Parte designada de un lote en que se puede aplicar el método de muestreo. Cada sublote debe estar físicamente separado e identificado.

2.3. MUESTRA INCREMENTAL

Cantidad de material tomada de un lugar al azar del lote o sublote.

2.4. MUESTRA AGREGADA

Porción total que resulta de la acumulación de las muestras incrementales.

2.5. MUESTRA PARA ANÁLISIS

Muestra destinada al análisis del laboratorio.

2. REQUISITOS GENERALES PARA EL MUESTREO

3.1. PERSONAL

El muestreo será realizado únicamente por personal autorizado y designado para esta actividad.

3.2. MATERIAL A SER MUESTREADO

Todo el contenido del lote es susceptible de ser muestreado. Cada lote bajo observación se subdividirá en el sublotes para su muestreo por separado.

3.3. MUESTRAS INCREMENTALES

Las muestras incrementales deben ser tomadas de varios y diferentes sitios del lote o sublote. Cada muestra debe identificarse claramente por medio de etiquetas.

3.4. MUESTRAS POR TRIPLICADO

Las muestras para análisis, defensa y referencia deberán tomarse de la muestra final homogenizada.

3.5. EMPAQUETADO Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Cada muestra se ubicará en un recipiente limpio e inerte que ofrezca la protección adecuada contra la contaminación y daños durante la manipulación. Todas las precauciones necesarias se tomarán para evitar cualquier cambio en la composición de la muestra que podría empeorar durante el transporte o almacenamiento. Las muestras deben almacenarse en un lugar fresco, seco y oscuro.

3.6. SELLADO Y ETIQUETADO DE MUESTRAS

Cada muestra será sellada e identificada en el lugar del muestreo. Se debe llevar un registro de cada muestra, permitiendo que cada lote sea identificado sin ambigüedad, con la fecha y lugar de muestreo junto con cualquier información adicional.

3.7. PRECAUCIONES:

- Se deben considerar todas las medidas de seguridad para las personas encargadas del muestreo y para no causar ningún daño al lote muestreado.
- Los equipos utilizados deben estar limpios y libres de los residuos de muestras anteriores para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Como la distribución de micotoxinas es generalmente heterogénea, las muestras, deben ser cuidadosamente homogenizadas por el personal del laboratorio.

- Durante el transporte, preparación y análisis, las muestras no deben ser expuestas a la luz del día (ej. las aflatoxinas gradualmente se degradan bajo la influencia de luz ultravioleta).

4. MUESTREO AL GRANEL: PRODUCTOS EMPAQUETADOS (VENTA AL POR MENOR)

4.1. **Muestra incremental para lotes en puntos al granel**

El peso de los incrementos dependerá del peso del paquete individual:

- En el caso de los paquetes con un peso mayor al del incremento requerido (100 g), el peso de la muestra agregada será mayor a 10 kg (aceptable hasta 30 kg). Si este muestreo produce inaceptables daños económicos, es posible tomar un número suficiente de muestras individuales para completar con el peso de la muestra agregada.

- Si el peso de un solo paquete es mucho mayor al requerido, entonces 100 g (incremento) se tomarán de cada paquete. Esto puede hacerse en el sitio del muestreo o en el laboratorio. Sin embargo, en algunos casos es necesario aplicar un método alternativo de muestreo.

5. SELECCIÓN DE LA MUESTRA INCREMENTAL

Cada parte del lote debe tener la misma oportunidad de ser escogida. Errores sistemáticos podrían aparecer si el equipo y procedimientos usados para la selección reducen esas oportunidades. Los alimentos pueden comercializarse al granel, en contenedores o en paquetes individuales y el método de muestreo puede aplicarse a todas las diferentes formas en las que los alimentos son puestos en el mercado.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. **Mezcla y subdivisión de la muestra agregada**

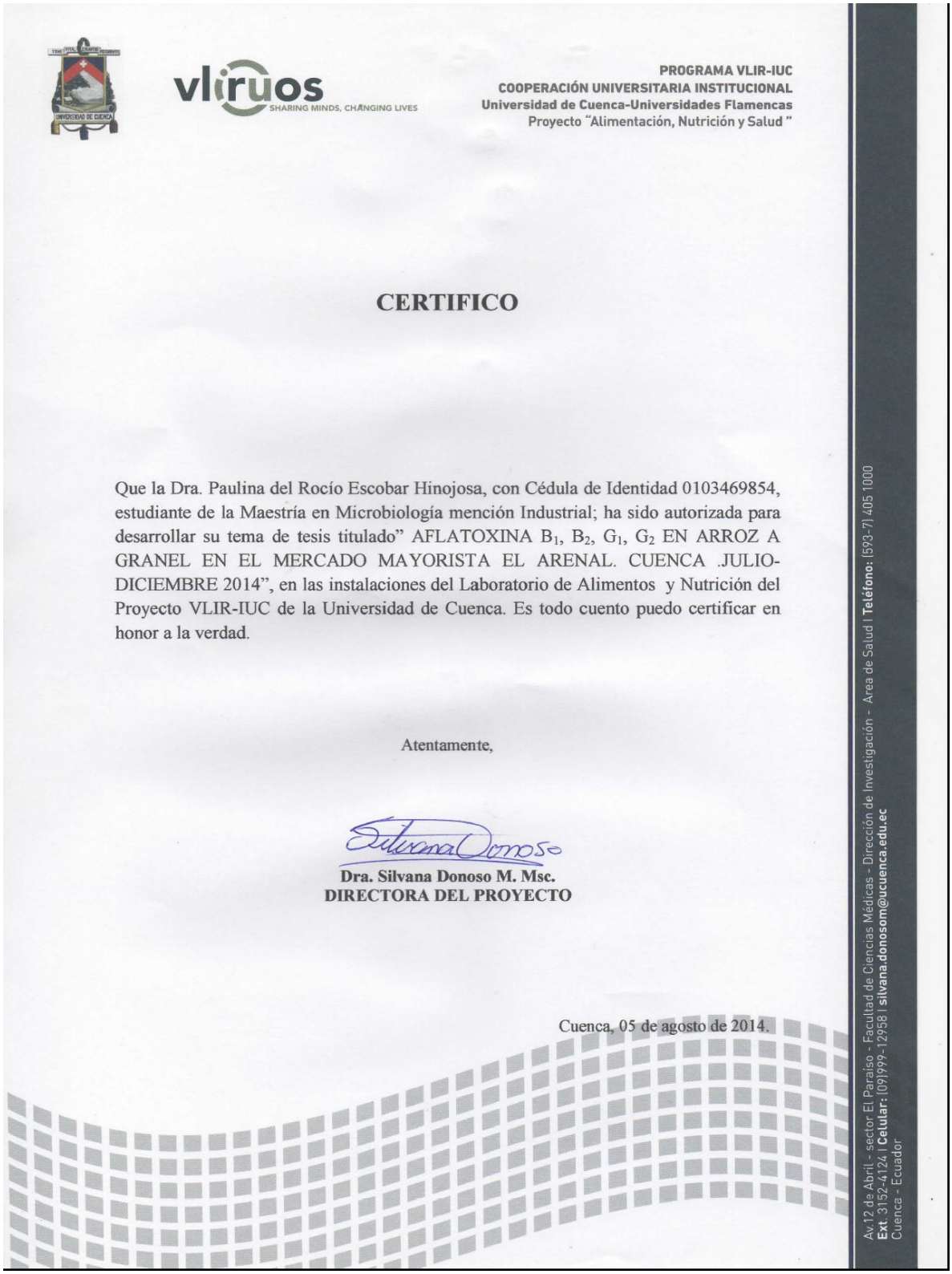
En el laboratorio las 37 muestras deben mezclarse y luego subdividas en 3 muestras para análisis según el siguiente proceso sistemático (44) (46):

a) Mezclar cuidadosamente las muestras agregadas.
b) Extender la muestra agregada en un rectángulo (espesor considerable).
c) Dividir el rectángulo en 20 celdas iguales (~ 500 g cada una).
d) Tomar cierta cantidad de material de cada celda con una espátula grande desde el fondo de la celda y distribuir en 3 porciones al azar (~1 kg).
e) De cada porción (~1 kg) tomar un tercio de la cantidad de material al azar (~330 g cada uno) y mezclar las 3 porciones (~1 kg de muestra final).

La homogenización y subdivisión de las muestras para análisis constituyen la última etapa del muestreo y se lo realizará en el laboratorio. Para esto se utilizará el equipo moledor adecuado y se homogenizará en un ambiente más propicio. De cada muestra agregada se obtienen 3 muestras para análisis, y cada una será subdivida así (44):

a) Dividir la muestra final en 3 muestras iguales:
    - dos para el análisis propiamente dicha
    - una de referencia

9.2 AUTORIZACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA TESIS



PROGRAMA VLIR-IUC
COOPERACIÓN UNIVERSITARIA INSTITUCIONAL
Universidad de Cuenca-Universidades Flamencas
Proyecto "Alimentación, Nutrición y Salud "

CERTIFICO

Que la Dra. Paulina del Rocío Escobar Hinojosa, con Cédula de Identidad 0103469854, estudiante de la Maestría en Microbiología mención Industrial; ha sido autorizada para desarrollar su tema de tesis titulado" AFLATOXINA B_1, B_2, G_1, G_2 EN ARROZ A GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA .JULIO-DICIEMBRE 2014", en las instalaciones del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC de la Universidad de Cuenca. Es todo cuento puedo certificar en honor a la verdad.

Atentamente,

Dra. Silvana Donoso M. Msc.
DIRECTORA DEL PROYECTO

Cuenca, 05 de agosto de 2014.

Av.12 de Abril - sector El Paraíso - Facultad de Ciencias Médicas - Dirección de Investigación - Area de Salud I **Teléfono:** (593-7) 405 1000
Ext. 3152-4124 I **Celular:** (09)99-12958 I **silvana.donosom@ucuenca.edu.ec**
Cuenca - Ecuador

9.3 FICHA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

PROGRAMA DE POSTGRADO MICROBIOLOGÍA AVANZADA

AFLATOXINA B_1, B_2, G_1, G_2 EN ARROZ AL GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA. 2014.

Fecha:

Ubicación
:

Referencia
:

Puesto

Muestra

Tipo de almacenamiento:
Recipiente donde se almacena:
Cantidad recolectada:
Observaciones :
Firma del Responsable: _____

9.4 FICHA DE RECOLECCIÓN DE RESULTADOS

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
PROGRAMA DE POSTGRADO MICROBIOLOGÍA AVANZADA

AFLATOXINA B1, B2, G1, G2 EN ARROZ A GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA 2014

Fecha: Responsable:

# Muestra	Área	Tiempo de retención	Aflatoxina B1	Área	Tiempo de retención	Aflatoxina B2	Área	Tiempo de retención	Aflatoxina G1	Área	Tiempo de retención	Aflatoxina G2

9.5 RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ARROZ

Muestra N°	Concentración Aflatoxina B_1 ug/kg	Concentración Aflatoxina B_2 ug/kg	Concentración Aflatoxina G_1 ug/kg	Concentración Aflatoxina G_2 ug/kg	Aflatoxinas totales $B_1+B_2+G_1+G_2$ ug/kg
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,25	0,00	0,00	0,25
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,28	0,00	0,00	0,00	0,28
6	0,00	0,00	0,32	0,00	0,32
7	0,00	0,32	0,00	0,00	0,32
8	0,78	0,00	0,00	0,27	1,05
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,31	0,00	0,00	0,00	0,31
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,45	0,00	0,45
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,11	0,45	0,00	0,00	0,56
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,52	0,59	0,00	0,00	1,11
18	0,43	0,00	0,00	0,00	0,43
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	1,28	0,00	0,23	0,00	1,51
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,57	0,00	0,00	0,00	0,57
25	0,00	0,00	0,00	0,19	0,19
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,29	0,00	0,00	0,29
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,38	0,00	0,00	0,00	0,38
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Muestra N°	Concentración Aflatoxina B_1 ug/kg	Concentración Aflatoxina B_2 ug/kg	Concentración Aflatoxina G_1 ug/kg	Concentración Aflatoxina G_2 ug/kg	Aflatoxinas totales $B_1+B_2+G_1+G_2$ ug/kg
33	0,26	0,00	0,00	0,00	0,26
34	0,14	0,00	0,00	0,00	0,14
35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	0,57	0,00	0,00	0,00	0,57
37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
41	0,15	0,10	0,00	0,00	0,25
42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
45	0,30	0,00	0,00	0,00	0,30
46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48	0,16	0,00	0,00	0,00	0,16
49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
51	0,28	0,00	0,00	0,00	0,28
52	0,17	0,00	0,00	0,45	0,62
53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
54	0,00	0,12	0,00	0,00	0,12
55	0,98	0,00	0,00	0,00	0,98
56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
58	0,16	0,00	0,00	0,00	0,16
59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
62	0,46	0,00	0,00	0,00	0,46
63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
65	0,00	0,58	0,00	0,00	0,58
66	0,19	0,00	0,00	0,00	0,19
67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
69	0,38	0,00	0,00	0,00	0,38

Muestra N°	Concentración Aflatoxina B_1 ug/kg	Concentración Aflatoxina B_2 ug/kg	Concentración Aflatoxina G_1 ug/kg	Concentración Aflatoxina G_2 ug/kg	Aflatoxinas totales $B_1+B_2+G_1+G_2$ ug/kg
70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75	0,35	0,00	0,00	0,00	0,35
76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
77	0,00	0,32	0,00	0,00	0,32
78	0,54	0,00	0,00	0,00	0,54
79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
86	0,91	0,00	0,00	0,00	0,91
87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Media	0,12	0,03	0,01	0,01	0,17
Desviación standard	0,24	0,11	0,06	0,06	0,29

10. GLOSARIO

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Aflatoxinas: sustancia tóxica y cancerígena producida por hongos.

Apoptosis: es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente.

ARN: ácido ribonucleico.

Atóxico: que no tiene toxicidad. No venenoso.

Biodisponibilidad: fracción de la dosis administrada que llega en forma activa (sin metabolizar) a la circulación sistémica.

Carcinogénica: Un agente carcinógeno, o cancerígeno, tanto físico, como químico o biológico, es aquél que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que produce cáncer.

Citocromo C: es una proteína pequeña, que funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV.

Coagulopatía: fallo del proceso de coagulación.

Cromatografía: método de análisis químico para la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, que en un principio se utilizó para separar sustancias coloreadas.

Deshidrogenasa: enzima que oxida indirectamente por transferencia de hidrógeno a un aceptor.

Enzimas proteolíticas: son enzimas que dividen a las proteínas.

Ergotismo: conjunto de síntomas producidos por la intoxicación con cornezuelo de centeno.

Eucarióticos: aquellas células con núcleo diferenciado, envuelto por una membrana y con citoplasma organizado, y de los organismos constituidos por ellas.

Genotóxica: capaz de alterar el ácido desoxirribonucleico, produciendo así cáncer o mutación.

Hepatotóxica: tóxico para el hígado.

Hidroxilo: radical formado por un átomo de hidrógeno y otro de oxígeno, que forma parte de muchos compuestos.

Inmunosupresión: Anulación de la respuesta inmunitaria de un organismo.

Inocuos: que no hace daño o que no causa malestar.

Lactona: es un compuesto orgánico del tipo éster cíclico.

Metabolitos: es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.

Micotoxicosis: el envenenamiento provocado por sustancias tóxicas de origen fúngico.

Micotoxinas: es una toxina producida por un organismo del Reino Fungi, que incluye setas, mohos y levaduras.

Mutagénicos: son agentes que interaccionan directa o indirectamente con el ADN y que provocan mutaciones.

Necrosis: degeneración de un tejido por muerte de sus células.

Parénquima: parte noble, funcional, de un órgano.

Rastrojo: residuo de las cañas de la mies, que queda en la tierra después de segar.

Saprófito: plantas y microorganismos que se alimentan de materias orgánicas en descomposición. Microorganismos, especialmente, bacterias que viven a expensas de la materia orgánica descompuesta, por tanto, no patógenos.

Sustrato: Sustancia sobre la que actúa una enzima.

Teratogénicos: propiedad o potencial para induce malformaciones estructurales permanentes o defectos en un embrión o un feto.

Transversión: mutación causada por la sustitución de una purina por una pirimidina, o de una pirimidina por una purina en el ADN o el ARN.

Ubicuos: que está presente a un mismo tiempo en todas partes.

Presidencia

de la República

del Ecuador

Plan Nacional de Ciencia y Tecnología

SENESCYT
SECRETARÍA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS		
TÍTULO Y SUBTÍTULO: AFLATOXINA B_1, B_2, G_1, G_2 EN ARROZ AL GRANEL EN EL MERCADO MAYORISTA EL ARENAL. CUENCA. 2014.		
AUTOR: Dra. Paulina Escobar H.	TUTOR: Dra. Lourdes Jerves. Msc	
	REVISR: Dr. Carlos Mosquera.	
INSTITUCIÓN: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	FACULTAD: Ciencias Médicas	
CARRERA: Maestría en Microbiología - Mención Industrial.		
FECHA DE PUBLICACIÓN: Abril 2016	No. DE PÁGS: 61	
ÁREAS TEMÁTICAS: Ciencias de la vida		
PALABRAS CLAVE: Micotoxinas, aflatoxinas, arroz, HPLC		
RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue cuantificar los niveles de aflatoxinas en arroz que se expende a granel en tiendas, abacerías y comisariatos ubicados en el Mercado Mayorista "El Arenal" de la ciudad de Cuenca, con el fin de establecer los niveles de aflatoxina B_1, B_2, G_1, G_2; durante el periodo de recolección Julio a Diciembre y que corresponden al segundo semestre del año 2014. La metodología a aplicarse consistió en una previa selección de locales de expendio, para luego realizar una recolección de muestras representativas de arroz. La técnica de determinación utilizada en el laboratorio fue Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), comparándose los resultados obtenidos con la normativa vigente y establecida por la Unión Europea para muestras de arroz, se realizó un análisis estadístico para su interpretación. La aflatoxina de mayor incidencia fue la Aflatoxina B_1, con una media de 0,1 µg/kg siendo más baja para aflatoxina B_2 con un 0,03 µg/kg, para Aflatoxina G_1 con el 0,01µg/kg y con valor similar para Aflatoxina G_2 con 0,01µg/kg; por lo que se encuentran dentro de los límites establecidos por la Unión Europea para este cereal, y con un valor promedio de $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$: 4,0 µg/kg, y para Aflatoxina B_1 de 2 µg/Kg.		
No. DE REGISTRO (en base de datos):	No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	☐ SI	☐ NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0983154033	E-mail: paulina.escobar@ucuenca.edu.ec
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: SECRETARIA DE LA ESCUELA DE GRADUADOS	
	Teléfono: 2288086	
	E-mail: egraduadosug@hotmail.com	