

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

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

**ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN POR
DEOXINIVALENOL (DON) PRESENTE EN HARINA DE
TRIGO ALMACENADA EN EL SECTOR DE SANGOLQUÍ
– PICHINCHA, MEDIANTE LA EXTRACCIÓN POR
COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD (IAC) Y
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA
(HPLC).**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ANA BELÉN GUERRERO HINOJOSA

Sangolquí, 16 de Diciembre de 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Ana Belén Guerrero Hinojosa

COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Mario Lozada

Sangolquí, 16 de Diciembre de 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ANA BELÉN GUERRERO HINOJOSA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 16 de Diciembre de 2011

Dra. Blanca Naranjo
Directora

B.Sc. Karina Ponce
Codirectora

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la oportunidad y la dicha de la vida. De manera especial a mis padres por ser mi ejemplo, guía y fortaleza; gracias a los valores que me han inculcado he llegado a ser quien soy. A mis hermanos que son mi fuente de apoyo constante. A mi abuelita quien ha sido ejemplo de superación; y a José Guevara quien ha sido mi amigo incondicional y en cada momento de incertidumbre, ha sabido ser mi luz para continuar adelante.

Ana Belén Guerrero Hinojosa

AGRADECIMIENTO

A mi familia, por ser el apoyo, motivación y guía constante a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Al personal docente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la ESPE, que han sido mi fuente de sabiduría durante esta gran etapa.

Al Laboratorio de Plaguicidas de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad) y el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) del INIAP, por abrirme sus puertas para realizar la presente investigación.

Al Dr. Iván Samaniego, por haber colaborado con este estudio transmitiéndome todos los conocimientos necesarios para el mismo.

A mis amigos quienes siempre han estado presentes en los momentos fáciles y difíciles de mi vida. Gracias por su apoyo.

Ana Belén Guerrero Hinojosa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
LISTADO DE TABLAS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	ix
LISTADO DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del Problema.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
1.4. Marco Teórico.....	5
1.4.1. Micotoxinas.....	5
1.4.2. Tricotecenos.....	9
1.4.3. Trigo.....	15
1.4.4. Métodos de extracción y purificación.....	16
1.4.5. Técnicas de detección.....	20
1.5. Hipótesis.....	25
2. CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1. Participantes.....	26
2.1.1. Instituciones.....	26
2.2. Zona de estudio.....	26
2.2.1. Trabajo de campo.....	26
2.2.2. Trabajo de laboratorio.....	27
2.3. Periodo de investigación.....	28
2.4. Procedimientos.....	28
2.4.1. Preparación de estándares para curva de calibración.....	28

2.4.2. Estandarización de método.....	30
2.4.3. Fortificación de muestras y determinación de porcentaje de recuperación.....	32
2.5. Diseño y Análisis de datos.....	34
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	35
3.1. Estandarización de método.....	35
3.2. Curvas de calibración.....	36
3.3. Lectura de blancos diarios.....	36
3.4. Determinación de la concentración de DON presente en muestras de harina de trigo.....	37
3.4.1. Análisis exploratorio de datos.....	37
3.4.2. Análisis inferencial de datos.....	43
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	49
4.1. Estandarización de método.....	49
4.2. Curvas de Calibración.....	51
4.3. Lectura de blancos diarios.....	52
4.4. Determinación de la concentración de DON presente en las muestras de harina de trigo.....	52
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	55
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	57
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	59
ANEXOS.....	66

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Propiedades físicas de algunas micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i>	6
Tabla 1.2: Niveles máximos admitidos de deoxinivalenol en alimentación humana.	15
Tabla 2.1: Ubicación de los lugares de muestreo.	27
Tabla 2.2: Volúmenes necesarios para preparar los puntos de la curva de calibración.	29
Tabla 2.3: Equivalencia de las concentraciones de DON.	30
Tabla 3.1: Porcentaje de recuperación por muestra y del método en general.	35
Tabla 3.2: Resultados de las curvas de calibración realizadas.	36
Tabla 3.3: Concentración de DON presente en las muestras blanco.	37
Tabla 3.4: Resumen global de medidas de tendencia central y de dispersión.	43
Tabla 3.5: ANOVA por tipo de local.	45
Tabla 3.6: ANOVA por tipo de almacenamiento.	45
Tabla 3.7: ANOVA por marca.	46
Tabla 3.8: ANOVA por molino.	46
Tabla 3.9: Intervalos de Confianza global del estudio.	48

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Países que cuentan o no con reglamento.....	3
Figura 1.2: Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.....	6
Figura 1.3: Estructura básica de los tricotecenos.....	10
Figura 1.4: Estructura básica de DON.	12
Figura 1.5: Límites a nivel mundial para el deoxinivalenol en harina de trigo y otros cereales.	14
Figura 1.6: Extracción en fase sólida de micotoxinas.	18
Figura 1.7: Extracción en Columnas de Inmunofinidad.....	19
Figura 1.8: Cromatografía de intercambio iónico.	23
Figura 1.9: Mecanismo de cromatografía de exclusión molecular.	24
Figura 2.1: Cronograma del desarrollo del presente estudio.	28
Figura 3.1: Histograma de la frecuencia relativa en la que las muestras presentan determinada concentración de DON.	38
Figura 3.2: Diagrama de Barras en base al promedio obtenido en cada una de las categorías por tipo de almacenamiento a) tomando en cuenta los valores atípicos obtenidos b) sin valor atípico.....	40
Figura 3.3: Diagrama de Barras en base al promedio obtenido en cada una de las categorías por tipo de local a) tomando en cuenta los valores atípicos obtenidos b) sin valor atípico.	41
Figura 3.4: Diagrama de Barras en base al promedio obtenido de acuerdo al molino en el que se obtuvo la muestra a) tomando en cuenta los valores atípicos obtenidos b) sin valor atípico.	42

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A: Mapa de ubicación de cada una de las muestras recolectadas en Sangolquí.....	66
ANEXO B: Resumen del método para cuantificación de DON.	67
ANEXO C: Cromatograma de matriz blanco utilizada para la determinación del porcentaje de recuperación.....	68
ANEXO D: Cromatograma de matriz foritificada con 400 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra.	69
ANEXO E: Cromatograma de matriz foritificada con 400 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra. Repetición 2.	70
ANEXO F: Cromatograma de matriz foritificada con 1600 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra.	71
ANEXO G: Curva de Calibración al 16/06/2011.....	72
ANEXO H: Cuantificación de blanco.	73
ANEXO I: Cromatograma muestra 023.	74
ANEXO J: Cromatograma muestra 025.	75
ANEXO K: Cromatograma muestra 030.	76
ANEXO L: Cromatograma muestra 029.	77
ANEXO M: Cromatograma muestra 019.....	78
ANEXO N: Resumen global de los datos obtenidos en el presente estudio. ...	68

RESUMEN

El Deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida por *Fusarium graminearum* que contamina a gramíneas como el trigo. Los principales síntomas de la contaminación con DON son: vómito, rechazo al alimento y anorexia. En el Ecuador no existe una normativa que controle el Límite Máximo Residual (LMR) de DON en harina de trigo. El objetivo de este análisis fue realizar una vigilancia de control en el Sector de Sangolquí – Pichincha, para comparar las concentraciones obtenidas experimentalmente con los valores establecidos en normativas internacionales y, proporcionar a la autoridad fitozoosanitaria del Ecuador un protocolo estandarizado para su uso en futuras vigilancias, así como valores de contaminación de harina de trigo para el establecimiento de una base, con la que se establecerá una normativa sobre la micotoxina. Se utilizaron Columnas de Inmunoafinidad para la extracción y se cuantificó con Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Al finalizar el estudio se determinó que todas las muestras de harina analizadas presentaron contaminación con DON, en un amplio rango entre 10,48 y 842,16 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra. La muestra DON 019 superó el valor establecido en la legislación de la Unión Europea (750 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra). Con un ANOVA se comprobó que la contaminación está relacionada con la marca y el molino del que provenían las harinas. Por lo tanto, se concluyó que la harina de trigo que consume la población de Sangolquí es de buena calidad y no ocasiona daño a su salud. Se sugiere realizar un estudio a nivel nacional para desarrollar la normativa para DON.

ABSTRACT

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by *Fusarium graminearum*, and it attacks principally to grass crops such as the wheat. In the latest years, the interest for DON has increased because of the effects that it causes in the animal and human health. The principal symptoms detected after a contamination are vomit and anorexia. Nowadays, Ecuador does not have rules to control the presence of DON in wheat. With this investigation, it had been done a surveillance of the quantity of DON present in wheat flour, in Sangolquí – Pichincha. It had the objective of making a comparison between the values obtained and the values that are in the legislation of the European Union, to have an idea of the values of DON that present some wheat flour in Ecuador and in the future they can make the rules for control. Also, another objective was to standardize the method, in order to give it to the national authority, and then they could use it for future controls. The standardization consisted in an extraction with Immunoaffinity Columns and the quantification with High Performance Liquid Chromatography. With this study it could be possible to determine that all the samples were contaminated by DON in a wide range of 10,48 and 842,16 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ of sample. Only one sample had a higher value than the one established by the European Union (750 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ of sample). With the use of an ANOVA, it could be determined that the contamination is related with the brand and the grind that the samples were from. In conclusion, the wheat flour that Sangolquí population is consuming is of a good quality and it will not damage their health. It is suggested that there must be a national study to corroborate these values and then develop the rules based on the European Union Legislation.

ABREVIATURAS

DON: Deoxinivalenol

DAS: Diacetoxipernol

UE: Unión Europea

JECFA: Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint Expert Committee on Food Additives)

FHB: Fusariosis de la Espiga (Fusarium Head Blight)

SPE: Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agricultural Organization)

FSC: Fluidos Supercríticos

TLC: Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography)

AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analistas (Association of Analytical Communities)

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)

DAD: Detector de Arreglo de Diodos

ODS: Octadecylsilane

IAC: Columna de Inmunoafinidad (Immunoaffinity Column)

LMR: Límite Máximo Residual

DE: Desviación Estándar

IDC: Índice de Confianza

LI: Límite Inferior

LS: Límite Superior

LSD: Dietilamida de Ácido Lisérgico (Lysergic Acid Diethylamide)

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema.

Actualmente la seguridad alimentaria y la inocuidad en general, han permanecido como necesidades humanas básicas debido al efecto de globalización que permite el intercambio de materias primas y terminadas a gran escala. El aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se ha constituido en los últimos años en una meta importante de acción internacional y nacional.

Resultan igual de preocupantes los contaminantes microbiológicos como los químicos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado tres tipos cruciales de contaminantes en los alimentos: las micotoxinas, ficotoxinas y toxinas vegetales; que provocan enfermedades transmitidas por los alimentos (OMS, 2002). De éstas, las micotoxinas son las que provocan mayores daños a nivel económico y de salud, por lo que han merecido tanta atención hasta ahora. En varios países representan un tema de vital importancia relacionado con la inocuidad de los alimentos (FAO, 2004).

Comprender los severos efectos que las micotoxinas causan sobre la salud de los seres humanos y animales, ha contribuido para que muchos países tomen la firme decisión de reglamentar la presencia de las micotoxinas en los alimentos y balanceados, para proteger la salud humana, animal y sus intereses económicos (FAO, 2004). Desarrollar este tipo de normativas es una actividad compleja que implica muchos factores y partes interesadas (Know Mycotoxins, 2008).

El Deoxinivalenol es una micotoxina perteneciente a los tricotecenos del grupo B producidas por *Fusarium spp.* (Soriano, 2007). En laboratorio han sido caracterizados químicamente alrededor de 150 tricotecenos, pero los de mayor importancia en la naturaleza son: Toxina T-2, Diacetoxipernol (DAS) y Deoxinivalenol (Agrocalidad, 2010). Se ha detectado al DON como principal contaminante de trigo, cebada, avena, centeno y maíz (Soriano, 2007). En la actualidad, se conoce que es un citotóxico agudo y potente inmunosupresor, induce a la degeneración de la médula ósea, vasos linfáticos e intestino (Cabello, 2007).

Se ha documentado que el Deoxinivalenol en cerdos provoca reducción en el consumo de alimentos con dosis menores a 2mg.L^{-1} , y a concentraciones más altas produce vómitos. Respuestas similares se han observado en ganado y aves. En humanos se ha asociado con brotes de enfermedades que ocasionan problemas gastrointestinales como diarreas y vómitos (Agrocalidad, 2010).

El Ecuador no posee una estricta regulación de DON en cereales a pesar de su potencial toxicidad (Figura 1.1), por lo que este trabajo contribuye a establecer una línea base, para posteriormente formular una normativa con la finalidad de mejorar la calidad sanitaria en la harina de trigo que se expende a nivel nacional.



Figura 1.1: Países que cuentan o no con reglamento.

Fuente: (FAO, 2004)

1.2. Justificación.

La contaminación con Deoxinivalenol (DON) en cereales, se encuentra ampliamente distribuida y tiene gran repercusión económica y sanitaria debido a sus graves efectos inmunotóxicos (Caballero, 2008). El consumo de alimentos con presencia de DON en cantidades superiores a las permitidas puede causar serios daños en la salud humana y animal (Escobar & Fragas, 2004).

Se conoce que en la última década, varios países exportadores de trigo como Canadá, Argentina y Estados Unidos, han sido sometidos a rigurosos estudios, detectándose la presencia de Deoxinivalenol (Escobar & Fragas, 2004). Hasta el año 2010 en el Ecuador se importaba alrededor del 97% de trigo que se consume (CIMMYT, 2010), pues la producción nacional era pobre y de baja calidad (Diario Hoy, 2007). Toda la harina y grano de trigo que se importa no pasa por pruebas de micotoxinas, debido a la falta de implementación de procesos de control por parte de Agrocalidad, que es la autoridad nacional fitozoosanitaria en el Ecuador.

A causa de los múltiples efectos que ocasionan las micotoxinas sobre los organismos, con especial atención aquellas que son cancerígenas, éstas se encuentran reguladas con estrictas normas en la mayoría de países (Agro-Bio, 2007). Basándose en los posibles riesgos que las micotoxinas tienen en la salud humana y animal, diferentes organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), The Food and Drug Administration (FDA) y la Food and Agriculture Organisation (FAO) han establecido los límites permitidos de micotoxinas en alimentos para el hombre y en los ingredientes para la alimentación animal (Denli & Pérez, 2006).

Dada la trascendencia del DON y su toxicidad dentro del campo económico y de salud, es necesario estandarizar los métodos de detección y determinar el grado de contaminación en harinas de cereales tales como el trigo, para sugerir campañas o programas de control y así evitar el consumo de productos contaminados.

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo General.

Realizar un estudio sobre la contaminación por Deoxinivalenol (DON) en harina de trigo almacenada en el sector de Sangolquí – Pichincha, mediante la extracción por Columnas de Inmunoafinidad (IAC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

1.3.2. Objetivos Específicos.

- Recopilar información sobre las concentraciones permitidas de Deoxinivalenol en harinas de trigo a nivel internacional.

- Estandarizar el método de extracción con el uso de Columnas de Inmunofinidad (IAC) y detección por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).
- Compilar información sobre las bodegas que expenden harina de trigo en el sector de Sangolquí.
- Realizar una comparación de las concentraciones obtenidas experimentalmente de las muestras con los estándares establecidos a nivel internacional.
- Sugerir la elaboración de un reglamento que pueda utilizar la autoridad competente para la regulación de la micotoxina.

1.4. Marco Teórico.

1.4.1. Micotoxinas.

1.4.1.1. Definición.

El término “micotoxina” fue acuñado en 1962 por Forgacs y Carll, quienes lo definieron como “intoxicación del huésped debido a la ingesta de una sustancia tóxica de origen fúngico” (Casto & Ahumada, 1993).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos que se encuentran en forma natural en diversos cultivos agrícolas. Se generan durante la fase estacionaria del crecimiento de los microorganismos (Figura 1.3) (Caballero, 2008). Estos agentes naturales son producidos por varios tipos de hongos como: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (Tabla 1.1) (Oancea & Stoia, 2008). Se conoce que los tres géneros más

importantes son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; debido a la toxicidad de los compuestos que producen (Medina, 2005).

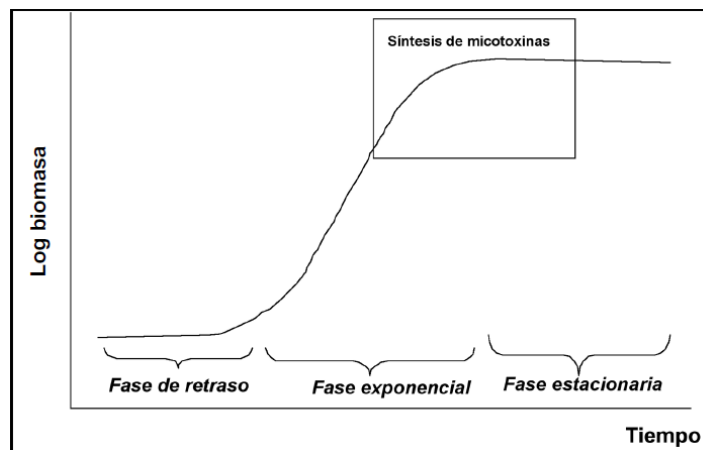


Figura 1.2: Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.

Fuente: (Soriano, 2007)

Tabla 1.1: Propiedades físicas de algunas micotoxinas producidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Micotoxina	Principal Productor	Peso Molecular	Temperatura de Inactivación (°C)
Aflatoxina B1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>	312	268-269
Aflatoxina B2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>	314	286-289
Aflatoxina G1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus nomius</i>	328	244-246

Continuación Tabla 1.1.

Micotoxina	Principal Productor	Peso Molecular	Temperatura de Inactivación (°C)
Aflatoxina G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>	330	237-240
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i>	403	169
Fumagillin	<i>Aspergillus fumigatus</i>	459	190-192
Citreoviridin	<i>Penicillium citroviride</i>	434	107-110
Citrinin	<i>Penicillium citrinum</i>	250	172
Ácido Penicillico	<i>Penicillium puberulum</i>	170	83-87
Patulina	<i>Penicillium patulum</i>	154	111
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium crookwellense</i>	296	131-135
Toxina T-2	<i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i>	466	150-151
Fumonisina B1	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>	721	Polvo
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium crookwellense</i>	318	164

1.4.1.2. Historia.

La palabra “micotoxina” proviene de dos palabras griegas *mikes* que significa hongo y *toxina* que significa veneno. Una de las micotoxicosis más conocidas es el ergotismo, producida por el hongo *Claviceps* que al contaminar el centeno forma una masa alargada y ennegrecida que

constituye el conocido cornezuelo del centeno. En China se lo utilizaba hace más de 3000 años en obstetricia (Soriano, 2007).

En la Biblia también se citan a las micotoxinas, en el año 600 a.C. se sugiere que la muerte de los primogénitos pudo haberse dado por el consumo de cereales contaminados en gran medida por tricotecenos, y que por razones culturales los consumían solo los hombres y sus hijos varones, lo que dio lugar a hemorragias y muerte. Mientras que en el año 400 a.C. en la antigua Persia, los abortos y muertes al nacer se explicaban debido al consumo de micotoxinas. En los años 1600 en Salem murieron muchas personas por ser acusadas de brujería, pues su comportamiento no era normal. Algunas personas experimentaban ceguera temporal, sordera, ataques de rabia, fiebre, dolor de estómago, debilidad, quemazón en los dedos y dolor en las manos. Hoy en día se intenta explicar estos hechos debido a que estos individuos consumían LSD (Dietilamida del Ácido Lisérgico), un derivado sintético del ácido lisérgico, que es uno de los alcaloides del cornezuelo del centeno. También se presume que muchos de ellos consumieron pan de centeno contaminado con micotoxinas (Soriano, 2007). Se conoce que en el año 1960 en Inglaterra hubo una intoxicación masiva de pavos que llevó al estudio de las Aflatoxinas (Carrillo, 2003).

1.4.1.3. **Efectos.**

La contaminación por micotoxinas en alimentos, piensos y/o materia prima utilizada para la elaboración de balanceados o alimentos destinados al consumo humano, es un problema de interés público, tanto económico como de salud humana y animal (Oancea & Stoia, 2008). El consumo de dichos alimentos origina una intoxicación denominada micotoxicosis (Instituto de Salud Pública de Chile, 2009), que es la forma de evidenciar la toxicidad resultante de la absorción de la micotoxina (Wilches & Rojas, 2000). La contaminación puede ocurrir antes o durante la cosecha, al igual que en el almacenaje del cereal (Moreno, Martínez, & Raybaudi, 2000).

El Consejo de Ciencia y Tecnología de los Estados Unidos calculó que las micotoxinas causan, en promedio anual, pérdidas económicas de \$932 millones (Medina, 2005). La presencia de micotoxinas en los alimentos es un potencial problema de salud pública, afecta a la producción agropecuaria, disponibilidad de ciertos productos y comercialización de éstos a nivel regional e internacional (Oancea & Stoia, 2008). En 1985 la OMS realizó un estudio en el que se determinó que el 25% de los granos del mundo posiblemente se encontraban contaminados por micotoxinas. Este dato seguramente ha aumentado desde entonces debido al creciente efecto de globalización, e importaciones y exportaciones de granos y cereales (KnowMycotoxins, 2008).

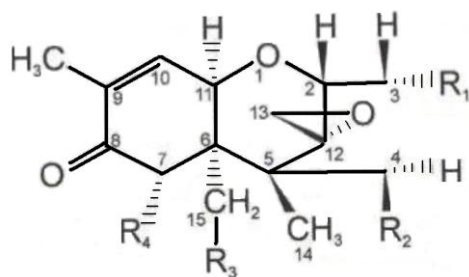
1.4.2. Tricotecenos.

Los tricotecenos son toxinas producidas por varios tipos de hongos como: *Fusarium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*. Éstas contaminan todo tipo de comida, pero particularmente a cereales. Se han identificado alrededor de 80 compuestos de los cuales unos pocos son tóxicos para animales y humanos (Oancea & Stoia, 2008).

Los tricotecenos son una familia de sesquiterpenoides, la mayoría posee un núcleo tetraciclo con doble enlace entre en C9 - C10 y un anillo epoxi en C12 – C13 (Soriano, 2007). Están divididos en cuatro grupos de acuerdo a los grupos sustituyentes funcionales (Figura 1.4)

- A: Toxina T-2.
- B: Nivalenol y Deoxinivalenol.
- C: Crotocin.
- D: Aquellos compuestos con anillos macrocíclicos.

La Toxina T-2 y el Nivalenol fueron las primeras micotoxinas en ser estudiadas debido a su fuerte toxicidad, pero en la actualidad la más relevante del grupo es DON (Pozas & Abad, 2010).



Micotoxina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
15-acetildeoxinivalenol	OH	H	OAc	OH
3-acetildeoxinivalenol	OAc	H	OH	OH

Figura 1.3: Estructura básica de los tricotecenos.

Fuente: (Soriano, 2007).

1.4.2.1. Deoxinivalenol (DON).

1.4.2.1.1. Definición.

Como se citó anteriormente el Deoxinivalenol es una micotoxina que se encuentra en la naturaleza, perteneciente a los tricotecenos del grupo B producidas por *Fusarium* spp., especialmente por *F. graminearum*. Ha ganado importancia en los últimos años debido a su gran concentración en productos derivados de las gramíneas como: trigo, cebada, avena, centeno y maíz. (Soriano, 2007).

1.4.2.1.2. Historia.

En la década de los cincuenta, el envenenamiento fúngico rojo se registró en varias áreas rurales de Japón y el sur de Corea. Morooka *et al.* (1972) determinaron que esta enfermedad era causada por una toxina producida por un hongo (DeVries, Trucksess, & Jackson, 2002). Este metabolito secundario fue aislado por primera vez por Morooka en 1973

denominándolo toxina roja. Yoshizawa en 1973, descubrió su estructura química y renombró al compuesto como 4-deoxinivalenol (Soriano, 2007). En el mismo año, Vesonder y sus colaboradores aislaron el mismo compuesto a partir de maíz contaminado con *F. graminearum*, en estudios sobre la alimentación en cerdos. Esta sustancia había causado rechazo de alimento y vómitos en los individuos, por lo que Vesonder la denominó “vomitoxina” (Soriano, 2007).

Entre los años 1980 y 1982, en el noreste de Estados Unidos y el este de Canadá se detectó trigo altamente contaminado con DON. En la misma década se presentó un brote importante de micotoxicosis provocado por DON en el Valle de Cachemira – India, donde se determinó que 7818 personas habían consumido este cereal contaminado, sin reportarse fallecimientos (Soriano, 2007).

1.4.2.1.3. **Características del compuesto.**

El Deoxinivalenol (Figura 1.5) es un compuesto orgánico polar que pertenece al grupo B de los tricotecenos. (Sobrova, Adam, Vasatkova, Beklova, Zeman, & Kizek, 2010). Tiene una función carbonilo en la posición C8, tres grupos hidroxilos (OH⁻) a los que se asocian su toxicidad y, un grupo ceto insaturado en posición α , β . Nombre químico: 12,13-epoxi-3 α , 7 β -trihidroxitricotec – 9 – ene – 8 – ona, fórmula molecular: C₁₅H₂₀O₆, peso molecular: 296,3 g.mol⁻¹, punto de fusión: 151 – 153°C y longitud de onda UV de 254 nm debido a la función ceto insaturada en posición α , β (Soriano, 2007).

Este compuesto es relativamente soluble en agua y altamente soluble en solventes polares acuosos como: metanol, etanol, cloroformo, acetonitrilo y etil acetato (Sobrova, Adam, Vasatkova, Beklova, Zeman, & Kizek, 2010). Es estable a 121°C, por 15 min a 1 atm (autoclavado) y bajo condiciones medianamente ácidas. Se logra una completa inactivación a

370°C por 10 min y su inactivación química se produce con una solución de hipoclorito de sodio del 3-5% (Soriano, 2007).

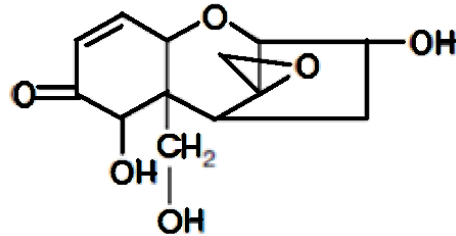


Figura 1.4: Estructura básica de DON.

Fuente: (Carrillo, 2003)

1.4.2.1.4. Peligros y efectos adversos.

La contaminación con Deoxinivalenol en cereales se encuentra ampliamente distribuida y tiene gran repercusión económica y sanitaria debido a sus graves efectos inmunotóxicos (Caballero, 2008). El consumo de alimentos con presencia de DON en cantidades superiores a las permitidas puede causar serios daños en la salud humana y animal (Escobar & Fragas, 2004).

1.4.2.1.4.1. Efectos en la salud humana.

El potencial daño que ocasiona DON en la salud humana puede ocurrir después de la ingestión de alimentos contaminados con la micotoxina (Sobrova, Adam, Vasatkova, Beklova, Zeman, & Kizek, 2010). El principal motivo de preocupación es que esta micotoxina se mantiene activa en la comida después de exponerle a las condiciones normales del tratamiento culinario.

La ingesta en cantidades mayores a las permitidas puede causar problemas gastrointestinales, diarreas, vómitos, inmunodepresión,

degeneración de la médula ósea, vasos linfáticos e intestino (Cabello, 2007).

1.4.2.1.4.2. **Efectos en la salud animal.**

En estudios realizados se ha determinado que animales expuestos a DON, transmitieron la micotoxina a los productos como: huevos, leche y carnes (Sobrova, Adam, Vasatkova, Beklova, Zeman, & Kizek, 2010). El tricoteceno actúa sobre el sistema nervioso central y causa un síndrome emético, es citotóxico e inmunosupresor, causa rechazo de los alimentos (anorexia) y en consecuencia reduce el crecimiento (Oancea & Stoia, 2008)

1.4.2.1.5. **Regulación.**

Según la FAO (2004), pocos países han fijado límites reglamentarios o guía para el Deoxinivalenol en los alimentos (Figura 1.1). El DON se ha convertido en una micotoxina de alta prioridad en los programas de monitoreo actuales. Como se puede observar en la Figura 1.5, 19 de 37 países tienen como valor límite máximo $750 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, siendo éste una referencia para la UE. El Ecuador no posee una regulación con respecto a esta micotoxina (Agrocalidad, 2010).

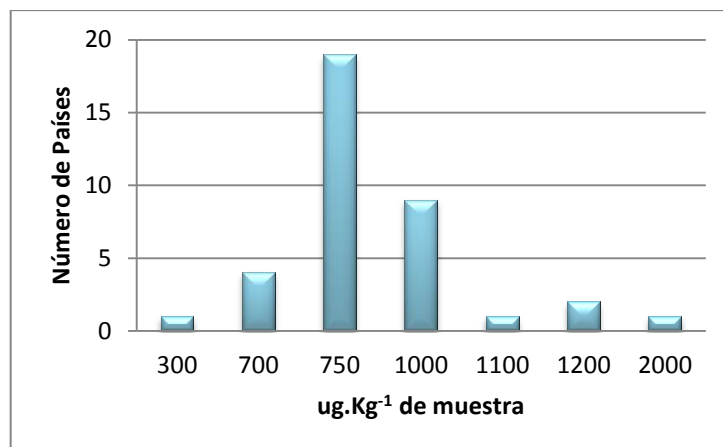


Figura 1.5: Límites a nivel mundial para el deoxinivalenol en harina de trigo y otros cereales.

Fuente: (FAO, 2004)

El Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció una ingesta máxima diaria tolerable de DON de $1\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corporal en animales, sin evidenciarse efectos sobre el sistema inmunológico, crecimiento y reproducción (Agrocalidad, 2010). Para determinar la ingesta diaria máxima tolerable en humanos se tomó en cuenta la región a la que pertenecían los participantes y se logró establecer un valor de $1,2\text{ng.Kg}^{-1}$ de peso corporal para la dieta latinoamericana (Soriano, 2007).

Muchos países han establecido límites máximos permitidos de DON en alimentos, siendo la Unión Europea los más exigentes con una concentración máxima permitida en trigo duro y avena no procesados de 1750 y de $750\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para harinas de cereales, como se citó anteriormente (Tabla 1.2). En el caso de alimentos a base de cereales para infantes y niños pequeños el máximo permitido es de $200\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (Agrocalidad, 2010).

Debido a los graves efectos que las micotoxinas pueden ocasionar sobre los seres humanos y animales, muchos países han fijado

reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y piensos, para proteger la salud humana y sus intereses económicos. Establecer normativas para las micotoxinas es una actividad compleja que involucra varios factores y partes interesadas (FAO, 2004).

Tabla 1.2: Niveles máximos admitidos de deoxinivalenol en alimentación humana.

Producto	Deoxinivalenol ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz.	1250
Trigo duro y avena no elaborados.	1750
Harina de cereales, en especial la harina de maíz y el maíz triturado o molido. Se incluye en esta categoría también la sémola.	750
Pan, pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno.	500
Pasta (seca).	750
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad y alimentos infantiles.	200

Fuente: (Soriano, 2007)

1.4.3. Trigo.

El trigo (*Triticum vulgare*) es una gramínea presente en todo el mundo (Geremia, 2009). La harina de trigo se utiliza principalmente para la alimentación humana y animal (Dirección General de Normas, 1982). Por ser de alto consumo, precisa de una atención especial cuando se trata de sus cualidades sanitarias, como la contaminación por micotoxinas que representa un riesgo significativo a la salud de los consumidores. Este tema ha recibido cada vez más atención por parte de las autoridades de seguridad alimentaria de todo el mundo (Geremia, 2009).

1.4.3.1. Importancia Económica.

El trigo representa el segundo cultivo de mayor producción, siendo superado por el maíz en un 1,05%, pero es el primer cereal desde el punto de vista comercial. La demanda mundial de trigo totaliza 679 millones de toneladas al año y es el grano más consumido por el hombre en occidente (FAO, 2010). Anualmente se producen 100 Kg/habitante en el mundo, es por esto que casi toda su producción se destina a la alimentación humana. En el Ecuador existe una producción pobre y destinada al autoconsumo, por tal razón se ha preferido optar por la importación del grano. Hasta agosto del 2007, el país importó \$74,5 millones, de los cuales \$46,6 millones provinieron de Canadá, \$16,5 millones de Argentina y \$11,4 millones de los EEUU (Diario Hoy, 2007).

1.4.3.2. Contaminación con DON.

Entre toda la variedad de cereales, el trigo es el alimento que presenta los mayores niveles de contaminación con DON. Esto ocurre porque *Fusarium graminearum* es el principal patógeno del cultivo provocando fusariosis de la espiga (FHB), y es el principal productor de Deoxinivalenol (Soriano, 2007). Los factores ambientales que influyen en su producción son: humedad relativa (90-100%), contenido de agua en las semillas (22-23%), temperatura de almacenamiento (20-30°C), ventilación, niveles de oxígeno atmosférico (1-2% O₂) y cantidad de inóculo presente por rastrojos de cosechas anteriores (Wilches & Rojas, 2000).

1.4.4. Métodos de extracción y purificación.

Los análisis de micotoxinas demandan de altos niveles de exactitud, precisión y reproducibilidad; por lo que es aconsejable utilizar procedimientos de calidad, incluyendo materiales de referencia certificados y de ser posible pruebas interlaboratoriales.

Los procesos analíticos, para determinar micotoxinas en alimentos, generalmente requieren un proceso de extracción de la matriz (muestra) con un solvente adecuado y proceso de limpieza para eliminar cualquier interferencia (Leslie & Visconti, 2008). Es importante recalcar que las micotoxinas no se encuentran con una distribución uniforme en la muestra por lo que se requiere una homogeneización exhaustiva al momento de realizar la extracción (Soriano, 2007).

1.4.4.1. **Extracción en fase sólida.**

La extracción en fase sólida (SPE) tiene el mismo principio para todas las matrices. Consiste en una columna de plástico con un empaquetamiento de varios tipos de adsorbentes como charcol, alumina y célite (FAO, 2001). Permite concentrar y retener el analito de interés en una fase sólida con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación del mismo (Figura 1.6), y los contaminantes de la matriz son finalmente eluidos y desechados (Soriano, 2007).

Un ejemplo muy utilizado en DON es Mycosep® 225 o Mycosep® 227, desarrollado en EEUU por la compañía Romer Labs Incorporation. Tiene como material de empaquetamiento carbón, celite, resinas de intercambio iónico, entre otros (Romer Labs Incorporation, 2009). Para tricotecenos se pueden utilizar cartuchos C18 previamente acondicionados (Soriano, 2007). En la actualidad ya no son muy utilizados debido a la especificidad que brindan otros métodos.

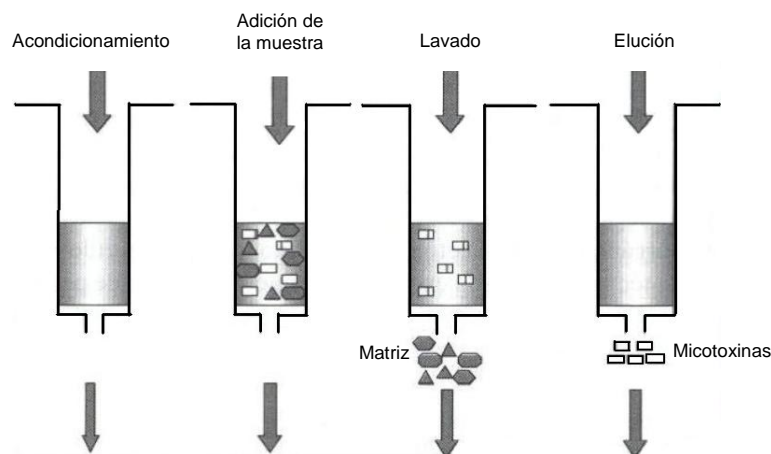


Figura 1.6: Extracción en fase sólida de micotoxinas.

Fuente: (Soriano, 2007)

1.4.4.2. Extracción en columnas de Inmunoafinidad.

El uso de columnas de Inmunoafinidad tiene el principio similar a la SPE y es muy utilizada en la actualidad. Como se puede observar en la figura 1.7, consiste en una columna plástica que posee en su interior anticuerpos monoclonales específicos para DON, fijados en agarosa, sefarosa o dextrano (Soriano, 2007). La diferencia es que este tipo de limpieza es mucho más específica, pues separa selectivamente a DON de las sustancias de la matriz que pueden interferir en el análisis. La separación se basa en la formación del complejo antígeno – anticuerpo que se quedará unido al soporte de la columna y posteriormente se eluye con un solvente orgánico para desnaturalizar los anticuerpos y obtener la micotoxina de interés (Kotal & Radová, 2001).

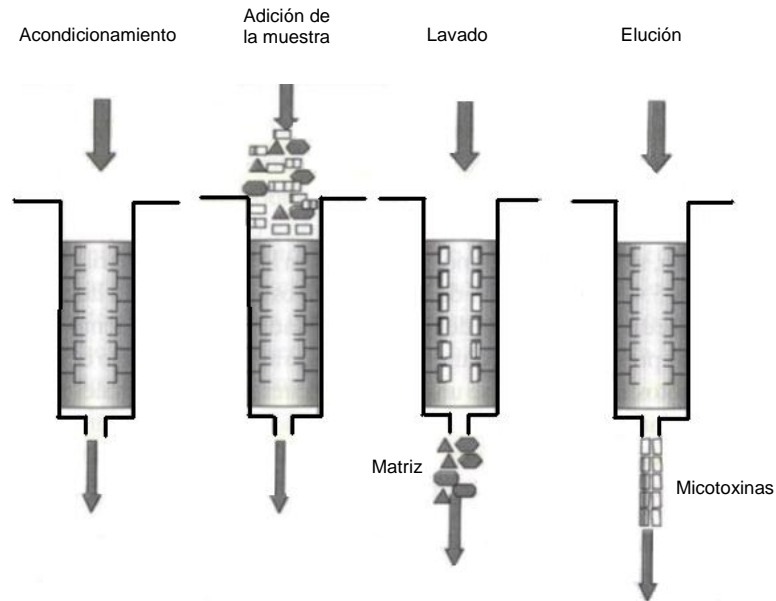


Figura 1.7: Extracción en Columnas de Inmunofinidad.

Fuente: (Soriano, 2007)

1.4.4.3. Extracción con fluidos supercríticos.

Este tipo de extracción es poco utilizado debido a su baja reproducibilidad, interferencia de la matriz, alta inversión y costo de mantenimiento de los equipos (FAO, 2001). Se basa en la separación de sustancias disueltas dentro de la matriz utilizando la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico (FSC) de modificar su solubilidad. La extracción se desarrolla sin realizar cambios de fase, simplemente variando las condiciones de presión y/o temperatura de los FSC (Els autores, 2005).

1.4.4.4. Extracción acelerada con disolventes.

Actualmente, esta técnica ya no es muy común debido al uso de grandes cantidades de solventes. Consiste en una extracción sólido – líquido a temperatura y presión fijas. Una columna se llena con la matriz a ser analizada y se hace pasar la muestra para la retención del analito y su posterior elución (Soriano, 2007).

1.4.5. Técnicas de detección.

Los métodos analíticos a ser utilizados deben permitir la medición del contaminante a niveles más bajos de los permitidos, con precisión y exactitud para establecer programas de monitoreo y proveer seguridad en el comercio nacional e internacional (Leslie & Visconti, 2008).

Existen varios tipos de cromatografía que se utilizan para la cuantificación de DON, pero para decidir el método a utilizar, se debe tomar en cuenta varios aspectos: disponibilidad de instrumentación, límite de detección requerido, composición de la matriz, propiedades del analito y disponibilidad de soluciones calibrantes con una determinada concentración (FAO, 2001).

1.4.5.1. Cromatografía Líquida en Capa Fina (TLC).

La cromatografía líquida en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) es la técnica pionera dentro de la cromatografía. Utilizada para métodos de screening cuando no se requieren límites de detección bajos (Leslie & Visconti, 2008). Para micotoxinas se la utiliza desde el año 1961 (Soriano, 2007). Es sencilla, rápida y de bajo costo (Schaafsma, Nicol, Savard, Sinha, Reid, & Rottinghaus, 1998). Desafortunadamente la TLC es efectiva cuando se trabaja con extractos sumamente limpios y no sirve para cuantificar debido a su baja selectividad (Kotal & Radová, 2001). Se ha notado que en los últimos años el número de publicaciones con el uso de esta técnica ha disminuido debido al uso frecuente de otras más avanzadas (Soriano, 2007). Cabe recalcar que según la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC) el método oficial para la cuantificación de DON se basa en TLC, tomando en cuenta que el porcentaje de recuperación es menor al 70% (AOAC, 2005).

1.4.5.2. **Cromatografía de Gases (GC).**

La cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) es una técnica basada en la separación de los compuestos de acuerdo a su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria (Soriano, 2007). Para la detección de los Tricotecenos tipo A el método más utilizado es GC con detector de captura de electrones y detector de espectrometría de masas (Leslie & Visconti, 2008). Esta técnica no es muy utilizada para DON, pues requiere de un tratamiento pre-columna, equipos costosos y solamente se utiliza para la confirmación de datos (Kotal & Radová, 2001).

1.4.5.3. **Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).**

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) junto con varios tipos de detectores como: UV, arreglo de diodos (DAD) y Fluorescencia, es la técnica más utilizada para la identificación de la mayoría de micotoxinas (Leslie & Visconti, 2008). La primera publicación que se realizó sobre análisis de micotoxinas con HPLC fue en 1973 y desde entonces ha incrementado su uso (Soriano, 2007). Se trata de un método físico de separación de dos o más analitos basado en la velocidad de desplazamiento de los compuestos de acuerdo a sus propiedades físicas. En ella participan dos fases, una móvil (líquida) y otra estacionaria (sólida) (Túnez & Muñoz, 2000).

1.4.5.3.1. **Tipos de cromatografía líquida.**

1.4.5.3.1.1. Cromatografía de reparto.

La cromatografía de reparto ha llegado a ser la más utilizada. Se basa en la separación de los compuestos presentes en la muestra en base a la diferencia de distribución de los mismos entre una fase orgánica y otra acuosa (Túnez & Muñoz, 2000). En este caso, la separación del analito depende de la afinidad que tenga hacia la fase sólida o líquida. Si la

muestra es muy afín a la fase estacionaria, su tiempo de retención será mayor y viceversa (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999).

Dentro de la cromatografía de reparto existen dos subdivisiones de acuerdo a la polaridad de la fase estacionaria, la cromatografía de fase normal y fase reversa (Jurado & Alcázar, 2010).

1.4.5.3.1.2. Cromatografía de fase normal.

Para este tipo de cromatografía se requiere de una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar. Los empaques de las columnas que se utilizan comúnmente son diol, sílica y amino (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999).

1.4.5.3.1.2.1. Cromatografía de fase reversa.

En la cromatografía de fase reversa o inversa se requiere de un empaque no polar y una fase móvil polar (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999). La interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria depende de las fuerzas de dispersión separándose los compuestos según su hidrofobicidad, es decir, los compuestos más polares tienen un tiempo de retención menor (Soriano, 2007). Los empaques que más se usan son: ODS (C18), octyl y dimetil (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999).

1.4.5.3.1.2.2. Cromatografía de afinidad.

Se basa en la interacción soluto de la mezcla – sitio activo de la fase estacionaria (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999). Esta interacción se fundamenta en las características estructurales del analito para que interaccione con la fase estacionaria (Túnez & Muñoz, 2000).

1.4.5.3.1.3. Cromatografía de intercambio iónico.

Está relacionada con los métodos actuales y efectivos para la separación y determinación de iones. Se basa en el uso de resinas de intercambio iónico como fase estacionaria (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999). El fundamento de este tipo de cromatografía son las interacciones electrostáticas entre los grupos ionizables de los productos a separar y el material de empaque (Figura 1.8) (Túnez & Muñoz, 2000). La fase estacionaria se encuentra inicialmente neutralizada (cationes o aniones). Cuando la muestra se pone en contacto con la resina se realiza un intercambio iónico formándose sales y asociaciones iónicas entre la fase estacionaria y la móvil (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999).



Figura 1.8: Cromatografía de intercambio iónico.

Fuente: (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999).

1.4.5.3.1.4. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.

Técnica de purificación muy utilizada debido a su sencillez y eficacia, especialmente en compuestos de alto peso molecular o macromoléculas (Universidad San Carlos de Guatemala, 2010). La fase estacionaria es un gel muy hidrófilo que al ponerlo en contacto con la fase móvil forma una matriz de poros semiuniformes que actúan a manera de tamiz molecular (Figura 1.9) (Túnez & Muñoz, 2000). Las moléculas que se van a separar se aplican sobre este tipo de tamiz, y posteriormente se eluyen con un disolvente apropiado. La elución ocurrirá en orden descendiente de acuerdo al tamaño de las moléculas (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999).

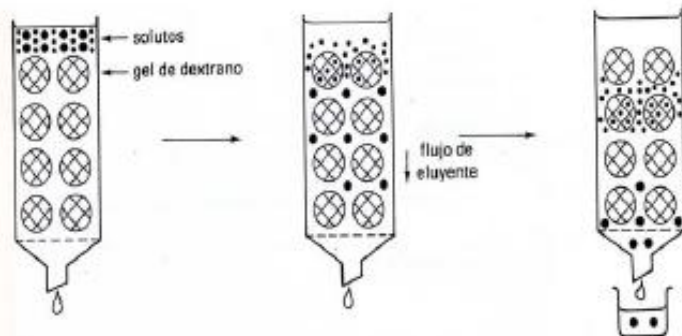


Figura 1.9: Mecanismo de cromatografía de exclusión molecular.

Fuente: webpages.ull.es/.

1.4.5.3.2. Sistema de elución.

Dependiendo de la forma en que se utiliza el solvente, existen dos sistemas para la elución del analito.

1.4.5.3.2.1. Isocrática.

Tipo de elución en donde ocurre un desplazamiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria con una composición constante durante el tiempo de corrida (Jurado & Alcázar, 2010).

1.4.5.3.2.2. Gradiente.

Tipo de elución que tiene un cambio continuo de composición en la fase móvil, con la finalidad de aumentar la fuerza eluyente (Jurado & Alcázar, 2010).

1.4.5.3.3. Ventajas y desventajas.

Las principales ventajas que presenta el HPLC son: permite separar sustancias termolábiles, no volátiles, polares y apolares. Técnica rápida y reproducible, y permite realizar cuantificaciones exactas (Soriano, 2007). También tiene una difusión mínima en la fase móvil, no tiene efectos

negativos por calor y no destruye la muestra, por lo que se puede recuperar para un uso posterior (Verde, Escamilla, Reyes, & Malpica, 1999). Como desventajas están el alto costo, gran gasto de instrumentación, baja capacidad y requerimiento de personal altamente calificado (Túnez & Muñoz, 2000).

1.4.5.4. Cromatografía de masas o espectrofotometría de masas en tándem.

Es la tecnología más avanzada que existe para la separación y cuantificación de contaminantes químicos. La diferencia con la cromatografía líquida y de gases es que ésta es mucho más rápida, las separaciones que se realizan tardan milisegundos y presentan resultados igualmente satisfactorios (Skoog, Holler, & Crouch, 2008). Además, las técnicas cromatográficas como GC y HPLC, requieren de dilución de la muestra con gran cantidad de fase móvil y la eliminación posterior de ésta, lo que conlleva una gran posibilidad de contaminación al ambiente (Sogorb & Vilanova, 2004). Por lo tanto, la cromatografía de masas es mucho más sensible que las citadas anteriormente, debido a que el ruido químico que se produce es mucho menor. La principal desventaja del uso de esta técnica es el elevado costo del equipo (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

1.5. Hipótesis.

Las muestras de harina de trigo almacenadas en las bodegas del sector de Sangolquí presentan niveles de contaminación con DON mayores a los permitidos a nivel internacional.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes.

El presente estudio fue realizado por Ana Belén Guerrero Hinojosa, egresada de la carrera de Ing. en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército. Con la colaboración del Bioquímico Farmacéutico Juan Carlos Gualotuña, técnico encargado del proyecto de micotoxinas en Agrocalidad. También se contó con el apoyo del Doctor Iván Samaniego, director del laboratorio de micotoxinas del INIAP y el del Químico Alex Portilla, técnico del laboratorio de micotoxinas.

2.1.1. Instituciones.

Se contó con el apoyo del laboratorio de plaguicidas de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad) y el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) del INIAP.

2.2. Zona de estudio.

La investigación se realizó en dos fases, la primera que consistió en el trabajo de campo y la segunda que abarcó la investigación en laboratorio.

2.2.1. Trabajo de campo.

Se realizó el muestreo en 32 bodegas de almacenamiento y distribución de harina de trigo (Tabla 2.1), entre ellas despensas, mercados y supermercados ubicadas en la ciudad de Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia Pichincha (Anexo A).

Tabla 2.1: Ubicación de los lugares de muestreo.

Numero de muestra	Local	Ubicación
DON 001	AKI SUPERDESPENSA	S0°19.7803' W78°27.0529'
DON 002	TIA	S°19.7179' W78°27.0376'
DON 003	DISTRIBUIDORA LA UNION	S0°19.6481' W78°26.9843'
DON 004	BODEGA PICHINCHA N°1	S0°19.6349' W78°26.9864'
DON 005	SIN NOMBRE	S0°19.6393' W78°26.9755'
DON 006	BODEGA PICHINCHA N°3	S0°19.6176' W78°26.9992'
DON 007	COMERCIAL JR.	S0°19.5998' W78°26.9426'
DON 008	COMERCIAL HERRERA	S0°19.6062' W78°26.939'
DON 009	LA BODEGA	S0°19.5954' W78°26.9126'
DON 010	BODEGA JEFFSABETH	S0°19.6496' W78°26.838'
DON 011	BODEGA VICTORIA	S0°19.693' W78°26.838'
DON 012	BODEGA LA ECONOMÍA	S0°19.7578' W78°26.8272'
DON 013	VIVERES LA FERIA	S0°19.7155' W78°26.809'
DON 014	VIVERES PRECIO Y PESO JUSTO	S0°19.7115' W78°26.8086'
DON 015	MEGA TIENDA	S0°19.6702' W78°26.7958'
DON 016	BODEGA PROVIT	S0°19.6797' W78°26.793'
DON 017	VIVERES DON DIEGO	S0°19.6527' W78°26.9173'
DON 018	MEGA SANTA MARÍA	S0°19.793' W78°27.0656'
DON 019	MAGDA	S0°19.413' W78°26.9531'
DON 020	MEGAMAXI	S0°18.5515' W78°27.0204'
DON 021	HIPERMARKET	S0°18.5938' W78°26.6489'
DON 022	DISTRIBUIDORA EL AMERICANO	S0°19.7254' W78°26.8409'
DON 023	BODEGA LA UNIVERSAL	S0°19.5856' W78°26.9516'
DON 024	BODEGA SÁNCHEZ	S0°19.6604' W78°26.997'
DON 025	LA ECONOMÍA SU BODEGA	S0°19.6841' W78°27.0065'
DON 026	MERCADO	S0°19.6119' W78°26.9628'
DON 027	MERCADO	S0°19.6119' W78°26.9628'
DON 028	MERCADO	S0°19.6119' W78°26.9628'
DON 029	MERCADO	S0°19.6119' W78°26.9628'
DON 030	MERCADO	S0°19.6119' W78°26.9628'
DON 031	MERCADO	S0°19.6119' W78°26.9628'
DON 032	MEGAMAXI	S0°18.5515' W78°27.0204'

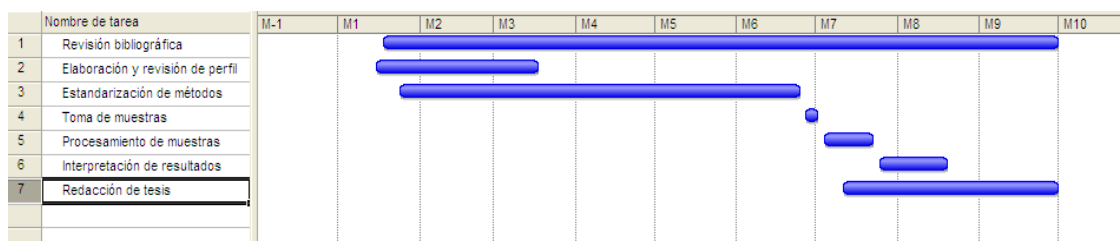
2.2.2. Trabajo de laboratorio.

Se realizó el proceso de extracción en los laboratorios del INIAP – LSAIA ubicados en Cutuglahua, Cantón Quito, provincia de Pichincha y la cuantificación se realizó en los laboratorios de Plaguicidas de Agrocalidad, ubicados en Tumbaco, cantón Quito, provincia de Pichincha.

2.3. Periodo de investigación.

Este estudio se realizó en un periodo de nueve meses, iniciando el 15 de febrero del 2011 y culminando el 30 de septiembre de 2011 distribuidas cada una de las principales actividades de la manera en la que se observa en la figura 2.1.

Figura 2.1: Cronograma del desarrollo del presente estudio.



2.4. Procedimientos.

2.4.1. Preparación de estándares para curva de calibración.

Para la preparación de estándares se partió de una solución madre de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de DON en acetato de etilo:metanol (95:5) marca Supelco. Se preparó una solución de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como solución stock. Se tomaron $100 \mu\text{L}$ de la solución madre, se evaporó en corriente de nitrógeno a 50°C y se resuspendió en acetonitrilo para su almacenamiento.

De la solución stock de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se tomaron los volúmenes que se citan en la tabla 2.2 para construir una curva que va desde 125 ng.mL^{-1} hasta 1500 ng.mL^{-1} y se aforó a 2mL cada una.

Tabla 2.2: Volúmenes y concentraciones necesarias para elaborar la curva de calibración.

Concentración de DON (ng.mL ⁻¹)	Volumen a tomar de la solución stock de 10 µg.mL ⁻¹ (µL)
1500	300
1000	200
500	100
250	50
125	25

Debido a que las normativas se expresan en µg.Kg⁻¹ de muestra, las concentraciones citadas en la tabla 2.2 se deben relacionar con los Kg de masa que representa la muestra, de la siguiente manera.

$$\frac{25g \text{ de muestra}}{200mL} * \frac{2mL}{0,4mL} * 0,05mL = 0,0625g \text{ de muestra}$$

$$Ci = \frac{Co * 0,05mL}{0,0625g \text{ de muestra}}$$

Donde:

Ci= Concentración de DON en µg.Kg⁻¹ de muestra

Co=Concentración de DON en ng.mL⁻¹

Obteniéndose de esta manera las concentraciones que se observan en la tabla 2.3.

Tabla 2.3: Equivalencia de las concentraciones de DON.

Concentración de DON (ng.mL⁻¹)	Concentración de DON (µg.Kg⁻¹ de muestra)
1500	2400
1000	1600
500	800
250	400
125	200

La curva de calibración se realizó dentro del rango de 200-2400 µg.Kg⁻¹ de muestra, siendo el valor aceptado por la Unión Europea 750 µg.Kg⁻¹ de muestra, que se encuentra en el punto medio de la curva. Para facilitar la interpretación de datos se ingresó en el software del equipo HPLC (Empower) los valores de la Tabla 2.3.

2.4.2. Estandarización de método.

2.4.2.1. Muestreo.

Se compraron varios tipos de harina y se almacenaron en los envases en los que se expenden al público. La toma de muestras se realizó el día anterior al procesamiento, identificándolos para su ingreso a la base de datos, y se almacenaron en un lugar fresco y seco.

2.4.2.2. Extracción.

Se inició con la homogenización de la harina de trigo. Posteriormente, se pesaron 25 g de muestra a los que se les añadió 200 mL de agua destilada tipo HPLC y se licuó por 3 min. El licuado fue decantado y luego filtrado a través de papel filtro y papel de fibra de vidrio. A continuación, se tomaron 2 mL del filtrado y se colocaron en la Columna

de Inmunofinidad (IAC) marca Romer Labs, que previamente se puso a temperatura ambiente y se colocó en Manifold con una llave para evitar el goteo provocado por gravedad. Se dejó pasar a una velocidad de 1gota/6segundos. Una vez que pasó todo el filtrado se lavó la columna con 5 mL de agua destilada tipo HPLC. Seguidamente, se secó la columna dejando pasar aire suavemente con una jeringuilla. Para recuperar el DON retenido en la IAC, se realizó la elución dejando pasar 4 mL de metanol grado HPLC por la columna, realizando contraflujo del eluyente con una jeringuilla para romper físicamente el complejo antígeno – anticuerpo, y se recolectó el analito en tubos de base cónica. Finalmente, se llevó el eluato a evaporar en baño de nitrógeno a 40°C. Se almacenó para posterior cuantificación.

2.4.2.3. **Cuantificación.**

Los pellets en tubos cónicos fueron resuspendidos con 400 µL de fase móvil, agua:metanol (88:12), a temperatura ambiente y se homogeneizó con vortex y ultrasonido para asegurar la disolución.

El equipo HPLC se purgó y se dejó estabilizar la línea base dejando pasar la fase móvil por alrededor de una hora. Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las siguientes:

- Columna: Symmetry waters C18 4,6µm.
- Temperatura de horno: 30°C.
- Fase móvil: Agua:metanol (88:12).
- Flujo: 1mL.min⁻¹.
- Volumen de inyección: 50 µL.
- Tiempo de corrida: 12 min.
- Detector: UV 220 nm.

Realizada la separación por HPLC de cada una de las muestras, se cuantificó por comparación con la curva de calibración ya desarrollada. Cada día se corrió un set analítico o conjunto de muestras, y se incluyó un estándar y un blanco para control de calidad interno.

2.4.2.4. Análisis de blanco.

El blanco fue una muestra que se sometió al mismo proceso de extracción y cuantificación al que fueron sometidas el resto, con la diferencia de no poseer matriz a ser analizada, sino tan solo el solvente extractante. Esta fue utilizada diariamente en cada medición para verificar que no exista contaminación externa.

2.4.2.5. Método de descontaminación del material.

Finalizado el proceso de extracción, se dispuso todo el material en bandejas para trasladarlos al área de lavado, dejando el material en remojo en una solución clorinada al 3% por 20 min y se realizó un lavado con jabón y enjuague con agua destilada. Finalmente, se secó todo el material en una estufa a 65°C.

En la Anexo B se visualiza un gráfico que resume el método de extracción y cuantificación de DON en harina de trigo.

2.4.3. Fortificación de muestras y determinación de porcentaje de recuperación.

La efectividad del método de extracción se determinó con fortificaciones de matriz (adición de estándar interno) y se realizó la extracción y cuantificación con los procesos descritos anteriormente. No se contó con un blanco, por lo que se realizó la cuantificación de una matriz y se determinó la concentración de DON para posteriormente hacer la diferencia y obtener el valor real de la fortificación.

2.4.3.1. Fortificación o adición de estándar interno.

Se realizaron fortificaciones en dos puntos de la curva, uno de alta concentración ($1600 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra) y otro de baja concentración ($400 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra). En 25 g de muestra se adicionaron 50 μL de solución madre de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estándar, para obtener una concentración de $400 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra. Para obtener una concentración de $1600 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra, a 25 g de muestra se agregaron 200 μL de solución madre del estándar de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En los siguientes cálculos se pueden observar las relaciones realizadas para la adición del estándar interno.

- Volumen de solución madre necesaria para obtener una concentración de $400 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra.

$$400 \frac{\mu\text{g}}{\text{Kg}} * \frac{1\text{Kg}}{1000\text{g}} * 25\text{g} = 10\mu\text{g de DON}$$

$$\frac{1\text{mL}}{200\mu\text{g}} * 10\mu\text{g} = 0,05\text{mL} = 50\mu\text{L de solución madre de estándar a ser adicionada en la muestra.}$$

- Volumen de solución madre necesaria para obtener una concentración de $1600 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra.

$$1600 \frac{\mu\text{g}}{\text{Kg}} * \frac{1\text{Kg}}{1000\text{g}} * 25\text{g} = 40\mu\text{g de DON}$$

$$\frac{1\text{mL}}{200\mu\text{g}} * 40\mu\text{g} = 0,2\text{mL} = 200\mu\text{L de solución madre de estándar a ser adicionados en la muestra.}$$

2.4.3.2. Porcentaje de recuperación.

En los Anexos C – F se incluyen los cromatogramas de las fortificaciones realizadas para obtener el porcentaje de recuperación de estándar de las Columnas de Inmunofinidad. No se pudo contar con una matriz blanco, por lo que para las pruebas se utilizó como blanco una harina de trigo con una concentración de DON de $245,334 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra y a cada lectura obtenida en las muestras se le realizó la diferencia del valor de la matriz blanco (Ver Anexo N).

2.5. Diseño y Análisis de datos.

Para cuantificar Deoxinivalenol en harina de trigo se utilizó un método de extracción y cuantificación con un porcentaje de recuperación mayor al 90% y error menor al 20%, es por esto que se realizó cada análisis por duplicado para confirmar que no existan errores del operador. El proceso que se siguió en la extracción y cuantificación siempre fue el mismo, es decir, un día se realizó la extracción de la toxina y se mantuvo en refrigeración para la cuantificación al día siguiente, recibiendo todas el mismo tratamiento.

Para el estudio se aplicó un diseño estadístico basado en Análisis Exploratorio de Datos y Análisis Inferencial de Datos; con la finalidad de determinar la concentración promedio del contaminante (DON) y su influencia con las variables tipo de local donde se adquirió la harina, tipo de almacenamiento, marca y molino del que provenía las muestras; a las que se les aplicó una ANOVA para visualizar la dependencia o no de las variables.

Se tomó como referencia un intervalo de confianza basado en el parámetro permitido internacionalmente de $750 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra, como Límite Máximo Residual (LMR) establecido por la Unión Europea.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Estandarización de método.

Se probó un método que disponía la entidad auspiciante, al no funcionar la misma, se realizó una serie de pruebas y modificaciones para estandarizar el método de extracción de DON en harina de trigo.

Estandarizada la extracción de DON, se realizaron pruebas a una concentración alta ($1600 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) y a una baja ($400 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) de la micotoxina. Finalmente se determinó un porcentaje de recuperación del método de 101,8% como se observa en la tabla 3.1. En el capítulo cuatro se explica el por qué del excedente en el porcentaje de recuperación.

Tabla 3.1: Porcentaje de recuperación por muestra y del método en general.

Identificación	Concentración de DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Concentración de DON – blanco ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Porcentaje de recuperación
Matriz fortificada 400R1	658,591	413,257	103,31%
Matriz fortificada 400R2	647,95	402,616	100,65%
Matriz fortificada 1600	1872,138	1626,804	101,68%
Blanco matriz	245,334		
		Promedio de recuperación del método	101,88%

3.2. Curvas de calibración.

La reproducibilidad del equipo se constató con cuatro curvas de calibración realizadas a distintos días (Anexo G). Se obtuvo en todas un coeficiente de determinación mayor 0,98 y ecuaciones de las curvas de calibración muy parecidas entre sí (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Resultados de las curvas de calibración realizadas.

Curva	Concentración de DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Área	Ecuación	R ²
1	200	5899,6916	$y = 57,619x + 1180,8$	0,9907
	400	14361,3577		
	800	33075,595		
	1600	62519,5028		
	2400	84512,0671		
2	200	7790,7324	$y=36,35x+3263,037$	0,989794
	400	16811,2755		
	800	35307,0498		
	1600	1713,26917		
	2400	2308,22268		
3	200	8020,09079	$y=36,04x+2060,57$	0,997699
	400	16828,8231		
	800	57923,8655		
	1600	57923,8655		
	2400	89084,84		
4	200	7016,10535	$y=37,165x+2088,186$	0,99759
	400	18752,8372		
	800	32870,0543		
	1600	61848,879		
	2400	90648,699		

3.3. Lectura de blancos diarios.

La tabla 3.3 muestra las cuantificaciones de blancos, donde se determinaron concentraciones mínimas de DON (Ver Anexo H). Para evitar error en las lecturas, se realizó un promedio de todos los blancos, siendo éste general para el método. Este valor se utilizó para el cálculo de la diferencia con la lectura de cada muestra de harina de trigo (Anexo N).

Tabla 3.3: Concentración de DON presente en las muestras blanco.

Lecturas diarias de blancos	
Identificación	Concentración de DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)
Blanco 02/07	61,485
Blanco 05/07	67,180
Blanco 07/07	81,312
Blanco 09/07	79,134
Blanco 12/07	79,671
Blanco 28/06	72,280
Blanco 30/06	79,530
Promedio	74,370

3.4. Determinación de la concentración de DON presente en muestras de harina de trigo.

Después de seguir todos los procedimientos citados en la metodología, se pudieron determinar las concentraciones de DON de las muestras de harina de trigo. En los Anexos I – M se pueden observar los resultados más representativos del estudio.

3.4.1. Análisis exploratorio de datos.

Como se puede constatar en el Anexo N, se obtuvieron datos variados de la concentración de la micotoxina, los que oscilan dentro de los rangos determinados por la curva de calibración. Se tomaron en cuenta las siguientes variables para realizar el análisis de las muestras.

- Tipo de almacenamiento: A, B, C, D; siendo A de mejor calidad, y D menor calidad.
- Tipo de local: Supermercado, despensa y mercado.
- Molino: L1, L2; L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13.
- Marca: M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18.

Mediante el análisis de la Figura 3.1 se determinó que los datos obtenidos presentaron un comportamiento unimodal asimétrico a la derecha, y en las dos primeras categorías se observó una alta frecuencia de muestras, lo que representó el 75% del total de observaciones, siendo estas concentraciones de DON menores que $141,36 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra. Una de las muestras presentó valores atípicos mayores a $840,28 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra, la que superó el LMR y representó el 3% de las observaciones realizadas, esto implicó que el 97% de las muestras cumple con la norma establecida por la UE.

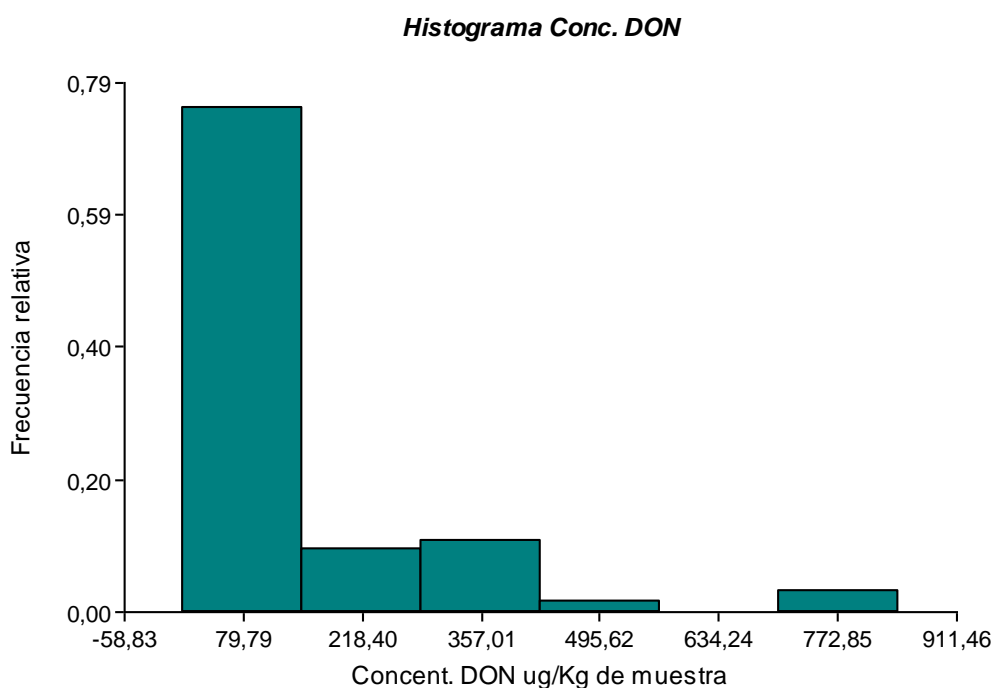


Figura 3.1: Histograma de la frecuencia relativa en la que las muestras presentan determinada concentración de DON.

Con los diagramas de barras se determinó que el foco de contaminación de la muestra DON 019 (valor atípico) posiblemente ocurrió en el molino. Los resultados del molino L4 fueron los más altos, ya sea tomando en cuenta el valor atípico (Figura 3.4 a), al igual que cuando no lo consideró (Figura 3.4 b), por lo tanto, se descartó la presencia de errores en el procedimiento estadístico, o eventos extraordinarios. Este molino

constantemente presentó mayor concentración de DON a comparación de los otros.

Se pudo determinar que si se eliminaba el valor atípico las concentraciones cambiaban en cada una de las categorías en los casos de tipo de almacenamiento y local (Figura 3.2 y 3.3). Se demostró, de manera global, que existió menor concentración de DON en harinas adquiridas en el supermercado, las que tenían un mejor tipo de almacenamiento (Tipo A); a diferencia de las provenientes del mercado que presentaron un almacenamiento inadecuado (Tipo D).

No se realizó un gráfico por marcas debido a que no existía el número suficiente de observaciones por cada subvariable.

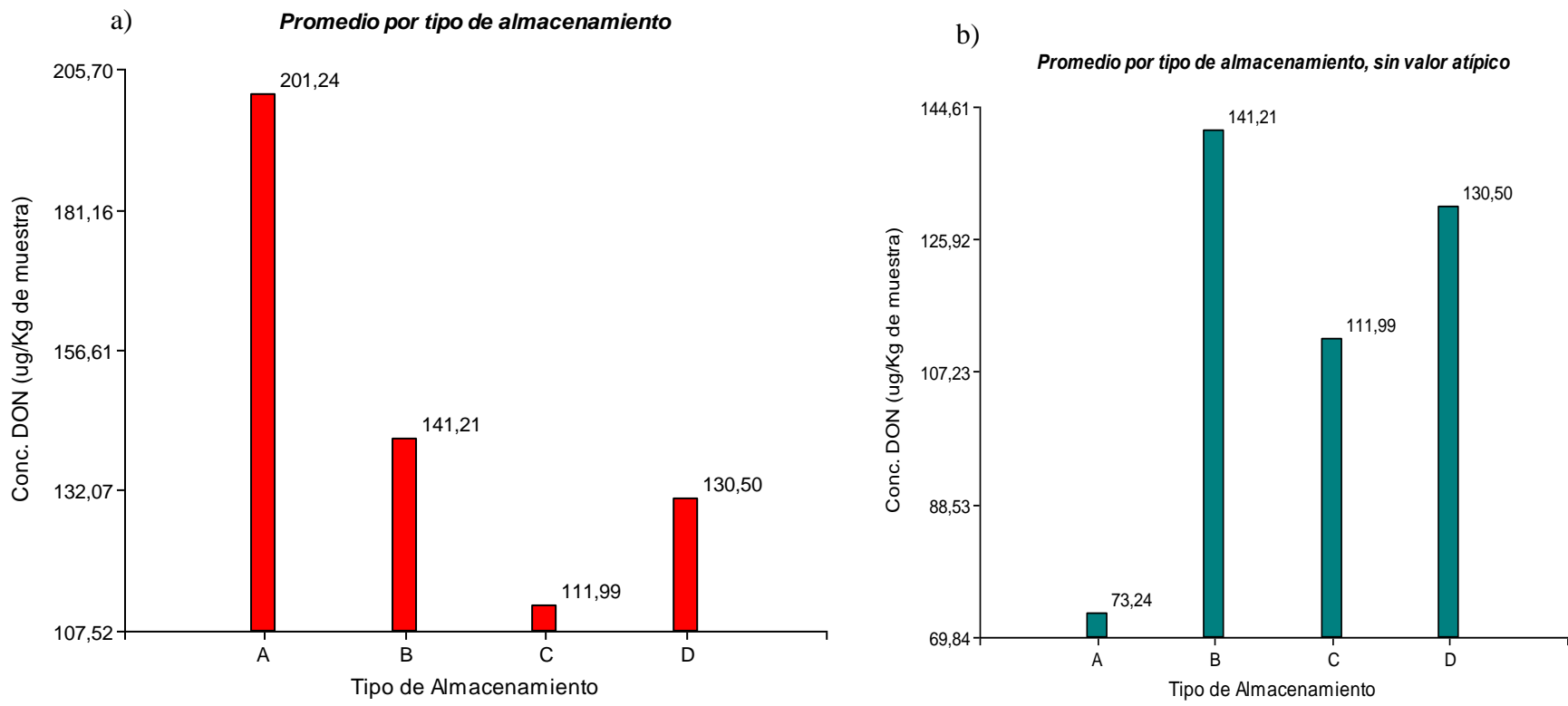


Figura 3.2: Diagrama de Barras en base al promedio obtenido en cada una de las categorías por tipo de almacenamiento a) tomando en cuenta los valores atípicos obtenidos b) sin valor atípico.

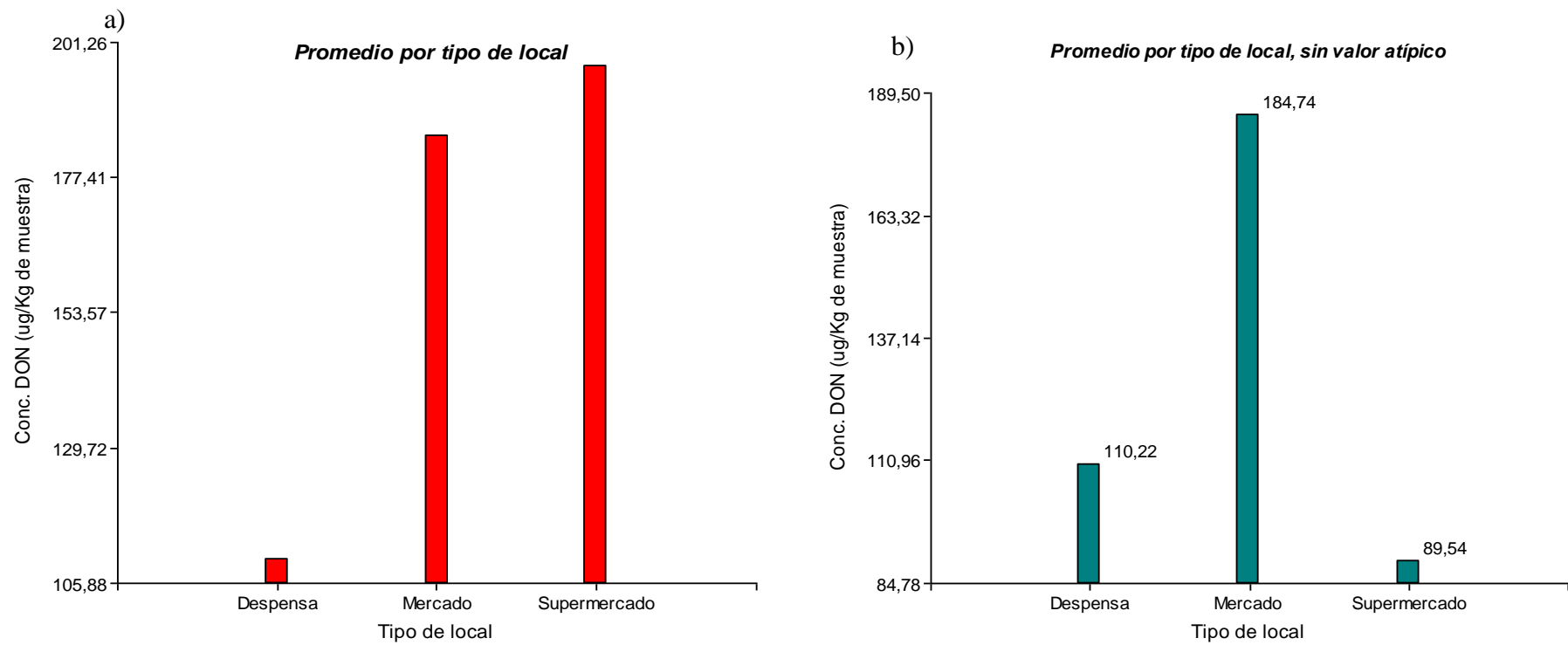


Figura 3.3: Diagrama de Barras en base al promedio obtenido en cada una de las categorías por tipo de local a) tomando en cuenta los valores atípicos obtenidos b) sin valor atípico.

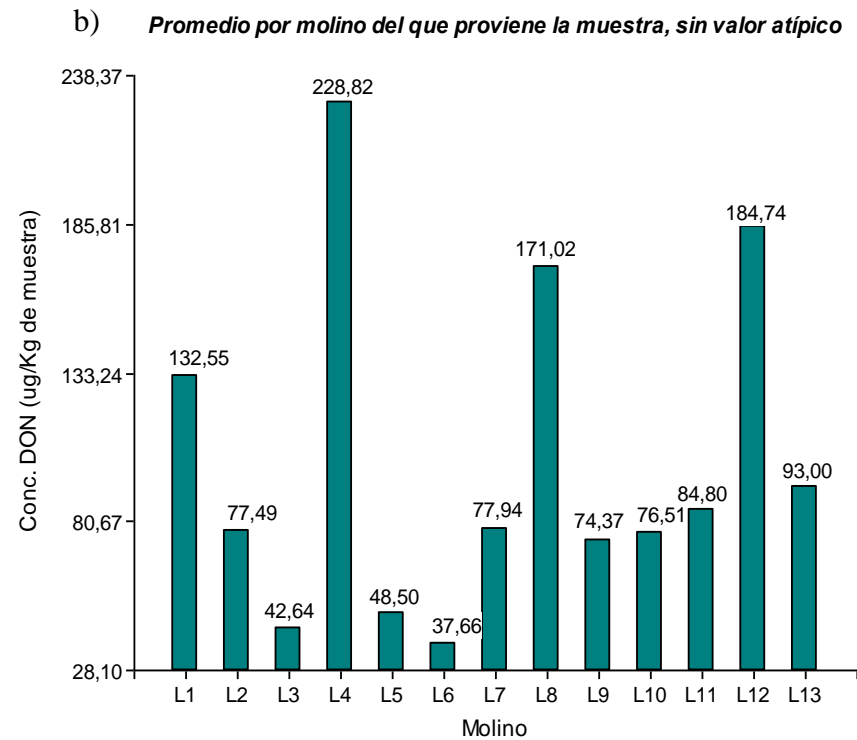
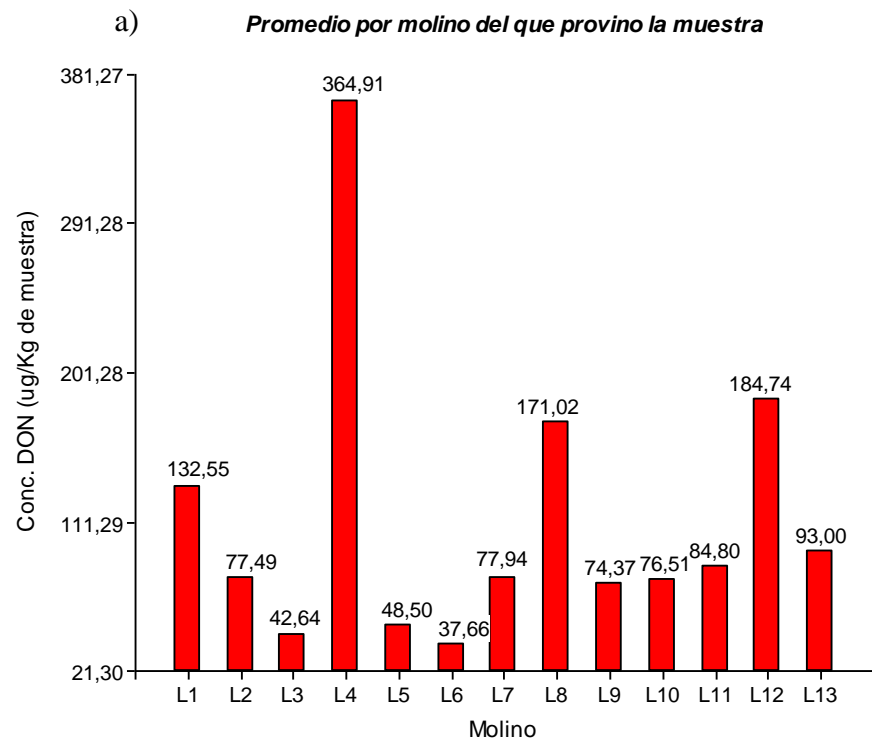


Figura 3.4: Diagrama de Barras en base al promedio obtenido de acuerdo al molino en el que se obtuvo la muestra a) tomando en cuenta los valores atípicos obtenidos b) sin valor atípico.

3.4.2. Análisis inferencial de datos.

Los datos obtenidos en la tabla 3.4 demostraron que se obtuvieron medidas de tendencia central con una amplia variabilidad en los datos, obteniendo un valor mínimo de 10,48 y máximo de 842,16 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra, mediana de 82,69 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra y media de 141,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra. La Desviación Estándar (DE) fue alta con un valor de 165,64, pues como se citó anteriormente los datos fueron muy dispersos.

Tabla 3.4: Resumen global de medidas de tendencia central y de dispersión.

Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín.	Máx.	Mediana
Concent. DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	65	141,5	165,64	20,54	117,06	10,48	842,16	82,69

También se realizó un Análisis de Covarianza (ANOVA) utilizando la prueba de hipótesis LSD FISHER con un nivel de significancia de 0.05.

Se tomaron en cuenta las siguientes hipótesis:

- ANOVA por tipo de local (Tabla 3.5).
 - $H_1 = \mu_{\text{Despensa}} = \mu_{\text{Mercado}} = \mu_{\text{Supermercado}}$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.
- ANOVA por tipo de almacenamiento (Tabla 3.6).
 - $H_1 = \mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.
- ANOVA por marca (Tabla 3.7).
 - $H_1 = \mu_{M_1} = \mu_{M_2} = \mu_{M_3} = \mu_{M_4} = \mu_{M_5} = \mu_{M_6} = \mu_{M_7} = \mu_{M_8} = \mu_{M_9} = \mu_{M_{10}} = \mu_{M_{11}} = \mu_{M_{12}} = \mu_{M_{13}} = \mu_{M_{14}} = \mu_{M_{15}} = \mu_{M_{16}} = \mu_{M_{17}} = \mu_{M_{18}}$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.
- ANOVA por molino (Tabla 3.8).
 - $H_1 = \mu_{L_1} = \mu_{L_2} = \mu_{L_3} = \mu_{L_4} = \mu_{L_5} = \mu_{L_6} = \mu_{L_7} = \mu_{L_8} = \mu_{L_9} = \mu_{L_{10}} = \mu_{L_{11}} = \mu_{L_{12}} = \mu_{L_{13}}$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.

Las tabla 3.5 y 3.7 presentan las ANOVAS por las variables tipo de local y de almacenamiento respectivamente, en las que se obtuvieron valores $p > 0.05$, lo que demostró que no presentan una relación significativa con respecto a la contaminación obtenida en las unidades experimentales y se aceptó la hipótesis H_1 en los dos casos.

En el caso de las variables por marca (Tabla 3.7) y molino (Tabla 3.8) se obtuvieron valores $p < 0.05$, demostrando una relación lineal significativa con la contaminación de la harina de trigo con DON, rechazándose la H_1 y aceptándose la H_0 , es decir, que al menos alguna de las marcas y los molinos es diferente y tiene una relación con la concentración de DON. Esto corroboró los resultados obtenidos en los gráficos de barras donde se estableció que la contaminación posiblemente fue ocasionada en los molinos de procesamiento.

Con la prueba de hipótesis LSD Fisher se pudo corroborar que la muestra de harina proveniente del molino L4 presentó la mayor contaminación, siendo mucho más alta que las que presentaron los otros molinos de procesamiento (Tabla 3.8). Con respecto a las marcas se pudo identificar tres grupos: A, B y C (Tabla 3.7); siendo A los de mejor calidad y C de mala calidad con altas concentraciones de Deoxinivalenol. Es importante denotar que M17 es la única marca que se encontró en el grupo C y pertenece al molino L4.

Tabla 3.5: ANOVA por tipo de local.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON (µg.Kg ⁻¹ de muestra)	66	0,06	0,06	115,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Tipo de local	102718,66	2	52359,33	1,93	0,1543

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=107,81762

Tipo de local	Medias	N	E.E.	Grupos
Dispensa	110,22	40	25,82	A
Mercado	184,74	11	49,23	A
Supermercado	196,92	14	43,64	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla 3.6: ANOVA por tipo de almacenamiento.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON (µg.Kg ⁻¹ de muestra)	66	0,03	0,00	117,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

FV	SC	GI	CM	F	p-valor
Tipo de almacenamiento	57779,18	3	19259,73	1,93	0,5605

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=123,02756

Tipo de almacenamiento	Medias	N	E.E.	Grupos
C	111,99	13	46,28	A
D	130,50	30	30,46	A
B	141,21	10	52,76	A
A	201,24	12	48,16	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla 3.7: ANOVA por marca.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON (µg.Kg ⁻¹ de muestra)	66	0,76	0,67	67,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Marca	1326534,92	17	78031,47	8,54	<0,0001

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=155,06189

Marca	Medias	N	E.E.	Grupos
M9	37,66	2	67,59	A
M4	42,64	5	42,74	A
M6	48,50	4	47,79	A
M2	51,68	2	67,59	A
M7	64,93	4	47,79	A
M13	70,64	2	67,59	A
M11	72,63	4	47,79	A
M16	74,37	2	67,59	A B
M15	76,51	2	67,59	A B
M10	77,95	6	39,02	A B
M12	84,80	2	67,59	A B
M3	87,22	2	67,59	A B
M18	93,00	2	67,59	A B
M1	171,02	2	67,59	A B
M14	184,74	11	28,82	A B
M5	228,82	7	36,13	B
M8	240,61	4	47,79	B
M17	841,22	2	67,59	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla 3.8: ANOVA por molino.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON (µg.Kg ⁻¹ de muestra)	66	0,38	0,24	102,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Molino	664750,30	12	55395,86	2,64	0,0078

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=203,12651

Marca	Medias	N	E.E.	Grupos
L6	37,66	2	102,43	A
L3	42,64	5	64,78	A
L5	48,50	4	72,43	A
L10	73,58	4	72,43	A
L9	74,37	2	102,43	A
L2	77,49	6	59,14	A
L7	77,95	6	59,14	A
L11	84,80	2	102,43	A
L13	93,00	2	102,43	A
L1	132,55	10	45,81	A
L8	172,02	2	102,43	A B
L12	184,74	11	43,68	A B
L4	364,91	9	48,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Se determinó el Intervalo de Confianza (IDC) para la media. Como se puede observar en la Tabla 3.9 el IDC global demuestra con un 95% de certeza, que las unidades experimentales poseen concentraciones entre 100,46 y 182,55 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra. Es importante recalcar que para determinar el Límite Inferior (LI) y el Límite Superior (LS) se tomó en cuenta al valor atípico (Ver Tabla 3.9 a), y justamente por ser un valor fuera de lo común en el estudio se determinó el IDC sin el valor atípico (Ver Tabla 3.9 b), disminuyendo el rango determinado anteriormente a uno entre 91,67 (LI) y 146,91 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra (LS) con un 95% de certeza. A partir de estos resultados se pudo corroborar que en el Ecuador se puede aplicar una normativa con los mismos criterios utilizados por la Unión Europea.

Tabla 3.9: Intervalos de Confianza global del estudio

a) Tomando en cuenta el valor atípico

Variable	Parámetro	Estimación	EE	n	LI (95%)	LS (95%)
<i>Concent. DON</i> ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	<i>Media</i>	141,50	20,54	65	100,46	182,55

b) Sin tomar en cuenta el valor atípico

Variable	Parámetro	Estimación	EE	n	LI (95%)	LS (95%)
<i>Concent. DON</i> ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	<i>Media</i>	119,29	13,82	65	91,67	146,91

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Estandarización de método.

Una de las etapas de la vigilancia de la inocuidad alimentaria es la obtención de datos acerca de los niveles de determinadas sustancias que pueden estar presentes en los alimentos (Euskadi, 1996). Es por esto que se vio la necesidad de realizar el presente estudio, con la finalidad de establecer una línea base sobre la contaminación de DON en harina de trigo en el Ecuador.

La obtención de datos y valores es el resultado de un proceso que comenzó con la selección y validación del método analítico. Este tuvo varias modificaciones, entre ellos la cantidad de muestra que se utilizó fue de 25 g y el volumen de solvente extractante fue de 200 mL, pues en el instructivo de las Columnas de Inmunoafinidad (IAC) se propone el uso de estas cantidades, con la finalidad de trabajar con una muestra representativa (Romer Labs Incorporation, 2009).

La homogenización entre matriz y solvente debe ser adecuada y de corta duración, es por esto que R-Biopharm (2010) sugiere en el instructivo de las IAC realizar una homogenización con licuadora, método que fue efectivo para la extracción, pues disminuyó el tiempo de procesamiento de la muestra en 27 min y presentó buenos resultados.

Del filtrado se tomaron 2mL para que la cantidad de muestra que entra en contacto con la IAC sea mayor y, se dejó pasar el extracto por la IAC a una velocidad de 1gota/6segundos para que el DON tenga tiempo de exponerse a los anticuerpos monoclonales y ser atrapado por los mismos (VICAM, 2010).

Se recuperó el DON de la IAC con 4mL de metanol para asegurar la elución completa del DON retenido por la columna (Samaniego, 2011) (R - Bipharm Rhone LTD., 2010). Finalmente se llevó a sequedad con atmósfera de nitrógeno y en baño maría, con el objetivo de formar un ambiente inerte y evitar que el compuesto se oxide como cita García (1989) en su manual de métodos para el análisis de micotoxinas en grano.

La cuantificación con HPLC se realizó utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en la metodología (Knass, 2011), con la finalidad de mejorar la resolución del pico obtenido en los cromatogramas. Para obtener un mejor tiempo de retención y forma de pico se tuvo que determinar una composición adecuada de fase móvil con los diversos solventes orgánicos, de modo que la afinidad del compuesto sea la apropiada (Jurado & Alcázar, 2010).

Realizar una investigación sobre análisis de contaminantes en alimentos supone la determinación de los mismos en cantidades muy pequeñas y matrices muy complejas; requiriendo la aplicación de métodos analíticos muy sensibles. Por lo anteriormente citado, se analizó si el método analítico seleccionado era robusto por medio de las fortificaciones de matriz en concentraciones altas y bajas (Samaniego, 2011). Escobar (2004) en su estudio "Determinación de Deoxinivalenol en muestras de trigo por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia" demostró la necesidad de realizar fortificaciones en dos puntos de la curva para determinar el porcentaje de recuperación. En este estudio se observó que el porcentaje de recuperación es mayor con el uso de IAC, a diferencia de columnas preparadas en laboratorio que presentan una recuperación menor al 80%.

Se determinó que la metodología de extracción fue la adecuada obteniéndose un porcentaje de recuperación del método de 101,88%. Se consideró que es algo común que este valor haya sobrepasado el 100%,

debido a que el certificado de funcionamiento de las IAC demostraron un 113,90% de recuperación (Romer Labs Incorporation, 2009). Según Samaniego (2011), se puede considerar que las Columnas de Inmunofinidad poseen una pequeña cantidad de DON para mantener activos a los anticuerpos monoclonales, explicándose de esta manera la cantidad extra de DON que se recupera en las muestras fortificadas.

Todas las extracciones de matriz se realizaron por duplicado para comprobar que los dos valores no difieran en más de un 20% entre sí, caso contrario pudo ser probable que la muestra no estuvo bien homogeneizada o no se siguió correctamente el proceso de extracción y cuantificación (Solá, 2011), como fue el caso de DON 004, DON 005 y DON 023 en las que se realizó una tercera repetición para comprobar la concentración de contaminante.

4.2. Curvas de Calibración.

Para la cuantificación por medio de HPLC se preparó una serie de soluciones patrón, de modo que el rango de concentración fue lo suficientemente amplio (200 – 2400 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra) para que abarque los valores que contenían las muestras. En un estudio sobre Deoxinivalenol se realizó una curva entre 100 - 2000 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra para cuantificar muestras de harina de trigo (FAO, 1996). También se tomó en cuenta el LMR establecido por la UE de 750 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra, el mismo que se encuentra en un punto medio de la curva de calibración. A partir del LMR se consideraron valores mayores y menores en una misma proporción, por ello se realizó una curva de calibración dentro de este rango (Agrocalidad, 2010).

Se validó la curva de calibración con cuatro repeticiones en diferentes días, para constatar que los estándares no se diluían o concentraban con el tiempo (Gualotuña, 2011). Con las cuatro curvas se

determinó que los estándares mantuvieron su concentración y linealidad, obteniéndose un R^2 mayor a 0,98.

4.3. Lectura de blancos diarios.

Todos los días se realizó una lectura de un blanco con la finalidad de realizar un control de calidad interno, como sugiere Euskadi (1996) en su manual de selección y validación de métodos analíticos. A partir de estas lecturas se pudo confirmar que no existió contaminación cruzada o interferencia exógena, confirmando estos resultados con el estudio “Método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de carbamazepina en plasma humano” donde no se observaron interferencias exógenas al realizar cuantificaciones de blancos (Jiménez, Calero, & Padrón, 2007).

4.4. Determinación de la concentración de DON presente en las muestras de harina de trigo.

Con respecto al monitoreo realizado en el Laboratorio de Plaguicidas de Agrocalidad, de un total de 32 análisis de harina de trigo realizados para Deoxinivalenol, el 100% fueron positivas en un amplio rango de concentración que osciló entre 10,48 y 842,16 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra (tabla 3.4), solo el valor de DON 019 fue superior al máximo de 750 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra, permitido por la reglamentación sanitaria de la Unión Europea (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

La incidencia fue igual a la obtenida en un estudio realizado en Brasil que demostró una contaminación de 17/17 (100%) de muestras de harina de trigo (Soriano, 2007). Con estos resultados se puede evidenciar una tendencia a nivel continental, donde países como Argentina, Chile y Canadá demuestran un patrón de incidencia en América mayor al 90%; a diferencia de Europa, donde Austria, Finlandia, Francia y Holanda no

superan el 55% (Soriano, 2007). Demostrando que dentro de la cadena de producción y comercialización del trigo, en América, no existe un tratamiento adecuado provocando una contaminación del producto.

En los cromatogramas de cuantificación de muestras, la forma y resolución del pico varió a medida que avanzaron los días. En un inicio se observaron picos con forma Gaussiana y al finalizar el estudio se obtuvieron picos con hombros hacia la derecha, esto pudo ser ocasionado por dos motivos, que la columna se haya ensuciado con algún componente de la matriz o que el DON en algún momento de la extracción comenzó a descomponerse (Biking, 2006). Por esta razón, los cromatogramas con hombros se cuantificaron incluyendo las deformaciones del pico.

En el análisis estadístico, se demostró que la contaminación se produjo en los molinos debido a un almacenamiento inadecuado o una pobre selección y limpieza del grano antes de llevarlo a los silos, dato corroborado en el estudio “Distribución de Deoxinivalenol en los molinos de trigo suave” (Seitz, Yamazaki, Clements, Mohr, & Andrews, 1985), donde se aprecia que la mayor contaminación de DON ocurre antes de ingresar a los silos de las empresas molineras. Como se aprecia en la Figura 3.8, la muestra de harina proveniente del molino L4 presenta los valores más altos de concentración a pesar de no tomar en cuenta el valor atípico que es el más alto de todas las observaciones. De igual manera, se relacionó la concentración de DON con el tipo de local en el que se compró la muestra, sin tomar en cuenta el valor atípico, se observaron menores concentraciones de DON en harinas adquiridas en un supermercado que en aquellas compradas en el mercado (Figura 3.7). Esta diferencia puede deberse a que el grano era molido directamente por el dueño del negocio, sin realizar el control de calidad requerido al procesar los granos de trigo (Soriano, 2007) a diferencia de las harinas de marca que tienen un mejor control de calidad.

En el Análisis de Varianza se determinó que las variables tipo de local y almacenamiento no afectan a la variable dependiente concentración de DON, mientras que ésta si difiere en las variables marca y molino, demostrando que la contaminación que presentó la harina de trigo depende de la manipulación a la que se le sometió antes del empaquetamiento y no después del mismo.

Al realizar la prueba de hipótesis de Fisher también se observó que en las variables marca y molino del que proviene la muestra se forman varios grupos (Ver Tabla 3.7 y 3.9), en el caso de la marca se obtuvieron cuatro: A, AB, B y C. Siendo A las muestras con menor concentración y C las de mayor concentración. Es importante recalcar que la gran mayoría se congregan en los grupos A y AB, siendo C el que representa al valor de la muestra atípica. En el caso de los molinos, solo se pueden observar tres grupos A, AB y B, siendo B el molino del que proviene la harina que representa el valor atípico.

Finalmente, se determinó que las muestras presentaron concentraciones en un rango de 100,46 – 182,55 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra con un 95% de certeza. Según la reglamentación sanitaria normada por la Unión Europea, la harina de trigo que la población de Sangolquí está consumiendo es de buena calidad y no afectará a su salud, pues no superó los 750 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. La recopilación bibliográfica determinó que 37 países disponen de reglamentación para DON, de los cuales 19 trabajan con la normativa de la Unión Europea, es decir, un máximo de 750 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ muestra.
2. Se estandarizó el método para la cuantificación de Deoxinivalenol en harina de trigo con la ayuda del personal de Agrocalidad e INIAP. Este protocolo será utilizado en futuras inspecciones que realizará Agrocalidad como autoridad nacional fitozoosanitaria.
3. No fue posible obtener información por parte de los molinos y bodegas expendedoras de la harina de trigo, por considerar la información solicitada como confidencial.
4. De un total de 32 muestras sometidas al proceso de cuantificación de DON, el 100% fue positiva, pero tan solo el 3% superó el LMR permitido por la legislación sanitaria de la Unión Europea.
5. Se constató que la micotoxina DON no cuenta con un valor permitido en la legislación ecuatoriana, los resultados de esta vigilancia reflejaron la necesidad de incorporar un reglamento que norme y regule la concentración de esta micotoxina en harina de trigo. También se determinó que la harina de trigo que consume la población de Sangolquí es de buena calidad, y no afecta a la salud de sus consumidores según la normativa sanitaria de la Unión Europea.

6. Se determinó que en el Ecuador se puede realizar una reglamentación en base a la legislación Europea debido a que el 97% de las muestras analizadas no sobrepasaron el LMR establecido por UE.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Adecuar los laboratorios de Agrocalidad con un área exclusiva para la cuantificación de micotoxinas, para evitar la contaminación del material con otros analitos.

Disponer de materiales y reactivos adecuados para el análisis. Adquirir estándares de micotoxinas en forma cristalina para el uso diario y utilizar los estándares en solución solo para realizar un seguimiento de la concentración de aquellos preparados por el operador.

Adquirir un evaporador de muestras adecuado, que tenga baño maría para que la distribución de calor sea homogénea y dispensador de nitrógeno con agujas largas.

Adquirir Columnas de Inmunoafinidad de marca Biopharm, ya que se comprobó que retienen el 100%, evitando la incertidumbre en los blancos.

Filtrar los solventes para la fase móvil y desgasificarlos en ultrasonido por aproximadamente 30 min, no llenar la botella más de 600 mL, se comprobó que a mayor volumen se requiere mayor tiempo de ultrasonido y temperatura.

Adquirir un estándar en solución que tenga como solvente metanol o acetonitrilo. Evitar tener los estándares en etil acetato debido a la posible formación de dos fases inmiscibles al momento de trabajar con el extractante, que en el caso específico de DON es agua.

Evitar la formación de burbujas en el equipo HPLC al momento de realizar las lecturas. Revisar la presión del equipo constantemente.

Realizar una segunda fase de esta investigación a nivel nacional para obtener datos más relevantes con el fin de desarrollar una futura legislación.

Realizar un seguimiento al molino L4 que fue el que presentó mayor concentración de DON.

Implementar una normativa por parte de la autoridad competente para la regulación de DON en harina de trigo y otras micotoxinas en diversas matrices.

Desarrollar un sistema de capacitación a productores y vendedores para evitar la contaminación con Micotoxinas en los alimentos. Debido al desconocimiento de la existencia de las mismas, no se realiza un tratamiento adecuado de los productos al ver que existen hongos en su superficie.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Agrocalidad. (2010). Procedimiento específico de ensayo para determinación de Deoxinivalenol (DON) en Trigo. Quito.

AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. Dr. William Horwitz.

Bicking, M. (2006). Integration Errors in Chromatographic Analysis, Part I: Peaks of Approximately Equal Size. Recuperado el 26 de Septiembre de 2011, de LCGC: <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/author/authorInfo.jsp?id=32060>.

Caballero, A. (2008). Temas de Higiene de los alimentos. La Habana: Ciencias Médicas.

Cabello, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Editorial Médica Panamericana.

Carrillo, L. (2003). 6. Micotoxinas. Recuperado el 27 de Marzo de 2011, de Microbiología Agrícola: www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf

Casto, E., & Ahumada, F. (1993). Micotoxinas. Rol e Importancia en nutrición acuícola. Depósito de Documentos de la FAO .

DeVries, J., Trucksess, M., & Jackson, L. (2002). Mycotoxins and food safety. Springer.

Diario Hoy. (17 de Octubre de 2007). Producción de Trigo no cubre la demanda local. Recuperado el 15 de Marzo de 2011, de <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/produccion-de-trigo-no-cubre-la-demanda-local-279914-279914.html>

Els autors. (2005). Extracción con fluidos supercríticos. Recuperado el 28 de Abril de 2011, de <http://www.edicionsupc.es/ftppublic/pdfmostra/CT00803M.pdf>

Escobar, A., & Fragas, I. (2004). Determinación de Deoxinivalenol (vomitoxina) en muestras de trigo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Revista Salud Animal .

Euskadi. (1996). Selección y Validación de los métodos analíticos. Recuperado el 26 de Septiembre de 2011, de http://www.euskadi.net/r33-2709/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9519.pdf

FAO. (1996). Manuales para el control de calidad de los alimentos. La garantía de la calidad en el laboratorio químico de control de los alimentos. Food & Agriculture Org.

FAO. (2010). Perspectiva a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Recuperado el 16 de Abril de 2011, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5143s/y5143s00.pdf>

FAO. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Recuperado el 21 de Mayo de 2011, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499s/y5499s00.pdf>

FAO. (2001). Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food: Prepared By He Fifty-Sixth Meeting Of The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Food & Agriculture Org.

García, G. (1989). Manual de métodos para el análisis de micotoxinas en granos. Editorial UNAM.

Gualotuña, J. (20 de Junio de 2011). Cuantificación de DON. (A. B. Guerrero, Entrevistador)

Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). Informe Monitoreo de Micotoxinas en Alimentos. Recuperado el 27 de Septiembre de 2011, de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/06/Informe%20Micotoxinas%202010%20vf.pdf

Instituto de Salud Pública de Chile. (2009). Micotoxinas en Alimentos de consumo directo en Chile. Recuperado el 15 de Julio de 2011, de

www.ispch.cl%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fdocumento_tecnico%2F2010%2F08%2FMICOTOXINAS%2520EN%2520ALIMENTOS%2520DE%2520CONSUMO%2520DIRECTO%2520EN%2520CHILE%25202008-2009.pdf

Iturra, F. (20 de Junio de 2011). Cuantificación de DON. (A. Guerrero, Entrevistador)

Jiménez, N., Calero, J., & Padrón, A. (2007). Método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de carbamazepina en plasma humano . Cubana Farm .

Jurado, J., & Alcázar, A. (2010). Química Analítica Avanzada. Recuperado el 2 de Mayo de 2011, de <http://personal.us.es/jmjurado/docs/HPLC20092010.pdf>

Knass, P. (7 de Junio de 2011). Extracción de DON con IAC DONStar. (A. B. Guerrero, Entrevistador)

Know Mycotoxins. (2008). Regulations. Recuperado el 06 de abril de 2010, de www.knowmycotoxins.com

Kotal, F., & Radová, Z. (2001). A simple method for determination of Deoxynivalenol in cereals and flours. Czech J. Food Science .

Leslie, J., & Visconti, A. (2008). Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade. CABI.

Medina, J. (2005). Diagnóstico e interpretación de análisis de micotoxinas.

Moreno, M., Martínez, A., & Raybaudi, R. (2000). Determinación de Deoxinivalenol (DON) en trigo, cebada y maíz y su relación con los niveles de mohos totales, *Fusarium* spp., porcentaje de colonización y actividad de agua. Archivos latinoamericanos de nutrición .

Oancea, S., & Stoia, M. (2008). Mycotoxins: a review of toxicology, analytical methods and health risks. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology.

OMS. (2002). Estrategia Global de la OMS para la inocuidad de los alimentos. Alimentos más sanos para una salud mejor. Inocuidad de los alimentos .

Pozas, R., & Abad, J. (2010). Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros. Recuperado el 22 de Junio de 2011, de http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/10058/1/memoria_68538-68540.pdf

R - Bipharm Rhone LTD. (2010). DONPREP. Immunoaffinity column for detection of Deoxynivalenol using HPLC. Escocia.

Romer Labs Incorporation. (2009). Rapid, Accurate Quantitation of Deoxynivalenol (DON) in Grains by HPLC-UV using MycoSep®225 or MycoSep®227 Trich+ Columns.

Samaniego, I. (10 de Junio de 2011). Detección de micotoxinas. (A. B. Guerrero, Entrevistador)

Schaafsma, A., Nicol, R., Savard, M., Sinha, R., Reid, L., & Rottinghaus, G. (1998). Analysis of Fusarium toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathologia* .

Seitz, L., Yamazaki, T., Clements, R., Mohr, H., & Andrews, L. (1985). Distribution of Deoxynivalenol in Soft Wheat Mill Streams. *Cereal Chem* .

Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. Cengage Learning Editores.

Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., & Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary toxicology* .

Sogorb, M., & Vilanova, E. (2004). Técnicas analíticas de contaminantes químicos aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. Ediciones Díaz de Santos.

Solá, I. (18 de Febrero de 2011). Extracción de DON. (A. B. Guerrero, Entrevistador)

Soriano, J. (2007). Micotoxinas en Alimentos. Ediciones Díaz de Santos.

Túnez, I., & Muñoz, M. (2000). Cromatografía en capa fina de lípidos. Recuperado el 19 de Julio de 2011, de <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/12%20CROMATOGRAF%C3%8DA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20L%C3%8DPIDOS.pdf>

Universidad San Carlos de Guatemala. (2010). Cromatografía en columna. Recuperado el 27 de Agosto de 2011, de <http://es.scribd.com/doc/36020380/Cromatografia-de-Exclusion-Molecular>

Verde, J., Escamilla, M., Reyes, A., & Malpica, F. (1999). Cromatografía líquida de alta resolución. Recuperado el 29 de Julio de 2011, de http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/quimica/ESCAMILLA_HURTADO_MA_DE_LOURDES_Manual_de_practicas_de_quimi.pdf

VICAM. (2010). DONtest HPLC. California.

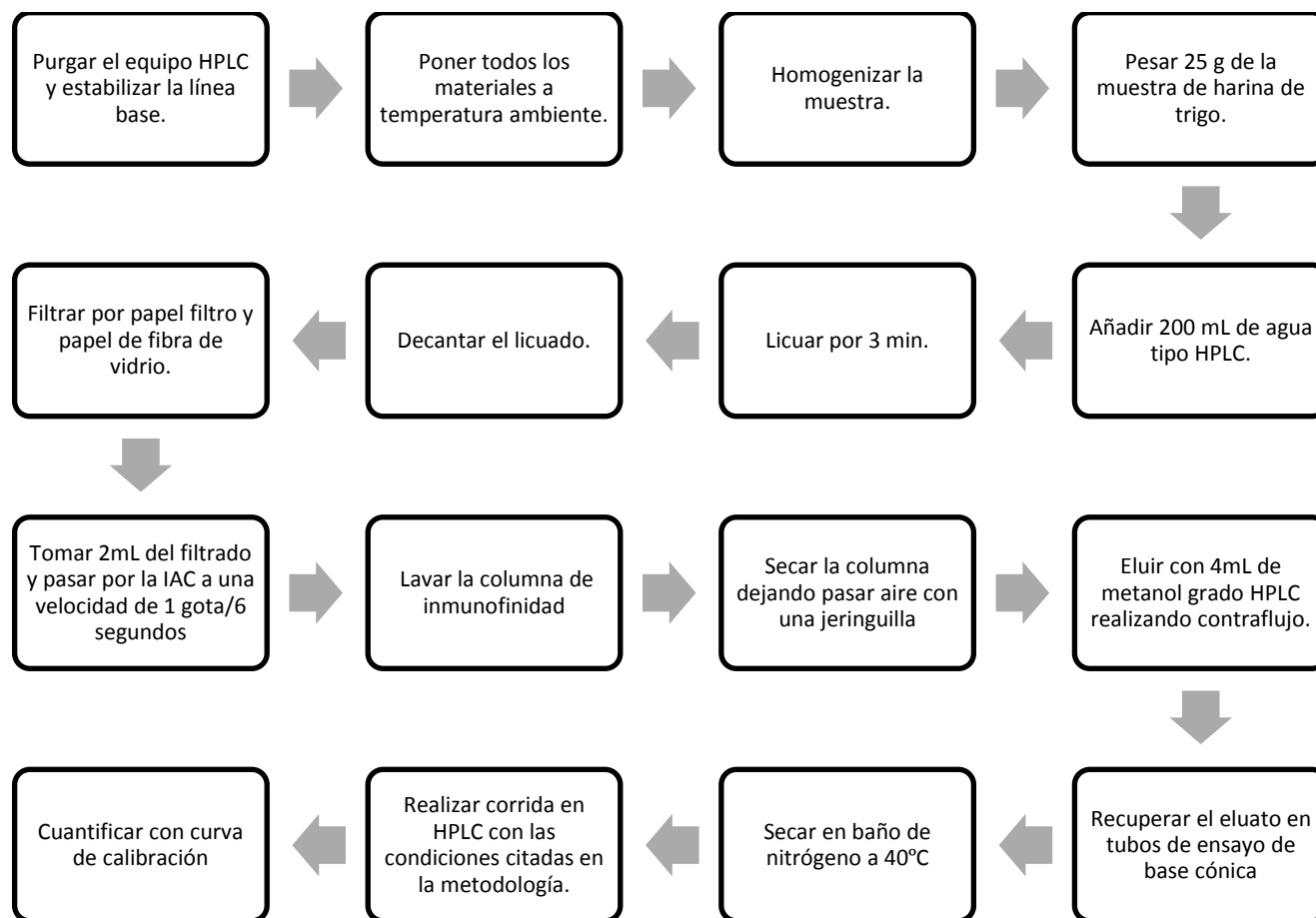
Wilches, A., & Rojas, L. (2000). Detección y cuantificación de Deoxinivalenol en productos de consumo infantil comercializados en Pamplona, norte de Santander. Recuperado el 23 de Agosto de 2011, de <http://www.acta.org.co/Pdf/Revista/Revista%2016/Segundo/Segundo.pdf>

ANEXOS

ANEXO A: Mapa de ubicación de cada una de las muestras recolectadas en Sangolquí.



ANEXO B: Resumen del método para cuantificación de DON.



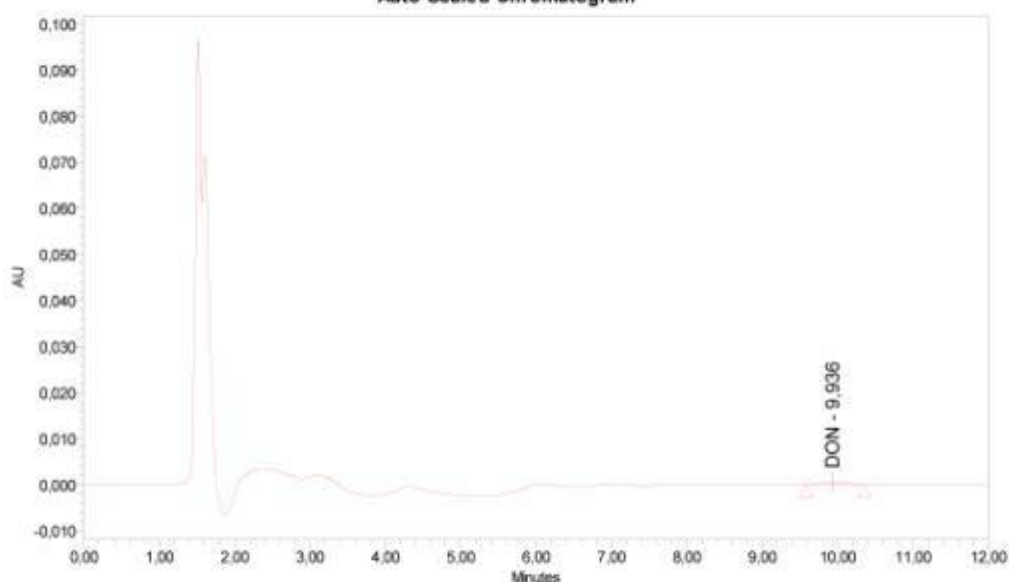
ANEXO C: Cromatograma de matriz blanco utilizada para la determinación del porcentaje de recuperación.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	Blanco matriz	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	15062011
Vial:	6	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	15/06/2011 14:16:25 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 10:24:13 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.936	12183	496	245.334	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 10:25:23 America/Guayaquil

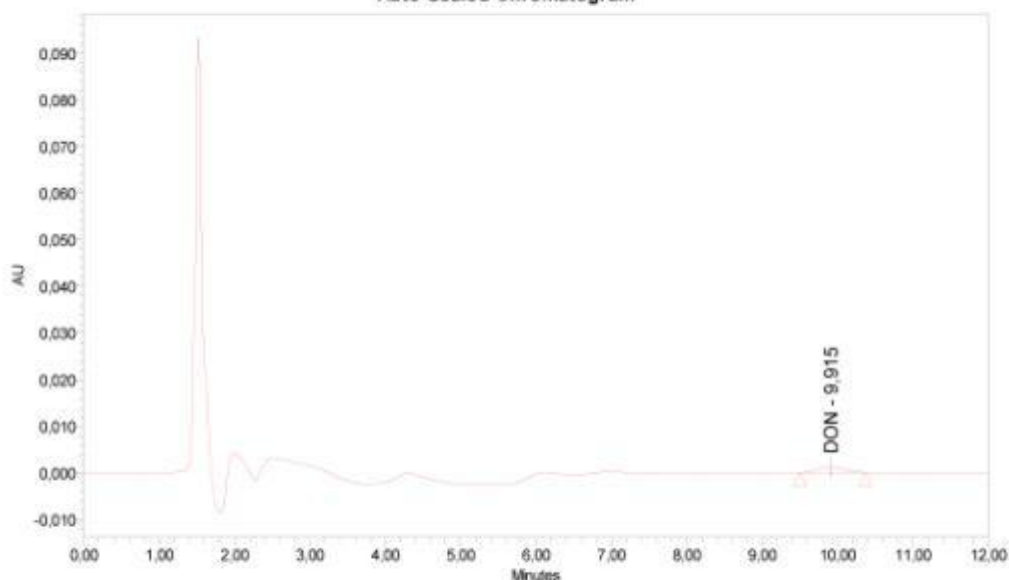
ANEXO D: Cromatograma de matriz fortificada con 400 µg. Kg⁻¹ de muestra.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	Matriz fortificada 400 R1	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	15062011
Vial:	7	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	15/06/2011 14:29:13 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 10:27:45 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.915	27208	1066	658.591	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 10:31:12 America/Guayaquil

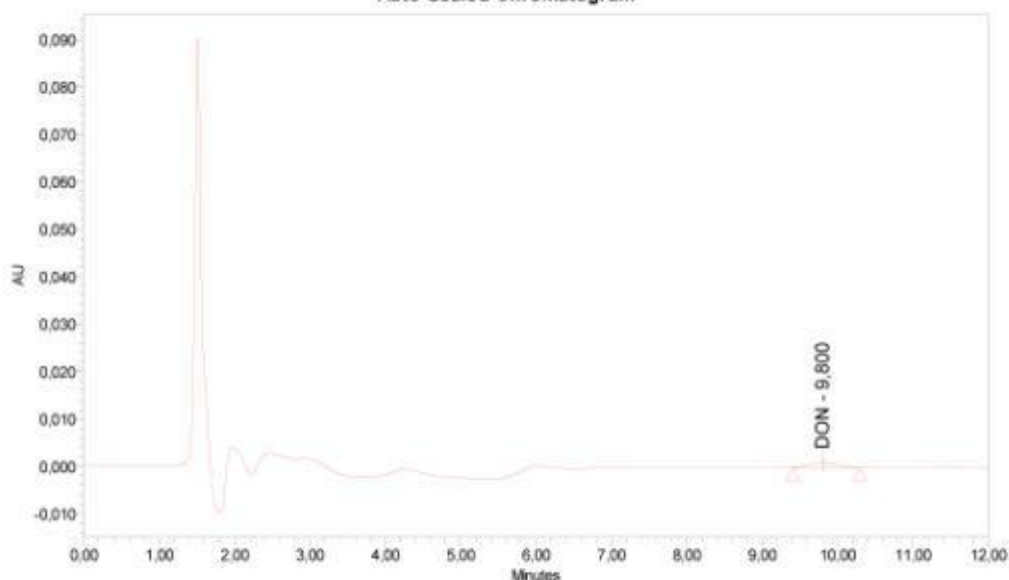
ANEXO E: Cromatograma de matriz fortificada con 400 µg. Kg⁻¹ de muestra. Repetición 2.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	Matriz fortificada 400 R2 13/06	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	16062011
Vial:	8	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	16/06/2011 11:20:46 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 10:28:23 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.800	26821	1010	647.950	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 10:31:44 America/Guayaquil

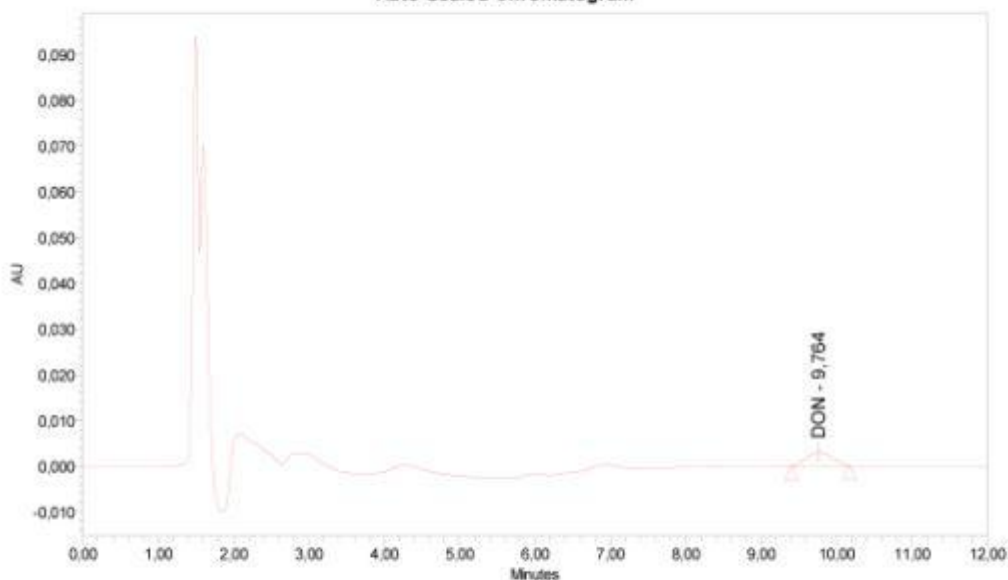
ANEXO F: Cromatograma de matriz fortificada con 1600 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de muestra.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	Matriz fortificada 1600 13/06	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	16062011
Vial:	9	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	16/06/2011 11:33:32 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 10:29:30 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.764	71330	2924	1872,138	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 10:32:37 America/Guayaquil

ANEXO G: Curva de Calibración al 16/06/2011.

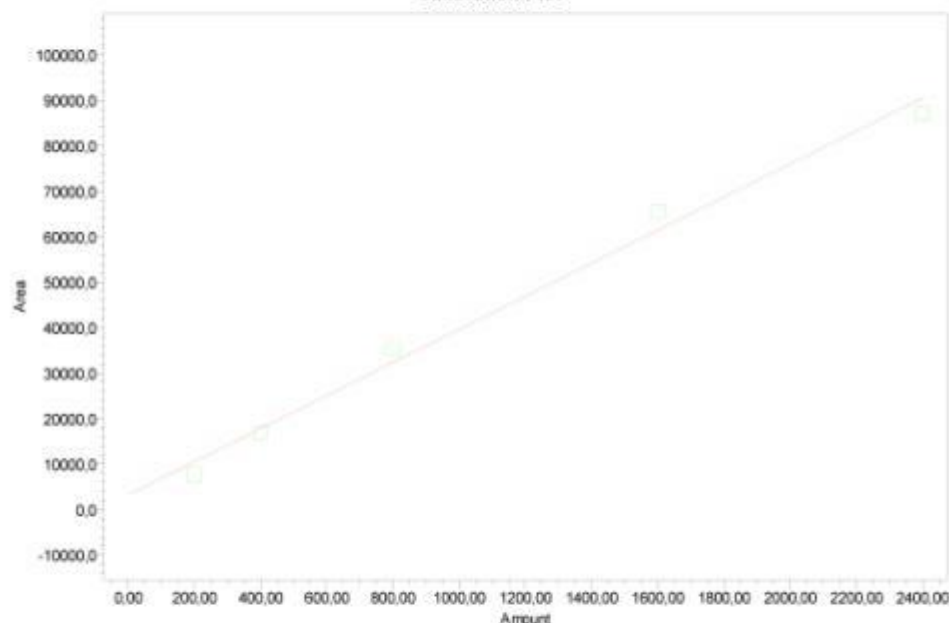


Curva de Calibración DON

Processing Method:	Curva DON final	Project Name:	DEOXINVALENOL
Processing Method ID:	2005	System:	SISTEMA UV VIS
Channel:	W2489 ChA	Calibration ID:	2012
Proc. Chnl. Descr.:	****		
Date Calibrated:	30/06/2011 11:12:26 ECT		

A 3,263037e+003
 B 3,635811e+001
 C 0,000000e+000
 D 0,000000e+000
 R² 0,989794

Calibration Plot



Peak: DON

Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Ignore
1	DON	200,000000	7790,732403	124,530565	-37,735	No
2	DON	400,000000	16811,275525	372,633223	-8,842	No
3	DON	800,000000	35307,049840	881,344362	10,168	No
4	DON	1600,000000	65554,261373	1713,269167	7,079	No
5	DON	2400,000000	87185,645324	2308,222684	-3,624	No

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Curva de Calibración DON
 Report Method ID 2690
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 13:47:45 America/Guayaquil

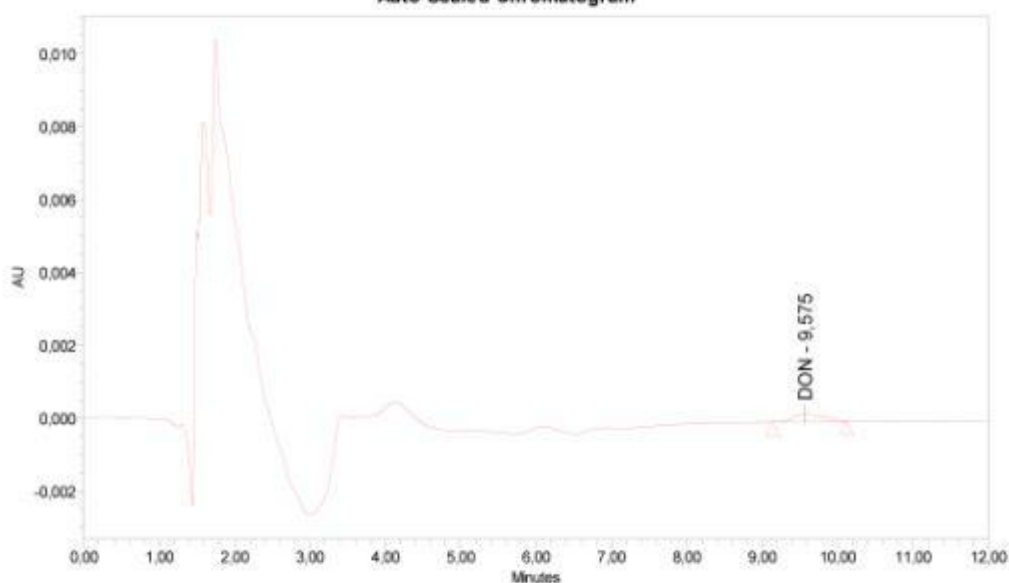
ANEXO H: Cuantificación de blanco.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	Blanco 02/07	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	02062011
Vial:	3	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50,00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	02/07/2011 13:21:32 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 10:59:21 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9,575	5499	201	61,485	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos

Report Method: Report method DON

Report Method ID 2258

Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL

Date Printed:

13/07/2011

12:05:01 America/Guayaquil

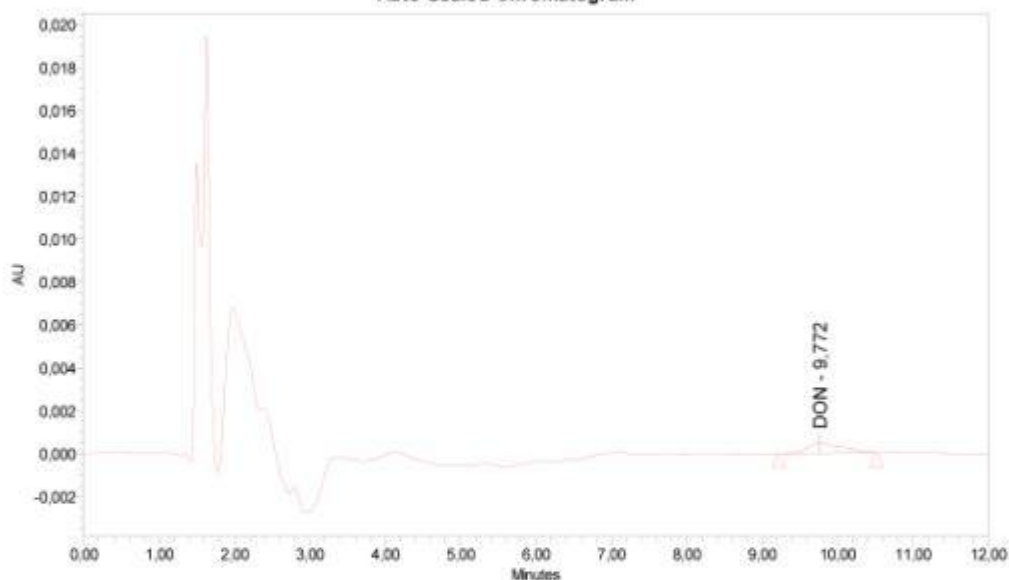
ANEXO I: Cromatograma muestra 023.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	DON23R-2	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	12072011
Vial:	5	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	12/07/2011 13:32:38 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 11:42:47 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.772	15247	496	329.601	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos

Project Name: DEOXINIVALENOL

Report Method: Report method DON

Date Printed:

Report Method ID 2258

13/07/2011

Page: 1 of 1

12:27:15 America/Guayaquil

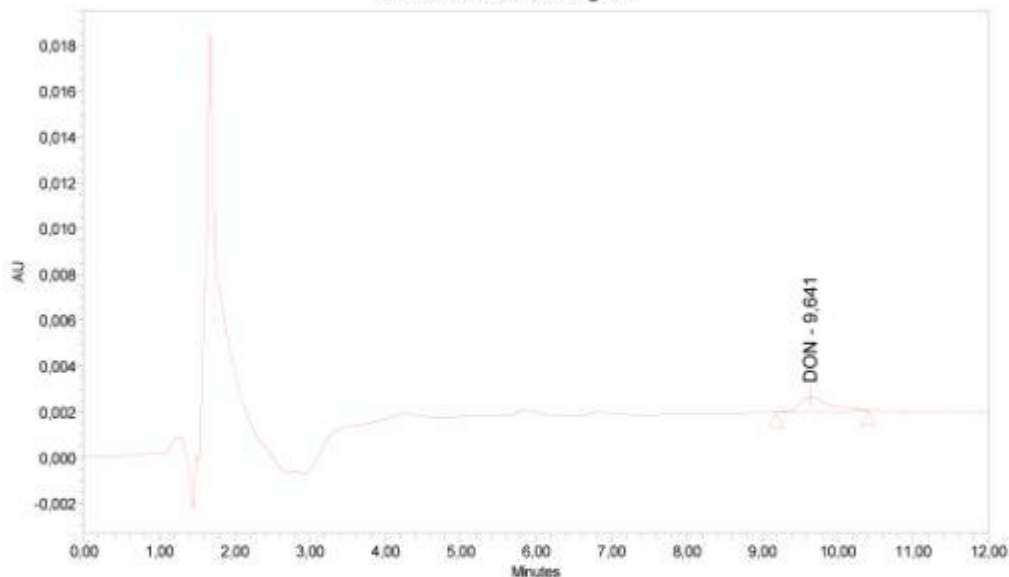
ANEXO J: Cromatograma muestra 025.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	DON 025R	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	07072011
Vial:	10	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	07/07/2011 13:27:12 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 11:38:07 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.641	18079	669	407.498	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 12:25:19 America/Guayaquil

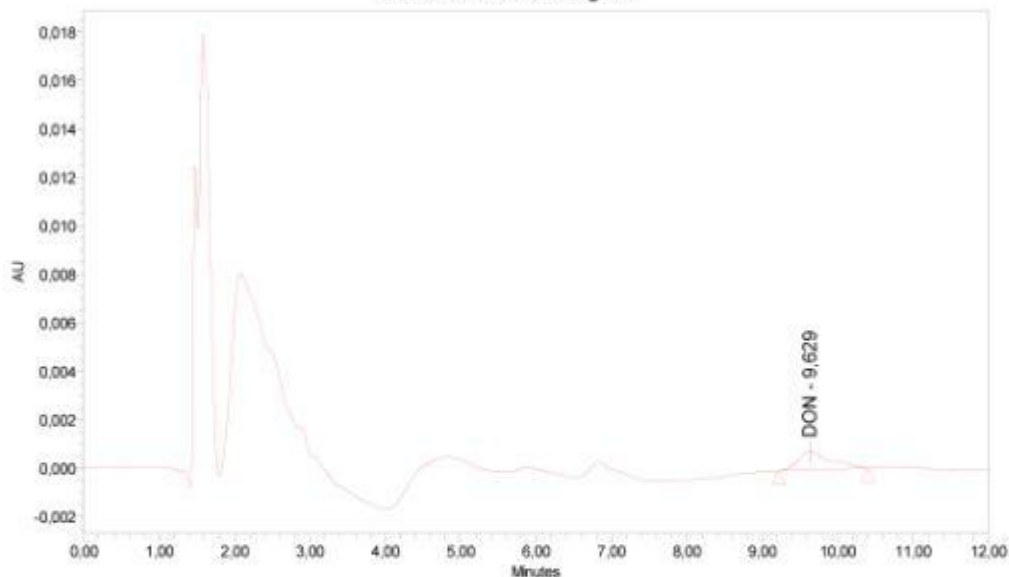
ANEXO K: Cromatograma muestra 030.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	DON 030	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	09072011
Vial:	14	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	09/07/2011 14:57:02 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 11:31:34 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.629	22233	759	521.762	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 12:24:01 America/Guayaquil

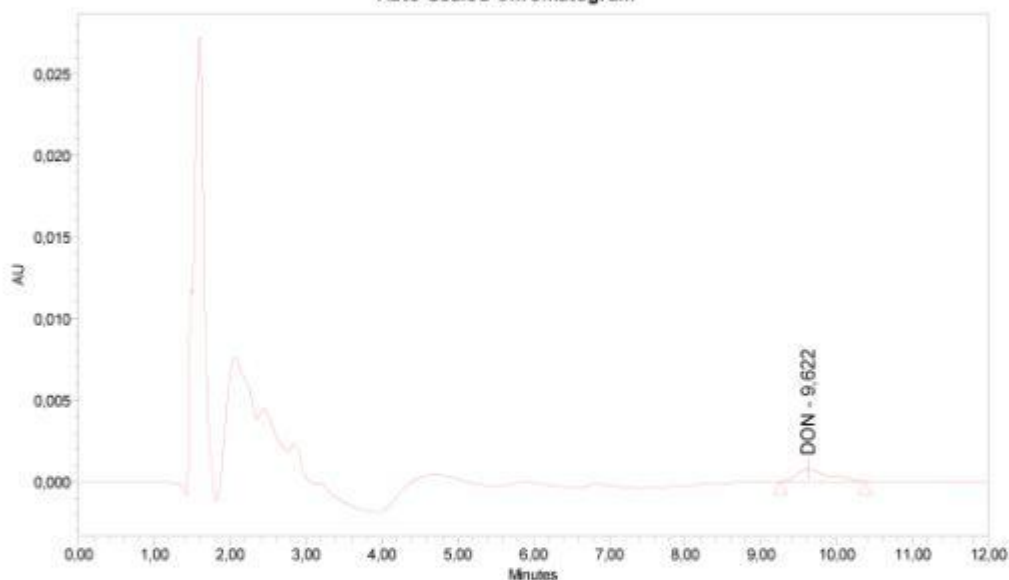
ANEXO L: Cromatograma muestra 029.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	DON 029	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	09072011
Vial:	12	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	09/07/2011 14:31:28 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 11:29:45 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.622	20847	737	483.628	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos
 Report Method: Report method DON
 Report Method ID 2258
 Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL
 Date Printed:
 13/07/2011
 12:22:44 America/Guayaquil

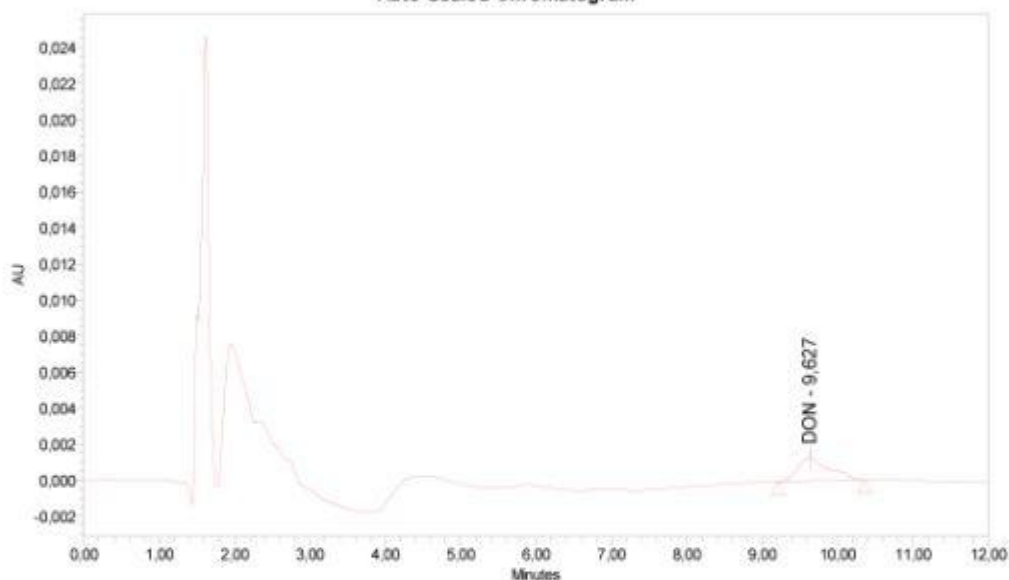
ANEXO M: Cromatograma muestra 019.



Report method DON

Cuantificación de Deoxinivalenol en Harina de Trigo			
Sample Name:	DON 019	Acquired By:	JCarlos
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	09072011
Vial:	6	Acq. Method Set:	DONset
Injection #:	1	Processing Method:	Curva DON final
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	12.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 220nm
Date Acquired:	09/07/2011 13:14:42 ECT		
Date Processed:	13/07/2011 11:25:35 ECT		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 DON	9.627	36518	1275	914,648	ppb

Registered Company Name: AGROCALIDAD

Analista: Ana Belén Guerrero - Tesista AGROCALIDAD

Registered User Name: LABORATORIOS

Reported by User: JCarlos

Report Method: Report method DON

Report Method ID 2258

Page: 1 of 1

Project Name: DEOXINIVALENOL

Date Printed:

13/07/2011

12:20:33 America/Guayaquil

ANEXO N: Resumen global de los datos obtenidos en el presente estudio.

Identificación	Tipo de local	Tipo de almacenamiento	Marca	Molino	Lectura ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Lectura menos blanco ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Promedio	Porcentaje de error
DON 001	SUPERMERCADO	B	M1	L8	248,392	174,022	171,0242143	2,47%
DON 001R	SUPERMERCADO	B	M1	L8	242,397	168,027		
DON 002	SUPERMERCADO	A	M2	L1	115,949	41,579	51,68321429	17,43%
DON 002R	SUPERMERCADO	A	M2	L1	136,158	61,788		
DON 003	DESPENSA	B	M3	L2	169,952	95,582	87,21671429	10,92%
DON 003R	DESPENSA	B	M3	L2	153,222	78,852		
DON 004	DESPENSA	D	M4	L3	96,315	21,945	70,74971429	17,93%
DON 004R	DESPENSA	D	M4	L3	157,057	82,687		
DON 004R-2	DESPENSA	D	M4	L3	133,183	58,813		
DON 005	DESPENSA	D	M5	L4	7,99	0	114,2517143	5,53%
DON 005R	DESPENSA	D	M5	L4	193,693	119,323		
DON 005R-2	DESPENSA	D	M5	L4	183,551	109,181		
DON 006	DESPENSA	B	M6	L5	161,836	87,466	79,21671429	11,35%
DON 006R	DESPENSA	B	M6	L5	145,338	70,968		
DON 007	DESPENSA	D	M5	L4	347,5	273,130	267,5837143	3,30%
DON 007R	DESPENSA	D	M5	L4	336,408	262,038		
DON 008	DESPENSA	D	M7	L1	119,089	44,719	47,82671429	5,22%
DON 008R	DESPENSA	D	M7	L1	125,305	50,935		
DON 009	DESPENSA	B	M9	L6	119,547	45,177	37,65921429	14,39%
DON 009R	DESPENSA	B	M9	L6	104,512	30,142		

Continuación Anexo N

Identificación	Tipo de local	Tipo de almacenamiento	Marca	Molino	Lectura($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Lectura menos blanco($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Promedio	Porcentaje de error
DON 010	DESPENSA	C	M10	L7	127,066	52,696	53,94321429	1,96%
DON 010R	DESPENSA	C	M10	L7	129,561	55,191		
DON 011	DESPENSA	C	M11	L2	128,7	54,330	60,65171429	9,82%
DON 011R	DESPENSA	C	M11	L2	141,344	66,974		
DON 012	DESPENSA	D	M8	L1	233,58	159,210	150,2852143	8,27%
DON 012R	DESPENSA	D	M8	L1	215,731	141,361		
DON 013	DESPENSA	C	M11	L2	164,737	90,367	84,60421429	7,52%
DON 013R	DESPENSA	C	M11	L2	153,212	78,842		
DON 014	DESPENSA	D	M7	L1	167,281	92,911	82,03221429	14,95%
DON 014R	DESPENSA	D	M7	L1	145,524	71,154		
DON 015	DESPENSA	D	M6	L5	90,801	16,431	17,78221429	2,98%
DON 015R	DESPENSA	D	M6	L5	93,504	19,134		
DON 016	DESPENSA	D	M10	L7	157,78	83,410	79,30521429	5,49%
DON 016R	DESPENSA	D	M10	L7	149,571	75,201		
DON 017	DESPENSA	D	M10	L7	170,968	96,598	100,5857143	4,67%
DON 017R	DESPENSA	D	M10	L7	178,944	104,574		
DON 018	SUPERMERCADO	A	M13	L10	133,467	59,097	70,64221429	17,30%
DON 018R	SUPERMERCADO	A	M13	L10	156,558	82,188		
DON 019	SUPERMERCADO	A	M17	L4	914,648	840,278	841,2172143	0,21%
DON 019R	SUPERMERCADO	A	M17	L4	916,527	842,157		
DON 020	SUPERMERCADO	A	M16	L9	137,124	62,754	74,37321429	16,95%
DON 020R	SUPERMERCADO	A	M16	L9	160,363	85,993		
DON 021	SUPERMERCADO	A	M15	L10	154,344	79,974	76,51121429	4,70%
DON 021R	SUPERMERCADO	A	M15	L10	147,419	73,049		

Continuación Anexo N

Identificación	Tipo de local	Tipo de almacenamiento	Marca	Molino	Lectura ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Lectura menos blanco ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	Promedio	Porcentaje de error
DON 022	DESPENSA	C	M4	L3	100,378	26,008	24,88521429	2,29%
DON 022R	DESPENSA	C	M4	L3	98,133	23,763		
DON 023	DESPENSA	C	M5	L4	363,299	288,929	291,4082143	1,36%
DON 023R	DESPENSA	C	M5	L4	368,258	293,888		
DON 023R-2	DESPENSA	C	M5	L4	329,601	255,231		
DON 024	DESPENSA	C	M12	L11	167,235	92,865	84,80071429	10,67%
DON 024R	DESPENSA	C	M12	L11	151,107	76,737		
DON 025	DESPENSA	B	M8	L1	407,498	333,128	330,9417143	1,08%
DON 025R	DESPENSA	B	M8	L1	403,126	328,756		
DON 026	MERCADO	D	M14	L12	86,102	11,732	13,87321429	4,97%
DON 026R	MERCADO	D	M14	L12	90,385	16,015		
DON 027	MERCADO	D	M14	L12	138,708	64,338	54,59371429	16,35%
DON 027R	MERCADO	D	M14	L12	119,22	44,850		
DON 028	MERCADO	D	M14	L12	84,849	10,479	3,895214286	18,37%
DON 028R	MERCADO	D	M14	L12	71,682	0		
DON 029	MERCADO	D	M14	L12	483,628	409,258	402,8202143	2,73%
DON 029R	MERCADO	D	M14	L12	470,753	396,383		
DON 030	MERCADO	D	M14	L12	521,762	447,392	426,4597143	8,72%
DON 030R	MERCADO	D	M14	L12	479,898	405,528		
DON 031	MERCADO	D	M14	L12	189,087	114,717	113,1012143	1,74%
DON 031R	MERCADO	D	M14	L12	185,856	111,486		
DON 032	SUPERMERCADO	A	M18	L13	177,602	103,232	92,99721429	13,03%
DON 032R	SUPERMERCADO	A	M18	L13	157,133	82,763		

