

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 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).

Ana Belén Guerrero Hinojosa¹

RESUMEN

Se presenta una nueva metodología para la detección de Deoxinivalenol en harina de trigo con el uso de Columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia; y resultados de una vigilancia realizada en el sector de Sangolquí – Pichincha con la finalidad de establecer una línea base para que la entidad reguladora (Agrocalidad), pueda establecer una normativa a nivel nacional. En el estudio se determinó que en 32 muestras se observa una incidencia del 100%, de las cuales el 3% superan el Límite Máximo Residual establecido por la Unión Europea (750 $\mu\text{g.Kg muestra}^{-1}$). Se concluye que se puede realizar una normativa para el Ecuador en función de la legislación de la UE.

Palabras clave: Deoxinivalenol, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Columnas de Inmunofinidad.

ABSTRACT

With this study there had been established a methodology to detect Deoxynivalenol in wheat flour with the use of Immunoaffinity Columns and High Performance Liquid Chromatography. The results will be useful to be used by the authority – Agrocalidad, who will determine a normative for the country. In this study the 100% of samples were contaminated from where the 3% has a higher value than the one established in the European Union (750 $\mu\text{g.Kg muestra}^{-1}$). In conclusion, in Ecuador could be applied a legislation based on the values of the EU.

Key words: Deoxynivalenol, Immunoaffinity Columns, High Performance Liquid Chromatography.

INTRODUCCIÓN

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.

El Deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida por *Fusarium graminearum* que contamina a gramíneas como el trigo. 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

¹ Laboratorio de Plaguicidas – Agrocalidad. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Ing en Biotecnología.

como principal contaminante de trigo, cebada, avena, centeno y maíz (Soriano, 2007). Se conoce que es un citotóxico agudo y potente inmunosupresor, induce a la degeneración de la médula ósea, vasos linfáticos e intestino (Cabello, 2007).

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.

METODOLOGÍA

Se realizó un muestreo al azar en mercados, despensas y supermercados en el sector de Sangolquí, Pichincha. Se recolectaron 32 muestras en total. El trabajo en laboratorio se realizó en 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. Se realizó una curva de calibración en el rango de 200-2400 $\mu\text{g.Kg muestra}^{-1}$.

Para el procesamiento de las muestras 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 Inmunoadfinidad (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.

Para la cuantificación como condiciones cromatográficas: Columna: Symmetry waters C18 4,6 μm , 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. Se analizaron todos los días un blanco y se realizaron por duplicado las muestras. Se descontaminó el material con una solución clorinada al 3% y se realizó lavado de rutina.

RESULTADOS

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%. 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.

Mediante el análisis de la Figura 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.

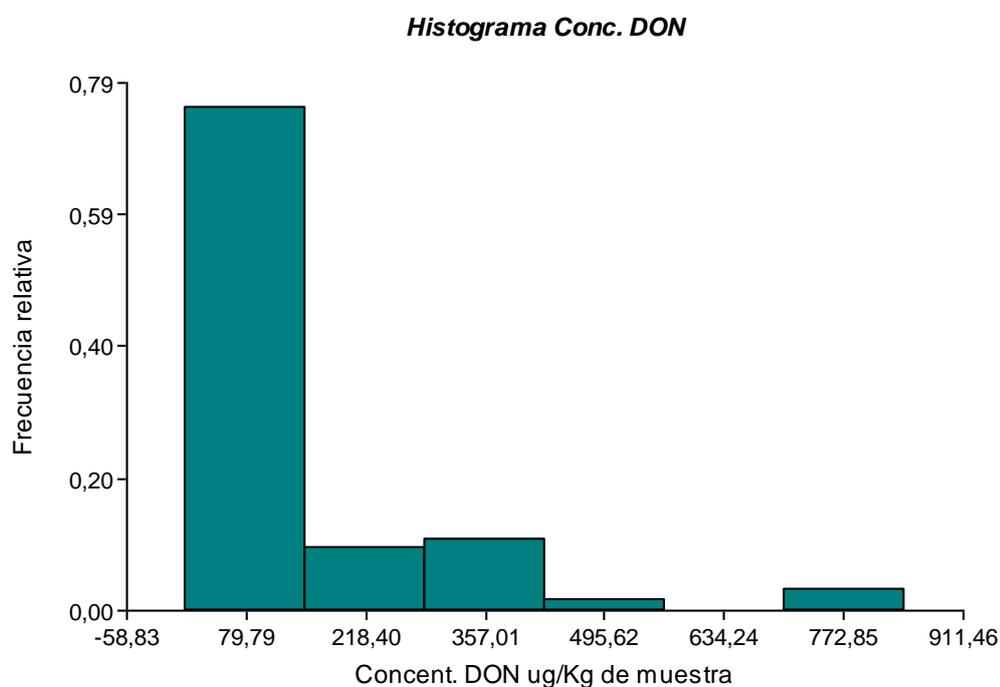


Figura 1: Histograma de la frecuencia relativa en la que las muestras presentan determinada concentración de DON.

Los datos obtenidos en la tabla 1 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 1: 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 2).
 - $H_1 = \mu_{\text{Dispensa}} = \mu_{\text{Mercado}} = \mu_{\text{Supermercado}}$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.
- ANOVA por tipo de almacenamiento (Tabla 3).
 - $H_1 = \mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.
- ANOVA por marca (Tabla 4).
 - $H_1 = \mu_{M_1} = \mu_{M_2} = \mu_{M_3} = \mu_{M_4} = \mu_{M_5} = \mu_{M_6} = \mu_{M_7} = \mu_{M_8} = \mu_{M_9} = \mu_{M_{10}} = \mu_{M_{11}} = \mu_{M_{12}} = \mu_{M_{13}} = \mu_{M_{14}} = \mu_{M_{15}} = \mu_{M_{16}} = \mu_{M_{17}} = \mu_{M_{18}}$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.
- ANOVA por molino (Tabla 5).
 - $H_1 = \mu_{L_1} = \mu_{L_2} = \mu_{L_3} = \mu_{L_4} = \mu_{L_5} = \mu_{L_6} = \mu_{L_7} = \mu_{L_8} = \mu_{L_9} = \mu_{L_{10}} = \mu_{L_{11}} = \mu_{L_{12}} = \mu_{L_{13}}$.
 - $H_0 = \text{Al menos alguna es diferente}$.

Las tabla 2 y 3 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 4) y molino (Tabla 5) 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 5). Con respecto a las marcas se pudo identificar tres grupos: A, B y C (Tabla 4); 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 ;**Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..1:**
ANOVA por tipo de local.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ 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
Despensa	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 ;**Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..2:**
ANOVA por tipo de almacenamiento.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de muestra)	66	0,03	0,00	117,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

FV	SC	Gl	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 ;**Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..3:**
ANOVA por marca.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ 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 **¡Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..4:**
ANOVA por molino.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² AJ	CV
Concent. DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ 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 6 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.

Tabla6: Intervalos de Confianza global del estudio

a) Tomando en cuenta el valor atípico

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

DISCUSIÓN

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 Inmunofinidad (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.

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.

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.

CONCLUSIONES

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 Inmunofinidad 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. (2010). *Procedimiento específico de ensayo para determinación de Deoxynivalenol (DON) en Trigo*. Quito.
- Cabello, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. Editorial Médica Panamericana.
- García, G. (1989). *Manual de métodos para el análisis de micotoxinas en granos*. Editorial UNAM.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). *Informe Monitoreo de Micotoxinas en Alimentos*. Retrieved 2011 йил 27-Septiembre from http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/06/Informe%20Micotoxinas%202010%20vf.pdf
- Jurado, J., & Alcázar, A. (2010). *Química Analítica Avanzada*. Retrieved 2011 йил 2-Mayo from <http://personal.us.es/jmjurado/docs/HPLC20092010.pdf>
- Knass, P. (2011 йил 7-Junio). Extracción de DON con IAC DONStar. (A. B. Guerrero, Interviewer)
- R - Bipharm Rhone LTD. (2010). *DONPREP. Immunoafinity 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. (2011 йил 10-Junio). Detección de micotoxinas. (A. B. Guerrero, Interviewer)

- Seitz, L., Yamazaki, T., Clements, R., Mohr, H., & Andrews, L. (1985). Distribution of Deoxynivalenol in Soft Wheat Mill Streams. *Cereal Chem.*
- Solá, I. (2011 йил 18-Febrero). Extracción de DON. (A. B. Guerrero, Interviewer)
- Soriano, J. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- VICAM. (2010). *DONtest HPLC*. California.