



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO TRADICIONAL DEL PELADO DE MAÍZ
CON CENIZA A SER UTILIZADO COMO ESTRATEGIA DE DETOXIFICACIÓN DE
AFLATOXINAS Y FUMONISINAS. CASO DE ESTUDIO: NABÓN – ECUADOR”.**

Tesis previa a la obtención del título
de Bioquímica Farmacéutica

AUTORAS

MARÍA JOSÉ MOLINA CANDO

MARÍA CRISTINA OCHOA AVILÉS

DIRECTORA

Ph.D. JOHANA ORTIZ ULLOA

CUENCA-ECUADOR

2015



DEDICATORIA

A Dios

Por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada paso de mi carrera.

A mis padres y hermana

Que hicieron todo en la vida para que yo pudiera cumplir mi objetivo, por motivarme y darme siempre su apoyo incondicional, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento.

A ti mi querida amiga , Cristina

Gracias por ver en mí la persona capaz de realizar éste sueño contigo, por brindarme tu tiempo, cariño, confianza y fuerza para seguir adelante, por estar conmigo siempre no solo como una amiga sino como una hermana.

María José



A Dios, por mostrarme siempre el camino que debo seguir y acompañarme en cada paso durante toda mi carrera.

A mis padres por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, por todas las veces en las que se levantaron a verificar que no dormía mientras estudiaba a altas horas de la noche. Les debo a ustedes todo lo que soy ahora, gracias de todo corazón.

A mi hermano Juan Pablo quien siempre ha estado conmigo en cada etapa de mi vida; a mi hermana Angélica, mi mejor amiga, no solo por el apoyo incondicional durante toda mi carrera sino por el brindado para la realización de ésta tesis. Gracias a los dos por ser mis hermanos en toda la extensión de la palabra. A mi querido sobrino Matías quien siempre pensó que estudié mucho durante mi carrera.

A mi esposo Jorge Luis, por todos los años junto a mi motivándome para que alcance mis objetivos. Gracias por la paciencia y amor que me brindas todos los días.

A mi querida amiga María José, podría escribir páginas enteras de por qué dedicarte esta tesis a tí. Gracias por toda la confianza depositada en mí y por estar siempre a mi lado académica y emocionalmente. Nada de esto hubiera sido posible sin tu ayuda.

Cristina



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, *María José Molina Cando*, autora de la tesis "CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO TRADICIONAL DEL PELADO DE MAÍZ CON CENIZA A SER UTILIZADO COMO ESTRATEGIA DE DETOXIFICACIÓN DE AFLATOXINAS Y FUMONISINAS. CASO DE ESTUDIO: NABÓN-ECUADOR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, abril de 2015

María José Molina Cando

C.I: 0103515201



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, *María Cristina Ochoa Avilés*, autora de la tesis "CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO TRADICIONAL DEL PELADO DE MAÍZ CON CENIZA A SER UTILIZADO COMO ESTRATEGIA DE DETOXIFICACIÓN DE AFLATOXINAS Y FUMONISINAS. CASO DE ESTUDIO: NABÓN-ECUADOR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, abril de 2015

María Cristina Ochoa Avilés

C.I: 0105193353



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecemos a Dios por habernos permitido llegar a este punto, por guiarnos a lo largo de nuestra carrera y darnos la fortaleza para seguir adelante.

A la Doctora Johana Ortiz Ulloa por habernos permitido realizar éste trabajo de tesis bajo su dirección. Gracias por la confianza depositada en nuestro trabajo, por todas las valiosas enseñanzas impartidas como docente en la facultad; pero especialmente le agradecemos por sus enseñanzas, apoyo y guía durante todo este año de trabajo.

A la Md. Angélica Ochoa Avilés por su apoyo incondicional para la realización de esta tesis. Gracias por todas las enseñanzas y valiosos consejos brindados como amiga y como profesional.

Al Laboratorio de Alimentos y Nutrición del proyecto VLIR-IUC por habernos abierto sus puertas y permitido realizar nuestros análisis dentro de sus instalaciones, por facilitarnos siempre los medios necesarios para llevar a cabo todas las actividades propuestas. De manera especial a la BQF. Gabriela Astudillo por su apoyo y ayuda durante la realización de éste trabajo de tesis.

A nuestra amiga Belen Ortega, por su colaboración en el desarrollo de esta proyecto.

Finalmente al Ing. José Egüez por brindarnos su apoyo y conocimiento para el desempeño de éste trabajo.



RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue caracterizar el proceso tradicional de pelado del maíz con ceniza y evaluar su efectividad como estrategia de detoxificación de micotoxinas. Particularmente, se evaluó la presencia de aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂) y fumonisinas B₁ (FB₁) y B₂ (FB₂) de 40 muestras de maíz seco sin pelar y 40 muestras de maíz seco pelado con ceniza, provistas por pequeños productores del cantón Nabón, a través de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). En el maíz seco sin pelar se observó una baja prevalencia de contaminación con aflatoxinas (2,5% AFG₂, 12,5% AFG₁, 17,5% AFB₂, 7,5% AFB₁) y una importante prevalencia de contaminación con fumonisinas (42,5% FB₁, y 35% FB₂); lo cual se redujo en el maíz pelado (10,5% AFG₁, 18% FB₁ y 8% FB₂). Ninguna de las muestras presentó concentraciones de micotoxinas que excedan los límites máximos establecidos en Ecuador para aflatoxinas o por la FDA para fumonisinas. La efectividad detoxificante del proceso de pelado de maíz con ceniza se evaluó comparando las concentraciones de micotoxinas antes y después del pelado, encontrando reducciones significativas para AFB₁ (P=0,004), AFB₂ (P<0,001), FB₁ (P=0,033) y FB₂ (P=0,023). Adicionalmente, se evaluó la influencia de las prácticas agrícolas en la contaminación del maíz por aflatoxinas y fumonisinas, y se identificó que la cosecha en los meses de julio a septiembre actuaría como factor protector para AFG₁ (OR; 0,087; IC: 0,008-0,87; P=0,039) y AFB₂ (OR= 0,128; P=0,027). Además, como factores protectores para FB₂, se identificaron al cultivo en zonas cálidas (OR=0,147; IC: 0,03-0,62; P=0,010) y el riego con agua lluvia (0,111; IC: 0,01-0,66; P=0,016).



ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the process of dehulling maize using wood ash and to evaluate its effectiveness as a detoxification strategy for mycotoxins. Particularly, the presence of aflatoxins B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) and fumonisins B₁ (FB₁) and B₂ (FB₂) of 40 samples of dried and no-dehulled maize and 40 samples of wood ash dehulled maize from small producers from Nabon were analyzed using high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Low prevalence of contamination with aflatoxins was observed in dried maize (2,5 % AFG₂, 12,5% AFG₁, 17,5% AFB₂, 7,5% AFB₁) and an important prevalence of contamination with fumonisins (42,5% FB₁, y 35% FB₂); which was reduced in dehulled maize (10,5% AFG₁, 18% FB₁ y 8% FB₂). None of the samples exceed the maximum limits for aflatoxins established in Ecuador or FDA for fumonisin. The detoxifying effectiveness of the process of dehulling maize using wood ash was assessed by contrasting the concentrations of mycotoxins before and after the dehulling process, finding significant reductions in contamination for AFB₁ (P = 0.004), AFB₂ (P < 0.001), FB₁ (P = 0.033) and FB₂ (P = 0.023). In addition, the influence of agricultural practices on aflatoxin and fumonisin contamination of maize was evaluated. Harvest in the period July-September was identified as a protective factor for AFG₁ (OR; 0,087; IC: 0,008-0,87; P=0,039) and AFB₂ (OR= IC: 0,128; P=0,027). Also, cultivation in warm zones (OR=0,147; IC: 0,03-0,62; P=0,010) and rainwater irrigation (0,111; IC: 0,01-0,66; P=0,016) were identified as protective factors for FB₂.



ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ANEXOS.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	XV
OBJETIVOS	XVII
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 MAÍZ	1
1.1.1 Generalidades del maíz.....	1
1.1.2 Composición del grano de maíz	2
1.1.3 Cultivo del maíz.....	4
1.1.4 Manejo del periodo post-cosecha.....	6
1.1.5 Maíz en el Ecuador.....	7
1.1.6 Plagas y enfermedades del maíz	10
1.2 MICOTOXINAS.....	11
1.2.1 Introducción.....	11
1.2.2 Aflatoxinas.....	14
1.2.3 Fumonisinias	18



1.3 NIXTAMALIZACIÓN.....	22
2. METODOLOGÍA.....	24
2.1. TIPO DE ESTUDIO.....	24
2.2. ÁREA DE ESTUDIO	24
2.3. MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA	24
2.4. INFORMACIÓN SOBRE PRÁCTICAS AGRÍCOLAS.....	26
2.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE MAÍZ.....	27
2.5.1. Tratamiento de las muestras:	27
2.5.2 Equipos, materiales y reactivos:	27
2.5.3. Análisis de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	29
2.5.4 Análisis de fumonisinas B ₁ y B ₂	32
2.5.5. Curvas de calibración	34
2.6. ANÁLISIS DE DATOS.....	37
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE MAÍZ.....	39
3.2. PRÁCTICAS AGRÍCOLAS.....	40
3.3. CARACTERIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO TRADICIONAL DEL PELADO DE MAÍZ CON CENIZA.....	42
3.4 CONTAMINACIÓN DEL MAÍZ CON MICOTOXINAS	48
3.4.1. Análisis de aflatoxinas	48
3.4.2. Análisis de fumonisinas	50



3.5 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PELADO DE MAÍZ CON CENIZA COMO ESTRATEGIA DE DETOXIFICACIÓN.....	52
3.6 INFLUENCIA DE LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LA CONTAMINACIÓN	53
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
4.1. CONCLUSIONES	55
4.2 RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS.....	60



LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Superficie cosechada de maíz, en hectáreas (Ha), en las provincias de la Sierra ecuatoriana. Fuente: (Peñaherrera, 2011).	8
Tabla 1.2. Composición química del porcentaje de proteína y de almidón. Fuente: (Peñaherrera, 2011)	9
Tabla 1.3. Principales micotoxinas producidas por hongos contaminantes de alimentos. Fuente: (FAO., 2009).	12
Tabla 2.1. Programa de elución tipo gradiente.....	31
Tabla 2.2. Características del método analítico de aflatoxinas	32
Tabla 2.3. Características del método analítico para fumonisinas	34
Tabla 2.4. Preparación de soluciones estándares para aflatoxinas.	35
Tabla 2.5. Preparación de soluciones estándares para fumonisinas.	36
Tabla 3.1. Procedencia de las muestras de maíz (n=40).....	39
Tabla 3.2. Prácticas Agrícolas relacionadas a la siembra del maíz en el cantón Nabón (n=40)	40
Tabla 3.3. Caracterización del pelado de maíz con ceniza (n=40).....	42
Tabla 3.4. Estandarización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza.	45
Tabla 3.5. Prevalencia de muestras positivas y niveles de aflatoxinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.	48
Tabla 3.6. Prevalencia de muestras positivas y niveles de fumonisinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.	50



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal. Fuente: (Cordero Ruíz, 2012).	3
Figura 1.2. Estructura de Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ . Fuente: (Kralj Cigić & Prosen, 2009)	15
Figura 1.3. Estructura química fumonisina B ₁ y B ₂ . Fuente: Royal Society of Chemistry (http://www.chemspider.com/)	19
Figura 1.4. a) Estructuras químicas de la esfingosina y esfinganina. b) Mecanismo de acción de las fumonisinas. Fuente: (Magan & Olsen, 2004)	21
Figura 2.1. Mapa del catón Nabón y sus parroquias. Fuente: Municipalidad de Nabón (http://www.nabon.gob.ec/portal/index.php/municipio/ubicacion-geografica)	26
Figura 2.2. Esquema de cálculo de gramos de muestra por mililitro al momento de la inyección	38



LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Lista de los participantes y fecha de recolección de las muestras.....	60
ANEXO 2. Consentimiento Informado.....	62
ANEXO 3. Encuesta sobre prácticas agrícolas del maíz.....	64
ANEXO 4. Flujograma de análisis de aflatoxinas y fumonisinas.	68
ANEXO 5. Concentración de aflatoxinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.....	69
ANEXO 6. Concentración de fumonisinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.....	70



INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que pueden contaminar un sin número de alimentos de contenido acuoso medio y bajo. La presencia de micotoxinas en la cadena alimentaria constituye un serio problema global pues da lugar a importantes pérdidas económicas a nivel agrícola y puede causar diferentes problemas en la salud animal y humana (FAO., 2009; Reddy et al., 2009; Wagacha & Muthomi, 2008). El ser humano al consumir alimentos contaminados con micotoxinas está expuesto a diversos efectos adversos que incluyen alteraciones nerviosas, gastrointestinales, reproductivas, así como inmunodeficiencia. Además existen micotoxinas que pueden causar efectos cancerígenos, genotóxicos y citotóxicos (Bräse, Encinas, Keck, & Nising, 2009).

El maíz constituye un cereal susceptible a la contaminación con micotoxinas en especial en países en vías de desarrollo, debido a la falta de normas regulatorias y la falta de aplicación de tecnologías útiles para manejo y conservación de los alimentos (FAO., 2009; Scussel, 2004). Además, en áreas rurales existe un mayor riesgo de contaminación debido a que los cultivos se realizan y consumen sin ninguna conciencia de seguridad alimentaria (Kimanya et al., 2008). Se han propuesto varios mecanismos para disminuir la contaminación del maíz por micotoxinas, los mismos que se pueden llevar a cabo tanto en las fases de pre-cosecha y de pos-cosecha. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue caracterizar el proceso de pelado de maíz con ceniza y evaluar su aplicabilidad como método de detoxificación de aflatoxinas y fumonisinas en mote pelado como producto final en el cantón Nabón de la Sierra Ecuatoriana.



Los resultados de este trabajo constituyen la primera etapa del proyecto de investigación “Assessment of the traditional wood ash nixtamalization as detoxification strategy to reduce Fumonisin and Aflatoxin contamination of boiled maize ("mote pelado"), Nabon-Ecuador” financiado por la Fundación Internacional de Ciencia (IFS) (Research Grant E/5398-1).



OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el proceso tradicional de pelado del maíz con ceniza y evaluar su efectividad como estrategia de detoxificación de fumonisinas y aflatoxinas.

Objetivos específicos

Caracterizar y estandarizar el proceso tradicional de pelado de maíz con ceniza en el área rural de Nabón, Ecuador mediante la aplicación de encuestas.

Evaluar el nivel de detoxificación proceso de pelado con ceniza mediante la determinación de micotoxinas (fumonisinas y aflatoxinas) en maíz seco antes y después del pelado con ceniza.



1. MARCO TEÓRICO

1.1 MAÍZ

1.1.1 Generalidades del maíz

El maíz (*Zea mays*) es una planta monoica anual que pertenece a la familia de las gramíneas. El cultivo de este cereal es uno de los más adaptables a diferentes climas, por lo cual su producción, junto con el arroz y el trigo, son los más importantes a nivel mundial (Mejía, 2005).

El cultivo del maíz es muy antiguo y se originó en el continente americano. Los países en América del sur que registran una agricultura antigua de éste cereal son Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia y Chile (Pesantez, 2004).

La producción del maíz está ampliamente distribuida a nivel mundial con valores de 645'414,836.10 toneladas de maíz por año. La cosecha de maíz se ubica por debajo de la cosecha de arroz y trigo a nivel mundial, pero en países con economías en desarrollo como en Latinoamérica, la cosecha de éste cereal se ubica en primer lugar. El principal continente productor es América con un 54,5% del total de la producción mundial, seguido por Asia con el 27,3%, Europa con un 11,2% y finalmente África y Oceanía con un 6,9% del total mundial. En el continente americano los países con mayor producción son Estados Unidos, Brasil, México y Argentina (INEC, 2009; Mejía, 2005). En la actualidad, consumo del maíz en países de Latinoamérica se realiza en cantidades superiores a la mitad de su producción, ya que éste cereal es considerado como una fuente importante de energía por su



elevado contenido de carbohidratos, proteínas, aceites y fibra.(Peñaherrera, 2011) El país con mayor volumen de consumo a nivel mundial es México con 12'996.136,96 (INEC, 2009).

Entre los países de América, el Ecuador se encuentra en cuarto lugar en lo que se refiere a consumo de maíz según la CAN (Comunidad Andina de Naciones), constituyendo un componente básico de la alimentación. Se ha estimado que el consumo per cápita de maíz alcanza cifras de 82,9 Kg/persona/año. Hasta el 2009, el consumo por habitante se ha incrementado en una tasa promedio de un 1,4% (INEC, 2009).

1.1.2 Composición del grano de maíz

La semilla o grano del maíz está compuesto por la cubierta o pericarpio, el endospermo amiláceo y el embrión o germen (Cordero Ruíz, 2012). La cubierta o pericarpio se caracteriza por su elevado contenido de fibra (87%) constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. El endospermo es la porción más grande del núcleo (82%) y se caracteriza por un elevado contenido de almidón y gluten. Finalmente el embrión representa el 11.5% del peso total del grano y contiene una elevada cantidad de grasa (aceite vegetal), proteínas y minerales (Mejía, 2005; Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013).

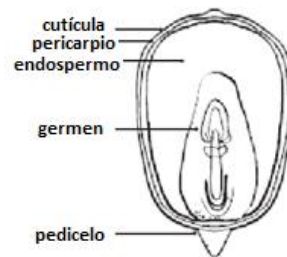


Figura 1.1. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal. **Fuente:** (Cordero Ruíz, 2012).

El principal componente del grano de maíz es el almidón, aunque también son comunes carbohidratos sencillos como glucosa, sacarosa y fructosa. El almidón se encuentra principalmente en el endospermo y está constituido por amilasa y amilopectina. (IICA-PROCIANDINO; Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013).

Las proteínas constituyen el segundo componente de importancia en el grano y se encuentran principalmente en el endospermo y germen. Existen tres tipos principales de proteínas: la zeína, la globulina y la glutenina. La zeína es considerada una proteína imperfecta ya que carece de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano (deficiencia en la calidad nutricional). Por otro lado, la glutenina y la globulina se ubican principalmente en el germen y están provistas de todos los aminoácidos esenciales (IICA-PROCIANDINO).

Los lípidos se encuentran principalmente en el germen (80-85%), se presentan como ácidos grasos saturados esteárico y palmítico; y ácidos insaturados linolénico y araquidónico. En menor cantidad encontramos a los ácidos fórmico y acético (Angel, 2010; IICA-PROCIANDINO; Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013).



El contenido de sustancias minerales (cenizas) del maíz oscila entre 1,2 a 1,7%, y se encuentran en un 75% en el germen. El maíz es un cereal pobre en calcio y rico en fósforo y hierro (IICA-PROCIANDINO; Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013). En cuanto al contenido vitamínico el maíz presenta un elevado contenido de carotenoides, vitamina A, tiamina y riboflavina. Las cantidades de ácido ascórbico y vitamina D son despreciables (IICA-PROCIANDINO).

1.1.3 Cultivo del maíz

1.1.3.1. Época de siembra: generalmente inicia con el período de lluvia tanto en la región Sierra como en la región Costa. En la Sierra, la siembra tiene lugar desde septiembre a diciembre lo que permite obtener una mejor germinación y producción (Eguez & Pintado, 2011; Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013).

1.1.3.2. Clima de cultivo: el maíz de altura (sierra) requiere de 760 a 1300 mm de precipitación durante todo el ciclo y una temperatura de 10 a 20°C (Peñaherrera, 2011).

1.1.3.3 Suelo: el maíz necesita suelos profundos, ricos en materia orgánica, con un pH entre 5.5 y 7.5; además se debe contar con buen drenaje para evitar encharcamientos (Peñaherrera, 2011).

1.1.3.4. Siembra: es importante una buena selección de la semilla para la obtención de una buena productividad. Las semillas óptimas para la siembra deben contar con pureza genética, física, calidad sanitaria, poder de germinación y deben conservar las características agronómicas propias de la variedad (Eguez & Pintado, 2011;



Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013). Por otra parte el suelo debe prepararse dos meses antes de la siembra a través de arado; con lo cual se consigue eliminar malezas, plagas y facilita la descomposición de residuos de otras cosechas. El surcado debe realizarse a una distancia de 80 a 90 cm entre surcos. A un costado de los mismos, con ayuda de un gualmo (palo con punta), se realizan los hoyos con una profundidad no mayor de 5cm, en los cuales se colocan dos semillas de maíz; de ésta manera se asegura una buena germinación y que las plantas emerjan al mismo tiempo (Eguez & Pintado, 2011; Peñaherrera, 2011).

1.1.3.5. Fertilización: es necesario realizar un análisis del suelo para conocer la cantidad de nutrientes requeridos para el cultivo; en caso de no ser posible el análisis, se han observado buenos rendimientos con la aplicación del abono 10-30-10 al fondo del surco en la siembra (Eguez & Pintado, 2011).

1.1.3.6. Agua de riego: la mayoría de los productores realizan la siembra en el inicio del período de lluvia, por lo cual no siempre es necesario el uso de un sistema de riego. Si se dispone de un sistema, es recomendable el riego por aspersión o goteo para un eficiente uso del agua; teniendo en cuenta que durante la etapa de emergencia la planta requiere una humedad constante (Eguez & Pintado, 2011; Peñaherrera, 2011).

1.1.3.7. Cosecha: la época de cosecha depende de la temperatura, altitud y variedad del maíz usada (Cordero Ruíz, 2012; Peñaherrera, 2011). En general el cultivo se encuentra maduro de 7-8 semanas luego de la aparición de las flores, en éste período el grano contiene un 35-45% de humedad y el máximo contenido de



materia seca, éste es el momento en el cual el cultivo debe ser cosechado para evitar las pérdidas en el campo (FAO, 2003; Mejía, 2005).

Cuando el cultivo se destina a consumo como choclo, la cosecha se realiza cuando el grano está bien formado y en estado lechoso; el almacenamiento se realiza en sacos hasta su comercialización. La cosecha del grano seco se realiza cuando el grano está en su madurez fisiológica, que se detecta con la presencia de una capa negra en la base del grano. Para su comercialización se almacena el producto en sacos, luego de 20 días adicionales en el campo (Eguez & Pintado, 2011; Peñaherrera, 2011).

La cosecha debe realizarse en la época óptima ya que si se cosecha con un alto contenido de humedad, se dificulta la conservación del producto; los granos se rompen, deterioran y son más susceptibles a pudriciones y contaminación por hongos (Cordero Ruíz, 2012).

1.1.4 Manejo del periodo post-cosecha

1.1.4.1. Secado: el secado de la mazorcas se debe realizar al sol sobre lonas, volteando periódicamente el producto para que el secado sea uniforme, hasta alcanzar una humedad de un 12% (Peñaherrera, 2011).

1.1.4.2. Limpieza, clasificación y desgrane: se deben eliminar las mazorcas enfermas y las impurezas como tuzas, pelos de maíz, hojas y tallos ya que podrían actuar como portadores de hongos e insectos. Antes del desgrane se deben clasificar las mazorcas en aquellas destinadas para la comercialización, maíz para



autoconsumo y maíz para semilla. Finalmente, para desgranar las mazorcas los granos deben estar completamente secos (12% humedad) (Peñaherrera, 2011; Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013).

1.1.4.3. Ensacado y almacenamiento: el grano debe almacenarse en sacos limpios, en lugares frescos con temperaturas de 10-12°C, con una humedad inferior al 13% y libres de insectos y roedores (Eguez & Pintado, 2011; Peñaherrera, 2011).

1.1.5 Maíz en el Ecuador

1.1.5.1. Producción de maíz ecuatoriano: en el Ecuador existe una elevada producción de maíz, alcanzando anualmente cifras de 43.284 toneladas solamente en la sierra ecuatoriana. Las provincias donde se ha observado una mayor presencia del cultivo son Bolívar en primer lugar con un 31,8%, en segundo lugar Cotopaxi con un 21,8% y finalmente la provincia de Azuay con 19,4% del total nacional. En lo que se refiere al consumo per cápita de maíz, a nivel nacional es de 82,9 Kg/persona/año. Hasta el 2009, el consumo por habitante se ha incrementado en una tasa promedio de un 1,4% (INEC, 2009).

La distribución del cultivo de los diferentes tipos de maíz depende de las costumbres de los agricultores. En el norte del Ecuador; en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha se consume maíz de tipo amarillo harinoso, en la parte central (Bolívar y Chimborazo), se cultiva el maíz blanco harinoso y; en el sur principalmente en las provincias de Cañar y Azuay se cultiva el maíz blanco amorochado o Zhima



(Peñaherrera, 2011). En la tabla 1.1 resume la superficie cosechada de maíz en la Sierra ecuatoriana.

Tabla 1.1. Superficie cosechada de maíz, en hectáreas (Ha), en las provincias de la Sierra ecuatoriana. Fuente: (Peñaherrera, 2011).

Provincia	Superficie cosechada (Ha)
Carchi	964
Imbabura	6.789
Pichincha	13.199
Cotopaxi	38.840
Tungurahua	4.682
Chimborazo	12.906
Bolívar	31.620
Cañar	3.252
Azuay	28.270
Loja	61.184
Total	201.706

1.1.5.2. Valor nutritivo del maíz ecuatoriano: Existen diferentes variedades de maíz cultivadas en el Ecuador y el contenido de proteínas y almidón en el maíz puede ser diferente de una variedad a otra. En la tabla 1,2 se detalla el valor nutritivo de las principales variedades de maíz ecuatoriano (Peñaherrera, 2011).

Tabla 1.2. Composición química del porcentaje de proteína y de almidón. Fuente: (Peñaherrera, 2011)

Raza	% Proteína (En base seca)	% Almidón (En base seca)
Blanco Blandito (INIAP-102)	8,3	73,1
Guagal (INIAP-111)	8,1	72,1
Chaucho (INIAP-122)	9,1	74,6
Mischca (INIAP-124)	8,0	74,0
Cuzco ecuatoriano	8,8	73,6
Chulpi (INIAP-192)	10,2	64,3

1.1.5.3. Clasificación del maíz: existen alrededor de 200 variedades diferentes de maíz, que se clasifican de acuerdo a las características del endospermo. De éstas, cinco son las más importantes: reventador, duro, blando, dentado y dulce (Mejía, 2005).

En el Ecuador, las principales variedades cultivadas son aquellas obtenidas de cruces entre diferentes especies que son el cuzco ecuatoriano (Zhima), guagal blanco blandito, mischa, chulpi, morochón y canguil morado. Estas variedades conservan las mismas características de la mazorca y el grano que el material original, así como la adaptación agroecológica pero con rendimientos que superan a las variedades tradicionales (Cordero Ruíz, 2012; Mejía, 2005; Peñaherrera, 2011).



Las principales variedades de la sierra ecuatoriana son (Encalada, Muñoz, & Ortiz, 2006; Peñaherrera, 2011):

- **INIAP-101:** Blanco harinoso precoz.
- **INIAP-102:** Blanco suave “Blanco blandito”
- **INIAP-111:** Blanco harinoso tardío “Guagal mejorado”
- **INIAP-122:** Amarillo suave precoz “Chaucho mejorado”
- **INIAP-124:** Amarillo suave precoz “Mishca mejorado”
- **INIAP-130:** Amarillo suave precoz.
- **INIAP-192:** Chulpi mejorado.
- **INIAP-153:** Blanco semi duro de precocidad intermedia “Zhima mejorado”
- **INIAP-180:** Amarillo duro de alto rendimiento
- **INIAP-176:** Amarillo cristalino.

1.1.6 Plagas y enfermedades del maíz

Existe una gran variedad de plagas que pueden afectar a la planta desde la germinación hasta la cosecha, causando enfermedades que pueden producir importantes pérdidas del cultivo. Los principales métodos para el control de plagas y enfermedades son el uso de plaguicidas, aceite vegetal (mariposa y mosca), uso de semilla libre de enfermedades y limpieza de residuos de cosechas anteriores (Cordero Ruíz, 2012; Eguez & Pintado, 2011; Peñaherrera, 2011).

Los insectos cumplen un rol importante en la contaminación del maíz por micotoxinas, tanto en la etapa de cultivo como en el almacenamiento del producto.



Al afectar la planta el insecto actúa como vector, facilitando la entrada de la espora en la mazorca y aumentando la infección al dañar el pericarpio del grano (García & Heredia, 2006; Magan & Olsen, 2004; Peñaherrera, 2011). Particularmente el gorgojo, que es una plaga de almacenamiento, se puede encontrar en el interior de los granos almacenados de ciclos anteriores y al almacenar nuevas cosechas el insecto se dirige a los granos sanos. El gorgojo ataca al grano produciendo alteraciones en el germen y desaparición de una gran cantidad de endospermo; además facilita el desarrollo de hongos en el grano lo cual aumenta el riesgo de producción de sustancias tóxicas (micotoxinas) (Mejía, 2005; Peñaherrera, 2011).

1.2 MICOTOXINAS

1.2.1 Introducción

La palabra micotoxina proviene del griego *mico* que significa hongo y *toxicum* que significa veneno. Las micotoxinas son productos del metabolismo secundario de los hongos toxigénicos, es decir que no son requeridos para el normal crecimiento y desarrollo de los hongos. Químicamente, las micotoxinas son productos no volátiles, de relativo bajo peso molecular, que presentan estructuras similares con abundantes grupos oxigenados y compuestos heterocíclicos (Bräse et al., 2009; FAO., 2009; Méndez-Albores, Villa, Rio-García, & Martínez, 2004).

Las principales especies productoras de micotoxinas corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Stachybotrys* y *Myrothecium*. Las micotoxinas pueden ser exclusivas de una especie, pero la mayoría de ellas son producidos por más de una especie (Bräse et al., 2009). Entre las micotoxinas más



estudiadas y de importancia mundial están las aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, zearanelona, alcaloides de ergot y tricotecenos (Bräse et al., 2009; FAO., 2009). A continuación se resume en la Tabla 1.3 los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de alimentos.

Tabla 1.3. Principales micotoxinas producidas por hongos contaminantes de alimentos. Fuente: (FAO., 2009).

Especie de moho	Micotoxinas producidas
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ y B ₂
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol, nivalenol, Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme (F. verticillioides)</i>	Fumonisina B ₁
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

La producción de estos metabolitos secundarios depende completamente de la presencia de condiciones óptimas de temperatura y humedad en el ambiente, así como del contenido de humedad en el alimento, madurez de la colonia, presencia de otro hongo o microorganismo y del daño físico del sustrato provocado por insectos.



Normalmente, los hongos crecen entre 10 y 40°C, en un rango de pH de 4 a 8, y con niveles de actividad de agua (A_w) por encima de 0,70 (a veces puede crecer en superficie muy secas) (Bräse et al., 2009; FAO., 2009).

Una vez que se ha producido la micotoxina, ésta se encontrará en todos los lugares de la colonia (hifa, micelio, esporas) así como en el sustrato en donde creció la colonia. El desarrollo de micotoxinas pueden ocurrir en cualquier etapa de la cadena alimenticia: antes de la cosecha, entre la cosecha y el secado, y durante el almacenamiento de los productos. Las micotoxinas pueden encontrarse en una amplia gama de alimentos de contenido acuoso medio y bajo que incluyen frutas, granos de cereales, frutos secos, frijoles y guisantes (Tabla 4) (FAO., 2009).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que hasta un 25% de los productos agrícolas del mundo están contaminados con micotoxinas a un cierto grado (Köppen et al., 2010). El ser humano y los animales al consumir alimentos contaminados con micotoxinas están expuestos a diversos efectos adversos que incluyen alteraciones nerviosas, gastrointestinales, reproductivas, inmunológicas así como efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos.

En la actualidad se considera que los países en vías de desarrollo son los más expuestos al consumo de alimentos contaminados con micotoxinas en comparación con los países desarrollados, lo cual se puede relacionar a la escasa regulación gubernamental y a la falta de aplicación de tecnologías útiles para el manejo y conservación de los alimentos. Sin embargo, es importante señalar que incluso con la aplicación de buenas prácticas de agricultura y un adecuados sistemas de análisis



de peligros y detección de puntos críticos de control (HACCP), no ha sido posible conseguir la completa eliminación de micotoxinas en alimentos (Bräse et al., 2009; FAO., 2009).

1.2.2 Aflatoxinas

El nombre de aflatoxinas deriva de la combinación de “a” de *Aspergillus*, “fla” de la especie y toxina que significa veneno. Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* que se desarrollan en climas tropicales y subtropicales donde las condiciones de temperatura y humedad son óptimas para la producción de las mismas. Se encuentran especialmente en cultivos de cereales (maíz, arroz, trigo, sorgo), frutos secos (nuez, almendras, pistachos), especias, algodón y semillas oleaginosas. También se pueden encontrar en leche, productos lácteos (queso yogurt), huevos y carnes por consumo de piensos contaminados con aflatoxinas por parte del animal.(FAO., 2009)

1.2.2.1 Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas: las aflatoxinas son metabolitos de baja solubilidad en agua pero solubles en soluciones acuosas de metanol, acetonitrilo y acetona. Son relativamente inestables a la luz, susceptibles a la hidrólisis alcalina y estables a un rango de pH entre 3 y 10 (Campos, 1994).

Químicamente las aflatoxinas son compuestos formados por anillos heterocíclicos oxigenados, que contienen un anillo de lactona que los hace susceptibles a la hidrólisis alcalina (Torres, Guzmán-Ortiz, & Ramírez-Wong, 2001).

Hasta el momento se han identificado alrededor de 18 clases de aflatoxinas, de las cuales las más importantes incluyen aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ que se originan de manera natural. Las demás aflatoxinas (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) se han encontrado como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Contreras & Flórez, 2009; Smith & Henderson, 1991). (Ver figura 2).

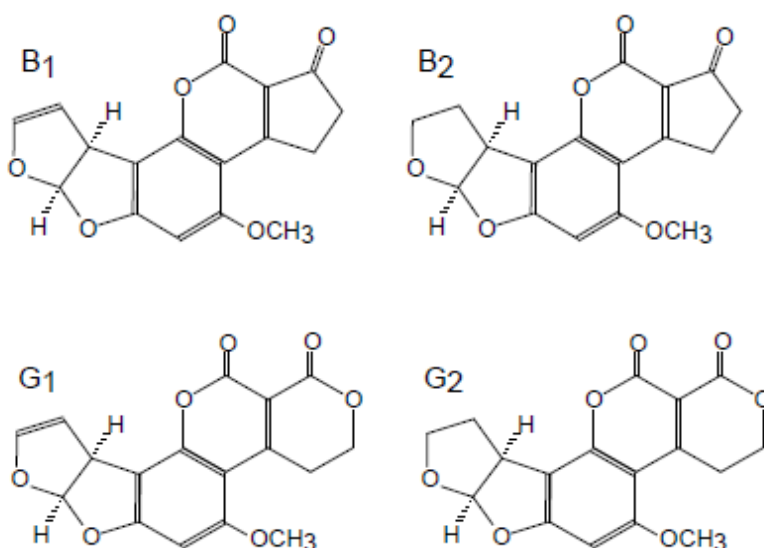


Figura 1.2. Estructura de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂. **Fuente:** (Kralj Cigić & Prosen, 2009)

Las toxinas tipo B se caracterizan por la fusión de un anillo ciclopentanona a un anillo lactona de la estructura cumarina, mientras las toxinas G contienen un anillo lactona fusionado en lugar del anillo ciclopentanona (Figura 2). La nomenclatura B y G, hace referencia a sus propiedades físico-químicas, dado que las aflatoxinas de tipo B presentan fluorescencia azul (blue) y las de tipo G fluorescencia verde (green)



cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm (Bräse et al., 2009; Contreras & Flórez, 2009).

Las especies como *Aspergillus flavus* son productores de AFB₁ y AFB₂ mientras *Aspergillus parasiticus* producen AFG₁ y AFG₂ así como AFB₁ y AFB₂. Otros tipos de aflatoxinas M₁ (metabolito producido por AFB₁), M₂, B₂A y G₂A han sido aisladas de cultivos *A. flavus* y *A. parasiticus* pero su producción es mínima (Bhat, Rai, & Karim, 2010).

El desarrollo del hongo productor de aflatoxinas dependerá de las condiciones de temperaturas en la que se encuentre, por ejemplo para *A. parasiticus* el rango temperatura de crecimiento oscila entre 6 a 8 °C y el máximo es de 44 a 66 °C, siendo óptima de 25 a 35 °C mientras que *A. flavus* puede producir la toxina entre 12 y 42 °C y su óptima es de 28 a 30 °C (FAO., 2009).

1.2.2.2. Efectos toxicológicos de las aflatoxinas: la exposición a aflatoxinas se da principalmente a través de la ingestión de alimentos contaminados ya sean por parte del animal o persona. También la absorción puede darse por vía dérmica, pero ésta es lenta e insignificante (Bhat et al., 2010; Bräse et al., 2009; García & Heredia, 2006; Gnonlonfin et al., 2013).

Las aflatoxinas son conocidas principalmente por causar enfermedades hepáticas agudas y crónicas, así como de poseer efectos inmunosupresores, mutagénicos teratogénico. (Bräse et al., 2009) Según la Agencia Internacional de Investigación de Cancer (IARC), las aflatoxinas son clasificadas como carcinógenos humanos de tipo



1(IARC, 2004). El consumo de comida y piensos contaminados con altos niveles de aflatoxinas ha sido relacionado con el retraso de crecimiento y pérdida de peso en niños, y en algunos casos ha llevado al desarrollo de cáncer hepatocelular. Además las aflatoxinas han sido relacionadas con el síndrome de kwashiorkor y como co-factores en la incidencia de cáncer de hígado en pacientes que poseen el virus de la Hepatitis-B (Bhat et al., 2010; Wagacha & Muthomi, 2008).

Su acción carcinogénica se basa en la biotransformación por el sistema hepático microsomal P450 a AFB₁-8,9-epóxido, un intermediario altamente reactivo capaz de unirse a las proteínas, a los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico; formando un compuesto estable con los residuos guanil que puede causar mutaciones en el gen p53 supresor de tumores. Esta alteración es característica de varios carcinomas, especialmente del carcinoma hepático en el hombre. (Urrego Novoa & Díaz, 2006).

1.2.2.3. Regulaciones de aflatoxinas en maíz: Actualmente, el límite máximo permitido en alimentos de consumo humano por parte de la FDA (Food and Drug Administration) es de 20 µg/kg de alimento (ppb) para el total de aflatoxinas (AFB₁, AFG₁, AFB₂, y AFG₂). Si las concentraciones exceden los límites establecidos, estos alimentos son destinados para el consumo animal. Por otra parte, el Comité Regulador Europeo establece un límite máximo de 4 µg/kg para el total de aflatoxinas y 2 µg/kg solo para AFB₁. En lo que refiere a Ecuador, el INEN permite un contenido máximo de 20 µg/kg de aflatoxinas totales (Bhat et al., 2010; Bräse et al., 2009; INEN, 1995; Normalización, 1995).



1.2.3 Fumonisin

Las fumonisin son una familia de 10 micotoxinas más recientemente aisladas, producidas por varias especies del género *Fusarium* (Bhat et al., 2010; Bräse et al., 2009). Las distintas especies de éste género pueden desarrollarse en una gran variedad de ambientes, principalmente por su habilidad para vivir en ausencia de oxígeno, y son considerados uno de los patógenos más importantes que afectan a cereales (Bräse et al., 2009).

Las fumonisin fueron aisladas por primera vez de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*; contaminantes comunes del maíz y productos derivados del maíz a nivel mundial (Bhat et al., 2010; Magan & Olsen, 2004).

La producción de fumonisin en el maíz generalmente está asociada a factores que causan estrés en la planta tales como: daños por insectos, elevado contenido de humedad en el suelo, elevadas temperaturas y falta de nutrientes en el suelo. Existen reportes de contaminación luego de la cosecha que han sido asociados a almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura inadecuadas (Magan & Olsen, 2004).

1.2.3.1. Propiedades físico-químicas de las fumonisin: las fumonisin son compuestos con un peso molecular promedio de 721.8 Da; tienen carácter polar, solubles en agua y soluciones acuosas de metanol y acetonitrilo, y son insolubles en solventes orgánicos (Bhat et al., 2010; Magan & Olsen, 2004).

A diferencia de la mayoría de micotoxinas, las fumonisinas no presentan una estructura cíclica. Son derivados policétidos que contienen aminas primarias y dos grupos tricarbóxicos. Se caracterizan por una cadena aminopolihidroxiálquil de 19-20 carbonos que presenta dos esterificaciones con grupos propano 1-2-3 ácido tricarbóxico (ácido tricarbálico). Estructuralmente se asemejan a los esfingolípidos (Bräse et al., 2009; Magan & Olsen, 2004).

Las fumonisinas se dividen en cuatro series relacionadas químicamente entre sí (A, B, C y P). De estas series, la serie B (FB₁₋₃) se caracteriza por un grupo amino libre, y es la más relacionada a contaminaciones en alimentos (Figura 3). La fumonisina B₁ (FB₁), conocida también como macrofusina, generalmente es responsable de un 70-80% de las contaminaciones. Las fumonisinas B₂ y B₃ suelen ser responsables de un 15-25% y 3-8% de contaminación, respectivamente (Bräse et al., 2009; Magan & Olsen, 2004).

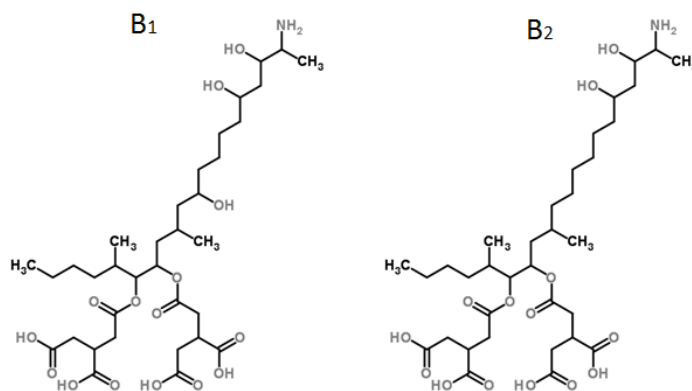


Figura 1.3. Estructura química fumonisina B₁ y B₂. **Fuente:** Royal Society of

Chemistry (<http://www.chemspider.com/>)



1.2.3.2. Efectos toxicológicos de las fumonisinas: el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas ha sido asociado a neurotoxicidad, aumento de la incidencia de cáncer esofágico, cáncer hepático, efectos inmunosupresores y defectos en el tubo neural en ratas (Bhat et al., 2010; Blandino, Reyneri, Colombari, & Pietri, 2009; Magan & Olsen, 2004).

El efecto carcinogénico de las fumonisinas ha sido comprobado en animales. En el caso de los humanos, dicho efecto ha sido evaluado y la IARC ha designado a las fumonisinas B₁ y B₂ como posibles agentes cancerígenos en humanos debido a que la mayoría de efectos toxicológicos en la salud humana no se encuentran claros ((IARC), 2002; Magan & Olsen, 2004; Palencia et al., 2003).

La mayoría de los efectos tóxicos de las fumonisinas provienen de su capacidad de alterar el metabolismo de los esfingolípidos. La fumonisina B₁ inhibe a la enzima ceramida sintetasa responsable de la acetilación de la esfinganina y la esfingosina (bases esfingoides) (Figura 4) (Magan & Olsen, 2004; Palencia et al., 2003).

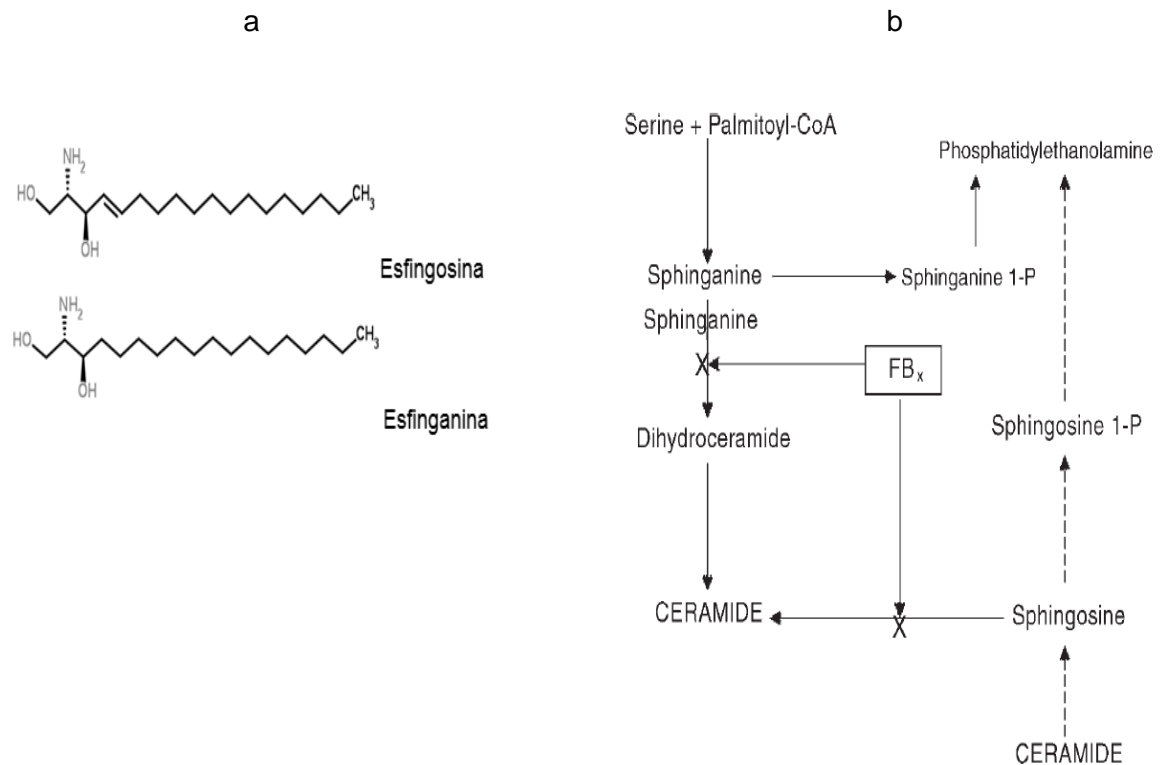


Figura 1.4. a) Estructuras químicas de la esfingosina y esfinganina. b) Mecanismo de acción de las fumonisinas. **Fuente:** (Magan & Olsen, 2004).

La alteración de ésta vía metabólica resulta en un aumento de los niveles de los precursores de esfingolípidos y una disminución de los niveles de esfingolípidos complejos responsables de la comunicación celular y la transmisión de señales. Por su parte, los elevados niveles de esfinganina (en menor proporción esfingosina) inician una cascada de alteraciones celulares (apoptosis y proliferación celular) que podrían resultar en toxicidad y carcinogenicidad (Bhat et al., 2010; Magan & Olsen, 2004).



1.2.3.3. Regulaciones de fumonisinas en maíz: En base a la información toxicológica de las fumonisinas, la FDA ha establecido el límite máximo permitido de fumonisinas totales ($FB_1+FB_2+FB_3$) en maíz y productos derivados de maíz 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento (Magan & Olsen, 2004). En Europa, la normativa es más estricta, siendo de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la suma de FB_1+FB_2 (Bhat et al., 2010; Magan & Olsen, 2004). En países de Latinoamérica, los niveles permitidos para fumonisinas totales son de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento (Palencia et al., 2003). En el Ecuador no existe un reglamento vigente que controle los niveles de fumonisinas en alimentos (Bhat et al., 2010; FAO, 2003; Magan & Olsen, 2004; Palencia et al., 2003).

1.3 NIXTAMALIZACIÓN

La nixtamalización es un proceso térmico alcalino, desarrollado por civilizaciones nativas americanas, para la elaboración de tortillas como producto final. El proceso consiste en la cocción del grano de maíz por 45-60 min en una solución alcalina al 1% (2-3 litros de agua /kg de maíz procesado con 1-3% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -cal-), seguido de un remojo por 14 horas. Luego de transcurrido éste tiempo el líquido de remojo se desecha y los granos cocinados son lavados para eliminar el pericarpio y el exceso de cal. Finalmente los granos nixtamalizados se muelen para formar una masa que se hornea o fríe para producir tortillas como producto final (Bullerman & Bianchini, 2007; De La Campa, Miller, & Hendricks, 2004; García & Heredia, 2006; Magan & Olsen, 2004; Tosi Vélez, 2012).



Se ha comprobado que el proceso de nixtamalización puede reducir la contaminación del maíz por aflatoxinas en un 83% y de fumonisinas en un 94%; sin afectar el valor nutricional del producto final (De La Campa et al., 2004; García & Heredia, 2006).

En el Ecuador, el maíz se consume directamente como grano cocido. El pelado del grano se realiza usando un proceso similar a la nixtamalización, en el cual se utiliza cal, ceniza o una mezcla de ambos. El producto del tratamiento alcalino es sometido a una nueva cocción que permite que el grano reviente (mote), lo cual constituye el producto final del proceso. (Tosi Vélez, 2012) El pelado de maíz con ceniza es una técnica ancestral de las regiones rurales de la sierra ecuatoriana, que confiere al grano especiales propiedades sensoriales, incluyendo mejor sabor y textura (Pappa, de Palomo, & Bressani, 2010; Tosi Vélez, 2012). Además, este proceso confiere diferentes propiedades fisicoquímicas como una mejora en la absorción de agua de los granos y el pH del líquido de cocción (Pappa et al., 2010).



2. METODOLOGÍA

2.1. TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio fue de tipo cuantitativo, analítico, descriptivo de corte transversal que incluyó la caracterización del pelado de maíz con ceniza en el cantón Nabón, la determinación de la contaminación de micotoxinas en el maíz y evaluación de la reducción de la contaminación por el pelado con ceniza.

2.2. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el cantón de Nabón, localizado en la provincia del Azuay al sur de la Sierra ecuatoriana a 3.000 metros sobre el nivel del mar. La mayoría de los habitantes de Nabón (93%) viven en áreas rurales y el 35% se consideran a ellos mismos como indígenas. Este cantón fue elegido por ser el más pobre de la provincia del Azuay (96.5%) en el cual uno de los principales cultivos es el maíz (Gobierno-Autonomo-Descentralizado-Municipal-Nabon, 2012; Nabón, 2012; Ortiz et al., 2013).

2.3. MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se adoptó un muestreo por conveniencia, por el cual se recolectó la información y las muestras de maíz de un total de 40 participantes. La toma de muestras se llevó a cabo durante el período Septiembre-Octubre de 2014 para lo cual se realizaron reuniones para socializar los objetivos y la metodología del estudio con las autoridades y agricultores de la zona. Finalmente se obtuvo la colaboración



voluntaria de 40 participantes (Anexo 1) provenientes de Nabón centro y sus alrededores (Figura 2.1.), quienes fueron informados de forma verbal y escrita a través del consentimiento informado (Anexo 2) sobre los objetivos, actividades, remuneración por la entrega de muestras de maíz, beneficios y riesgos del estudio.

A cada productor se solicitó un total de 10 kg de maíz del mismo lote de producción, el cual fue dividido en dos partes:

- Muestra 1: granos secos sin pelar (4 kg)
- Muestra 2: granos secos pelados con ceniza. (6 kg)

En una primera visita, se recolectó la muestra 1 debidamente homogenizada; la misma se transportó en saquillos etiquetados y cerrados para evitar posibles contaminaciones por humedad. Se solicitó al agricultor realizar el proceso de pelado de maíz con ceniza (muestra 2) y realizar el secado posterior de la misma. Una semana después de la primera visita, se recolectó la mitad de la muestra 2, la misma que se transportó en iguales condiciones que la muestra 1. Ambas muestras provinieron del mismo lote y por lo tanto del mismo proveedor. La otra mitad de la muestra 2 fue finalmente cocinada por el mismo proveedor. Esta muestra no fue objeto de estudio del presente trabajo de tesis.

Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca y se almacenaron apropiadamente hasta su procesamiento y análisis.

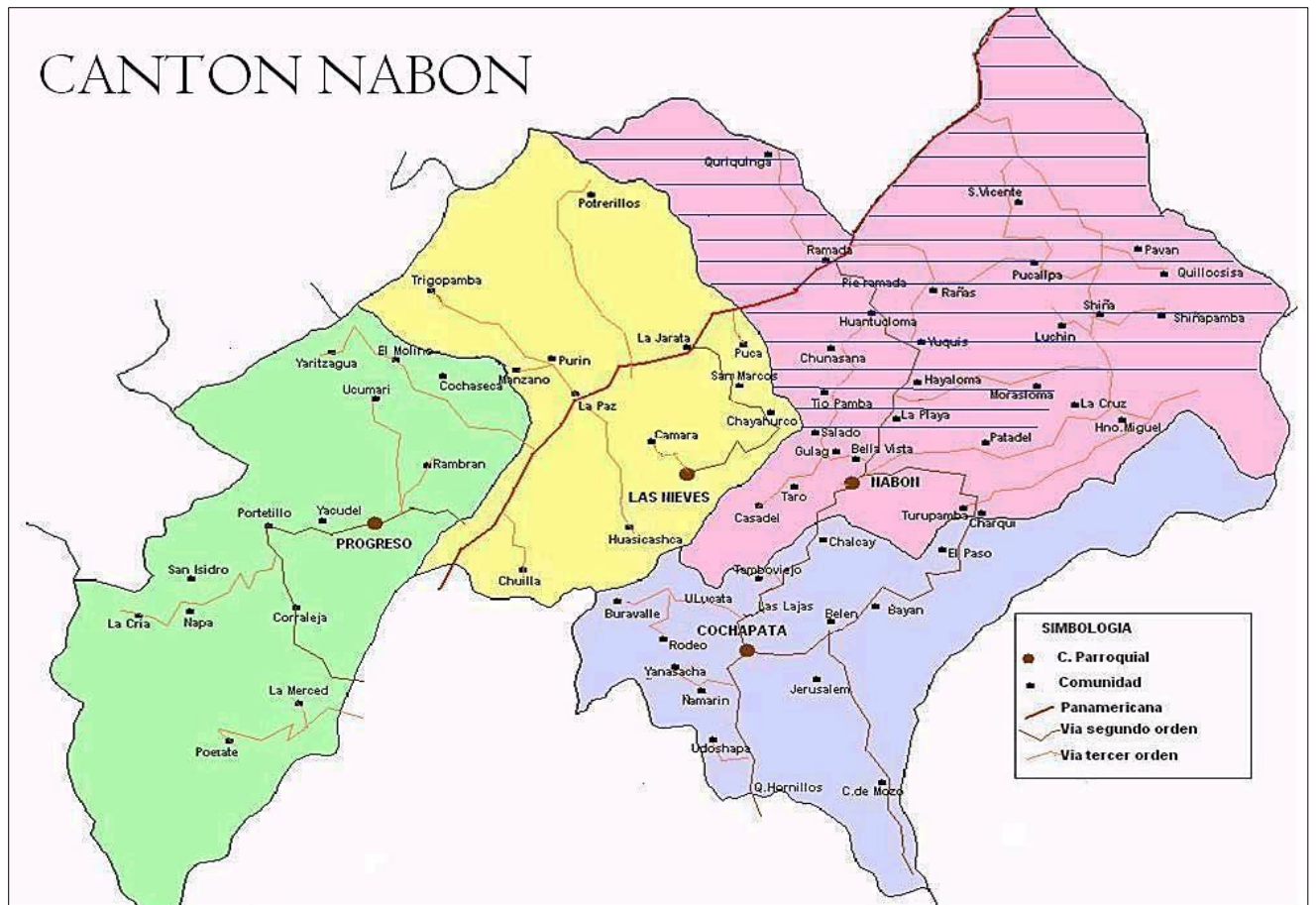


Figura 2.1. Mapa del catón Nabón y sus parroquias. **Fuente:** Municipalidad de Nabón (<http://www.nabon.gob.ec/portal/index.php/municipio/ubicacion-geografica>).

2.4. INFORMACIÓN SOBRE PRÁCTICAS AGRÍCOLAS

Junto con las muestras, se recolectó información sobre las prácticas agrícolas antes y después de la cosecha (época de siembra y cosecha, uso de pesticidas y fertilizantes, tratamiento en caso de contaminación con mohos u otro microorganismo), tipos de secado del maíz, caracterización del maíz y sobre el proceso de pelado de maíz con ceniza. Estos datos se recolectaron mediante la



aplicación de encuestas (previamente diseñadas y probadas) durante la etapa de muestreo (Anexo 3).

2.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE MAÍZ

2.5.1. Tratamiento de las muestras: Las muestras de maíz (muestra 1 y 2) fueron almacenadas en condiciones secas y a temperatura ambiente (20°C) en saquillos plásticos para simular las mismas condiciones de almacenamiento de los productores. Una vez recolectadas todas las muestras, fueron finamente molidas y almacenadas en fundas de papel debidamente etiquetadas a temperatura ambiente hasta su análisis.

2.5.2 Equipos, materiales y reactivos: Instalaciones, equipos, reactivos, estándares y la mayoría de los materiales para preparación de muestras fueron provistos por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición (Proyecto IFS Grant E/5398-1 y Proyecto “Alimentación, Nutrición y Salud” VLIR-IUC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca).

2.5.2.1 Equipos

- HPLC con detector de fluorescencia (Agilent 1200, US)
- Generador de nitrógeno (Domnick Hunter, US).
- Sistema de extracción al vacío (Heidolph, Alemania)
- Potenciómetro (Mettler Toledo, Suiza)
- Centrifuga (Hettich, Alemania)
- Homogeneizador horizontal (VWR, US)



- Purificador y destilador de agua (Barnstead, US)
- Micropipeta (Brand, Alemania)
- Micropipeta (Boeco, Alemania)
- Baño ultrasónico (Branson, US)

2.5.2.2 Materiales e insumos

- Papel filtro Whatman No. 1
- Filtros de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (0.45 μm x 13 mm)
- Cartuchos para extracción de fase sólida de intercambio aniónico fuerte (SAX)
- Cartuchos para extracción de fase sólida de inmunoafinidad (IAC) para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂
- Material de vidrio
- Papel aluminio
- Microtubos

2.5.2.3 Reactivos y estándares

- Fosfato de sodio dihidrogenado
- Metanol (MeOH)
- Acetonitrilo (MeCN)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Solución buffer de fosfato (PBS)
- Hexano
- Ácido trifluoroacético
- Ácido ortofosfórico



- Ácido acético glacial (HAc)
- Tetraborato de sodio
- B-mercaptoetanol
- Orto-phtaldehido
- Estándares de extractos sólidos puros de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂)
- Estándares de extractos sólidos puros de fumonisinas (FB₁, FB₂)

2.5.3. Análisis de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂

Las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ fueron determinadas a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección por fluorescencia siguiendo el método analítico estandarizado por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca.

2.5.3.1. Preparación de la muestra

- *Extracción:* en un una botella de vidrio tapa rosca se colocó 20 g. de maíz 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 PBS (pH de 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 H₂O 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 eluidas 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 H₂O 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 redissuelto 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.

2.5.3.2. Análisis por HPLC

Para el análisis de aflatoxinas, el residuo seco fue reconstituido con 1000 µL de una mezcla MeCN/H₂O (1:1, v/v) y homogeneizado en un baño ultrasónico a 30°C por 10 minutos. El extracto reconstituido fue filtrado (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 C₁₈ (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: A. mezcla de H₂O/MeOH/HAc (89:10:1, v/v/v); B. MeOH y C. MeCN (tabla 2.1). Las aflatoxinas fueron detectadas a una longitud de onda de 365 nm de excitación y 455 nm de emisión para AFG₂ y AFB₂ y 432 nm de emisión para AFG₁ y AFB₁. El análisis tuvo una duración total de 18 minutos.

Tabla 2.1. Programa de elución tipo gradiente.

Solvente	Fase Móvil		
	A	B	C
Minutos	H ₂ O/MeOH/HAc (89:10:1, v/v/v)	MeOH	MeCN
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 2.2. Características del método analítico de aflatoxinas

Características del método analítico de aflatoxinas					
		AFB₁	AFB₂	AFG₁	AFG₂
Límite de detección	µg/kg	0,86	0,67	0,61	0,92
Límite de cuantificación	µg/kg	1,72	1,34	1,23	1,84
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

2.5.4 Análisis de fumonisinas B₁ y B₂

Las fumonisinas B₁ y B₂ presentes en el maíz fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por fluorescencia siguiendo el método analítico optimizado por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca.

2.5.4.1. Preparación de la muestra

- *Extracción:* Las fumonisinas se extrajeron a partir de 20 g de la muestra de maíz finamente molida con 50 mL de una mezcla metanol/agua (75:25, v/v) en una de botella de vidrio de 100 mL. Se agitó vigorosamente por dos minutos. Posteriormente, se colocó la muestra en un agitador horizontal por 10 minutos a 300 rpm. La suspensión se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 y fue sometida a centrifugación por 10 minutos a 4000 rpm. El



pH del filtrado debía estar entre 5,8 y 6,5, caso contrario el pH fue ajustado con NaOH 0.1M o HCl 0.1N.

- *Lavado*: para limpiar la muestra se utilizaron cartuchos de intercambio aniónicos fuerte (SAX) que fueron pre-lavadas con 5 mL de metanol y 5 mL de metanol/agua (75:25, v/v). Se hizo pasar una alícuota de 10 mL del extracto a través de los cartuchos SAX a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. A continuación se realizó un lavado posterior con 8 mL metanol/agua (75:25, v/v) seguido de 3 mL de metanol a una velocidad de flujo de 5 mL/min. Se aplicó una ligera corriente de vacío en el cartucho (10 segundos). Finalmente las fumonisinas fueron eluidas muy lentamente (<1 mL min⁻¹) con 10 mL de metanol/ácido acético (99:1, v/v). El eluido fue recogido y evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.
- *Derivatización (in situ)*: El extracto seco se disolvió en 200 µL mL de metanol y se añadió 200 µL del reactivo derivatizante OPA (disolver 0,02 g de orto-ftaldehído en 0,5 mL de metanol, y añadir 2,5 mL de tetraborato de sodio 0,1 M y 25 µL de 2-mercaptoetanol). La solución se homogenizó por 30 segundos con un vortex y fue transferida inmediatamente en un vial para el análisis por HPLC. La solución derivatizada fue inyectada en un lapso total de 2min 30 segundos.

2.5.4.2. Análisis por HPLC

Un total de 20 µL de muestra fue inyectado en el HPLC en fase inversa. La separación cromatográfica se realizó en una columna ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (150 mm x 4.6 mm y de 5 µm tamaño de poro). La temperatura de trabajo de la



columna fue de 23°C. La separación se consiguió con una elución isocrática a una velocidad de flujo de la fase móvil de 1 mL min⁻¹. Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol/ buffer de fostato (NaH₂PO₄.H₂O) 0,1 M (75:25, v/v). El pH de la fase móvil se ajustó con ácido ortofosfórico hasta un pH de 3,35. Las Fumonisinias fueron detectadas por fluorescencia a longitudes de onda de 335 nm de excitación y 400 nm de emisión. El análisis tuvo una duración total de 18 minutos.

El método optimizado presenta las siguientes características analíticas:

Tabla 2.3. Características del método analítico para fumonisinas

Características del método analítico de fumonisinas			
		FB₁	FB₂
Límite de detección	µg/kg	2,37	3,95
Límite de cuantificación	µg/kg	4,73	7,90
Rango lineal	µg/kg	12,5 -125	12,5 -125
Linealidad (R ²)	-	0,9878	0,9955
Recuperación (recovery)	%	99	99

2.5.5. Curvas de calibración

2.5.5.1 Preparación de los estándares a partir de la solución madre

Se partió de una solución madre de 0.1 mg/mL de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, y fumonisinas B₁ y B₂ respectivamente. Los estándares fueron reconstituidos con acetonitrilo excepto para FB₁ que se utilizó una mezcla de acetonitrilo/agua 1:1.

Para la curva de calibración de aflatoxinas se partió de una mezcla de estándares secos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ de 100 µL a 5000 ng/mL y se redisolvió con 1000 µL de acetonitrilo (dilución 1/10) obteniendo una solución estándar de 500



ng/mL, de la cual se partió para realizar las siguientes diluciones: 75, 50, 40, 25, 20,15, 10, 7,5, 5,2,5,1,0,5 y 0,1 ng/mL (Tabla 2.4).

Para la curva de calibración de fumonisinas se partió de estándares secos de fumonisinas B₁ y B₂ de 100 µL a 0.1 mg/mL, respectivamente. Se redisolvió cada uno con 1000 µL de MeCN/H₂O. Se realiza una mezcla 1:1 de los estándares (500 uL FB₁ + 500 uL FB₂) obteniendo una concentración final de 5000 ng/mL. A partir de ésta concentración se realizó las siguientes diluciones (tabla 2.5).

Tabla 2.4. Preparación de soluciones estándares para aflatoxinas.

Concentración (ng/µL)	Stock	MeCN/H ₂ O (1:1)
	500 ng/mL	
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



Tabla 2.5. Preparación de soluciones estándares para fumonisinas.

Concentración (ng/μL)	Stock (5000 ng/mL)	Metanol:H ₂ O (1:1)
1000 (500)*	200	800
600 (300)	120	880
300 (150)	60	930
160 (80)	32	968
100 (50)	20	980
160 ng/mL		
80 (40)	500	500
80 ng/mL		
40 (20)	500	500
30 (15)	375	625
20 (10)	250	750
15 (7.5)	187,5	812,5
10 (5)	125	875
5 (2,5)	62,5	937,5
20 ng/mL		
2,5 (1,25)	125	875

Nota: * significa que la concentración entre paréntesis corresponde a la concentración final del estándar considerando la dilución final (1:1) con el reactivo derivatizante OPA.

2.6. ANÁLISIS DE DATOS

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

$$C \text{ (ng/g)} = \frac{C_1 \text{ (ng/mL)}}{g \text{ (g/mL)}}$$

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 2,5 g para aflatoxinas y 10 g para fumonisinas, lo que deduce de los siguientes esquemas de extracción y preparación de las muestras:

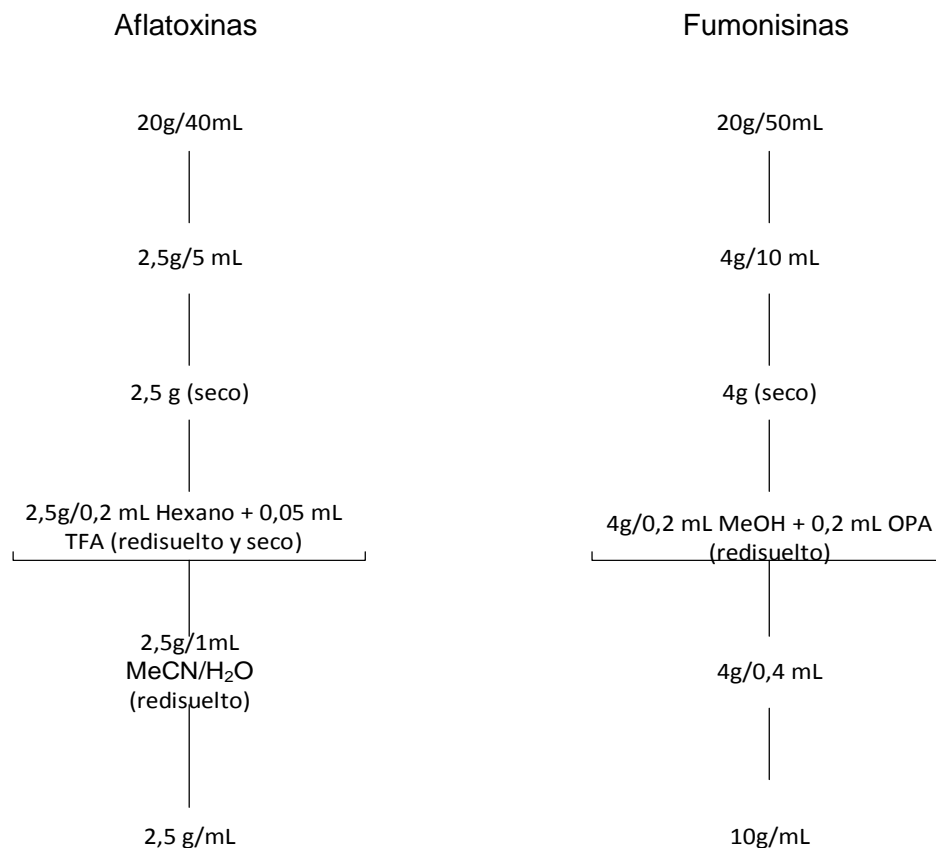




Figura 2.2. Esquema de cálculo de gramos de muestra por mililitro al momento de la inyección.

El análisis de los resultados incluyó estadística descriptiva para presentar las características de la población de pequeños productores de maíz de Nabón y sus prácticas agrícolas. Los resultados se presentaron con medidas de tendencia central y con tablas de contingencia.

La evaluación de la eficiencia del proceso de pelado con ceniza como estrategia de detoxificación de micotoxinas se llevó a cabo comparando el nivel de contaminación antes y después del pelado tests de Student pareado de una cola (one side paired t-test). Finalmente se evaluó la influencia de las prácticas agrícolas en el presencia de micotoxinas en el grano de maíz sin pelar. Esta evaluación se realizó utilizando regresiones logísticas bivariadas. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia del 5% ($P < 0.05$).

Los datos de las encuestas fueron ingresados por duplicado en el programa EpiData versión 3.1 y fueron analizados en el programa Stata versión 13.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE MAÍZ

En total se analizaron 40 muestras de maíz seco sin pelar y 40 muestras de maíz pelado con ceniza provistas por 40 pequeños productores de maíz del cantón Nabón y sus alrededores (Tabla 3.1.)

Tabla 3.1. Procedencia de las muestras de maíz (n=40)

Parroquia de Nabón	% del número total de muestras (n=40)
Yacudel	40
Progreso	12.5
Chayaurco	7.5
Buenavista	5
Nabón	5
Hermano Miguel	5
La Paz	2.5
La Ramada	2.5
Buravalle	2.5
Pucallpa	2.5
Rañas	2.5
Romerillo	2.5
Rosas	2.5
Tamboloma	2.5
Trancapata	2.5
Bellavista-Tamboloma	2.5

La mayoría de las muestras de maíz provinieron de la parroquia de Yacudel (40%), seguida de El progreso (12.5%). Esto se debió a que en Yacudel y El Progreso se practica el monocultivo del maíz. En estas parroquias se alcanza un promedio de 20°C, a diferencia de otras parroquias (Nabón centro, Cochapata, etc.) en donde se alcanzan temperaturas de 10°C como máximo.



La temperatura en dichos lugares es considerada como óptima para el cultivo de maíz (Gobierno-Autonomo-Descentralizado-Municipal-Nabon, 2012; Nabón, 2012). Además, la colaboración por parte del dirigente de la comunidad de Yacudel fue mucho mayor en comparación a otras, lo que hizo mucho más sencillo brindar la información necesaria a los agricultores, y por ende, su participación en este estudio.

3.2. PRÁCTICAS AGRÍCOLAS

Se recolectó información sobre las prácticas agrícolas relacionadas al cultivo del maíz en las distintas parroquias del cantón Nabón de los mismos proveedores de las muestras de maíz. La información recolectada hizo referencia particularmente al uso de fertilizantes, tipo de fertilizantes, uso de pesticidas, periodo de siembra y cosecha, tipo de maíz cultivado, prácticas de riego y secado, almacenamiento, identificación del grano en mal estado y destino del grano dañado. Además, se consultó sobre las preferencias de pelado de maíz. (Tabla 3.2)

Tabla 3.2. Prácticas Agrícolas relacionadas a la siembra del maíz en el cantón Nabón (n=40)

Variable		% prevalencia (n=40)
Uso de fertilizante	Si	90
Tipo de fertilizante	Orgánico natural	91.7
	Orgánico artificial	5.6
	Orgánico natural y artificial	2.8

Variable		% prevalencia (n=40)
Mes de siembra	Octubre-diciembre	82.5
	Julio-sept	10
	Enero-marzo	7.5
Mes de cosecha	Julio-septiembre	80
	Abril-junio	20
Tipo de maíz	Zhima	92.5
	Amarillo	5
	Maíz morocho	2.5
Tipo de riego	Agua lluvia	70
	Aspersión	17.5
	Riego canal por vertiente	5
	Agua por tubería del cerro	2.5
	Agua de vertedero	2.5
	Lluvia de agua de aspersión	2.5
Tipo de secado	Desgranado esteras al sol	47.5
	Desgranado en esteras bajo techo	22.5
	Mazorcas en esteras directo al sol	17.5
	Mazorca esteras bajo techo	5
	Mazorca y desgranado abiertos bajo techo	2.5
	Desgranado en carpa directo al sol	2.5
	Desgranado en saquillos al sol	2.5
Tipo de almacenamiento	Sacos	35
	Tanques de plástico	32.5
	Tanque de lata	20
	Sacos y tanques de plástico	7.5
	Tanque de acero inoxidable	2.5
	Se mantiene colgado	2.5
Tiempo de almacenamiento	6-12 meses	60
	0-6 meses	32.5
	Más de 12 meses	5
Mal estado del grano	Granos rotos	2.5
	Granos podridos	22.5
	Presencia de insectos	60
	Granos podridos y presencia de insectos	5
	Presencia de insectos y moho	5



Variable		% prevalencia (n=40)
	No se altera	5
Destino de los granos dañados	Alimento para animales	80
	Se desecha	15
	Se tuesta y se come	2.5
Pelado de maíz	Con ceniza	15
	Con cal	77.5
	Con ceniza y cal	7.5

3.3. CARACTERIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO TRADICIONAL DEL PELADO DE MAÍZ CON CENIZA

La información sobre el proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza en las distintas comunidades del cantón Nabón también fue recolectada mediante dos encuestas aplicadas durante la primera toma de muestra (maíz sin pelar) y durante la segunda toma (maíz pelado). Cabe indicar que a pesar de que solo un 15% de la población practicaba el pelado con ceniza, para este estudio se solicitó hacerlo de la manera tradicional, por lo tanto en la segunda toma de muestra todos los participantes proveyeron la información exacta del proceso. La información recolectada de los distintos participantes se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Caracterización del pelado de maíz con ceniza (n=40)

Variable	% prevalencia (n=40)
----------	-------------------------



Variable		% prevalencia (n=40)
Remojo del maíz antes del pelado	Si	25
	No	75
Ceniza	Leña de monte	90
	Leña de penco y monte	5
	Leña de tusa y monte	5
Tipo de olla	Aluminio	50
	Barro	28
	Paila de cobre	15
	Barro y aluminio	2.5
	Paila de bronce	2.5
Tipo de calentamiento	Leña	95
	Gas	2,5
	Leña y Gas	2,5
Orden de adición de los ingredientes	1) agua en ebullición; 2) ceniza más maíz	49
	1) agua caliente; 2) ceniza más maíz	18
	Otros	33
Cantidad de ingredientes	Maíz (gramos)	2500
	Agua (litros)	4,8
	Ceniza (gramos)	1452
Tipo de mezcla	Movimiento constante	92
	Ausencia de movimiento	8
Tiempo de cocción	<0,5 hora	36
	0,5-1 hora	43
	>1 hora	21
Tipo de remoción de la cáscara	Lavado y pelado de maíz	87
	Otros	13
Remojo posterior al pelado	Si	51
	<i>Tiempo de Remojo</i> (n=20)	75
Secado posterior al pelado	Si	64
	No (consumo inmediato)	36



Variable	% prevalencia (n=40)
<i>Tiempo de secado</i> (n=25) 48-72h	42

La caracterización del proceso tradicional de pelado de maíz con ceniza podría resumirse con las siguientes observaciones:

- (i) la mayoría de las personas no realizan un remojo del grano antes de pelarlo (75%)
- (ii) la obtención de ceniza para el pelado se realiza en su mayoría a partir de leña del monte (90%)
- (iii) la cocción del grano tiene lugar usando ollas de aluminio (50%) y la principal fuente de calentamiento usada es la leña (95%)
- (iv) Durante la cocción, la mayoría de los participantes remueven constantemente la mezcla (92%) por un período de 0.5-1 hora (43%)
- (v) Para la remoción de la cáscara, un 87% de los encuestados describió que el lavado y pelado de maíz es simultáneo y manual (refregado con los dedos).
- (vi) Después del pelado, la mayoría de los participantes no consumía el maíz inmediatamente (64%) sino que prefieren realizar un remojo de los granos pelados (51%) por el lapso de 12 horas (75%) antes de su cocción posterior.
- (vii) En el caso de que el maíz no se consuma luego del remojo posterior, se suelen secar los granos pelados (64%) por un período de 48-72 horas (42%).



- (viii) Con respecto a los ingredientes: a) se coloca el maíz y la ceniza simultáneamente en agua en ebullición (49%); y b) las cantidades promedio de ceniza y agua por cada 2500 gramos de maíz son 1500 gramos y 4.8 litros respectivamente.

Para la estandarización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza se partió de los datos presentados en la caracterización, los cuales fueron muy variables y de selección compleja. Los pasos seleccionados fueron aquellos que se repetían en más de un 50%, con excepción de: orden de adición de los ingredientes (49%), tiempo de cocción (43%) y tiempo de secado (42%).

El proceso estandarizado se presenta en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Estandarización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza

Estandarización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza	
Remojo del maíz antes del pelado	No
Ceniza	Leña de monte
Tipo de olla	Aluminio
Tipo de calentamiento	Leña
Orden de adición de los ingredientes	1) Agua en ebullición 2) Ceniza más maíz
Cantidad de ingredientes	1 galón de maíz (2.500 g) 1,5 galón de agua (4.8 L) 0,6 galón de ceniza (1.450 g)



Estandarización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza

Tipo de mezcla	Movimiento constante
Tiempo de cocción	0,5-1 hora
Tipo de remoción de la cáscara	Lavado y pelado de maíz
Remojo posterior al pelado	Si
Tiempo de Remojo	12h
Secado posterior al pelado	Si
Tiempo de secado	48-72h

El proceso tradicional de pelado de maíz con ceniza estandarizado en este estudio difiere en algunos pasos con otro proceso ecuatoriano referido como “proceso convencional de nixtamalización ecuatoriano” (Tosi Vélez, 2012). Según este proceso convencional, para la remoción del pericarpio se utiliza agua 2:1 en relación a la cantidad de maíz, 1% de cal y 1% de ceniza. Los granos de maíz se calientan en el agua alcalinizada hasta que ésta hierva y se deja en reposo la mezcla durante 8 horas. Luego de transcurrido éste tiempo, se realiza la prueba de desprendimiento del pericarpio, tomando un grano y frotándolo con los dedos hasta que se desprenda con facilidad. Finalmente se desecha el agua residual y se lavan los granos 2 o 3 veces para remover la cáscara y los residuos de cal y ceniza.

Con lo que respecta a los ingredientes, para la remoción del pericarpio, en el proceso tradicional de pelado de maíz estandarizado se usa únicamente ceniza, mientras que el proceso convencional usa una mezcla de cal y ceniza. Además, las cantidades de agua y maíz usadas en ambos procesos son similares; pero con respecto a la ceniza, el proceso convencional usa un 1% de cal y 1% de ceniza en



relación al peso del maíz (25g de cal y 25g de ceniza / 2500g de maíz); mientras que el proceso tradicional usa una elevada cantidad de ceniza (1450g de ceniza / 2500g de maíz). Por lo tanto, a pesar de que el proceso tradicional permite la remoción del pericarpio, es menos eficiente que el proceso convencional ya que requiere el uso de más material (ceniza) para la obtención de buenos resultados.

En el proceso tradicional de pelado con ceniza, la cocción tiene lugar en olla de aluminio con un movimiento constante, mientras que en el proceso convencional se usa principalmente una olla de barro sin realizar movimiento alguno. El tiempo de cocción en el proceso convencional es menor (0,3 a 0,6 horas) en comparación al tradicional (0,5 a 1 hora).

Finalmente, el proceso convencional realiza un remojo del maíz durante 8 horas en el agua de cocción para la posterior remoción de la cáscara a través del lavado, mientras que en el proceso tradicional se desecha el líquido de cocción e inmediatamente se procede a la remoción de la cáscara con agua adicional. Sin embargo, la mitad de los participantes (51%) refirieron realizan un remojo de los granos de maíz pelado (12h) luego de desechar el líquido de cocción.



3.4 CONTAMINACIÓN DEL MAÍZ CON MICOTOXINAS

El grado de contaminación con aflatoxinas y fumonisinas se evaluaron en 40 muestras de maíz seco sin pelar y 40 muestras de maíz pelado con ceniza, provenientes del mismo lote.

3.4.1. Análisis de aflatoxinas

Las tasas de contaminación, media, SD y todos los rangos de aflatoxinas en las muestras de maíz analizadas se presentan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Prevalencia de muestras positivas y niveles de aflatoxinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.

Maíz seco sin pelar (n=40)						
Aflatoxinas	Positivas/Total	LOD-LOQ	>LOQ	Media (µg/kg)	SD	Min-Max (µg/kg)
AFG ₂	1/40	1/40	-	-	-	-
AFG ₁	5/40	4/40	1/40	-	-	0,50 ^a
AFB ₂	7/40	5/40	2/40	0,6	0,2	0,50 – 0,77
AFB ₁	3/40	3/40	-	-	-	-
Maíz seco pelado con ceniza (n=38)						
AFG ₂	0/38	-	-	-	-	-
AFG ₁	4/38	4/38	-	-	-	-
AFB ₂	0/38	-	-	-	-	-
AFB ₁	0/38	-	-	-	-	-

Nota: ^a Valor único.



El 38% de las muestras de maíz seco sin pelar (n=15) estuvo contaminada con al menos con un tipo de aflatoxina.

En general, los resultados obtenidos de aflatoxinas totales (AFB₁, AFG₁, AFB₂, y AFG₂) no exceden los niveles máximos establecidos para el consumo humano en Latinoamérica y en Ecuador (20 ug/kg) (INEN, 1995). De igual manera, los resultados no superan los límites establecidos según las normas europeas para aflatoxinas totales (4ug/kg) ni para AFB₁ (2ug/kg) (Bhat et al., 2010; Bräse et al., 2009).

El 11% de las muestras de maíz pelado (n=4) estuvo contaminada solamente con AFG₁ a niveles que no excedieron a los límites máximos establecidos para el consumo humano.

La aflatoxinas de mayor prevalencia fueron AFB₂ (17,5%) seguida de AFG₁ (12,5%), AFB₁ (7,5%) y AFG₂ (2,5%). Estos resultados fueron menores a los encontrados en algunos estudios reportados en Latinoamérica, sobre todo en aquellos países con clima tropical y subtropical que favorece el desarrollo de *Aspergillus* en el maíz (Bräse et al., 2009; FAO., 2009). Por ejemplo, se ha reportado que muestras de maíz de Monterrey y Sonora (México) estuvieron contaminadas en un 89% con AFG₁ y en un 20% con AFB₁; de las cuales, 59% y 1% de las muestras contaminadas excedían los límites permitidos para aflatoxinas (García & Heredia, 2006). En un estudio colombiano se observó que el 12,5% de muestras de maíz estuvo contaminada por AFB₁ en niveles entre 2,4 y 12,5 µg/kg, 8,3% con AFB₂ en niveles inferiores a 2 µg/kg; mientras que no se detectaron aflatoxinas G₁ y G₂. El valor medio de aflatoxinas totales fue de 9,2 µg/kg, sin superar el límite máximo aceptado en la mayoría de países (Morris Navarro, 2011).



En lo que se refiere a Ecuador, existe poca información sobre niveles de contaminación de aflatoxinas en maíz, sin embargo un estudio realizado en la costa y sierra ecuatoriana, ha demostrado que las concentraciones de aflatoxinas en las muestras provenientes de la región costa son relativamente más altas que en la sierra, siendo aflatoxinas B₁ y G₁ las de mayor prevalencia. Solo una muestra analizada presentó una concentración de 8,6 µg/Kg de AFB₁, excediendo el límite permitido en la Unión Europea, pero no el límite dado por la normativa ecuatoriana ni los valores establecidos por la FDA (Sandoval Cañas, 2013).

3.4.2. Análisis de fumonisinas

Los niveles de contaminación, media, SD y todos los rangos de fumonisinas en las muestras de maíz analizadas se presentan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Prevalencia de muestras positivas y niveles de fumonisinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.

Maíz seco sin pelar (n=40)						
Fumonisin	Positivas/Total	LOD-LOQ	>LOQ	Media (µg/kg)	SD	Min-Max (µg/kg)
FB ₁	17/40	1/40	16/40	6,05	8,3	0,66 – 34,65
FB ₂	14/40	2/40	12/40	1,60	0,6	0,87 – 2,93
Maíz seco pelado con ceniza (n=38)						
FB ₁	7/38	1/38	6/38	3,73	3,9	0,8 – 10,98
FB ₂	3/38	1/38	2/38	3,08	2,2	0,53 – 4,63

De las 40 muestras de maíz seco sin pelar, el 42,5% de las muestras (n=17) estuvo contaminado al menos con FB₁. Los niveles de fumonisinas B₁ y B₂ no excedieron los



límites máximos establecidos por la FDA o la Unión Europea para el consumo humano.

Con respecto al maíz pelado, el 20% de las muestras (n=8) estuvo contaminado con al menos FB₁. Los niveles de fumonisinas FB₁ y FB₂ fueron menores a los del maíz sin pelar y no excedieron los límites máximos establecidos por la FDA o la Unión Europea para el consumo humano.

La fumonina B₁ fue la de mayor prevalencia tanto para maíz seco sin pelar (42,5%) como pelado (7,9%) y una concentración promedio de 6,1 µg/kg y 3,7 µg/kg respectivamente. Estos resultados fueron muy inferiores a lo reportado en otros estudios Latinoamericanos. En uno de ellos se reporta que todas las muestras analizadas en 20 localidades del estado mexicano resultaron positivas para FB₁ con concentraciones entre 6,6 y 269 µg/kg (García & Heredia, 2006). En otro estudio realizado en Argentina se reporta que del 90- 100% de muestras de grano de maíz (n=3246) recolectadas en diferentes regiones de Argentina estaban contaminadas con fumonisinas con niveles promedios (suma de FB₁, FB₂) de entre 1773 a 9093 µg/kg (Martinez & Moschini, 2012).

A nivel nacional no existe información sobre niveles de contaminación de maíz con fumonisinas, pero los resultados obtenidos en éste proyecto se podría relacionar con un estudio realizado en la parroquia San Juan – Gualaceo donde la flora micológica con segunda mayor prevalencia en el maíz fue el género *Fusarium* (26%) que es género productor de fumonisinas B₁ y B₂. Además, en este estudio se demostró que el desarrollo de éste género en granos de maíz estaba relacionado



significativamente a factores climáticos como la temperatura y humedad relativa (Pérez Culcay & Zárate Ochoa, 2013). Otros factores relacionados con el desarrollo de este género fúngico en el maíz y que causan estrés en la planta tales son daños por insectos o falta de nutrientes en el suelo (Magan & Olsen, 2004; Martinez & Moschini, 2012).

3.5 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PELADO DE MAÍZ CON CENIZA COMO ESTRATEGIA DE DETOXIFICACIÓN

Las diferencias en el grado de contaminación entre maíz pelado y sin pelar sugieren una reducción considerable de la contaminación de aflatoxinas y fumonisinas después del proceso de pelado con ceniza. Para verificar esta reducción se aplicó la prueba estadística T de Student pareada, obteniendo una diferencia significativa entre los niveles de contaminación antes y después del pelado para AFB₂ (P<0,001), AFB₁ (P=0,004), FB₂ (P=0,023) y FB₁ (P=0,033).

En otros estudios se ha descrito la efectividad de la nixtamalización (proceso similar al pelado con ceniza) como técnica de detoxificación para aflatoxinas y fumonisinas (De La Campa et al., 2004; Magan & Olsen, 2004; Pappa et al., 2010). Aunque no existen datos acerca de la efectividad del pelado de maíz con ceniza, su similitud con la nixtamalización (cocción alcalina) sugiere que la tasa de reducción podría ser similar en ambos procesos.



3.6 INFLUENCIA DE LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LA CONTAMINACIÓN

Para la evaluación de la influencia de las prácticas agrícolas en la contaminación del maíz por aflatoxinas y fumonisinas se realizaron regresiones logísticas con cada una de las prácticas agrícolas y la presencia de contaminación por aflatoxinas y fumonisinas antes del pelado con ceniza. Se observó que cultivar en los lugares más cálidos en Nabón resultó ser un factor protector para FB₂ (OR=0,147; IC: 0,03-0,62; P=0,010). Esto se contrapone al hecho que a mayor temperatura y humedad relativa, mayor es la incidencia del desarrollo de *Fusarium* y subsecuente producción de fumonisinas (De la Campa, Hooker, Miller, Schaafsma, & Hammond, 2005). Sin embargo, en este estudio los lugares con mayor temperatura (Yacudel, El progreso) fueron aquellos en donde se practica el monocultivo del maíz pues la temperatura de dichas zonas es la más óptima para el cultivo. Este efecto protector podría deberse a que en los lugares donde se siembra el maíz como monocultivo suelen recibir apoyo (socializaciones, charlas sobre buenas prácticas agrícolas, etc.) por parte de las autoridades del cantón Nabón. Por otro lado, se observó que el riego con agua lluvia fue también un factor protector para la contaminación con FB₂ (0,111; IC: 0,01-0,66; P=0,016). Elevados niveles de fumonisinas han sido observados en lugares con clima cálido y seco, pero niveles bajos de la misma se han observado en lugares cálidos con abundantes lluvias durante el cultivo (De la Campa et al., 2005). Por otro lado, existen estudios que indican que el cultivo de maíz bajo riego aumenta la incidencia de producción de aflatoxinas y fumonisinas, ya que podrían desarrollarse condiciones predisponentes para la contaminación (Chavarri et al., 2009).



En general, el cultivo de maíz países tropicales está recomendado en los meses de mayo a septiembre debido a una disponibilidad adecuada del agua de riego (agua lluvia) (Chavarri et al., 2009). Sin embargo, más estudios son necesarios para comprobar que el uso de agua lluvia como mecanismo de riego reduce el riesgo de contaminación para FB₂ y si está directamente relacionada con el tipo de clima de la zona.

Con respecto a aflatoxinas, se observó que el mes de cosecha en el periodo seco (julio a septiembre) actúa como un factor protector que disminuye el riesgo de producción de AFB₂ (OR= 0,128; IC: 0,02-0,79; P=0,027) y AFG₁ (OR; 0,087; IC: 0,008-0,87; P=0,039). Éste comportamiento podría deberse a que en dichos meses en la mayoría de países tropicales se llega a una temporada de sequía y al realizar la cosecha se podría evitar que la planta sufra de estrés y sea más propensa a la contaminación. Además una de las ventajas de realizar cultivos en países tropicales con respecto a aquellos que tienen cuatro estaciones es que es posible cultivar prácticamente durante todo el año obteniendo casi siempre buenos resultados (Chavarri et al., 2009). Es necesaria la realización de más estudios que permitan confirmar éstos resultados y evaluar una posible relación con otras prácticas agrícolas realizadas en la zona.

En lo que se refiere a AFB₁, AFG₂ y FB₁, no se observaron relaciones estadísticamente significativas entre las prácticas agrícolas y el grado de contaminación. Sin embargo, estudios adicionales podrían reflejar interacciones entre las diferentes prácticas que favorezcan la producción de dichas toxinas en maíz.



4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis constituye la primera etapa del proyecto de investigación “Assessment of the traditional wood ash nixtamalization as detoxification strategy to reduce Fumonisin and Aflatoxin contamination of boiled maize ("mote pelado"), Nabon-Ecuador” financiado por la Fundación Internacional de Ciencia (IFS). El objetivo final de este proceso es la optimización del proceso de pelado con ceniza como método de detoxificación de micotoxinas, la evaluación sensorial del producto final y la diseminación del proceso en las comunidades rurales del cantón azuayo Nabón.

En el presente trabajo de tesis se reporta la caracterización y estandarización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza, lo que incluyó la estandarización de las cantidades de agua y ceniza necesarios para pelar una cantidad determinada de maíz, así como también los pasos a seguir para el pelado de manera tradicional.

En el presente trabajo de tesis también se evaluó la capacidad de este proceso de pelado para reducir micotoxinas en el maíz. Los resultados demostraron una diferencia significativa entre los niveles de contaminación antes y después del pelado particularmente para AFB₂ (P<0,001), AFB₁ (P=0,004), FB₂ (P=0,023) y FB₁ (P=0,033). Además se observó que algunas prácticas agrícolas resultaron como factores protectores de la contaminación AFG₁ (cosecha en periodo seco), AFB₂ (cosecha en periodo seco) y FB₂ (clima cálido y riego con agua de lluvia).



4.2 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos demostraron que el proceso pelado de maíz con ceniza podría ser considerado como una estrategia de detoxificación para aflatoxinas y fumonisinas, sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan optimizar el método para así garantizar una máxima reducción de las toxinas.

Por otro lado en lo que se refiere a las prácticas agrícolas, serían necesarios más estudios en un mayor número de muestras, lo que permitirá reflejar de mejor manera la influencia de las prácticas agrícolas y la interacción entre las mismas en la producción de toxinas en maíz.



REFERENCIAS

- (IARC), I. A. f. R. o. C. (2002). Fumonisin B1. *82 (2002)*, 301. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol82/82-05.html> website:
- Angel, G. H. (2010). Composición y Calidad nutritiva de los Alimentos *Tratado de nutrición*. España, Madrid.
- Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9(1)*, 57-81.
- Blandino, M., Reyneri, A., Colombari, G., & Pietri, A. (2009). Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels. *Field crops research*, *111(3)*, 284-289.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., & Nising, C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical reviews*, *109(9)*, 3903-3990.
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, *119(1)*, 140-146.
- Campos, C. (1994). Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. *Fundación Chile*.
- Contreras, O. L. R., & Flórez, A. M. W. (2009). DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DE MAYOR CONSUMO INFANTIL COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, *7(1)*.
- Cordero Ruíz, J. R. (2012). OBTENCIÓN DE MOTE A PARTIR DE MAÍZ (*Zea mays* L.) VARIEDAD INIAP-111 GUAGAL MEJORADO, MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE HIDRÓXIDO DE CALCIO CAL-P24 Y CONTROL DE TIEMPOS DE COCCIÓN, PARA LA REMOCIÓN DE LA CUTÍCULA.
- Chavarrí, M., Mazzani, C., Luzón, O., González, C., Alezones, J., & Garrido, M. (2009). Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol Venez*, *22*, 2-7.
- De la Campa, R., Hooker, D. C., Miller, J. D., Schaafsma, A. W., & Hammond, B. G. (2005). Modeling effects of environment, insect damage, and Bt genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines. *Mycopathologia*, *159(4)*, 539-552.
- De La Campa, R., Miller, J. D., & Hendricks, K. (2004). Fumonisin in tortillas produced in small-scale facilities and effect of traditional masa production methods on this mycotoxin. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52(14)*, 4432-4437.
- Eguez, J., & Pintado, P. (2011). Guía para la producción de Maíz en la sierra sur del Ecuador. In G. y. p. Ministerio de Agricultura, MAGAP, I. Instituto Nacional Autónomo de Invetigaciones Agropecuarias & C. Secretaría Nacional de Educación Superior, Tecnología e Innovación, SENEYC (Eds.). Cuenca, Ecuador.
- Encalada, M., Muñoz, K., & Ortiz, F. (2006). *Certificación de las Semillas de Maíz en el Ecuador*. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- FAO. (2003). Reglamentos para las micotoxinas en el año 2003 y desarrollos actuales. Retrieved 30/04/2014, from <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s07.htm#bm07.3.4>
- FAO., F. a. A. O. o. t. U. N. (2009). Estudio FAO: alimentación y nutrición; 73. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de micotoxinas. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9(1)*, 57-81.
- García, S., & Heredia, N. (2006). Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*, *162(3)*, 255-264.



- Gnonlonfin, G. J. B., Hell, K., Adjovi, Y., Fandohan, P., Koudande, D., Mensah, G., . . . Brimer, L. (2013). A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: A sub-Saharan African perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(4), 349-365.
- Gobierno-Autonomo-Descentralizado-Municipal-Nabon. (2012). Ubicación Geográfica de Nabon. http://www.nabon.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=46:ubinabon&catid=35:historianabon&Itemid=54
- IARC, I. a. f. r. o. c. (2004). IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In I. a. f. r. o. cancer (Ed.), *Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 7, pp. 82). United Kindom: International Agency for Research on Cancer by the Secretariat of the World Health Organization.
- IICA-PROCIANDINO. Experiencias en el Cultivo del Maiz en el Area Andina. In I. B. Venezuela (Ed.). Venezuela.
- INEC. (2009). Sistema Agroalimentario del Maiz. 28.
- INEN, I. E. d. N. (1995). *NTE INEN 187:95. Granos y cereales. Maíz en grano. Requisitos*. Quito, Ecuador.
- Kimanya, M. E., De Meulenaer, B., Tiisekwa, B., Ndomondo-Sigonda, M., Devlieghere, F., Van Camp, J., & Kolsteren, P. (2008). Co-occurrence of fumonisins with aflatoxins in home-stored maize for human consumption in rural villages of Tanzania. *Food additives and contaminants*, 25(11), 1353-1364.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., & Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1595-1612.
- Kralj Cigić, I., & Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International journal of molecular sciences*, 10(1), 62-115.
- Magan, N., & Olsen, M. (2004). *Mycotoxins in food: Detection and control* (Vol. 103): Woodhead Publishing.
- Martinez, M. I., & Moschini, R. C. (2012). Riesgo climático de la región pampeana argentina con respecto a la contaminación con fumonisina en grano de Maíz. *Engormix. com*. 28 mayo 2012.
- Mejía, D. (2005). Maize Post-Harvest Operation. Rome: UAGST/FAO.
- Méndez-Albores, J., Villa, G., Rio-García, D., & Martinez, E. (2004). Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1611-1614.
- Morris Navarro, L. F. (2011). *Determinación de aflatoxinas en muestras de maíz (Zea mays) y arroz (Oryza sativa) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana mediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011*. Universidad Nacional de Colombia.
- Nabón, M. d. (2012). PLAN DE DESARROLLO LOCAL DEL CANTÓN NABÓN. 15-21. Retrieved from http://www.nabon.gob.ec/sitio/images/pdf/PLAN_DESARROLLO_LOCAL.pdf website:
- Normalización, I. E. d. (1995). *NTE INEN 187:95. Granos y cereales. Maíz en grano. Requisitos*. .
- Ortiz, J., Van Camp, J., Wijaya, S., Donoso, S., & Huybregts, L. (2013). Determinants of child malnutrition in rural and urban Ecuadorian highlands. *Public health nutrition*, 1-9.
- Palencia, E., Torres, O., Hagler, W., Meredith, F. I., Williams, L. D., & Riley, R. T. (2003). Total fumonisins are reduced in tortillas using the traditional nixtamalization method of Mayan communities. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3200-3203.
- Pappa, M. R., de Palomo, P. P., & Bressani, R. (2010). Effect of lime and wood ash on the nixtamalization of maize and tortilla chemical and nutritional characteristics. *Plant foods for human nutrition*, 65(2), 130-135.



- Peñaherrera, D. (2011). Manejo Integrado del Cultivo de Maíz de Altura. Módulos de Capacitación para capacitadores. Módulo 4. In I. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias & G. y. P. Ministerio de Agricultura, MAGAP (Eds.). Quito, Ecuador.
- Pérez Culcay, D. R., & Zárate Ochoa, M. E. (2013). Determinación de la flora micológica del maíz seco y su harina en la parroquia San Juan-cantón Gualaceo.
- Pesantez, G. (2004). Maíz Pan de América. In I. A. d. Folklore (Ed.). Cuenca, Ecuador.
- Reddy, K., Abbas, H., Abel, C., Shier, W. T., Oliveira, C., & Raghavender, C. (2009). Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 154-168.
- Sandoval Cañas, G. J. (2013). Determinación de aflatoxinas totales, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en matriz de cereales: maíz y cebada.
- Scussel, V. M. (2004). Aflatoxin and food safety: recent South American perspectives. *Toxin Reviews*, 23(2-3), 179-216.
- Smith, D., & Henderson, R. (1991). *Mycotoxins and animal foods*: CRC press.
- Torres, P., Guzmán-Ortiz, M., & Ramírez-Wong, B. (2001). Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2825-2829.
- Tosi Vélez, A. A. (2012). Nixtamalización de variedades locales seleccionadas de maíz y aplicación a recetas tradicionales y de autor.
- Urrego Novoa, J. R., & Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev. Fac. Med.(Bogotá)*, 54(2), 108-116.
- Wagacha, J., & Muthomi, J. (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 1-12.



ANEXOS

ANEXO 1. Lista de los participantes y fecha de recolección de las muestras

ID	Dirección (parroquia/ comunidad)	Muestra 1	Muestra 2
01	La ramada	04/09/14	10/09/14
02	Buravalle	04/09/14	10/09/14
03	Romerillo- Buravalle	04/09/14	10/09/14
04	Chayaurco	04/09/14	10/09/14
05	Tamboloma	04/09/14	10/09/14
06	Nabón Centro	04/09/14	10/09/14
07	La Paz	04/09/14	10/09/14
08	Pucallpa	04/09/14	10/09/14
09	Chayaurco	04/09/14	10/09/14
10	Chayaurco	04/09/14	10/09/14
11	Progreso	10/09/14	23/09/14
12	Buena vista (Progreso)	10/09/14	23/09/14
13	Yacudel	10/09/14	23/09/14
14	Yacudel	10/09/14	23/09/14
15	Yacudel	10/09/14	23/09/14
16	Yacudel	10/09/14	23/09/14
17	Yacudel	10/09/14	23/09/14
18	Progreso Centro	10/09/14	23/09/14
19	Yacudel	10/09/14	23/09/14
20	Yacudel centro	10/09/14	23/09/14
21	Buena vista (Progreso)	10/09/14	23/09/14
22	Progreso Centro	10/09/14	23/09/14
23	Progreso Centro	10/09/14	23/09/14
24	Progreso	10/09/14	23/09/14
25	Bellavista	10/09/14	23/09/14
26	Rañas	10/09/14	23/09/14
27	Yacudel	23/09/14	23/09/14
28	Yacudel	23/09/14	23/09/14
29	Yacudel	23/09/14	23/09/14
30	Yacudel	23/09/14	23/09/14
31	Yacudel Centro	23/09/14	23/09/14
32	Yacudel Centro	23/09/14	23/09/14



ID	Dirección (parroquia/ comunidad)	Muestra 1	Muestra 2
33	Yacudel Centro	23/09/14	23/09/14
34	Yacudel Centro	23/09/14	23/09/14
35	Yacudel Centro	23/09/14	
36	Bellavista	24/09/14	24/09/14
37	Rosas	24/09/14	24/09/14
38	Hermano Miguel	24/09/14	
39	Hermano Miguel	24/09/14	24/09/14
40	Trancapata	01/10/14	01/10/14

ANEXO 2. Consentimiento Informado



Universidad de



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la investigación:

Evaluación del pelado tradicional con ceniza como estrategia de descontaminación de micotoxinas (fumonisinas y aflatoxinas) en el mote pelado, Nabón-Ecuador.

Introducción

Usted ha sido invitado a participar en el presente estudio. Este formulario incluye un resumen de la información que los investigadores analizarán con usted. Si usted decide participar en el estudio recibirá una copia de este formulario.

Objetivo

El estudio se realiza para evaluar si el proceso tradicional de pelado de maíz con ceniza puede ser usado como estrategia de descontaminación de toxinas producidas por hongos del ambiente (micotoxinas).

Actividades del estudio

La ejecución de este proyecto está prevista para un periodo de 2 años.

Año 1: Se aplicarán dos encuestas previamente diseñadas y debidamente probadas:

1. La encuesta 1 incluye preguntas sobre las prácticas agrícolas del maíz y el procedimiento de pelado de maíz con ceniza. Esta encuesta se aplicará durante la recolección de la muestra de maíz pelado seco.
2. La encuesta 2 incluye preguntas sobre las preferencias de consumo del maíz y forma de cocción del maíz pelado. Esta encuesta será aplicada durante la recolección de la muestra de maíz cocido.

En las muestras de maíz recolectadas se analizará la presencia micotoxinas en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca.

Año 2: Se propondrán algunas modificaciones físicas al proceso tradicional de pelado de maíz con ceniza para aumentar su capacidad de descontaminación de micotoxinas. Se realizarán pruebas de aceptabilidad sensorial del maíz cocido utilizando el proceso modificado de pelado con ceniza, para lo cual se ofrecerán a los participantes de muestras de maíz cocido de inocuidad comprobada (libre de micotoxinas) para su degustación. Finalmente se difundirá a la comunidad el proceso de pelado con ceniza más eficaz para la decontaminación de micotoxinas y que haya sido aceptado desde el punto de vista sensorial.

Participantes

Este estudio prevé la participación de un total de 30 a 45 familias provenientes de todas las comunidades del cantón Nabón. Los participantes serán los mismos que accedan a proporcionar las muestras de maíz que serán remuneradas. El jefe de familia responderá las preguntas de las encuestas. Cualquier miembro de la familia puede participar en las pruebas sensoriales.



Costos de participación

No se debe pagar por la participación en este estudio. Por proporcionar las muestras de maíz, el participante recibirá por parte de los investigadores un pago total de \$30.00 que incluye un lote de 10 kilos de maíz y los costos de mano de obra por el pelado y cocción del maíz. Dicho lote será entregado en 3 partes: 1) maíz crudo seco (4 kilos), 2) maíz seco luego de ser pelado con ceniza (3 kilos), y 3) maíz pelado cocido (3 kilos). El 50% del pago será al inicio del estudio y el 50% restante a la entrega de la última muestra de maíz.

Aparte del pago de las muestras de maíz, no habrá retribución monetaria por la participación en el estudio.

Beneficios

Los beneficios de este estudio están dirigidos a las comunidades productoras y consumidoras de maíz del cantón Nabón. Si se demuestra una alta efectividad del proceso de pelado estudiado, los resultados se pueden difundir a otras zonas rurales y urbanas del país como estrategia para fomentar la inocuidad del maíz.

Riesgos

El estudio no representa un riesgo para el participante.

Confidencialidad

Ninguna persona fuera del proyecto tendrá acceso a la información obtenida del participante. La información tendrá un código para proteger su privacidad. Si alguno de los resultados en este estudio es publicado no se incluirán los nombres de los participantes.

Derechos

La participación en este estudio es voluntaria. El participante no perderá nada si decide no formar parte del estudio. Sin embargo, si decide participar del estudio desde el principio, el participante se compromete a proporcionar el lote de 10 kilos de maíz distribuidos en 3 partes. Luego de la entrega del lote total de muestra de maíz, el participante puede retirarse del estudio si lo desea, lo que deberá notificado a la persona que esté a cargo del estudio. No habrá sanciones ni pérdida de beneficios si usted decide no participar de las pruebas sensoriales (segunda parte del estudio).

Preguntas o problemas

Si el participante tiene alguna pregunta acerca de este estudio se puede contactar con la Dra. Johana Ortiz, investigadora principal del proyecto, al teléfono de la Universidad de Cuenca (07) 4051000 Ext. 4124, celular 0995341151 o por correo electrónico johana.ortiz@ucuenca.edu.ec.

Consentimiento informado:

Comprendo mi participación y los riesgos y beneficios de participar en este estudio. He tenido el tiempo suficiente para revisarlo y el lenguaje del consentimiento fue claro y comprensible. Todas mis preguntas como participante fueron contestadas. Me han entregado una copia de este formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar en este estudio de investigación.

Nombre y Firma del participante

Fecha

Nombre y Firma del investigador que obtiene el consentimiento

Fecha



ANEXO 3. Encuesta sobre prácticas agrícolas del maíz.

ENCUESTA SOBRE PRÁCTICAS AGRÍCOLAS DEL MAÍZ

Proyecto Evaluación del pelado tradicional con ceniza como estrategia de descontaminación de micotoxinas (fumonisinas y aflatoxinas) en el mote pelado, Nabón-Ecuador ”

Número de registro

Fecha de la encuesta (dd/mm/aa)

DATOS GENERALES:

Nombre del cultivador:

Dirección:

Teléfono:

PRÁCTICAS AGRÍCOLAS:

1. ¿Usted usa fertilizantes?

- 1. Si
- 2. No
- 9. No Sabe

Ir a pregunta # 3

Ir a pregunta # 3

2. ¿Qué fertilizante usa (principal)?

- 1. Abono de gallina
- 2. Abono de cuy
- 3. Abono de chancho
- 4. Úrea
- 5. Otro (especifique)
- 9. No Sabe

3. ¿Usted usa pesticidas?

- 1. Si
- 2. No
- 9. No Sabe

Ir a pregunta # 5

Ir a pregunta # 5

4. ¿Qué pesticida usa (principal)?

Especifique:

9. No Sabe

5. ¿En qué mes siembra el maíz?

Especifique:

9. No Sabe

6. ¿En qué mes cosecha el maíz?

Especifique:

9. No Sabe



7. ¿Qué tipo de maíz siembra?

Especifique:

9. No Sabe

8. ¿Cuál es el tipo de riego para el sembrío del maíz?

1. Agua lluvia

2. Otro (especifique)

9. No Sabe

9. ¿Cómo seca el maíz?

1. Mazorca, en esteras bajo techo

2. Mazorca, en esteras directo al sol

3. Desgranado, en esteras bajo techo

4. Desgranado, en esteras directo al sol

5. Otro (especifique)

9. No Sabe

10. ¿Cómo almacena el maíz?

1. Sacos

2. Esteras

3. Tanques plásticos

4. Otro (especifique)

9. No Sabe

11. ¿Cuánto tiempo almacena el maíz seco?

Especifique (meses):

9. No Sabe

12. ¿Cuándo considera usted que el maíz está en mal estado?

1. Granos rotos

2. Granos podridos

3. Presencia de insectos

4. Presencia de moho

5. Otro (especifique)

9. No Sabe

13. ¿Qué hace usted cuando el grano está dañado?

1. Alimento de animales

2. Se desecha

3. Se usa como abono

4. Se muele

5. Se limpia y come

6. Otro (especifique)

9. No Sabe

14. ¿Cómo Ud. suele pelar el maíz?

1. Con cal

2. Con ceniza

3. Otro (especifique)

9. No Sabe



PELADO DEL MAÍZ CON CENIZA

15. ¿Remoja el maíz antes de pelarlo?

1. Si

2. No

Ir a pregunta # 17

9. No Sabe

Ir a pregunta # 17

16. ¿Cuánto tiempo deja en en remojo el maíz antes de pelarlo?

Especifique:

9. No Sabe

17. ¿Cómo obtiene la ceniza para el pelado de maíz?

9. No Sabe

18. ¿Qué cantidad de ceniza utiliza para el pelado de maíz?

Especifique:

9. No Sabe

19. ¿Qué cantidad de agua utiliza para el pelado de maíz con esa cantidad de ceniza?

Especifique:

9. No Sabe

20. ¿Cómo realiza el pelado del grano de maíz?

Detallar el proceso completo, paso a paso hasta que el grano esté pelado

Incluir información con respecto al tiempo, tipo de fuente de calentamiento, escurrido, etc.

21. Durante la etapa de cocción, ¿cuánto tiempo deja en contacto el maíz con la ceniza ?

Especifique :

9. No Sabe

22. ¿Después del pelado, cuántos lavados del maíz con agua realiza?

Especifique:

9. No Sabe



23. ¿Después del pelado, deja en remojo el maíz en el agua de lavado?

1. Si - lavado inicial

2. Si - lavado final

3. No

9. No Sabe

Ir a pregunta # 24

Ir a pregunta # 24

24. ¿Cuánto tiempo deja en en remojo el maíz después de pelarlo?

Especifique:

9. No Sabe

25. ¿Para pelar el maíz, qué tipo de olla utiliza?

1. Olla de barro

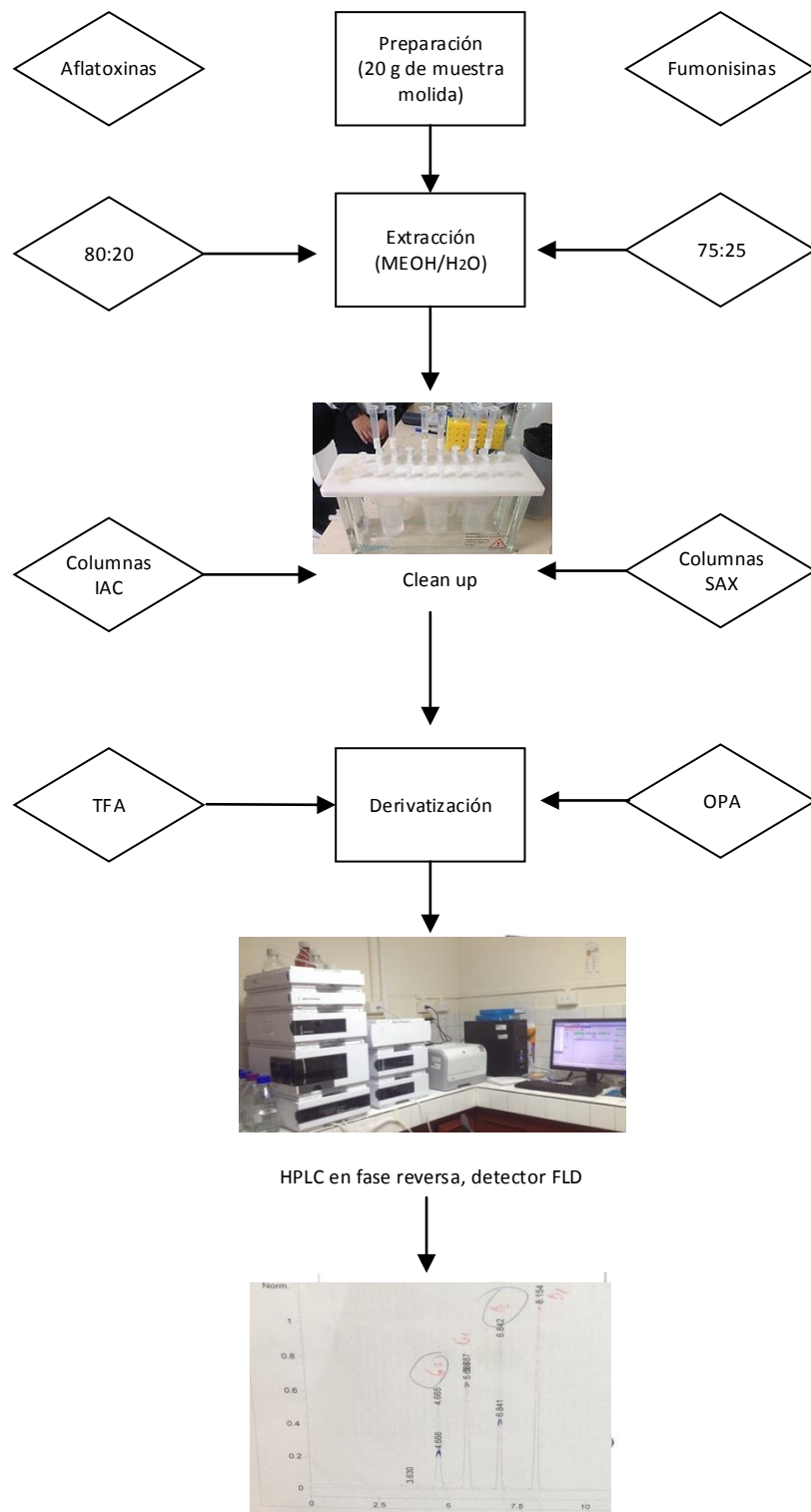
2. Olla de acero inoxidable

3. Otro (especifique)

9. No Sabe

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!

ANEXO 4. Flujoograma de análisis de aflatoxinas y fumonisinas.





ANEXO 5. Concentración de aflatoxinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.

Muestra	Maíz seco sin pelar				Aflatoxinas totales (µg/kg)	Maíz pelado seco				Aflatoxinas totales (µg/kg)
	Concentración (µg/kg)					Concentración (µg/kg)				
	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁		AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁	
01	-	-	-	-		-	-	-	-	
02	-	-	-	-		-	-	-	-	
03	-	-	-	-		-	-	-	-	
04	-	-	0,32	-	0,32	-	-	-	-	
05	-	-	-	-		-	-	-	-	
06	-	-	0,29	-	0,29	-	0,35	-	-	0,35
07	-	-	0,30	-	0,30	-	-	-	-	
08	-	-	-	-		-	0,39	-	-	0,39
09	-	-	-	-		-	-	-	-	
10	-	-	-	-		-	-	-	-	
11	-	-	-	-		-	-	-	-	
12	-	-	-	-		-	-	-	-	
13	-	0,50	-	-	0,50	-	-	-	-	
14	-	-	0,58	-	0,58	-	-	-	-	
15	-	0,27	-	-	0,27	-	-	-	-	
16	-	0,39	-	-	0,39	-	0,32	-	-	0,32
17	-	-	-	-		-	-	-	-	
18	-	-	0,49	-	0,49	-	-	-	-	
19	-	-	-	-		-	-	-	-	
20	-	-	-	-		-	-	-	-	
21	-	-	-	-		-	-	-	-	
22	-	-	-	-		-	-	-	-	
23	-	-	0,27	-	0,27	-	-	-	-	
24	-	-	-	-		-	-	-	-	
25	-	-	-	-		-	-	-	-	
26	-	-	-	-		-	-	-	-	
27	-	0,29	-	-	0,29	-	-	-	-	
28	-	0,28	-	-	0,28	-	-	-	-	
29	-	-	-	-		-	-	-	-	
30	-	-	-	-		-	-	-	-	
31	-	-	-	-		-	-	-	-	
32	-	-	-	-		-	-	-	-	
33	-	-	-	-		-	-	-	-	
34	-	-	-	-		-	0,46	-	-	0,46
35	-	-	-	-		-	-	-	-	
36	-	-	-	0,44	0,44	-	-	-	-	
37	-	-	-	0,41	0,41	-	-	-	-	
38	-	-	-	-		-	-	-	-	
39	0,41	-	0,77	-	1,18	-	-	-	-	
40	-	-	-	0,46	0,46	-	-	-	-	

Nota: (-) significa menor al límite de detección (LOD)



ANEXO 6. Concentración de fumonisinas en muestras de maíz seco sin pelar y pelado.

Muestra	Maíz seco sin pelar			Maíz pelado seco		Fumonisinias totales (µg/kg)
	Concentración (µg/kg)		Fumonisinias totales (µg/kg)	Concentración (µg/kg)		
	FB ₁	FB ₂		FB ₁	FB ₂	
01	-	-		-	-	
02	-	-		-	-	
03	-	-		-	-	
04	-	-		-	-	
05	-	-		-	-	
06	4,63	2,93	7,56	5,43	0,53	5,96
07	1,64	0,68	2,32	-	-	
08	5,58	0,94	6,52	-	4,63	4,63
09	2,61	0,96	3,57	2,16	-	2,16
10	11,37	2,03	13,4	1,03	-	1,03
11	0,66	2,01	2,67	-	-	
12	0,84	2,17	3,01	10,98	-	10,98
13	34,65	-	34,65	-	-	
14	10,27	1,22	11,49	0,80	-	0,8
15	7,28	1,27	8,55	-	-	
16	1,40	1,54	2,94	-	-	
17	2,50	1,53	4,03	-	-	
18	3,22	0,87	4,09	-	-	
19	2,07	-	2,07	-	-	
20	5,26	0,74	6,00	1,99	1,53	3,52
21	2,74	1,68	4,42	-	-	
22	-	-		-	-	
23	-	-		-	-	
24	-	-		-	-	
25	0,30	-	0,30	0,42	-	0,42
26	-	-		-	-	
27	-	-		-	-	
28	-	-		-	-	
29	-	-		-	-	
30	-	-		-	-	
31	-	-		-	-	
32	-	-		-	-	
33	-	-		-	-	
34	-	-		-	-	
35	-	-		-	-	
36	-	-		-	-	
37	-	-		-	-	
38	-	-		-	-	
39	-	-		-	-	
40	-	-		-	-	

Nota: (-) significa menor al límite de detección (LOD)