



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DEOXINIVALENOL (DON)
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN UNA
POBLACIÓN DE LÍNEAS MEJORADAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

IVÁN PATRICIO CANTOS SILVA

RIOBAMBA – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen Santísima por brindarme la oportunidad y la dicha de la vida. De manera especial a mis padres Gilberto Horacio Cantos M. y Luz María Silva C. por ser mi ejemplo, guía y fortaleza; gracias a los valores que me han inculcado he llegado a ser quien soy. A mi hermana María Angélica que es mi fuente de apoyo constante. A mi familia y amigos que siempre han estado a mi lado en los momentos buenos y malos durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por todas sus enseñanzas y experiencias impartidas durante mi permanencia en éste Magno Templo del Saber.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por el apoyo brindado en la realización del trabajo investigativo y de manera especial a la Dra. Susana Espín Responsable del Departamento de Nutrición y Calidad.

A Michigan State University por el financiamiento de la presente investigación a través del Ing. Esteban Falconí responsable del Programa de Cereales del INIAP y Director del proyecto “Association mapping for detecting QTLs for Fusarium Head Blight and Yellow Rust resistance in Bread Wheat” en EE.UU.

Al Dr. Carlos Pilamunga y a la Dra. Olga Lucero por su valiosa colaboración, en la dirección y asesoramiento en la ESPOCH y por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo, a todo el personal del Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del INIAP y de manera especial al Dr. Iván Samaniego y al Químico Alex Portilla por el apoyo y soporte técnico en la investigación realizada.

A Dios por darme la salud y la vida, a mis padres por su amor y apoyo incondicional, a mi hermana por ser mi ejemplo y soporte durante mi vida estudiantil y a mi familia por estar siempre presentes en todo momento, a todos ellos gracias de corazón.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DEOXINIVALENOL (DON) POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS MEJORADAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*)**”, de responsabilidad del señor egresado Iván Patricio Cantos Silva, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez DECANO FAC. CIENCIAS	_____	_____
Dr. Iván Ramos DIRECTOR DE ESCUELA	_____	_____
Dr. Carlos Pilamunga DIRECTOR DE TESIS (ESPOCH)	_____	_____
Dra. Susana Espín DIRECTORA DE TESIS (INIAP)	_____	_____
Dra. Olga Lucero MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Lcdo. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	_____

Yo, Iván Patricio Cantos Silva, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO y al INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS.

IVÁN PATRICIO CANTOS SILVA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AF	Aflatoxina
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
ARN	Ácido Ribonucleico
ATA	Aleukia Tóxica Alimentaria
a _w	Actividad de agua
°C	Grados Centígrados
CE	Comunidad Europea
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
cm	Centímetro
DAH	Ácido Hidroxicinámico
DCM _b	Diferencias cuadráticas medias entre niveles
DCM _w	Diferencias cuadráticas medias dentro de niveles
DL ₅₀	Dosis mínima letal
DNC	Departamento de Nutrición y Calidad
DON	Deoxinivalenol
Eq. Trolox/porción	Índice estándar de actividad antioxidante
EESC	Estación Experimental Santa Catalina
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme (Sistema de Evaluación del Funcionamiento de los Análisis de los Alimentos)
FDK	Fusarium Damaged Kernels (Granos dañados por Fusarium)
FHB	Fusarium Head Blight (Fusariosis de la Espiga de Trigo)
FN	Fumonisina
FNB ₁	Fumonisina B ₁
g	Gramos
GC	Gas Chromatography (Cromatografía de gases)
ha	Hectárea
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer)
INIAP	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
IRM	Internal Reference Material (Material de Referencia Interno)
ISO/IEC 17025	Norma Internacional de requisitos de gestión para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración.

JECFA	FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)
k	Factor de cobertura
kg	Kilogramos
kg/año	Kilogramo por año
Lo	Intercepto
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
LSAIA	Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos
LU	Unidades de luminiscencia
M	Pendiente
mAU	Mili Unidades de Absorbancia
MCR	Material de Referencia Certificado
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mL	Mililitros
mL/minuto	Mililitro por minuto
mm	Milímetros
mm/ciclo	Milímetros por ciclo
ng	Nanogramos
ng/g	Nanogramo por gramo
NOAEL	Non Observed Adverse Effects Level (Estimación del nivel de micotoxina al cual no se observan efectos tóxicos)
OAE	Organismo Ecuatoriano de Acreditación
OTA	Ocratoxina A
pH	Potencial de Hidrógeno
PN	Patulina
ppb	Partes por billón
PPO	Polifenol Oxidasa
r	Coefficiente de correlación
RSD_r	Desviación estándar relativa de repetibilidad
RSD_R	Desviación estándar relativa de reproducibilidad
SDCb	Suma de diferencias cuadráticas entre niveles
SDCw	Suma de diferencias cuadráticas dentro de niveles
S_m	Desviación de la pendiente
SL	Desviación del intercepto
<i>spp.</i>	Todas las especies
S_r	Desviación Estándar de la repetibilidad
S_R	Desviación Estándar de la reproducibilidad
$S_{y,x}$	Error típico
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)

tm	Tonelada métrica
tm/año	Toneladas métricas por año
t/ha	Tonelada por hectárea
<i>u</i>	Incertidumbre combinada
<i>U</i>	Incertidumbre expandida
UE	Unión Europea
UNAD	Universidad Nacional Abierta y a Distancia de Colombia
UNSA	Universidad Nacional de Salta Argentina
UV	Ultravioleta
V_{ef}	Grados efectivos de libertad
μg	Microgramos
$\mu\text{g/kg}$	Microgramo por Kilogramo
μL	Microlitros
YR	Yellow rust (Roya amarilla)
ZEA	Zearalenona

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
 ÍNDICE DE TABLAS
 ÍNDICE DE CUADROS
 ÍNDICE DE GRÁFICOS
 ÍNDICE DE FIGURAS
 ÍNDICE DE ANEXOS
 INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	El Trigo.....	1
1.1.1	Características Generales.....	1
1.1.2	Historia.....	1
1.1.3	La planta.....	3
1.1.3.1	Clima.....	3
1.1.3.2	Humedad.....	3
1.1.3.3	Agua.....	3
1.1.3.4	Suelo.....	3
1.1.4	Descripción Botánica.....	4
1.1.5	Morfología.....	4
1.1.5.1	Raíz.....	5
1.1.5.2	Tallo.....	5
1.1.5.3	Hojas.....	5
1.1.5.4	Inflorescencia.....	5
1.1.5.5	Granos.....	5
1.1.5.6	Genética.....	6
1.1.5.7	Clasificación.....	7
1.1.6	Tipos de Trigo.....	7
1.1.6.1	Trigo duro superior.....	7
1.1.6.2	Trigo blando.....	8
1.1.6.3	Trigo candeal.....	8
1.1.6.4	Trigo standard.....	8
1.1.7	Producción Mundial.....	8
1.1.8	Principales países productores.....	8
1.1.9	Comercio mundial.....	9
1.1.10	El Trigo en el Ecuador.....	10
1.1.11	Consumo de Trigo.....	11
1.1.12	Enfermedades del Trigo.....	11
1.1.12.1	Roya amarilla o lineal.....	12

1.1.12.2	Roya de la hoja o parda.....	12
1.1.12.3	Fusarium de la espiga.....	13
1.1.12.4	Carbón volador.....	13
1.1.13	Valor nutricional y potencial.....	13
1.1.13.1	Fibra dietética del grano.....	14
1.1.13.2	Actividad antioxidante del grano.....	15
1.1.13.3	Harinas con más fibra y antioxidantes.....	17
1.1.13.4	El Trigo blanco y su potencial.....	17
1.1.13.5	Diferenciar al trigo.....	18
1.1.13.6	Variedades en el Ecuador.....	19
1.1.13.7	Semilla mejorada.....	19
1.2	Micotoxinas.....	19
1.2.1	Historia.....	21
1.2.2	Hongos en el campo y el almacenamiento.....	21
1.2.3	Producción.....	23
1.2.4	Principales Micotoxinas.....	24
1.2.4.1	Aflatoxinas.....	24
1.2.4.2	Ocratoxina A.....	25
1.2.4.3	Fumonisinias.....	26
1.2.4.4	Zearalenona.....	26
1.2.4.5	Patulina.....	26
1.2.4.6	Tricotecenos.....	27
1.3	Deoxinivalenol.....	29
1.3.1	Características Generales.....	29
1.3.2	Relación de DON y enfermedades en el trigo.....	30
1.3.3	Efectos Toxicológicos.....	31
1.3.4	Prevalencia en el mundo.....	32
1.3.5	Límites a nivel mundial para Deoxinivalenol en el trigo (harina) y otros cereales	33
1.4	Columnas de inmunoafinidad.....	33
1.4.1	Características Generales.....	33
1.4.2	Técnica de Anticuerpos.....	33
1.5	Validación de Métodos Analíticos.....	35
1.5.1	Descripción.....	35
1.5.2	Parámetros de Validación.....	35
1.5.2.1	Linealidad.....	36

1.5.2.2	Precisión.....	37
1.5.2.3	Exactitud.....	38
1.5.2.4	Sensibilidad.....	39
1.5.2.5	Robustez.....	39
1.5.2.6	Selectividad.....	40
1.5.2.7	Incertidumbre.....	41
1.6	Materiales requeridos para la Validación de ensayos de laboratorio.....	51
1.6.1	Material de referencia.....	51
1.6.2	Material de referencia certificado.....	53
1.7	Fundamento legal.....	54
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	56
2.1	Lugar de la investigación.....	56
2.2	Materiales, Equipos y Reactivos.....	57
2.2.1	Materia Prima.....	57
2.2.2	Materiales de laboratorio.....	57
2.2.3	Equipos.....	58
2.2.4	Reactivos.....	59
2.2.5	Estándares.....	59
2.3	Metodología.....	59
2.3.1	Fase de laboratorio.....	60
2.3.1.1	Procedimiento.....	60
2.3.1.1.1	Preparación de reactivos.....	60
2.3.1.1.2	Molienda y pesaje de la muestra.....	60
2.3.1.1.3	Extracción de la muestra.....	60
2.3.1.1.4	Purificación de la muestra.....	60
2.3.1.1.5	Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	61
2.3.1.1.6	Cálculos y expresión de resultados.....	62
2.3.2	Tratamiento estadístico de la Validación del Método.....	62
2.3.2.1	Rango lineal y linealidad.....	62
2.3.2.2	Límite de detección.....	64
2.3.2.3	Límite de cuantificación.....	64
2.3.2.4	Precisión.....	65
2.3.2.5	Exactitud.....	68
2.3.2.6	Selectividad.....	68
2.3.2.7	Incertidumbre.....	68

2.3.3	Tratamiento estadístico de la concentración de DON en trigo.....	71
2.3.3.1	Procedimiento.....	71
2.3.3.2	Análisis estadístico.....	71
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
4.	CONCLUSIONES.....	97
5.	RECOMENDACIONES.....	99
6.	RESUMEN.....	100
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	102
8.	ANEXOS.....	109

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Preparación de estándares para curvas de calibración de DON...	74
CUADRO No. 2	Resultados promedio de la curva de calibración de DON para el día 1.....	75
CUADRO No. 3	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 1.....	76
CUADRO No. 4	Resultados promedio de la curva de calibración de DON para el día 2.....	77
CUADRO No. 5	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 2.....	78
CUADRO No. 6	Resultados promedio de la curva de calibración de DON para el día 3.....	79
CUADRO No. 7	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 3.....	80
CUADRO No. 8	Resultados promedio de la curva de calibración de DON para el día 4.....	81
CUADRO No. 9	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 4.....	82
CUADRO No. 10	Resultados promedio de la curva de calibración de DON para el día 5.....	84
CUADRO No. 11	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 5.....	85
CUADRO No. 12	Resultados promedio de la curva de calibración global de DON.	86
CUADRO No. 13	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración global de DON.....	87
CUADRO No. 14	Resultados del cálculo de límite de detección y cuantificación utilizando curva de calibración.....	88
CUADRO No. 15	Resultados del cálculo de límite de detección y cuantificación en matriz.....	89
CUADRO No. 16	Resultados del análisis de precisión del método.....	89
CUADRO No. 17	Resultados del cálculo de la suma de diferencias cuadráticas medias entre niveles y dentro de niveles.....	90
CUADRO No. 18	Resultados del cálculo de la desviación estándar y desviación estándar relativa de la repetibilidad y reproducibilidad.....	91
CUADRO No. 19	Resultados del cálculo del porcentaje de recuperación por día y total.....	91
CUADRO No. 20	Resultados del cálculo del porcentaje de recuperación en material de referencia.....	92
CUADRO No. 21	Resultados del cálculo de los coeficientes de sensibilidad para la incertidumbre.....	94
CUADRO No. 22	Resultados del cálculo de las contribuciones, incertidumbre combinada e incertidumbre expandida.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Principales países productores y sus producciones.....	9
TABLA No. 2	Composición típica de macro y micro elementos del grano de trigo y su distribución en distintos productos de molienda.....	15
TABLA No. 3	Actividades antioxidantes típicas de algunos alimentos elaborados con grano entero de cereales, frutas y verduras.....	16
TABLA No. 4	Principales tricotecenos y sus grupos funcionales.....	27
TABLA No. 5	Factores de cobertura k para diferentes grados efectivos de libertad, v_{ef}^*	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Curva de Calibración de DON para el día 1.....	75
GRÁFICO No. 2	Curva de Calibración de DON para el día 2.....	77
GRÁFICO No. 3	Curva de Calibración de DON para el día 3.....	79
GRÁFICO No. 4	Curva de Calibración de DON para el día 4.....	82
GRÁFICO No. 5	Curva de Calibración de DON para el día 5.....	84
GRÁFICO No. 6	Curva de Calibración global de DON.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura química básica de los Tricotecenos.....	27
FIGURA No. 2	Estructura química del Deoxinivalenol.....	29
FIGURA No. 3	Uso de anticuerpos para purificación de moléculas.....	34
FIGURA No. 4	Cromatograma de una muestra de trigo contaminada artificialmente con Deoxinivalenol.	93

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Planta de Trigo.....	4
FOTOGRAFÍA No. 2	Muestras de trigo en grano codificadas y ordenadas.....	109
FOTOGRAFÍA No. 3	Proceso de molienda del trigo.....	109
FOTOGRAFÍA No. 4	Pesaje de 25 g de muestra.....	110
FOTOGRAFÍA No. 5	Aforación del 200 mL de agua bidestilada.....	110
FOTOGRAFÍA No. 6	Extracción de la muestra mediante 200 mL de agua bidestilada y licuado por 3 minutos.....	111
FOTOGRAFÍA No. 7	Filtrado de la muestra por gravedad.....	111
FOTOGRAFÍA No. 8	Filtrado del extracto utilizando columnas de inmunoafinidad.....	112
FOTOGRAFÍA No. 9	Lavado de la columna de inmunoafinidad con 10 ml de agua bidestilada.....	113
FOTOGRAFÍA No. 10	Recuperación del DON con 3 mL de Acetonitrilo grado HPLC.....	113
FOTOGRAFÍA No. 11	Evaporación a sequedad de la muestra recuperada mediante gas nitrógeno al 99% de pureza.....	114
FOTOGRAFÍA No. 12	Reconstitución de la muestra con 300 µl de fase móvil y agitación por 3 minutos.....	114
FOTOGRAFÍA No. 13	Homogenización de la muestra en baño ultrasonido por 5 minutos.....	115
FOTOGRAFÍA No. 14	Colocación de las muestras en los viales de 200 µL con inserto fijo y ubicación de los mismos en el autosampler del equipo HPLC Agilent 1200.....	115
FOTOGRAFÍA No. 15	Ingreso de los códigos de las muestras al sistema y lectura en el equipo HPLC Agilent 1200.....	116

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Proceso de molienda de las muestras de trigo.....	109
ANEXO No. 2	Proceso de pesado y extracción de las muestras de trigo.....	110
ANEXO No. 3	Proceso de extracción del Deoxinivalenol en las muestras de trigo.....	111
ANEXO No. 4	Proceso de filtración de los extractos a través de las columnas de inmunoafinidad.....	112
ANEXO No. 5	Lavado de las columnas de inmunoafinidad y recuperación del Deoxinivalenol.....	113
ANEXO No. 6	Proceso de evaporación y reconstitución del Deoxinivalenol.....	114
ANEXO No. 7	Homogenización y colocación de las muestras en los viales.....	115
ANEXO No. 8	Lectura y resultados en el equipo HPLC Agilent 1200.....	116
ANEXO No. 9	Metodología Oficial de la Comisión de la Unión Europea para Validación en Laboratorios Químicos.....	117
ANEXO No. 10	Método oficial de la R-BIOPHARM para la extracción y análisis de Deoxinivalenol en cereales.....	118
ANEXO No. 11	Límites establecidos por la unión europea para micotoxinas en alimentos (Deoxinivalenol).....	120
ANEXO No. 12	Resultados del análisis del contenido de DON en una población de líneas mejoradas de trigo (<i>Triticum aestivum</i>).	121
ANEXO No. 13	Cromatograma del análisis de DON en trigo (Estándar DON 1500 ng/g).....	129

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador y en el mundo la contaminación de alimentos ha sido una problemática evidente y degenerativa, en las últimas décadas se ha venido desarrollando metodologías de ensayo para determinar de una manera específica y confiable la presencia de microorganismos dentro de las principales fuentes de alimentación como cereales, frutas, legumbres, etc. Los estudios de investigación para desarrollar nuevas especies mejoradas de alimentos resistentes a contaminación de hongos, bacterias y virus, se vienen desplegando con el fin de precautelar la economía de los sectores agrícolas, la estabilidad de los cultivos y en especial para prevenir enfermedades en el hombre y en animales.

El trigo es uno de los principales granos empleados para la alimentación, el cual junto con el maíz y el arroz se producen en una gran cantidad de países. En el año 2012 la producción mundial de trigo aumentó 679 millones de toneladas equivalentes a 1,3 %. El cultivo del trigo en Ecuador tiene una importancia relevante en la alimentación. De la harina de este cereal se elabora pan, galletas, fideos, pastelería, etc. En la actualidad tenemos problemas por su escasez en el mercado y la consiguiente subida del precio del pan, principalmente. El Gobierno trata de paliar el problema mediante subsidio del precio de la harina, así como el control del costo del pan en el mercado nacional. Pero la solución correcta del problema lo visualizamos en fomentar la producción nacional hasta lograr el autoabastecimiento, toda vez que tenemos tierras excelentes para producir trigo en el callejón interandino, así como en la península de Santa Elena. (35)

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular, producidas por hongos como metabolitos secundarios, llegando a contaminar cereales y otros productos alimenticios, provocando enfermedades e inclusive la muerte. La mayoría de las micotoxinas de importancia agrícola son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, y *Alternaria*. Estos géneros causan

grandes pérdidas económicas en los cultivos de cereales y en procesos de alimentación. El grado de infección de los hongos que colonizan cereales en campo dependerá de varios factores, por ejemplo la temperatura, la humedad, la precipitación durante antesis y pos-cosecha, el tratamiento de suelo y la rotación de cultivos. (19) (23) (31)

El Deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida por varias especies de *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* en áreas templadas y húmedas, y *F. culmorum* en aquellas áreas donde prevalecen condiciones ambientales frías. Estas especies son los agentes etiológicos de la enfermedad denominada “tizón de espiga” o “fusariosis de la espiga de trigo” (*fusarium head blight*, FHB) y de la “podredumbre de la espiga de maíz” (*gibberella ear rot*). En la última década en diferentes países exportadores de trigo (Canadá, Argentina y Estados Unidos) se ha reportado la presencia de DON. El consumo de trigo contaminado por esta micotoxina en cantidades que superan el valor máximo permitido (750 µg/kg), establecido por la Comisión Europea (Anexo No. 11), puede provocar efectos dañinos en la salud humana y animal, produciendo necrosis en tejidos tales como los del tracto gastrointestinal, médula ósea, y tejidos linfoides. En Ecuador existe escasa bibliografía sobre la contaminación por micotoxinas, especialmente de DON, sin embargo la población ecuatoriana tiene un alto riesgo en su salud, debido a la ingesta de diversas micotoxinas que contaminan los alimentos. (8) (19) (26) (28)

Para cumplir con este fin, en la presente investigación se planteó como Objetivo General: Evaluar la concentración de Deoxinivalenol (DON) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en una población de líneas mejoradas de trigo (*Triticum aestivum*), y como Objetivos Específicos: Validar el método de análisis para determinar la concentración de Deoxinivalenol en trigo utilizando Columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector UV; y Analizar el contenido de Deoxinivalenol en una población de líneas mejoradas de trigo, mediante el método desarrollado y validado previamente en el laboratorio. Se planteó la Hipótesis en la Fase I: El proceso de validación evalúa experimentalmente los parámetros de calidad, asegurando de esta manera la aptitud del método, y demuestra además que el mismo es aplicable a la determinación de DON en trigo; y en la Fase II: Los niveles de concentración de DON en

una población de líneas mejoradas de trigo cumplen el límite máximo de 750 µg/kg establecido por la Comisión Europea. Los análisis de laboratorio fueron realizados tomando como referencia el Método propuesto por R.BIOPHARM para el análisis de DON en cereales (Anexo No. 10), adaptado y validado en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Laboratorio del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP para utilizarlo en la evaluación de la presencia de DON en las líneas mejoradas trigo. El método seleccionado se basó en la utilización de columnas de inmunoafinidad DONPREP - Ref. N°: A1-P50.V1 que poseen anticuerpos monoclonales específicos para DON, tecnología que es altamente específica, sensible y rápida en relación a las tecnologías tradicionales de purificación. En éste método el DON fue extraído con agua bidestilada, una alícuota de este extracto fue aplicada sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina, la columna es lavada para eliminar todas las interferencias y el DON es recuperado de la columna con Acetonitrilo grado HPLC. La toxina es cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa C18 y detector UV.

Este estudio está enmarcado dentro del proyecto “Association mapping for detecting-QTLs-for-Fusarium Head Blight and Yellow Rust resistance in Bread Wheat”, Tesis de Doctorado del Ing. Esteban Falconí, M.Sc. en Michigan State University (EE.UU.). Dentro del proyecto en mención las líneas fueron seleccionadas a razón de los altos y bajos niveles de “FHB” y “YR” así como a la resistencia de los materiales que se observe en el campo. El INIAP, a través del Programa de Cereales y los Departamentos de Protección Vegetal, Biotecnología y Nutrición y Calidad, está trabajando en la identificación de genes de resistencia a *F. graminearum* y validación de técnicas para la identificación y cuantificación de DON. Uno de los métodos que el INIAP y la Universidad Estatal de Michigan están empleando para la identificación de genes es: “Mapeo por Asociación”. Mediante este método, es posible identificar muchos genes de resistencia a la enfermedad y, paralelamente, desarrollar marcadores moleculares para seleccionar variedades resistentes. Adicionalmente, el INIAP validó un método analítico altamente preciso para identificar y cuantificar DON en los granos de trigo. El método puede ser utilizado por cualquier individuo o empresa para conocer la concentración de la

toxina en cualquier lote de cereal o alimento procesado. La aplicación de métodos y herramientas modernas con que cuenta ahora INIAP permitirán que en pocos años los agricultores ecuatorianos cuenten con variedades de alto rendimiento y resistentes a *Fusarium* de la Espiga y a otras enfermedades.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 EL TRIGO

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Trigo (*Triticum* spp) es el término que designa al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, que pertenecen al género *Triticum*; son plantas anuales de la familia de las gramíneas, ampliamente cultivadas en todo el mundo. La palabra trigo designa tanto a la planta como a sus semillas comestibles, tal y como ocurre con los nombres de otros cereales. (4) (33)

El trigo es uno de los tres cereales más producidos globalmente, junto al maíz y el arroz, y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la antigüedad. El grano del trigo es utilizado para hacer harina blanca, harina integral, sémola, cerveza y una gran variedad de productos alimenticios. (5) (7) (10)

La palabra trigo proviene del vocablo latino *Triticum*, que significa “quebrado”, “triturado” o “trillado”, haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre. *Triticum* significa, por lo tanto, "el grano que es necesario trillar para poder ser consumido". (11)

1.1.2 HISTORIA

Tiene sus orígenes en la antigua Mesopotamia. Las más antiguas evidencias arqueológicas del cultivo de trigo vienen de Siria, Jordania, Turquía e Iraq. Hace

alrededor de 8 milenios, una mutación o una hibridación ocurrieron en el trigo silvestre, dando por resultado una planta con semillas más grandes, la cual no podría haberse diseminado con el viento. Existen hallazgos de restos carbonizados de granos de trigo almidonero (*Triticum dicocoides*) y huellas de granos en barro cocido en Jarmo (Iraq Septentrional), que datan del año 6700 antes de Cristo. (12)

La semilla de trigo fue introducida a la civilización del antiguo Egipto para dar inicio a su cultivo en el valle del Nilo desde sus primeros periodos y de allí a las civilizaciones Griega y Romana. La diosa griega del pan y de la agricultura se llamaba Deméter, cuyo nombre significa “señora”, por derivación latina se transformó en Ceres y de allí surge la palabra “cereal”. (11)

El trigo fue uno de los primeros productos cultivados a partir de la revolución neolítica en Oriente y pronto se convirtió en uno de los alimentos básicos del hombre en el viejo mundo. La obtención de la harina en esta época se lograba machacando el trigo con piedras planas, se obtenía una papilla, que permitía elaborar panes duros y chatos con forma de galletas. Como el trigo es el único grano con el contenido suficiente de gluten para levar o hacer una barra de pan, éste llegó a ser rápidamente favorecido sobre otros granos cultivados en aquella época, tal como la avena, el mijo, el arroz, y la cebada. (12)

La revolución industrial trajo nuevas tecnologías, en el cual hubo un proceso de migración masiva del campo a la ciudad y se necesitaron nuevos métodos de molienda y panificación, la utilización de piedras en la molienda fue reemplazada por acero, la harina de estos molinos era más fina y el pan era más liviano. Con la invención de la energía eléctrica surgen los motores eléctricos que sustituyen las aspas de los molinos. El siglo XX trajo consigo molinos automáticos que incrementaron la productividad, se obtuvieron harinas más blancas, debida a la incorporación del cernido (separar el salvado y las partículas de la harina). Actualmente los molinos tienen una capacidad productiva muy superior y las harinas tienen mayor calidad. Se hacen más alimentos con trigo que cualquier otro grano de cereal. El trigo contribuye entre 10-20% de la toma calórica diaria en las personas en sobre 60 países y existen más de 1000 variedades de pan en el mercado. (11) (12)

1.1.3 LA PLANTA

El trigo crece en ambientes con las siguientes características:

1.3.3.1 Clima:

Temperatura mínima de 3°C y máxima de 30 a 33°C, siendo una temperatura óptima entre 10 y 25°C. (12)

1.3.3.2 Humedad:

Requiere una humedad relativa entre 40 y 70%; desde el espigamiento hasta la cosecha es la época que tiene mayores requerimientos en este aspecto, ya que exige una humedad relativa entre el 50 y 60% y un clima seco para su maduración. (12)

1.3.3.3 Agua:

Tiene bajos requerimientos de agua, ya que se puede cultivar en zonas donde caen precipitaciones entre 25 y 2800 mm anuales de agua, aunque un 75% del trigo crece entre los 375 y 800 mm. La cantidad óptima es de 400 - 500 mm/ciclo. (12)

1.3.3.4 Suelo:

Los mejores suelos para su crecimiento deben ser sueltos, profundos, fértiles y libres de inundaciones, y deben tener un pH entre 6,0 y 7,5; en terrenos muy ácidos es difícil lograr un adecuado crecimiento. La siembra en cultivos rotativos de trigo es muy benéfica para los suelos ya que como la mayoría de las Gramíneas tiene raíces en cabellera, ayudando a mejorar la estructura de los mismos, y proporcionando mayor aireación, permeabilidad y retención de humedad. (12)

1.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.



FOTOGRAFÍA No. 1 PLANTA DE TRIGO

Es una planta herbácea (Fotografía No. 1), su sistema radical es adventicio, el tallo o caña es verde, rígido, formado por nudos y entrenudos, las hojas son envainadoras que nacen de los nudos, acintadas, sin peciolo, que poseen la vaina, parte que sobresale del tallo, el limbo es una lámina verde, angosta y con nervaduras longitudinales. La inflorescencia es la espiga conformada por el raquis; es un adelgazamiento del tallo conformado por nudos y entrenudos y la espiguilla, que se compone de un grupo de flores, no todas fértiles. (21)

El fruto es una cariósipide con un solo grano, que es la semilla caracterizada por una hendidura longitudinal en la parte central, compuesta por el embrión y el endospermo. (21)

1.1.5 MORFOLOGÍA

Según Kent N. las partes de la planta de trigo se pueden describir de la siguiente manera:

1.1.5.1 Raíz

El trigo posee una raíz fasciculada o raíz en cabellera, es decir, con numerosas ramificaciones, las cuales alcanzan en su mayoría una profundidad de 25 cm, llegando algunas de ellas hasta un metro de profundidad. (12)

1.1.5.2 Tallo

El tallo del trigo es una caña hueca con 6 nudos que se alargan hacia la parte superior, alcanzando entre 0,5 a 2 metros de altura, es poco ramificado. (12)

1.1.5.3 Hojas

Las hojas del trigo tienen una forma linear lanceolada (alargadas, rectas y terminadas en punta) con vaina, lígula y aurículas bien definidas. (12)

1.1.5.4 Inflorescencia

La inflorescencia es una espiga compuesta por un raquis (eje escalonado) o tallo central de entrenudos cortos, sobre el cual van dispuestas 20 a 30 espiguillas en forma alterna y laxa o compacta, llevando cada una nueve flores, la mayoría de las cuales abortan, rodeadas por glumas, glumillas o glumelas, lodículos o glomélulas. (12)

1.1.5.5 Granos

Los granos son cariósides que presentan forma ovalada con sus extremos redondeados. El germen sobresale en uno de ellos y en el otro hay un mechón de pelos finos. El resto del grano, denominado endospermo, es un depósito de alimentos para el embrión, que representa el 82% del peso del grano. A lo largo de la cara ventral del grano hay una depresión (surco), una invaginación de la aleurona y todas las cubiertas. (12)

En el fondo del surco hay una zona vascular fuertemente pigmentada. El pericarpio y la testa, juntamente con la capa aleurona, conforman el salvado de trigo. El grano de trigo contiene una parte de la proteína que se llama gluten. El gluten facilita la elaboración de levaduras de alta calidad, que son necesarias en la panificación. (12)

1.1.5.6 Genética

La genética del trigo es más complicada que la de la mayoría de las otras especies de plantas domesticadas. La especie del trigo es un poliploide estable, que tiene más de dos conjuntos de siete cromosomas. Tanto el *Triticum durum* como el *Triticum turgidum* evolucionaron como especies de tetraploides por el cruce natural de dos especies silvestres, *Triticum urartu* y una especie ahora extinta, *Sitopsis*. El trigo común del pan (*Triticum aestivum*) evolucionó como una especie de hexaploide posterior hace aproximadamente 2000 años, después del cruce natural de *Triticum turgidum* y *Aegilops tauschii*. El trigo *escaña* cultivada (*Triticum monococcum*) es Diploide ($2n=2x=14$ cromosomas). (4)

Los trigos Tetraploides (por ejemplo trigo *durum*) son derivados del almidonero silvestre (*Triticum dicoccoides*). El almidonero silvestre es el resultado de una hibridación entre dos hierbas silvestres diploides: *Triticum urartu* y una especie de hierba silvestre, *Aegilops searsii* o *Aegilops speltoides*. La hibridación que generó el almidonero silvestre ocurrió en tierra virgen, mucho antes de su domesticación. Los trigos Hexaploides evolucionaron en campos cultivados. Tanto el trigo dicoccoides como el *durum* hibridaron con otra hierba diploide silvestre (*Aegilops tauschii*) para crear los trigos hexaploides (cromosomas $6x$), *Triticum spelta* y *Triticum aestivum*. (4)

La heterosis o vigor híbrido ocurre en los trigos hexaploides, pero la semilla es difícil de producir en variedades híbridas cultivadas en una escala comercial como con las flores de maíz, porque las flores del trigo son completas y normalmente se autopolinizan. La semilla híbrida comercial del trigo se ha producido utilizando agentes químicos hibridantes, reguladores del crecimiento de la planta que intervienen selectivamente con el desarrollo de polen, u ocurriendo naturalmente en sistemas masculinos citoplasmáticos

de esterilidad. El trigo híbrido ha tenido un éxito comercial limitado en Europa (especialmente en Francia), en los Estados Unidos y en Sudáfrica. (10)

1.1.5.7 Clasificación

A nivel general, el trigo se clasifica de acuerdo a la textura del endospermo, porque esta característica del grano está relacionada con su forma de fraccionarse en la molturación, la cual puede ser vítrea o harinosa, y de acuerdo a la riqueza proteica, porque las propiedades de la harina y su conveniencia para diferentes objetivos, están relacionadas con esta característica. De esta manera, se pueden mencionar las variedades de trigo: *aestivum* (candeal), *aethiopicum*, *araraticum*, *boeoticum* (escaña silvestre), *carthlicum*, *compactum* (club), *dicoccoides* (escanda), *dicoccum* (farro), *durum*, *ispahanicum*, *karamyshevii*, *macha*, *militinae*, *monococcum* (escaña cultivada), *polonicum* (polaco), *repens*, *spelta* (espelta), *sphaerococcum*, *timopheevii*, *turanicum*, *turgidum*, *urartu*, *vavilovii* y *zhukovskyi*. (9)

Los trigos *monococcum*, *dicoccum* y *spelta* son vestidos, es decir, la lema y pálea forman una cubierta que permanece unida al grano después de la trilla. (9)

Los trigos más importantes para el comercio son el *Triticum durum* (utilizado principalmente para pastas y macarrones), el *Triticum aestivum* (utilizado para elaborar pan) y el *Triticum compactum* (se utiliza para hacer galletas). (9)

1.1.6 TIPOS DE TRIGO

1.1.6.1 Trigo duro superior

(*Triticum aestivum*) Compuesta por variedades de trigos duros aptos para pan de alto volumen, con excepcionales características molineras. Esta clase puede ser empleada como corrector en mezclas. Sus granos son vítreos y bien llenos, que se muelen con facilidad, con alto rendimiento de harina de excelente calidad. (39)

1.1.6.2 Trigo blando

(*Triticum compactum*) Produce excelente harina para galletas y bizcochuelos. Baja absorción de agua en el amasado. Niveles máximos de proteína de 10%. (39)

1.1.6.3 Trigo candeal

(*Triticum durum*) Variedades de trigo candeal de buenas características molineras, productoras de sémola de calidad para pasta. Podría garantizarse un nivel mínimo de proteína. (39)

1.1.6.4 Trigo standard

Variedades que no alcanzan los valores mínimos de su clase y partidas con mezcla de clases que se encuadran dentro de los estándares actuales. No se comercializa en base a niveles garantizados de proteína. (39)

1.1.7 PRODUCCIÓN MUNDIAL

En la estimación de Noviembre 2012 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos proyecta una producción mundial de trigo 2012/13 de 651,42 millones de toneladas, aproximadamente 1,6 millones de toneladas menores a lo estimado en Octubre y 44,6 millones de toneladas menores a lo cosechado globalmente en la campaña anterior 2011/12. (34)

1.1.8 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES

El trigo puede crecer en diversidad de latitudes, climas y suelos, aunque se desarrolla mejor en zonas templadas. Debido a esto, es posible encontrar cosechas de trigo en todos los continentes. (Tabla No. 1). (34)

TABLA No. 1 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES Y SUS PRODUCCIONES.

País	Toneladas de trigo
Unión Europea	131,82 millones
China	118,0 millones
India	93,9 millones
Estados Unidos	61,75 millones
Rusia	38,0 millones
Canadá	27,7 millones
Pakistán	23,3 millones
Australia	21,0 millones
Turquía	15,5 millones
Ucrania	15,5 millones
Irán	14,0 millones
Argentina	11,5 millones
Kazajstán	15,0 millones
Egipto	8,5 millones
Uzbekistán	6,7 millones
Brasil	5,0 millones
Otros países	49,75 millones

FUENTE: AGROPANORAMA.COM (2013)

1.1.9 COMERCIO MUNDIAL

El pronóstico más reciente relativo a la producción mundial de trigo en 2012 apuntó a una merma con respecto a 2011, mayor que la indicada en el pronóstico de la FAO publicado en marzo. Según se prevé, en 2012 la producción mundial de trigo descendió en un 3,6 por ciento con respecto a 2011 a 675 millones de toneladas, pronosticándose las disminuciones mayores para Ucrania, seguida de Kazajstán, China, Marruecos y la UE. Las contracciones previstas en la producción mundial coinciden con una ligera merma prevista en la utilización total de trigo en la campaña comercial 2012/13, tras el aumento considerable registrado en su utilización durante la campaña 2011/12, debido principalmente a un crecimiento excepcional de la demanda de pienso. Dada la

recuperación de los suministros de cereales secundarios prevista en la campaña venidera, es probable que la utilización anual de trigo para forraje descienda a niveles más normales. No obstante, después de una beneficiosa reconstitución de las existencias durante la presente campaña, se pronostica que en la venidera las existencias de trigo se contraerán en un 6,5 por ciento a 183 millones de toneladas. El descenso sería incluso más significativo si, como se presagia actualmente, la utilización total de trigo no disminuyera sino que aumentara. Esta perspectiva vale también para las relaciones entre las existencias y la utilización, que descenderían con respecto a sus niveles elevados de la presente campaña, pero se mantendrían todavía en niveles relativamente confortables. En cuanto al comercio mundial de trigo en 2012/13, se pronostica que, después del aumento de casi un 8,7 por ciento registrado en 2011/12, se contraerá en alrededor de un 1,7 por ciento debido a un debilitamiento de la demanda de importaciones, especialmente de trigo forrajero. Como consecuencia, no obstante la merma prevista en la producción mundial de trigo, la presión sobre el aumento de los precios puede disminuir. Todo parece indicar que también pesará sobre los mercados mundiales la abundancia de los suministros exportables, de suerte que, si en los meses venideros no se producen crisis importantes imprevistas a nivel de la oferta, es probable que los precios internacionales sean, por término medio, más bajos que en 2011/12. (15)

1.1.10 EL TRIGO EN EL ECUADOR

El trigo (*Triticum aestivum L.*), junto con el arroz, el maíz y la cebada, son los cereales de mayor importancia en Ecuador. El consumo nacional de trigo supera las 450 000 tm/año, resultando en un consumo per cápita superior a 30 Kg/año. El Ecuador importa el 98% de los requerimientos internos de trigo y tan solo un 2% (9000 tm) es producido a nivel local. (27)

Por otra parte, el Ecuador registra la productividad más baja de Latinoamérica con 0.7 t/ha, mientras que, el rendimiento promedio mundial es superior a 1.3 t/ha y en países desarrollados ubicados en latitudes altas los rendimientos registrados alcanzan las 6.0 t/ha. (27)

En 1960 el área destinada a la producción de trigo fue 100 000 ha y en 1970 se redujo a 75 000 ha. La reducción continuó en los años subsiguientes, registrándose en 1980 una superficie de 31 000 ha. Para el año 2006, el área dedicada a la producción de trigo no superó las 10 000 ha. Mientras que en 2009 se registra un incremento en la superficie, 13 000 ha. El INIAP estima que en los años 2010 – 2012 la superficie de trigo alcanzó las 15 000 ha. (27)

Cabe señalar, que el área de producción de trigo en Ecuador está distribuida a lo largo del callejón interandino, en zonas comprendidas entre los 2 000 y 3 200 metros de altura. No se pueden establecer zonas específicas de producción, pues las condiciones ambientales para cultivar el trigo se dan por igual en toda la sierra, sin embargo las provincias de Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar, Cañar y Loja registran el mayor aporte de grano a la molienda y a mayor superficie sembrada. (27)

1.1.11 CONSUMO DE TRIGO

El trigo generalmente es molido como harina para su utilización. Un gran porcentaje de la producción total de trigo es utilizada para el consumo humano en la elaboración de pan, galletas, tortas y pastas, otro tanto es destinado a alimentación animal y el restante se utiliza en la industria o como simiente (semilla), también se utiliza para la preparación de aditivos para la cerveza y otros licores. (8)

1.1.12 ENFERMEDADES DEL TRIGO

El trigo es susceptible a más enfermedades que cualquiera de los demás granos, en las estaciones húmedas las pérdidas más grandes se producen debido a la patología de otros cereales que afecta a la planta de trigo. (27)

La planta de trigo puede ser afectada principalmente por enfermedades provenientes de bacterias, hongos, parásitos o por virus. El trigo además puede sufrir del ataque de insectos en la raíz; también puede sufrir del ataque de plagas que afectan principalmente la hoja o la paja (cascarilla del grano), y que finalmente privan al grano del alimento

suficiente; con mayor gravedad puede ser afectado por la Fusariosis, que es un efecto de la presencia de moho en la espiga, la cual se manifiesta principalmente en la decoloración de la planta y la Septoriosis, que es un hongo que aparece en las semillas y se extiende a las hojas y el tejido verde de la planta. (28)

En su almacenamiento, el grano de trigo puede ser atacado por cuatro tipos de plagas: los insectos (gorgojos y polillas), los microorganismos (hongos y bacterias por efecto de la temperatura y la humedad), los roedores y los pájaros, cualquiera de ellos puede contaminar el producto e impedir su consumo. (28)

Las enfermedades más importantes en la Sierra de Ecuador que pueden atacar al trigo son: Roya amarilla o lineal (*Puccinia striiformis*), Roya de la hoja (*Puccinia triticina*), Fusarium de la espiga (*Fusarium spp.*) y Carbón volador (*Ustilago tritici*). (27)

1.1.12.1 Roya amarilla o lineal

Es producida por el hongo *Puccinia striiformis* que aparece formando líneas amarillas en las hojas, paralelas a las nervaduras. Estas líneas están conformadas de pústulas producidas por el mismo hongo. La enfermedad se manifiesta a partir de 70 – 90 días después de la siembra. La roya amarilla también ataca a la espiga. A esta enfermedad también se la conoce como “polvillo” o “royal” y se desarrolla a temperaturas entre 10 y 15°C, con una elevada humedad ambiental ocasionada por lluvia o rocío. (27)

1.1.12.2 Roya de la hoja o parda

Es producida por el hongo *Puccinia triticina* cuyo síntoma principal es la presencia de pequeñas pústulas aisladas con esporas de color anaranjado, ubicado sobre las láminas foliares. En infecciones fuertes se observan también sobre las vainas de las hojas. El desarrollo y diseminación de la roya de la hoja es favorecida por ambientes húmedos y temperados. (27)

1.1.12.3 Fusarium de la espiga

Es producido por varias especies de hongo *Fusarium spp.* durante la antesis se infectan los ovarios y dicha infección es favorecida por un clima cálido y húmedo durante la formación de las espigas y después de ella. Estos hongos se encuentran en el suelo y en los restos de cultivos. Esta enfermedad tiene importancia económica porque reduce la producción más de un 50% y también reduce la calidad del grano. Además, si el grano cosechado tiene más de un 5% de granos infectados puede tener toxinas (Deoxinivalenol) suficientes para ser nocivo para el hombre y los animales. (27)

1.1.12.4 Carbón volador

Es producido por el hongo *Ustilago tritici*, provocando que toda la espiga, excepto el raquis, sea reemplazado por masas de esporas de carbón. Estas esporas son arrastradas por el viento y caen sobre las flores de las plantas de trigo, donde germinan e infectan el embrión. Ahí permanecen en latencia hasta que el grano comienza a germinar. Los climas frescos y húmedos que alargan la floración, favorecen la infección y el desarrollo de esta enfermedad. (27)

1.1.13 VALOR NUTRICIONAL Y POTENCIAL

Para el consumidor común el trigo evoca una imagen convencional, la de un cultivo con el que siempre se ha manufacturado el pan y otros alimentos de consumo cotidiano. Por otra parte, es habitual que las dietas sobre todo aquellas basadas en un bajo consumo de carbohidratos recomienden limitar el consumo de pan y otros farináceos para controlar el peso corporal. Investigaciones recientes acerca del papel que juegan en la salud tanto la fibra dietética como los antioxidantes que contienen, podrían hacer cambiar esta visión si se revaloriza el rol del trigo y sus derivados en la dieta. A la vez, la demanda por calidad nutricional en los alimentos, impulsada por una población cada vez más consciente de lo que consume, puede ser la base para el desarrollo de negocios que aprovechen las cualidades funcionales del trigo, hasta hoy poco difundidas y durante largo tiempo subestimadas. (22)

1.1.13.1 Fibra dietética del grano

La fibra dietética, constituida por carbohidratos no digeribles y lignina presentes naturalmente en la dieta de origen vegetal, ha recibido creciente atención por los numerosos efectos saludables que acarrea su consumo habitual. Varios estudios afirman que la fibra dietética insoluble no solo aumenta el volumen de las deposiciones y regula el tránsito intestinal; también causa una disminución de la absorción de lípidos e interfiere con la circulación enterohepática de sales biliares, lo que contribuye a disminuir los niveles de colesterol. (22)

Por otra parte, la fibra dietética soluble aumenta la viscosidad del contenido intestinal, lo que retarda la absorción de carbohidratos y contribuye a disminuir los índices glicémico e insulinémico de la dieta. También, proporciona un sustrato fermentable para la microflora intestinal, lo que estimula su crecimiento y con ello la producción de ácidos grasos de cadena corta, que son el principal sustrato para las células de la mucosa intestinal. (22)

Se estima que la suma de los efectos descritos contribuye a disminuir la probabilidad de desarrollo de ciertos tipos de cáncer, enfermedad coronaria, diabetes y obesidad, efectos beneficiosos observados en poblaciones que consumen altos niveles de fibra dietética. Los granos de los cereales son ricos en fibra dietética, pero como ésta se localiza principalmente en la cáscara, el consumo de granos refinados, por ejemplo harina blanca de trigo, aporta a las personas solo una fracción de la fibra presente en el grano entero (Tabla No. 2). En el trigo predomina la fibra dietética de tipo insoluble, y sus efectos beneficiosos en la fisiología del aparato digestivo han sido demostrados por distintos estudios. (22)

TABLA No. 2 COMPOSICIÓN TÍPICA DE MACRO Y MICRO ELEMENTOS DEL GRANO DE TRIGO Y SU DISTRIBUCIÓN EN DISTINTOS PRODUCTOS DE MOLIENDA.

NUTRIENTE	UNIDADES /100 g	GRANO	HARINA DE GRANO ENTERO	REFINADA	CÁSCARA
ANÁLISIS PROXIMAL					
Proteínas	g	12,6	13,7	9,7	15,6
Almidón	g	62,4	60,0	58,9	14,1
Lípidos	g	1,54	1,87	1,48	4,25
Cenizas	g	1,57	1,60	0,58	5,79
Fibra Dietética	g	12,2	12,2	5,5	42,8
MINERALES					
Hierro	mg	3,19	3,88	1,26	10,57
Magnesio	mg	126	138	25	611
Fósforo	mg	288	346	107	1.013
Potasio	mg	363	405	149	1.182
Zinc	mg	2,65	2,93	1,02	7,27
Cobre	mg	0,43	0,38	0,19	1,00
Selenio	mg	71	71	15	78
VITAMINAS					
Tiamina	mg	0,38	0,45	0,19	0,52
Riboflavina	mg	0,12	0,22	0,07	0,58
Niacina	mg	5,46	6,37	1,20	13,58
Vitamina B6	mg	0,30	0,34	0,04	1,30
Folato	µg	38	44	31	79
Vitamina A	IU	9	9	0	9
Vitamina E	mg	1,01	0,82	0,05	1,49
Vitamina K	µg	1,90	1,90	0,30	1,90
ÁCIDOS GRASOS					
Saturados	g	0,27	0,32	0,30	0,63
Monoinsaturados	g	0,20	0,23	0,19	0,64
Poliinsaturados	g	0,63	0,78	0,85	2,21
CAROTENOIDES					
Luteína + Zeaxantina	µg	220	220	18	240

FUENTE: ZUÑIGA, 2006

1.1.13.2 Actividad antioxidante del grano

Los radicales libres son un subproducto normal del metabolismo celular. Pero si no son inactivados por los mecanismos de defensa celulares, pueden provocar daño por oxidación a diversas moléculas como el ADN, proteínas y lípidos de membranas. La pérdida de equilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad para neutralizarlos ha sido implicada en muchas enfermedades crónicas, entre otras aterosclerosis, cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cataratas, enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal y asma. Los antioxidantes dietéticos pueden retrasar o inhibir el daño por oxidación causado por los

radicales libres y, en consecuencia, reducir el riesgo de enfermedades asociadas al envejecimiento y promover una buena salud, cuando son consumidos de manera sostenida desde etapas tempranas de la vida. (22)

Aunque se ha promovido el consumo de frutas y verduras como fuentes de antioxidantes, no son los únicos alimentos que los poseen. Cereales como el maíz y el trigo, y alimentos elaborados con estos granos, son ricos en antioxidantes y poseen actividades comparables a las de frutas y verduras (Tabla No. 3). (22)

TABLA No. 3 ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES TÍPICAS DE ALGUNOS ALIMENTOS ELABORADOS CON GRANO ENTERO DE CEREALES, FRUTAS Y VERDURAS.

PRODUCTO	PORCIÓN (g)	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (Eq. Trolox/porción)
Cereales desayuno con grano entero	41	1,150
Vegetales	120	540
Frutos	120	1,440
Pan con grano entero	50	1,000

FUENTE: ZUÑIGA, 2006

Las sustancias con actividad antioxidante identificadas en el grano de trigo incluyen derivados del ácido hidroxicinámico (DAH), flavonoides, carotenoides, tocoferoles, tocotrienoles, ácido fítico y selenio. Aunque difieren en abundancia y actividad antioxidante, la característica común es su localización en el pericarpio y aleurona del grano, componentes de la cáscara o salvado, lo que determina su virtual ausencia en las harinas refinadas. (22)

En trigo, como en otros cereales, destaca por su abundancia el ácido ferúlico, un DAH que puede llegar a constituir el 90% de los DAH totales y explicar hasta un 75% de la actividad antioxidante total. (22)

Destaca el vínculo entre la fibra dietética y los antioxidantes naturales de los cereales. En trigo, más del 90% del ácido ferúlico del grano se encuentra unido químicamente al arabinosilano, un polímero estructural presente en las paredes celulares, que a la vez es

parte de la fibra dietética. Por esta razón se ha sugerido que, al menos parte de la función protectora contra enfermedades que posee la fibra dietética, se asocia a su contenido de antioxidantes. (22)

1.1.13.3 Harinas con más fibra y antioxidantes

El trigo se consume principalmente en la forma de productos que contienen harina blanca de un máximo de 78% de extracción. Aunque el contenido de fibra dietética en estas harinas no es muy alto, su consumo todavía representa una fuente muy importante de fibra dietética para la población, aportando entre el 40 y el 54% de la ingesta diaria promedio. Si bien esta contribución es significativa, el consumo de fibra dietética en nuestro país es inferior a lo recomendado internacionalmente. El aporte de fibra dietética de las harinas sería mayor si el trigo se moliera a tasas de extracción superiores, de modo que parte o toda la cáscara, o incluso el grano entero, se incorporaran al producto. (22)

Cantidades importantes de antioxidantes entrarían en la dieta de los consumidores, quienes se beneficiarían de todo el potencial nutritivo y funcional del trigo. Las principales limitantes para la fabricación de estas harinas con más cáscara, son su tono oscuro y sabor ligeramente más amargo que el de las harinas corrientes. La mayoría de los consumidores, ante la posibilidad de escoger, optan generalmente por una harina más blanca. El sabor puede ser muy importante en la aceptación por parte de los niños. El matiz oscuro y el gusto amargo se atribuyen a los pigmentos presentes en la cáscara de los granos de color marrón o rojo oscuro, característica que predomina en las variedades de trigo cultivado. Otro factor asociado al color oscuro en las harinas de alta extracción es la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO), localizada igualmente en la cáscara del grano. La mayor parte de las variedades de trigo poseen alta actividad de esta enzima. (22)

1.1.13.4 El trigo blanco y su potencial

El trigo blanco es trigo harinero cuya cáscara carece de pigmentos y posee muy bajos niveles de la enzima PPO. De su molienda se obtienen harinas de alta extracción más

blancas y con un sabor más agradable que aquellas fabricadas con las mezclas comunes. No obstante que su color de grano es la cualidad más reconocible, por sí sola no basta, características como la textura del grano, la cantidad de proteína (albúmina, prolamina, globulina y gluteínas), fuerza del gluten y la actividad alfa-amilasa, entre otras, determinarán la funcionalidad de cada lote de trigo blanco cosechado. (22)

La disponibilidad de harina de alta extracción a partir de trigo blanco, permitirá a la industria de alimentos elaborar un rango importante de productos con más fibra y antioxidantes, como panes, barras de cereal, cereales para el desayuno, galletas, snacks, raciones escolares, tortillas y otros. (22)

1.1.13.5 Diferenciar al trigo

Los productores y la industria molinera podrían adoptar el trigo blanco como alternativa para diferenciar la producción respecto del trigo corriente o "commodity", y así acceder a mercados especializados de mayor valor. Naturalmente, ello implica asumir desafíos. La experiencia de otros países indica que puede haber dificultades con el abastecimiento inicial de molinos si no se pone a disposición del medio un número adecuado de buenas variedades de trigo blanco. (22)

Estas variedades deben alcanzar rendimientos y niveles de calidad industrial no menores a los que poseen los trigos "commodity", de manera que tanto productores como molineros tengan buenos motivos para elegirlos. (22)

En segundo término, y aunque será el mercado el que determine si existe un valor "premium" para el trigo blanco, es necesario estudiar mecanismos de comercialización como la producción bajo contrato, a fin de ofrecer incentivos para llevar la producción a niveles competitivos. (22)

La asociación entre molinos y organizaciones de productores parece ser la mejor fórmula, porque asegura tanto el abastecimiento del molino como la certeza de compra para el productor. En tercer lugar, mientras que el manejo agronómico no es diferente al del trigo

común, los agricultores y molineros deberán incorporar la práctica de segregar el grano, requerida para preservar el valor de la materia prima a través de la cadena de producción y procesamiento. (22)

La presencia de trigo rojo voluntario, o la mezcla de trigos rojos y blancos a la cosecha, almacenaje, transporte o molienda, provocan pérdida de valor. (22)

1.1.13.6 Variedades en el Ecuador

El INIAP ha generado algunas variedades mejoradas de trigo adaptadas para las condiciones agrícolas de la sierra de Ecuador. Se encuentran vigentes, INIAP-Chimborazo 78, INIAP-Cojitambo 92, INIAP-Zhalao 2003, INIAP-Vivar 2010, INIAP-San Jacinto 2010, INIAP-Mirador 2010, que presentan características de resistencia a enfermedades, con alto rendimiento y calidad industrial. (27)

1.1.13.7 Semilla Mejorada

Los científicos del CIMMYT generan líneas mejoradas de maíz y trigo que contienen resistencia a los factores bióticos y abióticos que limitan la producción en los diversos ambientes del planeta y mejor calidad nutricional e industrial. La semilla mejorada se envía a las instituciones de investigación internacionales que la soliciten. Después de que estos materiales son ensayados, los cooperadores mandan al CIMMYT datos sobre su comportamiento, los cuales se utilizan para continuar el trabajo de mejoramiento. El CIMMYT proporciona las líneas de su trabajo de investigación conforme a los términos y condiciones del Acuerdo Normalizado de Transferencia de Materiales del Tratado Internacional sobre los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. (36)

1.2 MICOTOXINAS

Son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por diferentes géneros y especies de hongos, llegando a contaminar cereales y otros productos alimenticios, provocando enfermedades e inclusive la muerte. Estos metabolitos secundarios no son

necesarios para el crecimiento o reproducción del hongo en cuestión, a diferencia de los metabolitos primarios, pero le confieren al hongo ventajas selectivas, como aumentar la habilidad para competir con otros microorganismos por el sustrato e incrementar la capacidad parásita para infectar al hospedador, siendo muy activas frente a plantas (fitotoxinas), animales (micotoxinas), y microorganismos (antibióticos) inhibiendo su crecimiento e incluso produciendo su muerte cuando compiten con éstos por los nutrientes y por el hábitat. Por lo tanto las micotoxinas se constituyen en un factor de riesgo para la sanidad humana y animal. (31)

La mayoría de las micotoxinas de importancia agrícola son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, y *Alternaria*. Estos géneros causan grandes pérdidas económicas en los cultivos de cereales y en procesos de alimentación. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que entre 10 y 30% de los granos cosechados se pierden debido a la infección por hongos y que aproximadamente un 25% de los cultivos de cereales del mundo están contaminados por micotoxinas. (31)

El grado de infección de los hongos que colonizan cereales en campo dependerá de varios factores, por ejemplo la temperatura, la humedad, la precipitación durante antesis y pos-cosecha, el tratamiento de suelo y la rotación de cultivos. Los hongos crecen sobre materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos, forman metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas y/o animales. Estos metabolitos que enferman o matan a los animales que los consumen se conocen como micotoxinas, y la afección se llama micotoxicosis. (6) (31)

Las características de una micotoxicosis son:

- No es una enfermedad transmisible.
- En los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del moho.
- El brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje específico.

- El examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica. (6)

La presencia de las micotoxinas en los vegetales puede deberse:

- A la infección de la planta en el campo por el hongo patógeno o la colonización de las hojas por los saprobios.
- Al crecimiento de los mohos saprobios o patógenos post-cosecha sobre los frutos y granos almacenados.
- Al desarrollo fúngico saprobio durante el almacenamiento de los materiales ya procesados. (6)

1.2.1 HISTORIA

Las enfermedades producidas por la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas se denomina micotoxicosis primaria, producida por el consumo directo de productos directamente contaminados por el hongo, la micotoxicosis secundaria es producida por el consumo de productos indirectamente contaminados por el hongo, pero a los que han llegado las micotoxinas a través de la cadena alimentaria, como la carne y leche. (31)

Los primeros casos de micotoxicosis conocidos fueron debidos al centeno contaminado con *Claviceps purpurea*, en la Edad Media. En la Argentina, Quevedo describió la acción de los metabolitos tóxicos de un *Aspergillus* del maíz sobre varias especies animales. Pero la intoxicación masiva de pavos en Inglaterra llevó al estudio de las Aflatoxinas en 1960, llamadas así pues son producidas por especies del grupo *Aspergillus flavus*. (6)

1.2.2 HONGOS EN EL CAMPO Y EL ALMACENAMIENTO

Los hongos que deterioran los productos vegetales pueden ser adquiridos en el campo como por ejemplo *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* y otros, además de los fitopatógenos. Las especies difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica. Requieren una humedad relativa ambiente del 90 - 100% y un contenido de agua en las

semillas de 22 - 23%, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30°C, aunque algunos pueden crecer a 35°C o más. (4) (6)

La colonización de las partes aéreas de las plantas por los microorganismos comienza tan pronto como son expuestas al aire. Las bacterias suelen aparecer primero, luego las levaduras y finalmente los hongos filamentosos saprobios y patógenos. Los mohos continúan desarrollándose a lo largo de todo el crecimiento de la planta, y se acentúa cuando la planta envejece y las semillas maduran. La cosecha perturba el ecosistema y las condiciones relativamente estables de almacenamiento entrañan un profundo cambio en la composición de la microbiota. (6)

Los hongos abandonados en el campo suelen albergar esclerocios, como en el caso de *Aspergillus flavus*, que serán la fuente de contaminación del cultivo en la temporada siguiente. (6)

El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfigurán el aspecto de frutas y hortalizas. En los granos de cereales los hongos persisten solamente si el grano está suficientemente seco como para evitar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente. (6)

Otros hongos presentes en los productos almacenados son especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos xerófilos. Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de agua del producto almacenado, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento, la actividad de insectos y ácaros. Requieren menor humedad relativa ambiente (70 - 90%) y contenido de agua en los granos (15 - 20%), pero el rango de temperatura es más amplio (0 - 45°C) y puede crecer a menor concentración de oxígeno. (6)

La microbiota sobre y dentro de los vegetales afecta la calidad, el comportamiento durante el estacionamiento y el procesamiento. Las poblaciones mixtas de microorganismos que se encuentran naturalmente suelen constituir una desventaja competitiva para la producción de micotoxinas. Cuando el contenido de agua aumenta, el

crecimiento se vuelve más vigoroso, conduciendo a un calentamiento espontáneo del substrato y al desarrollo de especies de mohos termotolerantes, frecuentemente acompañados por actinomicetos termófilos. (6)

1.2.3 PRODUCCIÓN

El metabolismo primario de los hongos es similar al de la mayoría de organismos eucarióticos. Los metabolitos secundarios son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones sub-óptimas y estrés. (6)

Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia previa del desarrollo del hongo. La formación de micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y a veces morfológica. Se conocen unas 300 toxinas fúngicas. (6)

Las micotoxinas son específicas, cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios más restringido es el número de especies de hongos productores de micotoxinas. Las esporidesminas son producidas solamente por *Pithomyces chartarum*. La Aflatoxina B1 es producida por tres especies estrechamente relacionadas *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* y *A. flavus*. La Patulina es producida por unas once especies de *Penicillium*, tres de *Aspergillus* y dos de *Byssoschlamys*. (6)

La variabilidad en la producción de metabolitos secundarios por una especie dada es enorme. *Penicillium roqueforti* produce algunas micotoxinas en las condiciones de laboratorio pero no en los quesos madurados. Los rendimientos de toxina T-2 por cepas de *Fusarium sporotrichioides* varían considerablemente cuando crecen en el laboratorio, y no todas las cepas de *A. flavus* son aflatoxinogénicas. (6)

Por otra parte, la temperatura tiene una gran influencia sobre el crecimiento y la actividad de los hongos. El género *Aspergillus* es más común en los trópicos, *Fusarium* está asociado con los climas fríos y *Penicillium* predomina en las zonas templadas. La

temperatura a la cual el material amohosado es incubado en el laboratorio puede influir en la microbiota aislada a continuación, la incubación a 12°C puede favorecer el aislamiento de *Penicillium verrucosum* de un substrato con Ocratoxina A, donde predomina el género *Aspergillus*. Un estrés por sequía, durante el período del crecimiento del maní puede conducir a la presencia de Aflatoxinas, si la temperatura de la geocarpósfera se mantuvo entre 20 y 32°C durante las seis semanas anteriores a la cosecha. (6)

Aunque el crecimiento de *P. verrucosum* ocurre entre 0 y 31°C a una $a_w = 0,95$, la producción de Ocratoxina sólo se detecta si el rango de temperatura fue 12 - 24°C, siendo la máxima a 20°C y $a_w = 0,85$. *Alternaria alternata* produce la máxima concentración de Alternariol sobre granos de trigo a 25° C con una $a_w = 0,98$, pero la producción óptima de ácido tenuazóico por *Alternaria tenuissima* ocurre a 20°C con un contenido de humedad más elevado. Por otra parte, *Fusarium graminearum* produce la mayor cantidad de Zearalenona a 25°C y de Deoxinivalenol a 28°C a una $a_w = 0,98$. (6) (10)

También influye el pH del substrato, así la producción de Patulina en manzanas debida a *Penicillium expansum* se produce en un rango de pH 3,2 - 3,8, mucho más estrecho que aquel en que hay un crecimiento activo. (6)

1.2.4 PRINCIPALES MICOTOXINAS

Las principales micotoxinas por sus implicaciones en la salud humana y animal son:

1.2.4.1 Aflatoxinas (AF)

Producidas por hongos del género *Aspergillus* spp., dentro del grupo de Aflatoxinas la de mayor importancia en salud pública es la Aflatoxina B1 (AFB₁), ésta se relaciona con el desarrollo de carcinoma hepatocelular en poblaciones que consumen alimentos contaminados. Su mecanismo de acción tóxica, involucra la formación de ligandos entre uno de sus metabolitos, producido en el hígado luego de la ingestión de la toxina, con el

ADN de los hepatocitos, causando alteraciones en su replicación, está clasificada dentro del grupo I según la IARC, por su efecto carcinogénico para humanos y animales. (24)

El carcinoma hepatocelular es una de las causas de muerte por cáncer en especial en regiones de Asia y África, originándose estudios epidemiológicos que buscan correlacionar la presentación del carcinoma con el consumo de Aflatoxinas y la interacción es éstas con otras enfermedades hepáticas. (24)

La AFM₁, se origina en el hígado de los mamíferos luego del consumo de alimentos contaminados con AFB₁. Está clasificada según la IARC dentro del grupo 2B como posible carcinógeno para humanos, este metabolito se excreta en la leche y puede ser ingerido por los humanos al consumir este alimento contaminado, siendo la población infantil la más expuesta. Aunque es claro que el órgano blanco de las Aflatoxinas es el hígado, se han encontrado evidencias de inmunosupresión por exposición a estas micotoxinas. (24)

1.2.4.2 Ocratoxina A (OTA)

Es producida por hongos de los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., la distribución de esta micotoxina es mundial, contaminando sustratos como cereales, café, vino, jugo de uva y cerveza. La inhibición de la síntesis de proteína se ha definido como el mecanismo de toxicidad primario de OTA, se da por la inhibición competitiva de fenilalanina-tARNPhe sintetasa, que detiene la elongación del péptido. (24)

Según la IARC la OTA se encuentra dentro del grupo 2B por ser posible carcinógeno para humanos. Se ha encontrado relación entre el consumo de alimentos contaminados con OTA y la nefropatía endémica de los Balcanes y nefropatía porcina, determinando que el órgano blanco es el riñón. Los efectos sobre el sistema inmune han sido evaluados observándose inmunosupresión marcada después de la administración oral de OTA. (24)

1.2.4.3 Fumonisin (FN)

Son producidas por *Fusarium verticillioides*, fueron descubiertas en 1988. Se ha relacionado la Fumonisina B₁ (FNB₁) con la presentación de cáncer esofágico en humanos, leucoencefalomalacia en equinos y edema pulmonar porcino entre otros. (24)

Su distribución es mundial, siendo el maíz el cultivo más afectado. El mecanismo de acción tóxica de las fumonisin involucra la inhibición de la enzima ceramida sintetasa, generando un acúmulo de las bases esfingoides y una disminución de los esfingolípidos complejos. Se encuentra clasificada según la IARC dentro grupo 2B. (24)

1.2.4.4 Zearalenona (ZEA)

Es una lactona ácida resorcílica producida por diferentes especies del género *Fusarium* spp. Es una micotoxina de distribución mundial y los principales sustratos afectados son trigo, maíz, sorgo, cebada y piensos. (24)

La capacidad de la ZEA para acoplarse a los receptores del 17-β-estradiol ha determinado la acción tóxica de esta micotoxina, que compite con los estrógenos por los receptores citosólicos de las células de los órganos blanco y se une a estos, comportándose como un disruptor endócrino. En humanos se ha relacionado el consumo de ZEA con la presentación de pubertad precoz en niñas y aumento del tamaño de los órganos reproductores en niños. (24)

1.2.4.4 Patulina (PN)

Es una micotoxina producida por varias especies de *Penicillium* principalmente el *P. expansum*, de igual forma algunas especies de *Aspergillus* y *Byssochyllum* pueden también producir Patulina. Se puede encontrar como contaminante natural en manzanas, peras, albaricoques, melocotones, uvas y otras frutas con zonas empodrecidas, zumos y compotas de fruta y quesos. El principal síndrome que provoca es el neurotóxico afectando al sistema nervioso, puede haber también hepatotoxicosis y nefrotoxicosis así

como carcinomas. Se han dado casos de náuseas y vómitos. Además se ha demostrado que esta micotoxina es inmunosupresiva. (24)

1.2.4.5 Tricotecenos

Los tricotecenos (Figura No. 1) son toxinas que pertenecen al grupo de compuestos químicos cercanos entre sí producidos por varias especies de *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* y *Stachybotrys*. Se han detectado cuatro tricotecenos (Toxina T-2, Nivalenol, Deoxinivalenol, y Diacetoxiscirpenol) (Tabla No. 4) como contaminantes naturales en un pequeño número de muestras alimentarias. Los tricotecenos son inhibidores fuertes de la síntesis de proteínas en las células de mamíferos. Sin embargo, el Deoxinivalenol recibe su nombre común, vomitoxina, por los vómitos que normalmente acompañan en envenenamiento por tricotecenos. (42)

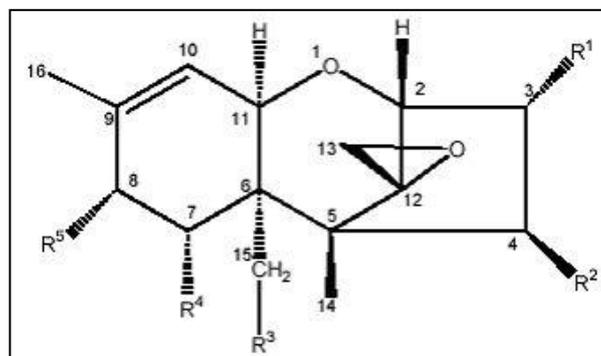


FIGURA No. 1 ESTRUCTURA QUÍMICA BÁSICA DE LOS TRICOTECENOS

TABLA No. 4 PRINCIPALES TRICOTECENOS Y SUS GRUPOS FUNCIONALES.

Trichothecene	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Type A</i>					
HT-2 toxin	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 toxin	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxyscirpentriol	OH	OAc	OAc	H	H
<i>Type B</i>					
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	O
3-acetyl- deoxynivalenol	OAc	H	OH	OH	O
15-acetyl- deoxynivalenol	OH	H	OAc	OH	O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	O
Fusarenon X	OH	OAc	OH	OH	O

El Deoxinivalenol (DON) es, probablemente, el tricoteceno que más frecuentemente se detecta, y la toxina es producida por *F. graminearum* y *F. culmorum*. Las dos especies de *Fusarium* son patógenos vegetales, y causan brotes de golpe blanco del trigo. Los brotes más serios de la enfermedad ocurren en años con lluvias intensas durante la estación de florecimiento. (38)

Se encontró DON en productos a base de trigo y de maíz, como por ejemplo en harina, pan y cereales para el desayuno. Las concentraciones de DON en muestras de cereales aleatorias mostraron una gran variación anual, con concentraciones que variaban desde por debajo de los límites de detección 5-50 µg/kg hasta más de 30 mg/kg. (38)

El Nivalenol es más común en Europa, Australia y Asia que en América. Los niveles tanto de cantidad media como de incidencia de muestras positivas en Nivalenol son más bajas que las de DON. La toxina T-2 se ha encontrado en muchos productos diferentes, pero normalmente en cantidades muy pequeñas. (38)

Se ha informado en Rusia de un posible papel de los tricotecenos en la enfermedad humana Aleukia Tóxica Alimentaria (ATA). La enfermedad ha sido seguida desde el siglo XIX, y se dio un brote fuerte en el distrito de Orenburg durante 1942-1947 donde 100 000 personas murieron. La enfermedad se atribuyó al consumo de trigo almacenado al aire libre, infectado con *Fusarium*. La enfermedad se caracterizaba por causar puntos en la piel, angina necrótica, leucopenia extrema, múltiples hemorragias y agotamiento de la médula ósea. Más tarde se vio muestras aisladas de *Fusarium sporotrichioides* y *F. poae* de trigo, producían toxina T-2 y estaban relacionadas con los tricotecenos, también se observaron síntomas similares a los que mostraban los pacientes que sufrían ATA, en animales expuestos a dosis tóxicas y agudas de toxina T-2. Los tricotecenos también se han asociado a brotes de desórdenes gastrointestinales humanos en Japón. (38)

1.3 DEOXINIVALENOL

1.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Llamado también DON, químicamente se denomina 12, 13 – epoxi - 3 α , 7 β , 15 trihidroxitricotec – 9 – ene – 8 – ona (Figura No. 2). Su peso molecular es de 296.3 gmol⁻¹ y corresponde a la fórmula molecular C₁₅H₂₀O₆. Cristaliza como agujas sin color con un punto de fusión de 151 – 153°C. Fue aislado y caracterizado de hongos procedentes de maíz en Japón. Posee dos derivados acetilados, 3-acetildesoxidivalenol (3-AcDON) un compuesto de fórmula molecular C₁₇H₂₂O₇ y punto de fusión entre 185 - 187°C y 15-acetildesoxinivalenol (15-AcDON) cuya fórmula molecular es C₁₇H₂₂O₇ y puntos de fusión entre 138 - 140°C. (31)

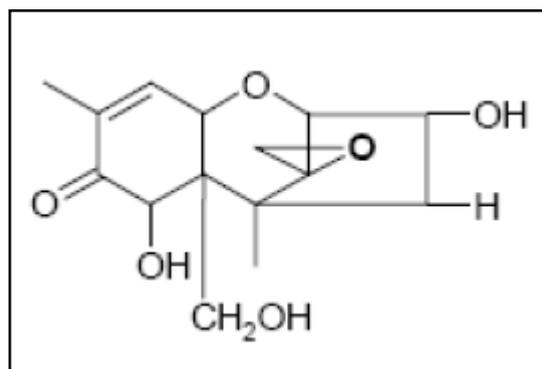


FIGURA No. 2 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DEOXINIVALENOL

Ambos metabolitos son solventes en metabolitos orgánicos polares como el acetonitrilo, metanol, y acetato de etilo, ligeramente solubles en agua y cloroformo. (31)

Es producido especialmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*. Este último tiene un crecimiento óptimo a 21°C y se encuentra principalmente en Escandinavia y Norte de Europa, mientras *F. graminearum* tiene un crecimiento óptimo a 25°C y se encuentra en mayor extensión en climas más cálidos, por ejemplo Norte América, China y Japón. (31)

El Deoxinivalenol, es probablemente la micotoxina más común producida por algunas especies de *Fusarium*, contamina diversos cereales como el trigo, maíz, arroz, centeno,

cebada y granos procesados como cereales de desayuno, aperitivos extrusionados y fritos, malta, cerveza y pan, tanto en países desarrollados como en desarrollo. (31)

Debido a los brotes de síndromes eméticos en el ganado ocasionados por la presencia de Deoxinivalenol en los piensos, se conoce vulgarmente con el nombre de Vomitoxina. Químicamente pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos y en concreto a los de tipo B, que se caracterizan por tener un carbonilo en el carbono 8. Es un componente muy estable durante el almacenamiento, molienda y procesado para la obtención de alimentos, es estable a 121°C, moderadamente estable a 180°C y parcialmente estable a 210°C. Se logra una completa inactivación a 370°C por 10 minutos, o a 205°C por 30 minutos. Se mantiene estable bajo condiciones ligeramente ácidas y la inactivación química se logra con una solución de hipoclorito de sodio al 3–5%. (31)

1.3.2 RELACIÓN DE DON Y ENFERMEDADES DEL TRIGO

Existe una correlación directa entre la incidencia del FHB y la contaminación de trigo con DON. Asimismo, la presencia de esta enfermedad en los cultivos está fuertemente relacionada con la humedad existente durante el período de floración (anthesis) y con la duración del periodo de lluvias. La distribución geográfica de ambos agentes etiológicos depende de la temperatura: *F. graminearum* crece a una temperatura óptima de 25°C ($a_w > 0.88$) y *F. culmorum* crece a una temperatura óptima de 21°C ($a_w > 0.87$). Se ha detectado DON como contaminante de trigo, cebada, avena, centeno y maíz, que conforman las dos terceras partes de la producción mundial de cereales, y con menor frecuencia se encuentra contaminando arroz, sorgo y triticale. (8) (20)

La capacidad productora de estas micotoxinas está estrechamente correlacionada con el nivel de agresividad medido. Sin embargo, la resistencia de un cultivo es influenciado significativamente por la producción de DON. En los genotipos más resistentes, la contaminación de la toxina se mantiene cerca de cero, mientras que los mismos aislados en inóculos, dan niveles de toxina muy altos en los cultivos susceptibles. Los niveles de toxinas se correlacionaron con la proporción de granos dañados por *Fusarium*, esta proporción es muy baja en cultivos altamente resistentes, la conclusión es que el nivel de

resistencia es más importante en la trayectoria de la acumulación de DON en un cultivo dado que en la agresividad de un aislado. En cultivos susceptibles, la capacidad de producción de DON es decisiva, pero en la resistencia de los cultivos altamente resistentes es el principal factor en el desarrollo de la enfermedad de la supresión y la acumulación de DON. En diferentes años, los valores de FDK (*Fusarium damaged kernels*) se asociaron con diferentes concentraciones de DON y esto depende en gran medida de la precipitación hacia finales de mayo, en el momento de la inoculación. (25)

1.3.3 EFECTOS TOXICOLÓGICOS

El DON inhibe la síntesis de ADN, ARN y la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. La toxina tiene un efecto hemolítico en eritrocitos. A altas dosis puede inducir émesis (vómitos) en cerdos, mientras que en bajas concentraciones en la dieta reducen el crecimiento y el consumo de alimentos (anorexia). (31)

Datos de la Comisión Europea en 1999 indican que la toxicidad oral aguda del Deoxinivalenol se estudia mediante experimentos realizados sobre diversos animales. Así pues, se estiman valores de DL₅₀ (dosis de micotoxina a la cual muere el 50% de los individuos expuestos) entre 46 y 78 mg/kg peso corporal para ratones. Para los cerdos, la mínima dosis que provoca efectos eméticos oscila entre 0.05 y 0.2 mg/kg peso corporal. Los efectos críticos que produce esta micotoxina se basan en el índice NOAEL (Non Observed Adverse Effects Level/estimación del nivel de micotoxina al cual no se observan efectos tóxicos) cuyos valores se encuentren entre 0.04 – 0.375 mg/kg peso corporal/día, en ratones y cerdos. (31)

Con respecto a la toxicidad en humanos, la infección de trigo en la India en el año 1989, afectó a 50.000 personas. En ese momento se estimó un NOAEL de 0.44 µg/kg peso corporal, usando una media de consumo en trigo de 67 g y un peso corporal medio de 53 kg. También es conocido que los granos de cereales contaminados con Deoxinivalenol a niveles entre 3 y 93 mg/kg han sido relacionados con micotoxicosis agudas en Japón, India y China con un cuadro sintomático de náuseas, vómitos, trastornos

gastrointestinales, vértigos y dolor de cabeza. Otros síntomas descritos en humanos incluyen dolor abdominal, diarrea e irritación de garganta entre otros. (31)

1.3.4 PREVALENCIA EN EL MUNDO

La presencia de Deoxinivalenol en alimentos ha sido sujeto de varias revisiones. Una compilación de DON en cereales ha sido preparada por JECFA en 2001, donde un promedio mundial, este tricoteceno ha sido encontrado en el 57% de las muestras de trigo, el 40% de las muestras de maíz, el 68% de las muestras de avena, el 59% de muestras de cebada, el 49% de muestras de centeno y el 27% de la muestras de arroz. Las concentraciones de DON en muestras de cereal mostraron grandes variaciones anuales, concentraciones en los límites de detección (5 – 50 µg/kg) a más de 30 mg/kg, aproximadamente el 40% de las muestras de trigo y el 57% de las muestras de cebada de la cosecha 1993 en EE.UU contenía DON que excedían los niveles para consumo humano. (31)

Como para la Patulina y la Ocratoxina A, unas pocas docenas de países han fijado límites reglamentarios o guía para el Deoxinivalenol en los alimentos. Mientras que en 1995 este tricoteceno estaba sólo esporádicamente reglamentado en los alimentos, se ha convertido ahora en una micotoxina de alta prioridad en los programas de monitoreo y desde fines de los años 1990, para las autoridades reglamentarias, cuando se informó de concentraciones con valores de mg/kg en los cereales y los productos a base de cereales particularmente en Europa. Análogamente al caso de la Ocratoxina A, resultó difícil resumir los límites más frecuentes para el DON en el trigo y en otros cereales en un único número y los interesados en los detalles completos de los muchos reglamentos actualmente vigentes para el DON. El pico de 750 µg/kg resulta de los países de la UE que emplean este valor límite desde hace varios años como guía (no oficial) para el DON en la harina usada como materia prima. (16)

1.3.5 LÍMITES A NIVEL MUNDIAL PARA EL DEOXINIVALENOL EN EL TRIGO (HARINA) Y EN OTROS CEREALES

Informaciones recientes sugieren que los hongos que producen el Nivalenol, un tricoteceno relacionado con el DON, frecuentemente aparecen en algunos países asiáticos más a menudo que las especies productoras de DON, por ejemplo en el Japón. Los hongos productores de Nivalenol han sido recientemente identificados con frecuencia en el sur y en el oeste de Inglaterra. Se han establecido reglamentos para límites de DON considerando su mayor toxicidad ante otras micotoxinas. En conclusión el límite permitido para DON en harina de trigo acorde a la Unión Europea es 750 ppb ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) (ng/g). (Anexo No. 11) (16)

1.4 COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD

1.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las columnas de inmunoafinidad contienen anticuerpos monoclonales capaces de “atrapar” y purificar micotoxinas en sustratos difíciles como el café, cereales, especias, algodón y cerveza. (40)

La alta especificidad lograda con estos anticuerpos permite obtener extractos limpios para su posterior detección por métodos cromatográficos (TLC, HPLC) o fluorimetría. Las columnas de inmunoafinidad para su uso en conjunción con un sistema de HPLC o GC y espectrómetro de masas son muy sensibles y específicas para la detección micotoxinas y utilizadas por su alta confiabilidad en los resultados. (40)

1.4.2 TÉCNICA CON ANTICUERPOS

Los anticuerpos son proteínas que se unen firmemente a sus antígenos. Los vertebrados la producen como un medio de defensa contra las infecciones. Cada animal puede fabricar miles de millones de moléculas de anticuerpos diferentes. Cada anticuerpo reconoce su antígeno con gran especificidad. Justamente esta propiedad es fundamental

en la utilización de esta técnica (Figura No. 3). El procedimiento puede separarse en los siguientes pasos:

1. Hay una columna con anticuerpos anti-A.
2. Se adicionan las moléculas antígeno -A, y las no deseadas.
3. Eluyen las moléculas no deseadas quedando las antígeno-A en los anticuerpos, más un poco de moléculas no deseadas.
4. Se lava la columna y quedan solo los anticuerpos más su molécula antígeno-A.
5. Finalmente eluye la molécula antígeno-A (que en este caso se quería separar). (43)

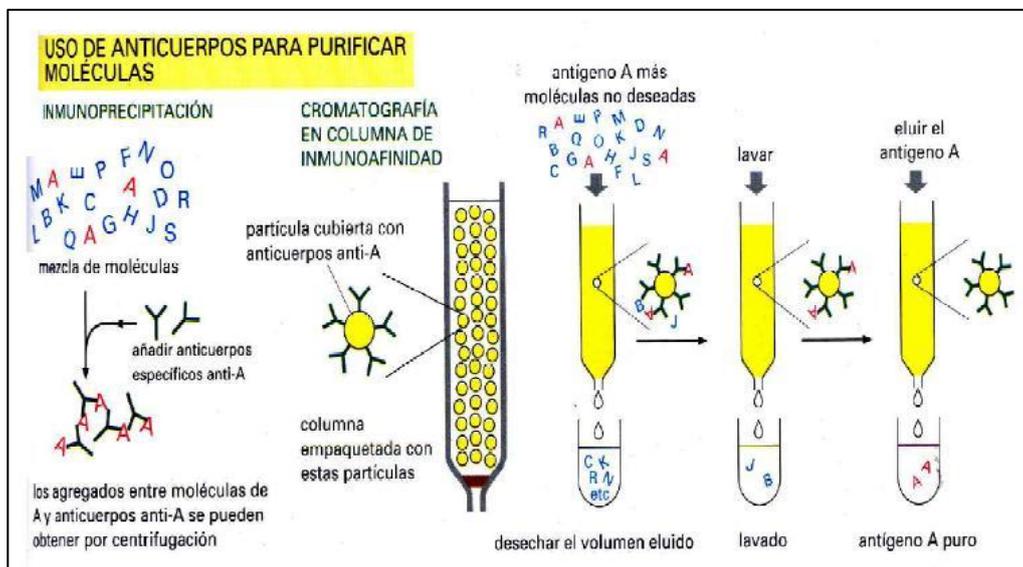


FIGURA No. 3 USO DE ANTICUERPOS PARA PURIFICACIÓN DE MOLÉCULAS.

En esta investigación el Deoxinivalenol se extrae de una muestra con agua bi-destilada y el extracto se filtra y pasa lentamente a través de la columna de inmunofinidad y donde se da la unión entre el anticuerpo y la toxina. La columna se lava a continuación para eliminar cualquier material extraño. El Deoxinivalenol purificado se libera de la columna utilizando 100% de acetonitrilo grado HPLC. El eluido se evapora a sequedad y se reconstituye en la fase móvil antes de la inyección en un sistema HPLC.

1.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1.5.1 DESCRIPCIÓN

La Validación es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. También es el proceso para verificar que un método es apto para aplicarlo en la resolución de un problema analítico, así como la comprobación técnica del personal y del laboratorio. (17)

Los laboratorios de ensayo deben validar los métodos de análisis no normalizados y normalizados, entendiéndose por métodos no normalizados los que diseña o desarrolla el propio laboratorio, de igual manera los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como sus ampliaciones y modificaciones. (29)

Como una actividad previa a la validación se tiene lo que se conoce como “puesta a punto”, la misma que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento general del método. Con esta actividad se consigue que el método funcione dando unas respuestas razonablemente aceptables y consistentes. Para ello es necesario afinar el método en todos sus apartados, prestando una especial consideración a los diversos parámetros instrumentales de aplicación, como son: longitud de onda, flujo de bomba, temperatura de horno, presión, limpieza de columna, fase móvil etc. (2)

1.5.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Para la validación de métodos analíticos cuantitativos se considera la evaluación de los siguientes parámetros: (30)

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Sensibilidad
- Robustez
- Selectividad
- Incertidumbre

1.5.2.1 Linealidad

La linealidad es la relación funcional (concentración) de analito (**X**) y la respuesta del método (**Y**), esta relación es denominada comúnmente como recta de calibración (respuesta lineal), aunque existen ocasiones en las que no tiene que ser lineal para que el método sea eficaz (en estos casos, se deberá encontrar un algoritmo adecuado). (3)

Rango lineal es el rango de concentraciones que va desde la concentración más pequeña en la que se pueden realizar mediciones cuantitativas (**LOQ**), hasta la concentración en la que la curva de calibración se desvía de la linealidad (límite de linealidad, **LOL**). La linealidad es la capacidad de un instrumento para dar una respuesta lineal dentro de todo su alcance de medición nominal. (17)

Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar, comprendiendo los ámbitos estudiados de trabajo con un exceso de al menos 50% sobre el límite superior y un defecto debajo de límite inferior del valor referencial de medida, las medidas de los puntos deben ser distribuidas lo más equidistante posible sobre el rango de trabajo, evitando ser concentrada tanto en la parte superior como inferior del rango, las cantidades del analito y el valor de la información acompañante son usadas para calcular los estimadores de regresión en un intervalo de regresión dado. (30)

Los documentos para evaluar la linealidad en la validación puede contener la siguiente información:

- Una tabla con las concentraciones de estándares utilizados y su respuesta en cada punto de la curva de calibración elaborada.
- Una representación gráfica de los valores medidos con la respuesta del equipo y los valores de pendiente, ordenada al origen, desviaciones estándar y límites de confianza.
- Rango de trabajo. (30)

1.5.2.2 Precisión

Se define como el grado de concordancia entre réplicas de mediciones de la misma cantidad, la precisión mide además el error aleatorio de un análisis, los parámetros usados generalmente para medir la precisión son: repetibilidad y reproducibilidad. (2)

La repetibilidad, expresa la precisión obtenida para un grupo de resultados de un ensayo llevado a cabo bajo las mismas condiciones de operación dentro de un mismo laboratorio, con el mismo equipamiento y realizados por el mismo operador, en un intervalo corto de tiempo. También se denomina precisión intra ensayo. Los ensayos deben ser análisis independientes de muestras aplicando todo el procedimiento analítico desde la preparación de la muestra hasta el cálculo final. (32)

La repetibilidad se expresa en función de la desviación estándar de las mediciones que se realicen y puede llevarse a cabo de dos maneras. (32)

- Con un mínimo de nueve determinaciones que se encuentren dentro del rango de concentraciones empleado durante el procedimiento, tres concentraciones/tres replicas para cada una, ó
- Un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración del ensayo. (32)

La reproducibilidad, es la precisión bajo condiciones reproducibles por la cual los resultados de los ensayos son obtenidos con el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes equipos y diferentes operarios, se la conoce como precisión inter laboratorios, se entiende por tanto que tiene relación con trabajos o estudios colaborativos entre laboratorios. (32)

La repetibilidad y la reproducibilidad generalmente dependen de la concentración del analito y por lo tanto se deben determinar para diferentes concentraciones, estableciendo, cuando sea relevante la relación entre la concentración y el coeficiente de variación. (32)

El documento para evaluar en la validación la repetibilidad y la reproducibilidad puede contener la siguiente información.

- Resultados en forma de una tabla de todas las repeticiones.
- Valor medio de las repeticiones obtenidas.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación. (30)

1.5.2.3 Exactitud

Es el grado de concordancia entre el valor medido y el valor real, dado que es difícil establecer un valor absoluto verdadero, se puede definir exactitud como la concordancia entre el valor medido y el valor real aceptado. (32)

La exactitud se mide como el porcentaje de recuperación del analito aplicando el método de ensayo, mediante el uso de muestras “spike”, que constituyen muestras a las que se les adiciona cantidades conocidas del compuesto en estudio, o a su vez utilizando materiales de referencia certificados (MCR). (32)

La recuperación, se evalúa mediante la capacidad de un método de determinar todo el analito presente en las muestras, según el alcance del método. La mejor manera de determinar la eficacia de extracción del método es adicionar diferentes concentraciones del analito a las muestras y procesarlas por el método completo. Aunque es la manera más común de cuantificar la recuperación, el analito adicionado puede no enlazarse tan fuertemente a la matriz como el presente de manera natural y dar como resultado la impresión de una elevada eficacia de extracción. (41)

El documento para evaluar en la validación la exactitud puede contener la siguiente información:

- Una tabla mostrando las cantidades de sustancia a ser determinada, la misma que fue añadida, pesada o la adición de volúmenes de solución estándar con sus

respectivas concentraciones. El correspondiente valor informativo, el “verdadero” y los valores medidos como recuperación.

- Valor medio para el porcentaje de recuperación. (30)

1.5.2.4 Sensibilidad

Es el gradiente de la curva de respuesta, o lo que es lo mismo, el cambio en la señal correspondiente a un cambio de concentración del analito. Para el intervalo lineal de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración, y es un parámetro objeto de seguimiento cuando se efectúan calibraciones rutinarias. (32)

Los parámetros a evaluar en la sensibilidad son el límite de detección y el límite de cuantificación.

El **límite de detección**, llamada también “cantidad mínima detectable” (LOD), es la concentración más baja de analito en estudio que es posible detectar (no cuantificar) con certeza. Se expresa en unidades de concentración. Su determinación se efectúa por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 ó 3. (32)

El **límite de cuantificación**, (LOQ) es la concentración más baja de un analito que puede ser determinado con precisión y exactitud aceptables, bajo condiciones operacionales establecidas para el método. Esta concentración es proporcional a una respuesta, que después de haber aplicado el método completo, es igual a la media de la respuesta del blanco (ruido) más diez desviaciones estándar. (32)

1.5.2.5 Robustez (Confiabilidad del método)

También designado “confiabilidad del método”, corresponde a los estudios que indican el grado de confianza del ensayo ante cambios de variables comunes, estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas etc. Este estudio puede ser retrospectivo, a partir de los resultados históricos obtenidos en

diferentes condiciones, pero en el caso de métodos nuevos el estudio es efectuado por el laboratorio emisor de la técnica. (41)

Es evidente que un método debe ser “solido” (reproducible) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien. (41)

1.5.2.6 Selectividad

La selectividad se establece cuando la señal producida en la etapa de medición puede ser atribuida únicamente al analito y no a la presencia de algo similar o la coincidencia. La selectividad y la especificidad evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias; la segunda se considera por lo general como un 100% de la selectividad. Las interferencias pueden disminuir o aumentar la señal atribuida al analito. (41)

Normalmente este parámetro se establece bibliográficamente pues el método seleccionado cuenta con información sobre su selectividad y las interferencias que se conocen, además se está utilizando columnas de inmunoafinidad específicas con anticuerpos monoclonales específicos para DON, que permiten separar al analito de las interferencias producidas por la matriz.

Para evaluar la selectividad la documentación necesaria puede incluir:

- Una lista de sustancias que pueden ser encontradas en la solución de ensayo, especialmente sustancias que pueden ser causa de problemas en la determinación cuantitativa.
- Tiempos de retención para el analito en cuestión y productos secundarios.
- Diagrama de cromatograma típico de una solución de ensayo y si es necesario el diagrama de cromatogramas de soluciones de ensayo piloto. (30)

1.5.2.7 Incertidumbre

Es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando. Puede ser considerada como la estimación que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se puede encontrar el valor verdadero de la magnitud medida, entendiéndose como valor verdadero aquel que representa la verdad absoluta. (17)

También se la define como la duda que se tiene del resultado de una medición por los errores aleatorios de causas comunes presentes en el momento en que se lleva a cabo la medición más todos aquellos que se heredan por otras causas, tales como: trazabilidad de los materiales de referencia, errores instrumentales, correcciones, entre otras. (17)

Para estimar la incertidumbre existen diferentes métodos, a continuación se describe los pasos que se pueden tomar como referenciales para realizar este cálculo. (2)

- **PASO 1**

Colocar la expresión de la magnitud de salida Y en función de todas las magnitudes de entrada X_i , (al menos serán aquellas que se miden directamente a partir de las que se calcula el resultado final; por ejemplo, si se mide el espacio, s , y el tiempo, t , para calcular la velocidad, poner la expresión $v = s/t$). (2)

$$\text{Ec. 1.1} \quad Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

En donde:

Y es la magnitud de salida, esto es, el resultado cuya incertidumbre se desea determinar. El valor de Y , se representa como y .

X_i son las magnitudes de entrada, esto es las variables de las cuales depende la magnitud de salida Y , entre las que se encuentran los valores que se miden y estiman. El valor estimado de la magnitud de entrada X_i se representa como x_i . (2)

• **PASO 2**

Aplicar la ley de la propagación de las varianzas a la expresión determinada anteriormente. (2)

$$\text{Ec. 1.2} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)$$

En donde:

$u(y)$ es la incertidumbre típica combinada asociada a la magnitud de salida, cuya estimación es y , que se obtiene a partir de la expresión que relaciona la magnitud de salida con las estimaciones de las magnitudes de entrada $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$. (2)

$$\text{Ec. 1.3} \quad C_i = \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)_{x_i}$$

La Ec 1.3 representa el coeficiente de sensibilidad con respecto a la magnitud de entrada X_i y se obtiene particularizando esta expresión para los valores de X_i aplicables a la medida o resultado cuya incertidumbre se está calculando. (2)

$$\text{Ec. 1.4} \quad u(x_i x_j) = u(x_i)u(x_j)r(x_i, x_j)$$

La Ec. 1.4 representa la covarianza estimada asociada a las estimaciones de las magnitudes de entrada x_i y x_j . Siendo $u(x_i)$ y $u(x_j)$ las incertidumbres típicas asociadas a las estimaciones de las magnitudes de entrada x_i y x_j , r es el coeficiente de correlación entre ambas que siempre se encuentra entre -1 y 1. (2)

El coeficiente de correlación, r , se puede calcular a partir de m pares de valores (p_i, q_i) de las magnitudes de entrada x_i y x_j , definidas como P y Q en el caso concreto, tomados simultáneamente. (2)

$$\text{Ec. 1.5} \quad r = s(\bar{p}, \bar{q}) = \frac{\sum_{k=1}^m (p_k - \bar{p})(q_k - \bar{q})}{m(m-1)}$$

Nota:

- a. En el caso de que todas las magnitudes de entrada X_1, \dots, X_n sean independientes entre sí, por lo tanto las $r(x_i, x_j) = 0$ la Ec. 1.2 se reduce a: (2)

$$\text{Ec. 1.6} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i)$$

$$\text{Ec. 1.7} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N u_{x_i}^2(y)$$

Debido a que la contribución a la incertidumbre típica de la estimación de salida asociada a cada magnitud de entrada, $u_{x_i}^2(y)$, es producto de la incertidumbre de la estimación de entrada, $u^2(x_i)$, por su correspondiente coeficiente de sensibilidad, C_i . (2)

- b. Si además la expresión de Y es aditiva ($Y = \pm X_1 \pm X_2, \dots, \pm X_n$), con todos los C_i iguales a 1, como es el caso habitual de medidas directas (las realizadas con un instrumento que da la indicación en las unidades en que se quiere expresar el resultado; por ejemplo medir voltios con un voltímetro, metros con una regla o una cinta métrica, masas con una balanza etc.), en las que las correcciones en el caso de que se hiciesen, se podrían poner como cantidades a añadir (\pm) a la indicación, (por ejemplo, correcciones expresadas como diferencia entre valor patrón e indicación en un certificado de calibración; también se podría considerar aditiva, una corrección estimada como un límite máximo directamente en las unidades de la indicación o como una corrección por temperatura que no se realiza en una regla metálica estimada a partir de un coeficiente de dilatación

lineal máximo y una máxima diferencia de temperatura respecto a la de calibración). La Ec. 1.2 se reduce a la siguiente: (2)

$$\text{Ec. 1.8} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N u^2(x_i) = \sum_{i=1}^N u^2_{x_i}(y)$$

- **PASO 3**

Calcular la incertidumbre típica asociada a cada x_i , $u(x_i)$, considerando todas las contribuciones asociadas. Para ello, si cada x_i puede ser considerada como variable de medida directa con todas las correcciones aditivas (caso b de la nota del paso 2) se seguirá la siguiente secuencia. (2)

- Establecer tan detalladamente como sea posible las causas de incertidumbre que afectan a la medida realizada, asociadas a cada factor que la determina. (2)

De **Tipo A** (si ha habido repetición de medidas de x_i y no se considera la contribución de tipo A sobre la función Y) y de **Tipo B** (posibles causas de incertidumbre a considerar para distintos tipos de medida y que conviene considerar su posible influencia, además de aquellas otras que específicamente sean significativas). (2)

Nota: Cuando se esté determinando la incertidumbre asociada a una calibración no deben considerarse las causas de incertidumbre ligadas a las características del instrumento a calibrar, salvo aquella que tenga influencia en el momento de calibración (resolución) ya que se trata de caracterizar un procedimiento independiente de este instrumento. (2)

- Evaluar la contribución de cada componente de la incertidumbre.
 - a. **Las componentes de tipo A** serán estimadas aplicando métodos estadísticos. Para ello se siguen los siguientes pasos. (2)
 - Realizar una serie de n medidas de la magnitud X_i correspondiente, identificada como Q (q_1, q_2, \dots, q_n), según se defina en el procedimiento de calibración o medida correspondiente. (2)

- Calcular la medida aritmética, como mejor estimador del valor verdadero de la estimación de salida. (2)

$$\text{Ec. 1.9} \quad \bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^N q_k}{n}$$

- Calcular la varianza experimental de la serie de n medidas realizadas mediante:
(2)

$$\text{Ec. 1.10} \quad s^2(q) = \frac{\sum_{i=1}^N (q_k - \bar{q})^2}{n-1}$$

Y la varianza de la media:

$$\text{Ec. 1.11} \quad s^2(\bar{q}) = \frac{s^2(q)}{n} = \frac{\sum_{i=1}^N (q_k - \bar{q})^2}{n(n-1)}$$

La incertidumbre asociada a esta estimación es:

$$\text{Ec. 1.12} \quad u(q) = s(\bar{q})$$

Nota 1:

Calibraciones: Si el número de mediciones n es pequeño ($n < 10$), la evaluación de tipo A expresada por la ecuación anterior puede no ser fiable. Si no se puede aumentar el número de observaciones deberían calcularse los grados efectivos de libertad. (2)

Ensayos: En general, es razonable suponer una distribución normal que proporcione un intervalo de cobertura con el nivel de confianza del 95% cuando el modelo es lineal en las magnitudes de entrada y se cumple alguna de las siguientes oportunidades: (2)

- Existe una contribución única y dominante a la incertidumbre, que se origina de una distribución normal, y los correspondientes grados de libertad son mayores de 30. (2)
- Las tres principales contribuciones son de tamaño similar y los grados efectivos de libertad son mayores de 30. (2)

Nota 2:

En ocasiones, cuando la medición está correctamente caracterizada y bajo control estadístico, es posible que se disponga de una estimación combinada de la varianza (repetibilidad Sr^2) que caracterice mejor la dispersión que la desviación típica estimada a partir de un número estimado de observaciones. En este caso, si el valor de la magnitud de entrada Q se calcula como la media aritmética \bar{q} de un número pequeño m de observaciones independientes, la varianza de esta media aritmética podrá estimarse como: (2)

Ec. 1.13
$$s^2(\bar{q}) = \frac{S^2 r}{m}$$

- b. Las componentes de tipo B** serán estimadas basándose en el certificado de calibración, la experiencia, recomendaciones del fabricante, etc. Se estimarán a partir de la información disponible o, cuando no se dispone de otra información, se estimará la incertidumbre máxima de las componentes; en este caso $U(X_i)$ puede ser dada por la regla práctica siguiente: (2)

Ec. 1.14
$$u(x_i) = \frac{\text{límite máximo de la componente}}{\sqrt{3}}$$

Para el caso que se estime una distribución de los posibles valores de tipo rectangular, o, en caso de distribución triangular: (2)

Ec. 1.15
$$u(x_i) = \frac{\text{límite máximo de la componente}}{\sqrt{6}}$$

Componer todas las contribuciones, tanto de tipo A como de tipo B, cuadráticamente: (2)

Ec. 1.16
$$u^2(y) = \sum u^2(x_i) = \sum u_{x_i}^2(y)$$

Nota:

En el caso de que cada x_i no pueda ser considerada como variable de medida directa con todas las correcciones aditivas, se aplicará, para dicha variable, lo establecido en el paso 1 y paso 2 hasta llegar a variables que cumplan con lo anterior. (2)

- **PASO 4**

La incertidumbre típica, $u(y)$, así calculada puede no haber tenido en cuenta otro tipo de contribuciones que habría que añadir en este momento (por ejemplo la contribución de Tipo A, si existiendo repeticiones de medidas no se ha considerado ya en las $u_{x_i}(y)$ - ¡No considerarlo en los dos sitios pues sería considerar dos veces la misma contribución!; así mismo se debería analizar si hay contribuciones que no se han considerado en las $u_{x_i}(y)$ ya sea porque no se puede estimar su contribución a las mismas y si al resultado final o porque esta última estimación es mejor o semejante y más cómoda de considerar en función de los datos disponibles: repetibilidad, reproducibilidad de la determinación a realizar, en su caso). (2)

Ec. 1.17
$$u^2(y)_{TOTAL} = u^2(y) + \sum(\text{otras contribuciones})^2$$

- **PASO 5**

A partir de la incertidumbre típica total se expresará la incertidumbre de medida como un intervalo de incertidumbre simétrico alrededor de la estimación de salida (y) dentro del cual se estima que se encontrará el valor verdadero de la medida realizada, con un factor de cobertura (k). (2)

Este intervalo se determina multiplicando la incertidumbre típica total, $u(y)_{TOTAL}$, por un factor K (factor de cobertura). Este factor será, usualmente, $k=2$, si podemos atribuir al

mensurando una distribución normal y la estimación de salida tiene la suficiente fiabilidad. La incertidumbre expandida así calculada corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente un 95%. (2)

Nota:

Si no se cumple alguna de las dos condiciones (normalidad y fiabilidad suficiente), el factor usual de $k=2$ puede producir una probabilidad de cobertura inferior al 95%. En estos casos, para garantizar que la incertidumbre expandida se corresponde con la misma probabilidad del 95%, tiene que utilizarse el procedimiento siguiente: Cuando se cumplen condiciones del Teorema Central del Límite (la distribución resultante de varios componentes derivados de distribuciones bien definidas por ejemplo normales, rectangulares, triangulares, es normal) el factor de cobertura se estima en la Tabla No. 5 en función de los grados efectivos de libertad, V_{ef} , de la $u(y)_{TOTAL}$, que se calculan según la fórmula de Welch-Satterhwaite (Ec. 1.18). (2)

Ec. 1.18
$$V_{ef} = \frac{u^2(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u^4_{x_i}(y)}{v_i}}$$

En donde:

$$u_{x_i}(y) \ (i= 1,2, \dots, N) \text{ son los productos } c_i \cdot u(x_i)y$$

Nota:

Para una incertidumbre típica $u_{x_i}(y)$ obtenida de una evaluación de Tipo A (para una desviación estándar), los grados de libertad serán $V_i = n - i$. (2)

Para una incertidumbre típica $u_{x_i}(y)$ obtenida de una evaluación tipo B (que no sea tipo A) los grados de libertad serán los indicados por los datos de partida (por ejemplo los certificados de calibración) o, si la estimación ha sido realizada a partir de un límite máximo elegido con criterio conservador, se considerará $V_{ef} = \infty$. (2)

TABLA No. 5 FACTORES DE COBERTURA k PARA DIFERENTES GRADOS EFECTIVOS DE LIBERTAD, V_{ef} *

V_{ef}	1	2	3	4	5	6	7	8	10	20	30	50	∞
k	13,97	4,53	3,31	2,87	2,65	2,52	2,43	2,37	2,28	2,13	2,09	2,05	2

* Para una probabilidad de cobertura (p) del 95.5%.

Por lo tanto la incertidumbre expandida se expresará:

$$\text{Ec. 1.19} \quad U = \pm k * u(y)_{TOTAL}$$

- **PASO 6**

Cálculo de la estimación de salida

Es la medida de la serie de determinaciones del resultado realizadas a partir de las estimaciones de entrada corregidas $X_{ic} = \bar{x}_i + corr_i$, donde \bar{x}_i es la media de la serie de medidas de x_i realizadas para determinar cada resultado y $corr_i$, es la corrección a realizar para la indicación x_i del equipo. (2)

Nota 1:

Se entiende por corrección, $corr_i$, la cantidad que hay que sumar al valor obtenido, x_i , para obtener el valor convencionalmente verdadero. La determinación de $corr_i$, se puede deber a una corrección simple o al resultado de un conjunto de correcciones. Son posibles fuentes de corrección, el certificado de calibración ($corr_{calibración} = X_{i\ patrón} - X_{i\ lectura\ equipo}$), la dilatación de un material, la variación con la temperatura de la resistencia eléctrica de un elemento, etc. (2)

Nota 2:

En caso de que no se realicen correcciones, dichas correcciones no realizadas se tendrán en cuenta (en su máxima estimación) para aumentar la incertidumbre expandida. (2)

- **PASO 7**

Expresión del resultado final

El resultado final de una medida se expresa por la estimación de salida y , con el intervalo de incertidumbre para un factor de cobertura k , dado (usualmente = 2 para una probabilidad de cobertura del 95%); mediante la expresión: (2)

$$\text{Ec 1.20} \quad y \pm U \text{ (indicando siempre el valor } k \text{)}$$

En los procedimientos específicos de calibración y/o medida en que sea aplicable, se incluirá, o se hará referencia concreta, un análisis de las incertidumbres asociadas a los resultados cuantitativos de la calibración o medida considerando los equipos, variaciones máximas de las magnitudes de influencia que admite el procedimiento, método, etc. Se indicarán las contribuciones a considerar (fuentes de incertidumbre y los métodos para valorar las incertidumbres típicas asociadas, número de observaciones en caso de repetición, etc.) y la expresión para su composición. El cálculo de las incertidumbres se podrá realizar en registros específicos en los que se cuantifiquen los límites de las contribuciones y se expongan determinando, en su caso, una tabla o expresión a aplicar para cada resultado concreto que se obtenga en una calibración o medida siguiendo dicho método. (2)

Para mayor claridad, es recomendable presentar los datos referentes a este análisis en forma tabulada. En la tabla, las magnitudes deben expresarse mediante un símbolo físico, x_i , o un breve identificador, indicando para cada una de ellas, como mínimo, el valor de la estimación de entrada, x_i , la incertidumbre típica asociada a ésta, $u(x_i)$, el coeficiente de sensibilidad, c_i , y las diferentes contribuciones, $u_{x_i}(y)$, a la incertidumbre típica, $u(y)$. Asimismo debe indicarse la dimensión de cada magnitud, junto con los valores que se facilitan en la tabla. (2)

Nota:

En el procedimiento, los valores se indicarán por su expresión, criterio o referencia a ellos, salvo cuando el valor sea constante para todo el alcance del procedimiento (se indicará). En los registros del cálculo concreto se expresarán los valores numéricos en lo posible. (2)

1.6 MATERIALES REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE LABORATORIO

1.6.1 MATERIAL DE REFERENCIA

Un material de referencia es una material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente bien establecidas para calibrar un aparato o instrumento, validar un método analítico, o asignar valores a un material o sistema. (32)

Los materiales de referencia tienen una gran importancia, ya que son un componente clave de todo programa de calidad. En el campo de la medición analítica se recurre a materiales de referencia para garantizar la exactitud y ajustarse a un sistema válido de medidas. (32)

Un material de referencia puede presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. Ejemplos: el agua para la calibración de viscosímetros, el zafiro que permite calibrar la capacidad térmica en calorimetría, las soluciones utilizadas para la calibración de un refractómetro, mezclas de gas, cepas para análisis microbiológicos y otras. (32)

Para que no exista la ambigüedad cuando se trate de materiales de referencia se consideran algunos términos prácticos, los cuales son: (32)

- **Material de Referencia Interno** (“Internal Reference Material” IRM): Es todo material preparado por un laboratorio para su exclusivo uso interno. (32)

- **Material de Referencia Externo** (“External Reference Material” ERM): Es el suministrado por un laboratorio ajeno al del propio usuario. (32)
- **Material de Referencia Estándar** (“Standard Reference Material” SRM): Es aquel material de referencia certificado por entidades reconocidas internacionalmente. (32)

Los requisitos que debe satisfacer un material de referencia para poder comercializarse se pueden agrupar en 2 categorías: (32)

1. Requisitos básicos
2. Requisitos adicionales (32)

1. Requisitos básicos

- **Homogeneidad:** Para un mismo material, no existen diferencias en el valor certificado ni en la matriz, o entre y/o dentro de diferentes frascos, ampollas. En rigor, este requisito básico sólo se cumple para las sustancias de referencia ultrapuras, por lo que en los demás casos hay que admitir un cierto grado de falta de homogeneidad, pero la exactitud de los valores certificados debe indicar este hecho. (32)
- **Estabilidad:** El material preparado debe ser estable en el tiempo, (se debe incluir la fecha de caducidad, si procede) así como permitir ser transportado. El cliente debe conocer durante cuánto tiempo permanece estable desde su recepción y desde que se abre el recipiente. La estabilidad se extiende a los parámetros certificados y a la matriz. (32)
- **Exactitud y trazabilidad:** Los materiales de referencia certificados se usan para verificar los resultados analíticos o para calibrar instrumentos. Para ambas aplicaciones la exactitud y la trazabilidad de valores certificados son exigencias

básicas. Dichos valores deben dar la mejor aproximación al valor verdadero; de ahí que los métodos empleados para la certificación serán aquellos que proporcionen la mayor exactitud posible. (32)

La trazabilidad con las unidades fundamentales significa que la unidad de medida puede ser relacionada con las unidades internacionales y que los valores medidos se relacionan correctamente con aquella unidad. (32)

2. Requisitos adicionales

- **Similitud con la muestra real:** Si el material de referencia se usa para comprobar la exactitud de un procedimiento analítico o para llevar a cabo el calibrado, la matriz del material de referencia debe ser tan parecida como sea posible a la de las muestras a analizar. La preparación de un material de referencia presenta con frecuencia el problema de que la matriz introduce riesgos de falta de estabilidad y homogeneidad del material. Así, este requisito de semejanza de matriz es fácil de cumplir para análisis de metales o minerales, pero mucho más complicado en el caso de muestras ambientales (contaminación), alimentos o biológicas. (32)
- **Precisión:** Cualquier valor certificado va acompañado del grado de incertidumbre inherente al mismo. Dicha incertidumbre ha de ser tan pequeña como sea posible, para lo cual, en el proceso de certificación, debe emplearse un gran número de resultados obtenidos por diferentes procedimientos analíticos. (32)

1.6.2 MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC)

El **Material de Referencia Certificado** es aquel que tiene certificados y valores de una o más de sus propiedades por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente. Ésta es la principal diferencia entre un MR y un MRC, ya que dicho certificado garantiza que un MRC sea desde un punto de vista práctico, la mejor referencia posible en la verificación de la trazabilidad de un método analítico. (32)

Los MRC se preparan en general en lotes en los que los valores de sus propiedades se determinan, dentro de los límites de incertidumbre indicados, por medio de mediciones sobre muestras representativas del lote entero. (32)

El **Certificado de un Material de Referencia** es el documento que acompaña a un material de referencia certificado, que indica uno o más valores de sus propiedades, su incertidumbre y confirma que han sido realizados los procedimientos necesarios para asegurar su validación y trazabilidad. (32)

Los MRC pueden ser:

- Soluciones patrón y mezclas de gas, a menudo preparadas gravimétricamente a partir de sustancias puras y utilizadas para calibración. (32)
- Sustancias puras caracterizadas por la pureza química y/o trazas de impurezas. (32)
- MR matriciales, caracterizados por la composición. Cada material puede prepararse con matrices de materiales naturales que contengan los componentes de interés o con mezclas sintéticas. (32)
- MR físico químicos, caracterizados por sus propiedades, como la viscosidad y la densidad óptica. (32)
- Objetos o artefactos de referencia, caracterizados por las propiedades funcionales como el gusto, el olor, la dureza, el índice de octano, este tipo incluye especímenes microscópicos. (32)

1.7 FUNDAMENTO LEGAL

La primera parte de esta investigación correspondiente a la **validación** del método analítico se basa en los parámetros establecidos en la Norma Internacional ISO/IEC

17025 que constituyen los requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración. De igual forma se acoge a lo establecido en el Reglamento (CE) No 401/2006 de la Comisión del 23 de febrero de 2006 del Diario Oficial de la Unión Europea en el cual se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

La segunda parte concerniente a la *evaluación de DON* en las líneas mejoradas de trigo, se realizó utilizando el método previamente validado en el laboratorio y para la interpretación de los resultados se basó en la Norma Internacional establecida en el Diario Oficial de la Unión Europea, Reglamento (CE) No 401/2006 de la Comisión del 23 de febrero de 2006 respecto a Deoxinivalenol, donde indica textualmente que el contenido máximo de DON en trigo es de 750 µg/kg, esto debido a que como se ha indicado con anterioridad no existe una norma nacional que regule el contenido de este contaminante.

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad (DNC) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC).

UBICACIÓN

Provincia:	Pichincha
Cantón:	Mejía
Parroquia:	Cutuglahua
Lugar:	Estación Experimental Santa Catalina
Dirección:	Panamericana Sur Km 1

SITUACIÓN GEOGRÁFICA

Altitud:	3058 m
Latitud:	00°22'S
Longitud:	78°33'O
Temperatura Promedio:	11.6°C
Tipo de Clima:	Templado-Húmedo

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIALES

Las muestras se obtuvieron con la colaboración de la Ing. Agr. Mayra Cathme, a través del Programa de Cereales del INIAP - Estación Experimental Santa Catalina, en el mes de Septiembre de 2011. Las muestras fueron cosechadas completamente a mano, la trilla se realizó con separación de glumas pero no de semilla dañada por *Fusarium*, la idea era conservar las semillas afectadas por *Fusarium* para cuantificar el daño causado por la enfermedad. La trilladora se reguló de tal manera que no elimine el grano contaminado, determinando el FDK (granos dañados por *Fusarium*). Para lo cual se emplea una escala visual que indica los granos dañados por la enfermedad. Luego de esto se realizó las entregas de los granos de trigo sin ninguna limpieza adicional en fundas de almacenamiento de alimentos herméticas, codificadas con los números de entradas y parcelas, mismas que fueron posteriormente ingresadas al LSAIA del INIAP - EESC con su respectivo número de registro y almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

Para el aseguramiento de los resultados en el laboratorio se adquirió materiales de referencia por medio del Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), consistente en muestras de harina de trigo contaminadas con DON.

2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, $0,45\ \mu\text{m}$ de poro, 47 mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana de fibra de vidrio tipo APFB
- Jeringuillas de polipropileno de 10 mL
- Columnas de inmunoafinidad para purificación de DON (DONPREP; recuperación 92%)

- Columna cromatográfica - ZORBAX SB-C18 (150 x 4,6 mm), tamaño de partícula de 5 μm
- Gas Nitrógeno 99.9% de pureza
- Tubos de ensayo de vidrio con punta cónica de 10 mL
- Gradillas porta tubos de ensayo
- Pipetas volumétricas de 2 mL
- Micropipeta automática de 100 a 1000 μL y de 10 a 100 μL
- Viales de plástico, 11 mm con inserto fijo de 500 μL
- Puntas para micropipeta automática
- Papel filtro Whatman N° 4 o equivalente
- Vasos de vidrio para licuadora de 500 mL
- Dispensador de agua
- Guantes quirúrgicos
- Guantes de caucho
- Kleenex
- Papel toalla

2.2.3 EQUIPOS

- Molino Retsch ZM 200
- Sistema de extracción al vacío compuesto de kitasato de 1000 mL, reservorios de 500 mL con membrana de filtro poroso y pinza metálica
- Bomba de vacío GE-MOT-012
- Balanza analítica de precisión 0.1 mg Shimadzu, modelo AUX 220
- Evaporador de muestras
- Baño María
- Equipo de Extracción en fase sólida al vacío Waters
- Agitador de Tubos Vortex
- Baño Ultrasonido

- Equipo HPLC Agilent 1100 series.
- Licuadora Osterizer 2.0301 -N
- Cronómetro digital Thomas Scientific

2.2.4 REACTIVOS

- Acetonitrilo grado HPLC Fisher
- Agua grado ultrapuro para uso en HPLC

2.2.5 ESTÁNDARES

- Estándar Deoxinivalenol Sigma D0156

2.3 METODOLOGÍA

Los análisis de laboratorio se realizaron tomando como referencia el método descrito por la R.BIOPHARM para el análisis de Deoxinivalenol (Anexo 10) en cereales mediante la extracción en agua en conjunto con las columnas de inmunoafinidad DONPREP - Ref. N°: A1-P50.V1 y Cromatografía Líquida de Alta Resolución, el mismo que fue adaptado y validado en el laboratorio para utilizarlo en trigo.

Este método experimental seleccionado está basado en la utilización de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para DON, tecnología que es altamente específica, sensible y rápida en relación a las tecnologías tradicionales de purificación. En éste método el DON es extraído con agua bi-distilada, una alícuota de este extracto es aplicada sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina, la columna es lavada para eliminar todas las interferencias y el DON es recuperado de la columna con acetonitrilo grado HPLC. La toxina es cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa C18 y detector UV.

2.3.1 FASE DE LABORATORIO

2.3.1.1 Procedimiento

2.3.1.1.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Solución de extracción: Agua ultrapura
- Solución Fase Móvil: Acetonitrilo:Agua; 10:90 (v/v).

2.3.1.1.2 MOLIENDA Y PESAJE DE LA MUESTRA

- a) Moler 100 g de trigo en el molino, obtener un tamaño de partícula de 1 mm.
- b) Colocar un frasco pequeño de licuadora de 500 mL, con número de identificación de la muestra sobre la balanza, encerrar la balanza.
- c) Pesar 25 g de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula.
- d) Trasladar el frasco de vidrio con la muestra hacia el laboratorio para la extracción.

2.3.1.1.3 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- a) Adicionar a la muestra 200 mL de agua ultrapura.
- b) Colocar el frasco en la licuadora, asegurar el mismo y homogenizar durante 3 minutos a alta velocidad.
- c) Filtrar la muestra por gravedad usando papel filtro y membrada de fibra de vidrio.
- d) Recoger la solución filtrada en frascos debidamente codificados.

2.3.1.1.4 PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA

- a) Adaptar una jeringa de polipropileno de 10 mL a la columna de inmunoafinidad DONPREP y conectar al sistema de filtración al vacío.

- b) Tomar 4 mL del filtrado y colocar en la jeringa previamente instalada en la columna de inmunoafinidad.
- c) Dejar pasar por gravedad el contenido del filtrado a través de la columna con un flujo de 1 gota por segundo.
- d) Lavar la columna con 10 mL de agua bi-distilada y dejar secar la columna.
- e) Desconectar la columna del sistema de vacío y aplicar presión positiva.
- f) Ubicar la columna más un tubo de punta cónica previamente codificado en el sistema de elución.
- g) Eluir el DON de la columna con 3 mL de acetonitrilo grado HPLC, empujar el aire a través de la columna controlando el flujo por medio del embolo de la jeringa (contraflujo).
- h) Recoger el eluido en un tubo de punta cónica.
- i) Colocar el tubo de vidrio en un sistema de evaporación a 60°C y volatilizar hasta sequedad.
- j) Reconstituir con 300 µL de fase móvil en el tubo de vidrio.
- k) Mezclar con un mezclador de vórtice por 3 minutos.
- l) Situar el eluido reconstituido en un vial de inserto fijo codificado.
- m) Inyectar las muestras en un sistema HPLC-UV.

2.3.1.1.5 CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Condiciones cromatográficas:

- **Columna:** ZORBAX SB-C18 (150 x 4,6 mm), tamaño de partícula de 5 µm
- **Temperatura de columna:** 40°C
- **Detector UV:** Longitud de onda 218 nm
- **Fase móvil:** Acetonitrilo:Agua; 10:90 (v/v).
- **Flujo:** 1mL/minuto
- **Volumen de inyección:** 20 µL

2.3.1.1.6 CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente formula:

$$\text{Ec. 2.1} \quad \text{DON } (\mu\text{g/kg}) = \frac{(ABC)}{(DE)}$$

A= Área del pico correspondiente a DON de la muestra

B= Concentración de DON ($\mu\text{g/kg}$) de solución estándar

C= Volumen final de la muestra

D= Área del pico de DON en la solución estándar.

E= Peso de la muestra representada en la solución (g)

2.3.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

2.3.2.1 Rango Lineal y Linealidad

La linealidad del método se evaluó relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de DON, mediante el siguiente esquema: (2)

CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR	RESPUESTA DEL EQUIPO				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
P ₁					
P ₂					
P ₃					
P ₄					
P ₅					

Con las soluciones obtenidas se realizó el estudio de regresión lineal, evaluando los siguientes parámetros:

- **Coefficiente de correlación (r):**

$$\text{Ec. 2.2} \quad r = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]^{1/2} \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]^{1/2}}$$

- **Pendiente (m):**

$$\text{Ec. 2.3} \quad m = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = \frac{S_{yx}}{S_{xx}}$$

- **Intercepto (L):**

$$\text{Ec. 2.4} \quad L = \frac{\sum y - m \sum x}{n} = y - mx$$

- **Desviación de la pendiente (Sm):**

$$\text{Ec. 2.5} \quad Sm = \frac{\sqrt{S^2_{yx}}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} = \frac{S_{yx}}{\sqrt{S_{xx}}}$$

- **Desviación del intercepto (SL):**

$$\text{Ec. 2.6} \quad SL = \sqrt{Sm^2 \frac{\sum x^2}{n}} = Sm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

- **Error Típico ($S_{y,x}$):**

$$\text{Ec. 2.7} \quad S_{x,y} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n-2}}$$

- **Límite de confianza de la pendiente:**

$$\text{Ec. 2.8} \quad m: m \pm t.Sm$$

- **Límite de confianza del intercepto:**

$$\text{Ec. 2.9} \quad L: L \pm t.SL$$

Se aceptaron curvas de calibración con un $r^2 \geq 0.9999$, se establecieron los límites de confianza para el intercepto y la pendiente mediante t-student al 95% de confianza para n-2 grados de libertad, los mismos que sirvieron como controles de calidad del método una vez validado. Se utilizó el valor de $S_{y,x}$ para la estimación de la incertidumbre por curva de calibración como contribución a la incertidumbre total del método. (2)

2.3.2.2 Límite de Detección

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluó el límite de detección con la siguiente relación:

$$\text{Ec. 2.10} \quad LOD = 3 L/m$$

En donde:

L = intercepto

m = pendiente

2.3.2.3 Límite de cuantificación

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluó el límite de cuantificación con la siguiente relación:

Ec. 2.11

$$LOQ = 6 L/m$$

En donde:

L = intercepto

m = pendiente

2.3.2.4 Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)

El estudio de repetibilidad y reproducibilidad se realizó utilizando muestras artificialmente contaminadas con DON (muestras spike), mediante el siguiente esquema: (2)

		Respuestas				
NIVEL	Repeticiones	Día 1	Día 2	Día3	Día 4	Día 5
P ₁	R ₁ R ₂ R ₃					
P ₂	R ₁ R ₂ R ₃					
P ₃	R ₁ R ₂ R ₃					

Mediante estos resultados se realizó un análisis de varianza y se evaluó la desviación estándar de la repetibilidad S_r y la desviación estándar de la reproducibilidad S_R .

El análisis de varianza se realizó mediante el siguiente esquema: (2)

Análisis simple de la varianza			
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM=SDC/v)
Entre niveles (Between)	$v_1 = k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^K p (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SCD_B}{k - 1}$
Dentro de niveles (Within)	$v_2 = n - k$	$SDC_W = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^p p (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SCD_W}{n - k}$
Total	$v = n - 1$ $= (v_1 - v_2)$	$SDC_T = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^p p (\bar{x}_{ij} - \bar{x})^2$ $= (SDC_B - SDC_W)$	$DCM_T = \frac{SCD_T}{n - 1}$

Las diferencias cuadráticas medias (DCM) son las respectivas varianzas.

Se evaluó el valor estimado de F el mismo que será comparado con el correspondiente valor de F tabulado:

$$\text{Ec. 2.12} \quad \hat{F} = \frac{DCM_B}{DCM_W}$$

La desviación estándar de repetibilidad (S_r) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 2.13} \quad S_r = \sqrt{DCM_W}$$

Utilizando la S_r se calculó la desviación estándar relativa de repetibilidad RSD_r .

$$\text{Ec. 2.14} \quad RSD_r = \left(\frac{S_r}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Se aceptaron valores de $RSD_r \leq 20$, de acuerdo a criterios expuestos en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas para métodos de análisis de control de DON. (Anexo No. 9).

La desviación estándar de reproducibilidad (S_R) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Ec. 2.15} \quad S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

Donde:

$$\text{Ec. 2.16} \quad S_L^2 = \frac{DCM_B + DCM_W}{p}$$

Siendo el denominador (p) igual al número de observaciones que se realizan cada día en cada nivel. (2)

Por lo tanto:

$$p = 3$$

Utilizando S_R se calculó la desviación estándar relativa de reproducibilidad RSD_R .

$$\text{Ec. 2.17} \quad RSD_R = (S_R / \bar{X}) \times 100$$

La RSD_R se evaluó de acuerdo a la ecuación de Horwitz:

$$\text{Ec. 2.18} \quad RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

En donde C es la tasa de concentración (es decir, $1=100\text{g}/100\text{g}$, $0,001=1000\text{mg}/\text{kg}$).

Se aceptaron valores de $RSD_R < 40\%$, de acuerdo a la ecuación de Horwitz, que relaciona los valores de RSD_R con el nivel de la tasa de concentración en la que se va a evaluar el analito (rango de > 500 ppb). (2)

2.3.2.5 Exactitud

Se calculó el porcentaje de recuperación en cada uno de los niveles expuestos en la tabla para el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ec. 2.19} \quad \% \text{Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100$$

C_{obtenido} = resultado obtenido.

C_{esperado} = valor teórico del mismo.

Se aceptaron valores entre el 70 y 120% de recuperación de DON en cada nivel en muestras de trigo artificialmente contaminadas y en el material de referencia certificado. (Anexo No. 9).

2.3.2.6 Selectividad

Este parámetro se estableció bibliográficamente pues el método seleccionado cuenta con información sobre su selectividad y las interferencias que se conocen, además se está utilizando columnas de inmunoafinidad específicas con anticuerpos monoclonales específicos para DON, que permiten separar al analito de las interferencias producidas por la matriz.

2.3.2.7 Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre se basó en el siguiente procedimiento: (2)

- Se colocará la expresión del resultado final a obtener (Estimación de salida) en función de todas las estimaciones de entrada (incluyendo las estimaciones de las magnitudes de influencia que se consideren convenientes).

Ec. 2.20 $Y = f(X_1, \dots, X_n)$
Estimación de Entrada + Estimación de Magnitud de Influencia (si interesa)

Nota:

Medida directa: Una sola magnitud de entrada.

Medida indirecta: Varias magnitudes de entrada.

- Se aplicó la ley de propagación de las varianzas [Se expresa $u(y)$ en función de las $u(x_i)$]

Ec. 2.21
$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)}$$

Donde:

$u(y)$ = incertidumbre típica combinada (u)

El cálculo de la incertidumbre asociada a cada x_i , $u(x_i)$, se realizó considerando todas las contribuciones asociadas según la siguiente ecuación general:

Ec. 2.22
$$u(x_i) = [\sum u^2(\text{tipo A y B})]^{1/2}$$

- Se identificó y estimó otras contribuciones no consideradas.
- Se calculó la incertidumbre típica total $u(y)_{total}$ añadiendo a $u(y)$ las contribuciones determinadas en el paso anterior.

Ec. 2.23
$$u(y)_{total} = [u^2(y) + \sum \text{otras contribuciones no consideradas}^2]^{1/2}$$

- Se determinó el valor del factor de cobertura k .

Ec. 2.24 $k = 2$ al 95.45 % de confianza y $v_{ef} = \infty$

Donde:

v_{ef} = N° de grados efectivos de libertad

El cálculo de v_{ef} se realizó con la siguiente fórmula:

Ec. 2.25
$$v_{ef} = \frac{u^4 y_{total}}{\sum_{i=1}^N \frac{(c_{xi})^4 u_{xi}^4}{V_{xi}} + \sum_{i=1}^N \frac{(otras\ contribuciones)^4}{v}}$$

- Según la ecuación descrita a continuación se calculó la incertidumbre asociada al resultado:

Ec. 2.26
$$U = k \cdot u(y)_{total} + \sum |correcciones\ no\ realizadas|$$

Donde:

U = Incertidumbre asociada al resultado

k = Factor de cobertura

- Finalmente se expresó el resultado de la siguiente forma:

Ec. 2.27
$$y \pm U$$

- Se aceptarán valores de incertidumbre inferiores al 40% del límite de cuantificación.

2.3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE DON EN TRIGO

2.3.3.1 Procedimiento

En la presente investigación se evaluó una población de 297 entradas, compuesta por 327 líneas mejoradas de trigo.

2.3.3.2 Análisis Estadístico

Se estableció el porcentaje de incidencia de DON en las muestras contaminadas con la siguiente expresión:

$$\text{Ec. 2.28} \quad \% \text{ incidencia} = \frac{N^{\circ} \text{muestras contaminadas}}{N^{\circ} \text{total de muestras}} \times 100$$

Se estableció el promedio de contaminación en las muestras que presenten incidencia de DON mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ec. 2.29} \quad \text{Prom. contaminación} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{Kg}} \right) = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Se aplicó la prueba t-student para comparar la cantidad de contaminación obtenida del análisis en cada muestra de trigo con el límite máximo permitido 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con $\alpha = 0.05$, mediante la siguiente expresión:

$$\text{Ec. 2.30} \quad t_{ob} = \frac{(x_o - x_a)}{s} \sqrt{n}$$

Donde:

X_o = Valor contaminación de DON en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la muestra de trigo analizadas.

X_a = Valor de contaminación referencial en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

S = Desviación estándar.

n = número de repeticiones.

Se aplicó los siguientes criterios:

- Si $t_{ob} < t_{tabla}$ no existe diferencia estadística significativa entre el promedio de contaminación y el valor referencial con un $\alpha = 0.05$.
- Si $t_{ob} > t_{tabla}$ existe diferencia estadística significativa entre el promedio de contaminación y el valor referencial con un $\alpha = 0.05$.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 FASE I: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE DEOXINIVALENOL (DON) EN TRIGO UTILIZANDO COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR UV.

3.1.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLGÍA

La estandarización del método para la determinación de DON en trigo utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se realizó con un estándar Sigma® D0156 con una pureza $\geq 98\%$.

Para establecer las condiciones del sistema cromatográfico se realizaron pruebas en el equipo, tomando como referencia la técnica de análisis para Deoxinivalenol en trigo de la R.BIOPHARM, obteniendo los siguientes parámetros:

- Longitud de onda: 218 nm
- Flujo: 1 mL/minuto
- Presión: 68 bares
- Temperatura: 40°C
- Volumen de inyección: 20 μ L
- Fase móvil: Acetonitrilo:Agua; 10:90 (v/v)

3.1.2 LINEALIDAD Y RANGO LINEAL

Para evaluar este parámetro se utilizó un estándar de DON Sigma® D0156 con una pureza \geq 98% (5 mg), a partir del cual se preparó una solución madre del mismo, inyectando un volumen de 4 mL de acetonitrilo, para obtener una concentración de DON de 1,25 mg/mL, la misma que fue valorada utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

De la solución madre de Deoxinivalenol, se preparó un estándar de trabajo para elaborar las curvas de calibración, diluyendo esta solución hasta una concentración de 5000 ng/mL. Partiendo de ésta se preparó 5 estándares mediante diluciones sucesivas con acetonitrilo, en las concentraciones que se observan en el cuadro No. 1.

CUADRO No. 1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES PARA CURVAS DE CALIBRACIÓN DE DON. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Volumen de solución DON (μL)	Volumen de Acetonitrilo (μL)	Concentración de DON (ng/mL)	Concentración de DON (ng)
1000,00	0,00	5000,00	100,00
500,00	500,00	2500,00	50,00
250,00	750,00	1250,00	25,00
125,00	875,00	625,00	12,50
62,50	937,50	312,50	6,25

Luego de preparados los estándares se realizó diariamente una curva de calibración por triplicado en cada punto durante cinco días. Los resultados promedios de la curva de calibración de DON para el día 1 se muestran en el cuadro No. 2.

CUADRO No. 2 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 1. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración (ng)	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
Área Curva 1	6,986	13,477	27,934	56,957	114,060

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No. 2, se graficó la concentración de DON (ng) versus el Área (mAU) para el día 1.

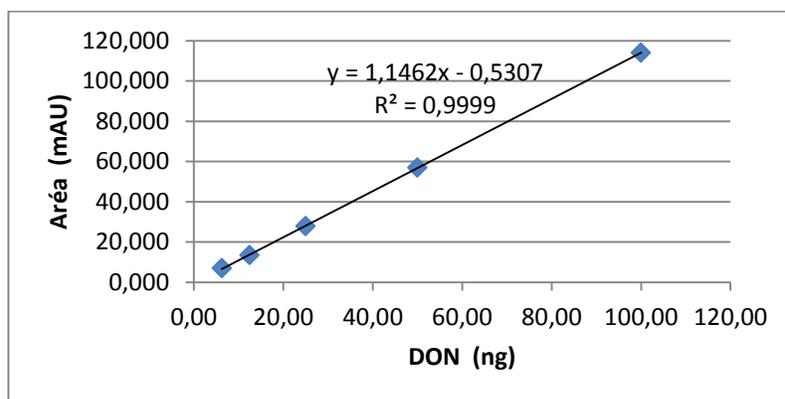


GRÁFICO No. 1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 1. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

En el gráfico No. 1 se puede observar la ecuación obtenida para la primera curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 1,1462 y de la ordenada al origen de -0,5307, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,9999, el mismo que indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de DON. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 1, los resultados se observan en el cuadro No. 3:

CUADRO No. 3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 1. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Parámetros	Curva 1
Pendiente (m)	1,1462
Intercepto (Lo)	-0,5307
Error típico (S_{v,x})	0,3139
Desv. Est. de m (Sm)	0,0041
Desv. Est. de Lo (SLo)	0,2125
Valor en tabla (t)	3,1824
Valor calculado (tr)	278,3560
m mín	1,1330
m máx	1,1590
Lo mín	-1,2070
Lo máx	0,1460

En el cuadro No. 3 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área). Observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 278,3560 y el valor t de la tabla al 95% de confianza es de 3,1824, lo que implica que existe una alta correlación lineal entre X (concentración) y Y (área).

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 1, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 1,1462 y de la ordenada al origen (Lo) de -0,5307, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) y desviación estándar de la ordenada al origen (SLo), con valores de 0,0041 y 0,2125 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 1,1330 a 1,1590 y de intercepto de -1,2070 a 0,1460.

De igual manera en el cuadro No. 3 se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 1 con un valor de 0,3139, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de DON para el día 2 se muestran en el cuadro No 4:

CUADRO No. 4 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 2. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración (ng)	6,2500	12,5000	25,0000	50,0000	100,0000
Área Curva 2	7,2310	13,6090	28,1810	57,0230	114,7940

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No. 4, se graficó la concentración de DON (ng) versus el Área (mAU) para el día 2.

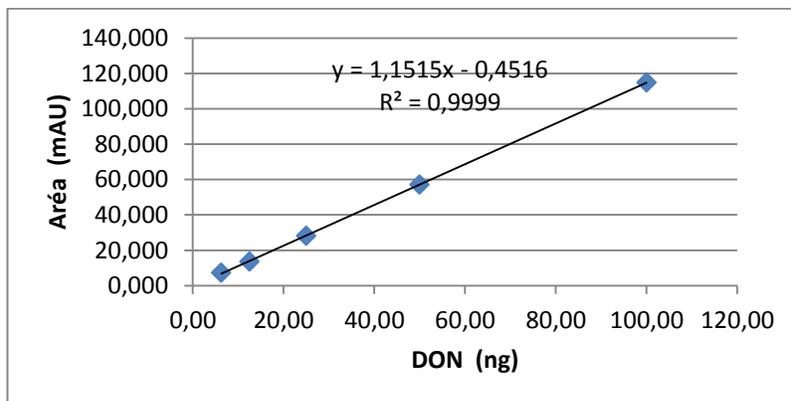


GRÁFICO No. 2 CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 2. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

En el gráfico No. 2 se puede observar la ecuación obtenida para la segunda curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 1,1515 y de la ordenada al origen de - 0,4516, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,9999, el mismo que indica

que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de DON. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 2, los resultados se observan en el cuadro No. 5:

CUADRO No. 5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 2. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Parámetros	Curva 2
m	1,1515
Lo	-0,4516
S_{v,x}	0,3606
Sm	0,0047
SLo	0,2441
t	3,1824
tr	243,4760
m mín	1,1360
m máx	1,1670
Lo mín	-1,2280
Lo máx	0,3250

En el cuadro No. 5 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X y Y, observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 243,4760 y el valor t de las tablas a al 95% de confianza es de 3,1824, lo que implica que existe una alta correlación lineal entre X (concentración) y Y (área).

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 2, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 1,1515 y de la ordenada al origen (Lo) de -0,4516, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) y desviación estándar de la ordenada al origen (SLo), con valores de 0,0047 y 0,2441 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de

cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 1,1360 a 1,1670 y de intercepto de -1,2280 a 0,3250.

De igual manera en el cuadro No. 5 se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 2 con un valor de 0,36056, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de DON para el día 3 se muestran en el cuadro No 6:

CUADRO No. 6 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 3. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración (ng)	6,2500	12,5000	25,0000	50,0000	100,0000
Área Curva 3	7,1240	13,8440	27,9710	56,4930	114,6410

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No. 6, se graficó la concentración de DON (ng) versus el Área (mAU) para el día 3.

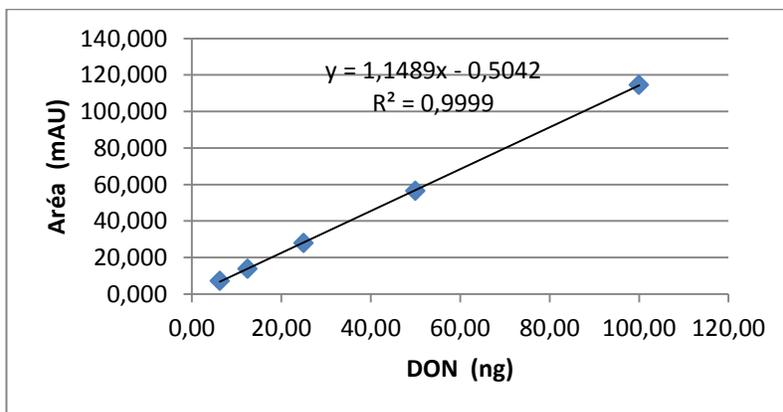


GRÁFICO No. 3 CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 3. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

En el gráfico No. 3 se puede observar la ecuación obtenida para la tercera curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 1,1489 y de la ordenada al origen de -0,5042, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,9999, el mismo que indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de DON. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 3, los resultados se observan en el cuadro No. 7:

CUADRO No. 7 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 3. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Parámetros	Curva 3
m=	1,1489
Lo=	-0,5042
S_{v,x}=	0,4191
Sm=	0,0055
SLo=	0,2837
t=	3,1824
tr=	209,0130
m mín=	1,1310
m máx=	1,1660
Lo mín=	-1,4070
Lo máx=	0,3990

En el cuadro No. 7 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X y Y, observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 209,0130 y el valor t de las tablas a al 95% de confianza es de 3,1824, lo que implica que existe una alta correlación lineal entre X (concentración) y Y (área).

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 3, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 1,1489 y de la ordenada al origen (Lo)

de -0,5042, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (SL_o), con valores de 0,0055 y 0,2837 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 1,1310 a 1,1660 y de intercepto de -1,4070 a 0,3990.

De igual manera en el cuadro No. 7 se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 3 con un valor de 0,4191, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de DON para el día 4 se muestran en el cuadro No 8:

CUADRO No. 8 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACION DE DON PARA EL DÍA 4. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración (ng)	6,2500	12,5000	25,0000	50,0000	100,0000
Área Curva 4	6,9930	13,6360	28,1300	57,1190	114,5370

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No. 8, se graficó la concentración de DON (ng) versus el Área (mAU) para el día 4.

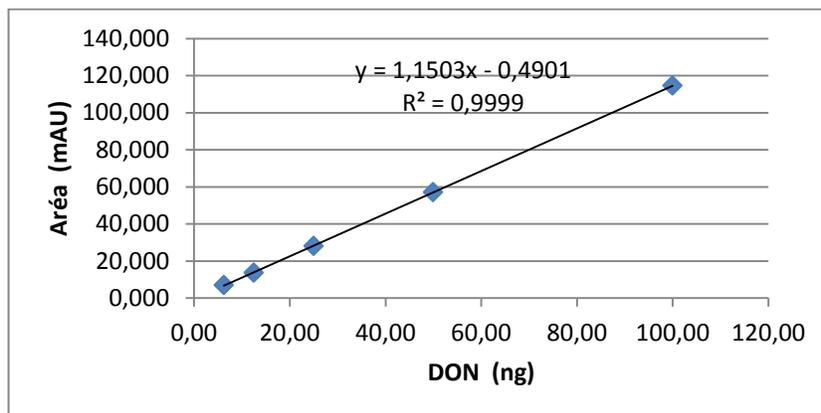


GRÁFICO No. 4 CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 4. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

En el gráfico No. 4 se puede observar la ecuación obtenida para la cuarta curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 1,1503 y de la ordenada al origen de -0,4901, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,9999, el mismo que indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de DON. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 4, los resultados se observan en el cuadro No. 9:

CUADRO No. 9 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 4. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Parámetros	Curva 4
m=	1,1503
Lo=	-0,4901
S_{v,x}=	0,2435
Sm=	0,0032
SLo=	0,1649
t=	3,1824
tr=	360,1140
m mín=	1,1400
m máx=	1,1600
Lo mín=	-1,0150
Lo máx=	0,0350

En el cuadro No. 9 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X y Y, observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 360,1140 y el valor t de las tablas a al 95% de confianza es de 3,1824, lo que implica que existe una alta correlación lineal entre X (concentración) y Y (área).

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 4, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 1,1503 y de la ordenada al origen (Lo) de -0,4901, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) y desviación estándar de la ordenada al origen (SL_o), con valores de 0,0032 y 0,1649 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 1,1400 a 1,1600 y de intercepto de -1,0150 a 0,0350.

De igual manera en el cuadro No. 9 se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 4 con un valor de 0,2435, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de DON para el día 5 se muestran en el cuadro No. 10:

CUADRO No. 10 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 5. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración (ng)	6,2500	12,5000	25,0000	50,0000	100,0000
Área Curva 5	6,9780	13,7670	27,9330	56,6430	114,0930

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No. 10, se graficó la concentración de DON (ng) versus el Área (mAU) para el día 5.

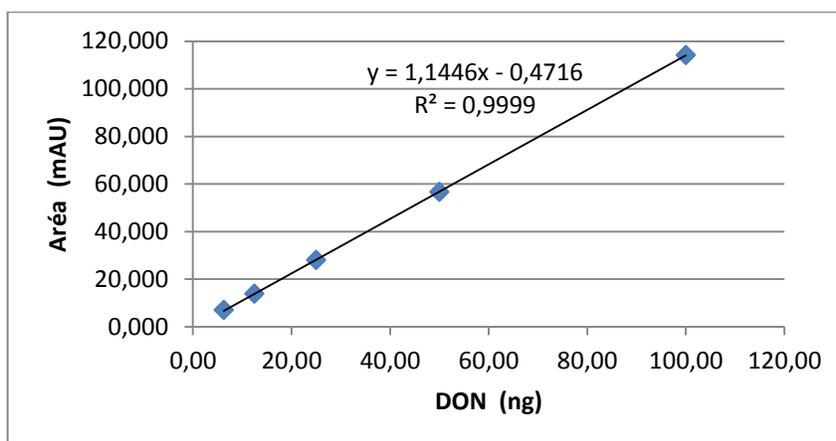


GRÁFICO No. 5 CURVA DE CALIBRACIÓN DE DON PARA EL DÍA 5. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

En el gráfico No. 5 se puede observar la ecuación obtenida para la quinta curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 1,1446 y de la ordenada al origen de -0,4716, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,9999, el mismo que indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de DON. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 5, los resultados se observan en el cuadro No. 11:

CUADRO No. 11 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 5. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Parámetros	Curva 5
m=	1,1446
Lo=	-0,4716
S_{v,x}=	0,2317
Sm=	0,0030
SLo=	0,1569
t=	3,1824
tr=	376,6240
m mín=	1,1350
m máx=	1,1540
Lo mín=	-0,9710
Lo máx=	0,0280

En el cuadro No. 11 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X y Y, observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 376,6240 y el valor t de las tablas a al 95% de confianza es de 3,1824, lo que implica que existe una alta correlación lineal entre X (concentración) y Y (área).

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 5, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 1,1446 y de la ordenada al origen (Lo) de -0,4716, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) y desviación estándar de la ordenada al origen (SL_o), con valores de 0,0030 y 0,1569 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 1,1350 a 1,1540 y de intercepto de -0,9710 a 0,0280.

De igual manera en el cuadro No. 11 se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 5 con un valor de 0,2317, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado.

Para el cálculo de la curva promedio de los 5 días se procedió a elaborar la curva con los datos promedios del área en función de la concentración. Los resultados promedios de la curva de calibración promedio de DON se muestran en el cuadro No. 12:

CUADRO No. 12 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DE DON. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración (ng)	6,2500	12,5000	25,0000	50,0000	100,0000
Promedio Área (mAU)	7,0624	13,6664	28,0298	56,8471	114,4247

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No. 12, se graficó la concentración de DON (ng) versus el Área (mAU) para el promedio de los cinco días.

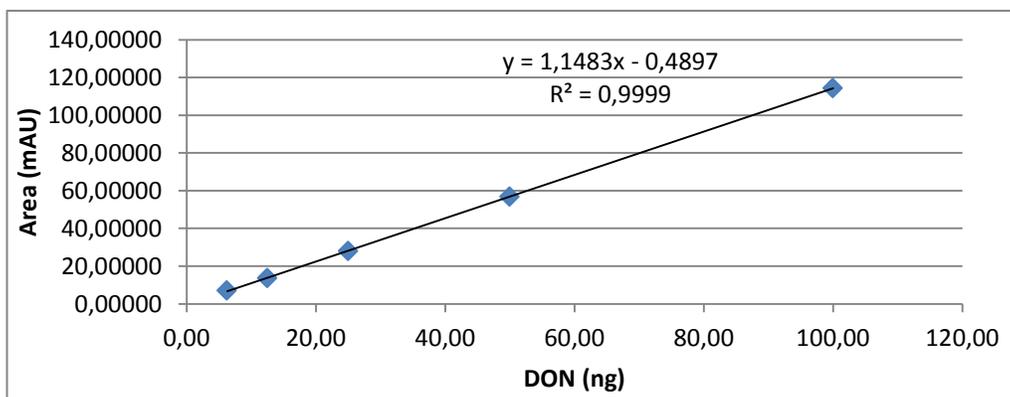


GRÁFICO No. 6 CURVA DE CALIBRACION GLOBAL DE DON. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

En el gráfico No. 6 se puede observar la ecuación obtenida para la curva de calibración promedio, encontrándose un valor de la pendiente de 1,1483 y de la ordenada al origen de -0,4897, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,9999, el mismo que indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de DON. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración global, los resultados se observan en el cuadro No. 13:

CUADRO No. 13 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DE DON. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Parámetros	Global
m=	1,1483
Lo=	-0,4897
S_{v,x}=	0,4191
Sm=	0,0041
SLo=	0,2124
t=	3,1824
tr=	293,5164
m mín=	1,1314
m máx=	1,1665
Lo mín=	-1,4071
Lo máx=	0,3987

En el cuadro No. 13 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X y Y, observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 293,5164 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,1824, lo que implica que existe una alta correlación lineal entre X (concentración) y Y (área).

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración promedio, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 1,1483 y de la ordenada al origen (Lo) de -0,4987, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) y desviación estándar de la ordenada al origen (SL_o), con valores de 0,0041 y 0,2124 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de

cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 1,1314 a 1,1665 y de intercepto de -1,4071 a 0,3987.

De igual manera en el cuadro No. 13 se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración promedio con un valor de 0,4191, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado.

3.1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se realizó la estimación del límite de detección y de cuantificación en base a los resultados establecidos en el estudio de linealidad, esto es utilizando el valor del intercepto, en este caso 0,4987 y de la pendiente, siendo el valor de la misma de 1,1483. Para la determinación del límite de detección se aplica la ecuación 2.10 y para el cálculo del límite de cuantificación se aplica la ecuación 2.11. De esta manera se obtuvo un límite de detección de 1,2780 ng y un límite de cuantificación de 2,5560 ng. Estos resultados se transformaron a valores representativos en muestra, utilizando los volúmenes de inyección y la masa de muestra inyectada al equipo los resultados se observan a continuación en el cuadro No. 14:

CUADRO No. 14 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN UTILIZANDO CURVA DE CALIBRACIÓN. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Límite de Detección ng DON	Límite de Detección ng DON/g	Límite de Cuantificación ng DON	Límite de Cuantificación ng DON/g
1,2780	38,3400	2,5560	76,6800

De esta manera se puede deducir que el método, presenta un límite de detección estimado con estándar de 38,3400 ng/g y de cuantificación de 76,6800 ng/g aproximadamente, el

mismo que fue calculado posteriormente en matriz. Los resultados se muestran a continuación en el cuadro N°15.

CUADRO No. 15 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN MATRIZ. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Límite de Detección	Límite de Cuantificación
114 ng DON/g muestra	228 ng DON/g muestra

Con estos resultados se establece que el límite de detección estimado en muestra es 114 ng DON/g muestra y de cuantificación de 228 ng DON/g muestra, indicando que el método presenta una alta sensibilidad para el análisis de DON, y cumple con las normativas para este tipo de análisis.

3.1.4 PRECISIÓN

Para establecer la precisión del método se realizó el análisis de muestras de trigo contaminado artificialmente con DON (muestras spike) en tres niveles de concentración bajo, medio y alto de la curva de calibración, por triplicado en cinco días diferentes, los resultados de esta prueba se presentan en el cuadro No. 16:

CUADRO No. 16 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PRECISIÓN DEL MÉTODO. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Concentración de DON (ng/g)					
Muestra spike	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
250	225,3796	253,7815	237,9765	230,3984	251,2298
	248,2276	241,7881	249,0091	239,8358	243,0191
	240,0844	245,5672	236,5503	239,6182	249,0843
1500	1347,2304	1449,0527	1358,5401	1415,8266	1417,8501
	1368,6941	1392,4061	1412,1214	1379,8096	1406,7396
	1347,3772	1360,4162	1400,7134	1412,1460	1378,9232
2500	2157,7333	2153,0005	2175,0000	2224,4344	2237,0713
	2251,4354	2090,6955	2186,7905	2177,7758	2137,4875
	2188,2244	2151,4296	2229,0000	2120,0533	2223,1021

En base a los resultados que se muestran en el cuadro No. 16, se realizó un análisis de varianza, calculando primeramente la suma de diferencias cuadráticas entre niveles (SDCb) y la suma de diferencias cuadráticas dentro de niveles (SDCw). Así mismo se calculó las diferencias cuadráticas medias entre niveles (DCMb) y dentro de niveles (DCMw). Estos resultados se muestran en el cuadro No. 17.

CUADRO No. 17 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA SUMA DE DIFERENCIAS CUADRÁTICAS MEDIAS ENTRE NIVELES Y DENTRO DE NIVELES. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

ng/g	SDCb	DCMb	SDCw	DCMw
250	315,7972	78,9493	530,6907	53,0691
1500	4984,0349	1246,0087	751,4553	751,7455
2500	10166,5040	2541,6260	19987,1175	1998,7117

En base a los resultados del cuadro No. 17 se evaluó la desviación estándar de la repetibilidad (S_r) (ecuación 2.13) y la desviación estándar de la reproducibilidad (S_R) (ecuación 2.15), así como la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) (ecuación 2.14) y la desviación estándar relativa de reproducibilidad (RSD_R) (ecuación 2.17). Estos resultados se pueden apreciar en el cuadro No. 18.

CUADRO No. 18 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

ng/g	S_r	RSD_r (%)	SL²	S_R	RSD_R (%)
250	7,2800	2,91	8,6267	7,8500	3,14
1500	27,4200	1,83	164,7544	30,2700	2,02
2500	44,7100	1,79	180,9714	46,6900	1,87

Como se puede apreciar en el cuadro No. 18, los valores de RSD_r y RSD_R cumplen con los criterios a los métodos de análisis de Deoxinivalenol por la CE, que establece que se aceptará valores de RSD_r ≤ 20% y RSD_R ≤ 40%, cuando el rango de concentración en el que se evalúa el analito es > 100 y > 500 µg/kg.

3.1.5 EXACTITUD

La exactitud se determinó en base al porcentaje de recuperación. Para lo cual en las muestras de trigo artificialmente contaminadas en los tres niveles de concentración: 250 ng/g, 1500 ng/g y 2500 ng/g, se calculó el porcentaje de recuperación utilizando la ecuación 2.19, obteniéndose un porcentaje de recuperación total de 92.40 %. Los porcentajes de recuperación promedio por día y total se muestran en el cuadro No 19:

CUADRO No. 19 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN POR DÍA Y TOTAL. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

NIVEL (ng/g)	% DE RECUPERACIÓN				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
250	95,16	98,82	96,47	94,65	99,11
1500	90,30	93,37	92,70	93,51	93,41
2500	87,97	85,27	87,88	86,96	87,97
% Recuperación Promedio por Día	91,14	92,49	92,35	91,71	93,50
% Recuperación Promedio Total	92,40%				

Como se puede apreciar en el cuadro No. 19, los valores de porcentaje de recuperación por día y total cumplen con los criterios exigibles a los métodos de análisis de Deoxinivalenol por la CE, que establece que se aceptará valores de porcentaje de recuperación de 70 a 120%, cuando el rango de concentración en el que se evalúa el analito es > 100 y > 500 ng/g (µg/kg) (ppb).

De igual manera se evaluó la exactitud del método, determinando el porcentaje de recuperación en el material de referencia certificado, obteniéndose un porcentaje de recuperación de 94,6 %, lo cual demuestra que el método presenta una exactitud adecuada, la misma que se encuentra dentro de los valores exigidos en la Comunidad Europea (70 a 120%). Los resultados del análisis del material de referencia se muestran en el cuadro No.20:

CUADRO No. 20 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN EN MATERIAL DE REFERENCIA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

DEOXINIVALENOL MCR (ng/g)	Valor medio Rango satisfactorio	782 523 – 1042
Resultados LSAIA	R1	720,67
	R2	758,38
	Promedio	739,53
RECUPERACIÓN CON MATERIAL DE REFERENCIA (%)	94,60%	

3.1.6 SELECTIVIDAD

Se estableció bibliográficamente, debido a que el método seleccionado utiliza columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para DON, que permiten separar al analito de las interferencias producidas por la matriz.

Además un indicador de la selectividad es la pureza de pico que se puede observar en un cromatograma con pico de analito libre de interferencias, Figura No. 4. (Anexo No. 13).

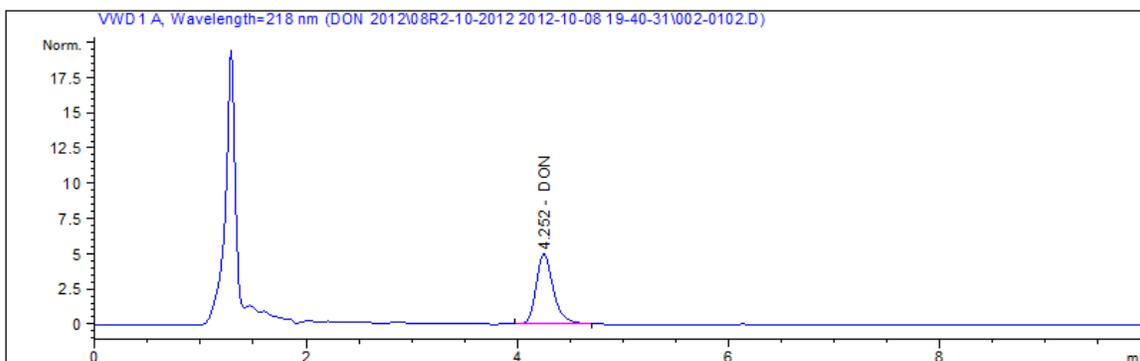


FIGURA No. 4 CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE TRIGO CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE CON DEOXINIVALENOL. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

3.1.7 INCERTIDUMBRE

Para el cálculo de la incertidumbre, primeramente en base a la expresión final del análisis (ecuación 3.1), se calculó los coeficientes de sensibilidad mediante derivadas parciales de cada una de las variables con respecto al resultado final utilizando la ecuación 1.3, los resultados se exponen en el cuadro No. 20.

$$\text{Ec. 3.1} \quad \text{DON} \frac{ng}{g} = \frac{C}{M_S} * \frac{V_1}{V_2} * \frac{V_3}{V_4} * R$$

C= Lectura del equipo expresada en nanogramos

V₁= Volumen de extracción

V₂= Volumen de la alícuota del extracto aplicado en la columna de inmunoafinidad

V₃= Volumen final del extracto redissuelto en acetonitrilo

V₄= Volumen del extracto inyectado al equipo

M_s= Peso de muestra en gramos

R= Factor de Recuperación

CUADRO No. 21 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD PARA LA INCERTIDUMBRE. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Variable	Coefficiente de sensibilidad (c)
C	100 ng/g
V ₁	200 mL
V ₂	4 mL
V ₃	300 µL
V ₄	20 µL
M _s	25 g
R	1,06

Posteriormente se calculó la contribución de la incertidumbre asociada a cada variable, además de la contribución asociada al factor de recuperación aplicando la ecuación 1.7. A continuación, se calculó la incertidumbre típica combinada aplicando la ecuación 2.21. Por último se calculó la incertidumbre expandida (ecuación 1.19), de esta manera se obtuvo una incertidumbre de 40,54, que va asociada al resultado final, de tal manera que el resultado obtenido en la determinación de Deoxinivalenol en trigo utilizando Columnas de Inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector UV tendrá un margen de error de +/- 40,54 ng/g (ppb).

Los resultados de las contribuciones de cada variable, la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para la determinación de DON en trigo se pueden apreciar en el cuadro No. 22.

CUADRO No. 22 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LAS CONTRIBUCIONES, INCERTIDUMBRE COMBINADA E INCERTIDUMBRE EXPANDIDA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Fuente	Contribución incertidumbre (u*c)	V_i ou V_{ef}	
Calibración (C)	19,1395	∞	
Volumen de extracción (V₁)	1,3788	∞	
Volumen de alícuota de extracto tomado (V₂)	4,6524	∞	
Volumen de redisolución de extracto (V₃)	0,0607	∞	
Volumen de extracto inyectado al equipo (V₄)	4,5788	∞	
Peso de muestra (Ms)	0.0142	∞	
Factor de recuperación (R)	0,0326	∞	
Incertidumbre combinada total (u)	20,2691		
Incertidumbre expandida (U)	k	2	40,54

3.2 FASE II: ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DON EN UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS MEJORADAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*), MEDIANTE EL MÉTODO DESARROLLADO Y VALIDADO PREVIAMENTE EN EL LABORATORIO.

Se realizó el análisis de DON en las muestras de trigo usando el método previamente validado en esta investigación. En el Anexo No. 12 se presentan los resultados del análisis de las muestras de trigo, para cada parcela y entrada.

Las líneas mejoradas de trigo (*Triticum aestivum*) presentaron una contaminación por DON menor al límite de cuantificación (< 228 ng/g), Por lo tanto las muestras cumplen con el

valor designado por la Unión Europea que establece que el contenido máximo para este contaminante es 750 ng/g ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (ppb) en trigo.

Desde el punto de vista de seguridad alimentaria, y al conocer que las diferentes líneas de trigo analizadas fueron producidas en el INIAP-EESC y en el CIMMYT, los resultados obtenidos da indicios de que el *Fusarium* no permanece estable por las condiciones climáticas a las cuales fue inoculado, además se puede establecer que las muestras presentan una resistencia a dicho hongo trayendo como consecuencia un bajo nivel de DON en el trigo estudiado, de igual manera los resultados indican que la población no tiene riesgo de exposición a esta micotoxina a partir del consumo de estas nuevas variedades de trigo.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES:

FASE I: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE DON EN TRIGO UTILIZANDO COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR UV.

1. Se establecieron los parámetros de validación acordes a la metodología establecida por la norma ISO/IEC 17025 y ASECAL, para los laboratorios de ensayo y calibración. Los parámetros fueron los siguientes: Linealidad, Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad), Exactitud, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Selectividad e Incertidumbre.
2. El método analítico para determinar Deoxinivalenol utilizando purificación con Columnas de Inmunofinidad y cuantificación por HPLC con detector UV, se ha validado siguiendo un protocolo o plan de validación y reúne todos los requisitos de la norma ISO-IEC-17025:2005 para cumplir con las regulaciones de la Comunidad Europea (CE).
3. Se confirma la Hipótesis planteada en la Fase I, puesto que el proceso de validación evalúa experimentalmente los parámetros de calidad, asegurando de esta manera la aptitud del método, demostrando además que el mismo es aplicable a la determinación de Deoxinivalenol en trigo.

FASE II: ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DON EN UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS MEJORADAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*), MEDIANTE EL MÉTODO DESARROLLADO Y VALIDADO PREVIAMENTE EN EL LABORATORIO.

1. Se determinó que las 327 muestras de trigo analizadas no presentan contaminación por Deoxinivalenol, es decir presentan un porcentaje de incidencia del 0%.
2. Se confirma la Hipótesis planteada en la Fase II, ya que los niveles de concentración de DON en la población de líneas mejoradas de trigo al no presentar contaminación se enmarcan dentro del límite máximo de 750 µg/kg establecido por la Comisión Europea para harina de trigo.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES:

4. Seguir todas las instrucciones de los protocolos analíticos y las buenas prácticas de laboratorio para evitar resultados erróneos por falta de cuidado en la manipulación; los elementos de ensayo y los equipos de medición.
5. Durante el estudio de validación debe controlarse el nivel de saturación de la columna del HPLC, a fin de evitar la formación de picos atípicos (asimetría), es recomendable someter a la columna a la limpieza luego de su jornada de trabajo.
6. Debido que se trabaja con cantidades muy pequeñas del analito la tarea del lavado del material debe ser muy cuidadosa, la desinfección debe realizarse con una solución de Hipoclorito de Sodio al 5% durante 30 minutos y su posterior lavado con agua y jabón líquido.
7. Se recomienda la utilización de Nitrógeno de elevada pureza en el proceso de secado de las muestras, ya que en el análisis del DON se requiere concentraciones relativamente bajas a nivel de ppb.
8. Realizar un estudio acerca del contenido de DON en otros productos derivados del trigo, así como también determinar la Ocurrencia Natural de DON en las zonas productoras de trigo a nivel nacional, así como en otros rubros de interés en el mercado alimentario ecuatoriano.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN:

La Evaluación de la Concentración de Deoxinivalenol (DON) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en una Población de Líneas mejoradas de Trigo (*Triticum aestivum*)”, se realizó en el Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP – Quito, teniendo como objetivos validar el método de análisis de DON en trigo utilizando columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector UV, y el análisis del contenido de DON en una población de líneas mejoradas de trigo (*Triticum aestivum*), correspondientes al proyecto “Association mapping for detecting QTLs for Fusarium Head Blight and Yellow Rust resistance in Bread Wheat”.

La metodología utilizada se basó en el método de la R.BIOPHARM - Ref. N°: A1-P50.V1 para el análisis de Deoxinivalenol en trigo, para ello se realizó la extracción del analito con 25 g de muestra en 200 mL de agua bi-destilada, se colocó 4 mL del extracto en la columna de inmunofinidad DONPREP, se lavó con 10 mL de agua bi-destilada y se eluyó con 3 mL de Acetonitrilo grado HPLC, posteriormente se llevó a sequedad con nitrógeno a 60°C y se reconstituyó con 300 µL de fase móvil (Agua:Acetonitrilo; 90:10; v/v), finalmente se realizó el análisis inyectando 20 µL en el HPLC con detector UV (218 nm).

Los resultados de la validación mostraron un porcentaje de pureza de pico de 100%; es lineal en un rango de 250 a 2500 ng/g, obteniéndose un coeficiente de correlación $r=0,9999$; es preciso puesto que en la repetibilidad se obtiene un $RSD_r \leq 20\%$ y reproducibilidad un $RSD_R \leq 40\%$; y finalmente es exacto porque se obtiene un porcentaje de recuperación de 92.4%, y

al resultado final va asociado una incertidumbre de $\pm 40,54$ ppb, de esta manera se comprueba la validez del método analítico.

Este método validado fue aplicado en la determinación de DON en 327 muestras de líneas mejoradas de trigo que fueron desarrolladas por el CIMMYT y cultivadas en la EESC del INIAP para evaluar la susceptibilidad o resistencia al *Fusarium*. Se obtuvo un porcentaje de incidencia de 0% de DON.

Se recomienda realizar un estudio acerca del contenido de DON en otros productos derivados del trigo, así como también en otros rubros de interés en el mercado alimentario nacional.

ABSTRACT

The assessment of the concentration of Deoxynivalenol (DON) by high resolution liquid chromatography on a Line Population improved wheat (*Triticum aestivum*), was conducted in the Laboratory and Analysis Services Food Research Experimental Station of Santa Catalina INIAP - Quito, with the objective to validate the method of analysis of DON in wheat using immunoaffinity columns and high resolution liquid chromatography with UV detection and analysis of DON content area in a population of breeding lines of wheat (*Triticum aestivum*), for the project "Association mapping for detecting QTLs for Fusarium Head Blight and Yellow Rust resistance in Bread Wheat".

The methodology is based on the method of R.BIOPHARM - Ref No: A1-P50.V1 for the analysis of Deoxynivalenol in wheat, for it was made analyte extraction with 25 g of sample in 200 mL of water bi-distilled, placed in 4 mL of extract DONPREP immunoaffinity column, washed with 10 mL of double distilled water and eluted with 3 mL of acetonitrile HPLC grade, then was dried with nitrogen at 60 °C and reconstituted with 300 µL of mobile phase (water:acetonitrile, 90:10, v/v) finally injecting analysis was performed in 20 µL HPLC with UV detector (218 nm).

The validation results showed a percentage peak purity of 100% is linear in a range of from 250 to 2500 ng/g, giving a correlation coefficient of $r = 0.9999$, is necessary since the repeatability is obtained $RSD_r < 20\%$ and reproducibility one $RSD_R < 40\%$, and finally is accurate because you get a percentage of 92.4% recovery and the end result is associated with an uncertainty of ± 40.54 ppb, so check the validity the analytical method. This validated method was applied to the determination of DON in 327 samples of wheat breeding lines were developed by CIMMYT and cultured in INIAP EESC to evaluate the susceptibility or resistance to *Fusarium*. We obtained a rate of 0% incidence of DON.

Conducting a study on the content of DON in other wheat products, as well as other Items of interest in the domestic food market.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFIA

1. **ASESORES EN CALIDAD Y MEDIO AMBIENTE (ASECAL).**, Cálculo de la Incertidumbre de Medida., s. ed., Madrid - España., ASECAL., 2008., Pp. 38.
2. **ASESORES EN CALIDAD Y MEDIO AMBIENTE (ASECAL).**, Validación de Métodos Analíticos., s. ed., Madrid - España., ASECAL., 2009., Pp.1 - 36.
3. **ASESORES EN CALIDAD Y MEDIO AMBIENTE (ASECAL).**, Acreditación de Métodos Analíticos., s. ed., Madrid - España., ASECAL., 2009., Pp. 21.
4. **AYKROD., W., y otros.**, El trigo en la alimentación humana., s.ed., Roma – Italia., FAO., 1970., Pp. 30 - 42.
5. **BELDEROK., B., y otros.**, Bread Making Quality of Wheat., s. ed., Springer – EE.UU., s. edt., 2000., Pp. 128 – 140.
6. **CARRILLO., L.**, Microbiología Agrícola., 3^{ra}. ed. Salta – Argentina., UNSA., 2009., Pp. 1 – 3.

7. **DENDY., D., y otros.,** Cereals and Cereal Products., s.ed., New York – EE.UU., Kluver Academic Plenum Publishers., 2001., Pp., 72 – 80.
8. **ESCOBAR., A., y otros.,** Determinación de Deoxinivalenol (Vomitoxina) en muestras de trigo por cromatografía líquida de alta resolución., s. ed., La Habana - Cuba., s. ed., 2004., Pp. 116 – 120.
9. **FORERO., D.,** Almacenamiento de Granos., s. ed., Bogotá – Colombia., UNAD., 2000., Pp. 32.
10. **HOSENEY., C.,** Principles of Cereal Science and Technology. American Association of Cereal Chemists, s. ed., Minnesota – EE.UU., s. ed., 1991., Pp. 43 – 52.
11. **KENT., N.,** Technology of Cereals., s. ed., Oxford – EE.UU., s. ed., 1991., Pp. 23 – 25.
12. **KENT., N.,** Technology of Cereals with special reference to wheat., s. ed., Oxford - EE.UU., s. ed., 1975., Pp. 53 – 56.
13. **POTTER., N.,** Ciencia de los Alimentos., 4^{ta} ed., Zaragoza - España., 1995 Editorial Acribia., Pp. 68 – 72.
14. **RUIZ., R.,** Cultivo del Trigo y la Cebada., s.ed., Bogotá – Colombia., s. ed., 2011., Pp. 32 – 36.
15. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO),** Perspectivas Alimentarias., s. ed., Roma – Italia., FAO., 2012. Pp. 2 – 4.

- 16. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).**, Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003., s. ed., Roma – Italia., FAO., 2003., Pp. 25 – 26.
- 17. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).**, Aseguramiento de la calidad y validación de metodología para análisis químicos., s. ed., Roma – Italia., FAO., 2003., Pp. 14.
- 18. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).**, Metodología de muestreo analítico, principios de metrología científica y cálculos de incertidumbre., s. ed., Roma – Italia., FAO., 2006., Pp. 66 – 75.
- 19. SAMSON., R., y otros.**, Introduction to food borne fungi., 7th ed., Ámsterdam - Holanda., Utrecht editorial., 2004., Pp. 30 – 42.
- 20. SORIANO., J.**, Micotoxinas de Alimentos., 3^{ra} ed., Madrid - España, Editorial Santos., 2007., Pp. 270 – 271.
- 21. VILLAR., L.**, El Cultivo de Trigo., s. ed., Bogotá – Colombia., s. ed., 2012., Pp. 157.
- 22. ZUÑIGA., J.**, Valor Nutricional y Potencial., Revista Inia Tierra Adentro., s. ed., Santiago de Chile – Chile., 2006., Pp. 26 – 28.
- 23. CIRILLO., T., y otros.**, Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs., Food Addit. Contam., Vol., 20., 2003., Pp. 566 - 571.

- 24. DUARTE., S., y otros.,** Micotoxinas en la Salud Pública., Revista de Salud Pública., Bogotá - Colombia., Vol.8., suppl.1., 2006., Pp. 130 – 132.
- 25. MESTERHAZY., A.,** Role of Deoxynivalenol in Aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in Resistance to *Fusarium Head Blight.*, [European Journal of Plant Pathology.](#), Ámsterdam – Holanda., [Vol. 108., Number 7.](#), 2002., Pp. 675 - 684.
- 26. ESPÍN., S.,** Informe del Taller Conjunto FAO/OPS sobre Prevención y Control de Micotoxinas en América Latina y el Caribe., s.ed., Quito - Ecuador., INIAP., 1991., Pp. 4 – 6.
- 27. INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP).,** Guía de Cultivo de Trigo., Programa de Cereales, Estación Experimental Santa Catalina., s. ed., Quito – Ecuador., INIAP., 2012., Pp. 2 – 14.
- 28. MÜHLEMANN., M., y otros.,** Mycotoxin contamination of Food in Ecuador., B: Ochratoxin A. deoxynivalenol. T-2 toxin and fumonisin. Mitt., Quito – Ecuador., Gebiete Lebensm Hyg., 1997., Pp. 593 - 612.
- 29. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION /INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION.,** Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración., 2^{da.} ed., Norma ISO/IEC 17025., Ginebra - Suiza., ISO., 2005., Pp. 13 – 17.

30. CORRALES., M., Validación de Métodos Analíticos por HPLC., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Facultad de Ciencias Químicas., Universidad Central del Ecuador., Quito – Ecuador., **TESIS** Dr. BQF., 1999., Pp. 13 – 18.

31. GÓMEZ., E., Caracterización de Cepas Toxigénicas del Género *Fusarium* mediante Técnicas de Biología Molecular., Facultad de Biotecnología., Universidad Politécnica de Valencia., Valencia - España., **TESIS** Dr. Ing. Agr., 2008., Pp. 30 – 39.

32. QUEZADA., C., Validación de un Método de Análisis para Ocratoxina A en café verde, utilizando Columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Facultad de Ciencias., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba – Ecuador., **TESIS** BQF., 2009., Pp. 30 – 47.

33. SALTOS., C., Introducción y Evaluación Agronómica de Seis Cultivares y Dos Líneas Promisorias de Trigo (*Triticum vulgare L*), en tres localidades de la Provincia Bolívar., Escuela de Ingeniería Agronómica., Facultad de Recursos Naturales., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba – Ecuador., **TESIS** Ing. Agr., 2011., Pp. 1.

34. AGROPANORAMA.COM

<http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Trigo.htm>

20130305

35. CENTRO DE ESTUDIOS DE FINANZAS PÚBLICAS

<http://www.cefp.gob.mx/publicaciones/apbcefp/2012/diciembre/apbcefp0122012.pdf>

20121201

36. CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAÍZ Y TRIGO

<http://www.cimmyt.org/es/que-hacemos/semillas-mejoradas>
20130305

37. EL UNIVERSO

<http://www.eluniverso.com/2012/01/28/1/1416/ecuador-busca-retornar-sustentabilidad-trigo.html>
20121228

38. FOOD INFO

<http://www.food-info.net/es/tox/trich.htm>
20130305

39. MADE IN ARGENTINA

http://www.made-in-argentina.com/alimentos/granos_y_oleaginosas/temas_relacionados/tipos_de_trigo.htm
20130305

40. MICOTOX LTDA.- Columnas de inmunoafinidad.

<http://www.micotox.com/esp/fprod.htm>
20130305

41. SÁNCHEZ., D

http://www.gemini.udistrial.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/que_es_valid.htm
20130305

42. WAGENINGEN UNIVERSITY

<http://www.food-info.net/es/tox/trich.htm>
20130305

43. WIKIPEDIA

http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_de_inmunofinidad
20130305

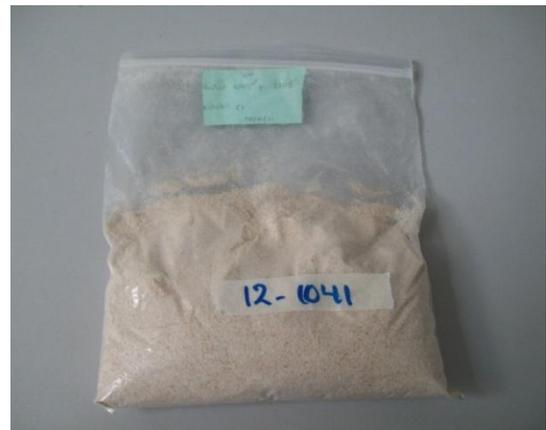
CAPÍTULO VIII

ANEXOS

ANEXO No. 1 PROCESO DE MOLIENDA DE LAS MUESTRAS DE TRIGO.



FOTOGRAFÍA No. 2 MUESTRAS DE TRIGO EN GRANO CODIFICADAS Y ORDENADAS. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. AGOSTO DEL 2012.

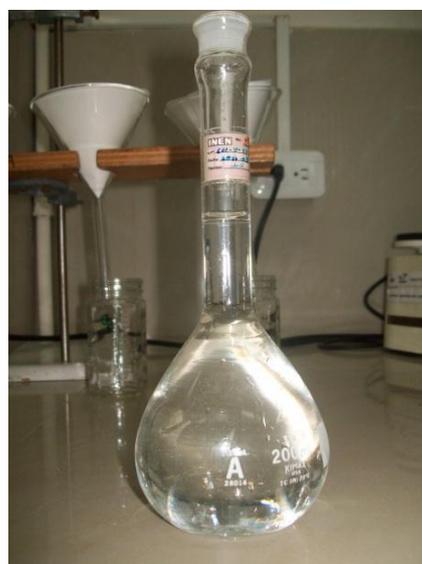


FOTOGRAFÍA No. 3 PROCESO DE MOLIENDA DEL TRIGO. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. AGOSTO DEL 2012.

ANEXO No. 2 PROCESO DE PESADO Y EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TRIGO.



FOTOGRAFÍA No. 4 PESAJE DE 25 g DE MUESTRA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.



FOTOGRAFÍA No. 5 AFORACIÓN DE 200 mL DE AGUA BIDEDESTILADA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

ANEXO No. 3 PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL DEOXINIVALENOL EN LAS MUESTRAS DE TRIGO.



FOTOGRAFÍA No. 6 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA MEDIANTE 200 mL DE AGUA ULTRAPURA Y LICUADO POR 3 MINUTOS. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.



FOTOGRAFÍA No. 7 FILTRADO DE LA MUESTRA POR GRAVEDAD. MEDIANTE LICUADO Y AGUA BIDESTILADA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

ANEXO No. 4 PROCESO DE FILTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS A TRAVÉS DE LAS COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD.



FOTOGRAFÍA No. 8 FILTRADO DEL EXTRACTO UTILIZANDO COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

ANEXO No. 5 LAVADO DE LAS COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y RECUPERACIÓN EL DEOXINIVALENOL.



FOTOGRAFÍA No. 9 LAVADO DE LA COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD CON 10 mL DE AGUA BIDESTILADA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.



FOTOGRAFÍA No. 10 RECUPERACIÓN DEL DON CON 3 mL DE ACETONITRILLO GRADO HPLC. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

ANEXO No. 6 PROCESO DE EVAPORACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL DEOXINIVALENOL.



FOTOGRAFÍA No. 11 EVAPORACIÓN A SEQUEDAD DE LA MUESTRA RECUPERADA MEDIANTE GAS NITRÓGENO AL 99% DE PUREZA. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

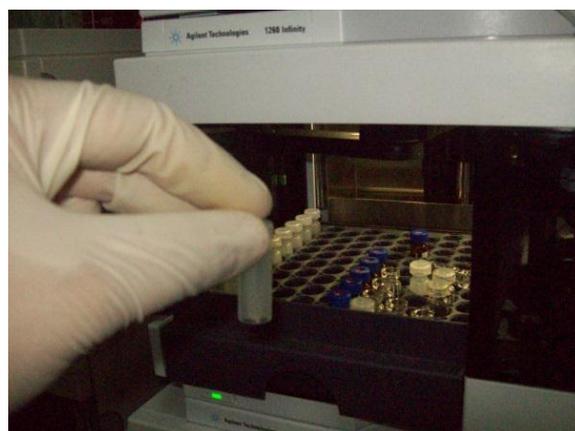


FOTOGRAFÍA No. 12 RECONSTITUCIÓN DE LA MUESTRA CON 300 μ L DE FASE MÓVIL Y AGITACIÓN POR 3 MINUTOS. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

ANEXO No. 7 HOMOGENIZACIÓN Y COLOCACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS VIALES.

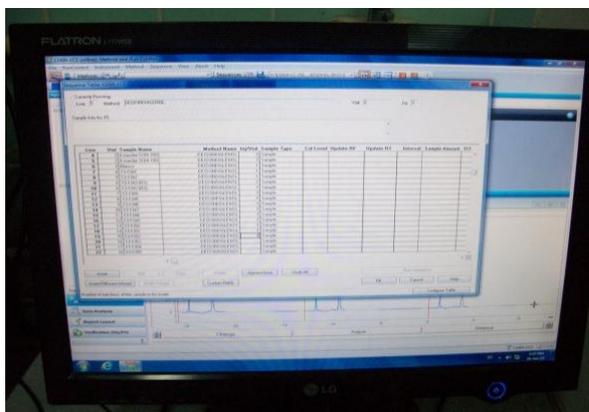


FOTOGRAFÍA No. 13 HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA EN BAÑO ULTRASONIDO POR 5 MINUTOS. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.



FOTOGRAFÍA No. 14 COLOCACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS VIALES DE 200 µL CON INSERTO FIJO Y UBICACIÓN DE LOS MISMOS EN EL AUTOSAMPLER DEL EQUIPO HPLC AGILENT 1200. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

ANEXO No. 8 LECTURA Y RESULTADOS EN EL EQUIPO HPLC AGILENT 1200.



FOTOGRAFÍA No. 15 INGRESO DE LOS CÓDIGOS DE LAS MUESTRAS AL SISTEMA Y LECTURA EN EL EQUIPO HPLC AGILENT 1200. LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. NOVIEMBRE DEL 2012.

4. MÉTODO DE ANÁLISIS QUE UTILIZARÁ EL LABORATORIO Y REQUISITOS DE CONTROL DEL LABORATORIO

4.1. **Definiciones**

Algunas de las definiciones más comúnmente utilizadas que el laboratorio deberá aplicar son las siguientes:

r = Repetibilidad, valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de repetibilidad (misma muestra, mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y breve lapso entre ambos) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %), por lo que $r = 2,8 \times s_r$.

s_r = Desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad.

RSD_r = Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad $[(s_r / \bar{x}) \times 100]$.

R = Reproducibilidad, valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de reproducibilidad (material idéntico obtenido por operadores en distintos laboratorios, utilizando el método de prueba estandarizado) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %); $R = 2,8 \times s_R$.

s_R = Desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad.

RSD_R = Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad $[(s_R / \bar{x}) \times 100]$.

4.2. **Requisitos generales**

Los métodos de análisis utilizados para el control de los alimentos se ajustarán a lo dispuesto en los puntos 1 y 2 del anexo III de la Directiva 882/2004/CE.

4.3. **Requisitos específicos**

4.3.1. *Criterios de funcionamiento*

En tanto la legislación comunitaria no exija ningún método específico para la determinación del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, los laboratorios podrán aplicar cualquier método de su elección, siempre que se ajuste a los siguientes criterios:

d) criterios de funcionamiento para el deoxivalenol:

Contenido µg/kg	Deoxivalenol		
	RSD _r %	RSD _R %	% de recuperación
> 100-≤ 500	≤ 20	≤ 40	de 60 a 110
> 500	≤ 20	≤ 40	de 70 a 120

APPLICATION NOTE

CEREAL



DEOXYNIVALENOL EXTRACTION METHOD

Application note for analysis of deoxynivalenol in cereal using water extraction in conjunction with DONPREP

Ref No. : A1-P50.V1

Date: April 2003

INTRODUCTION

Deoxynivalenol (DON) is a member of the trichothecene family, which is the largest group of mycotoxins produced by the *Fusarium* moulds. Deoxynivalenol is also called vomitoxin because of its emetic effects on swine and other animals. In humans, several cases of food poisoning related to DON contaminated cereals have been reported. DON is found in abundance in various cereal crops (wheat, barley, maize, oats and rice).

Since DON is one of the most prevalent mycotoxins found in cereals, the European Commission has recently proposed levels of 500ppb for DON in cereal products for direct consumption and 750ppb for flour used as raw material in food.

R-Biopharm Rhône Ltd have developed DONPREP for analysis deoxynivalenol in cereals and baby food and have found it to be suitable for the detection of cereals offering average recoveries of 92% and a %CV of 6.

METHOD

- Place 25g of ground cereal in a blender jar and add 200ml of deionised or HPLC grade water. Blend at high speed for 2 minutes.
- Filter the sample through Whatman No 4 or Whatman No. 113 filter paper and collect the filtrate in a conical flask.
- Filter again through microfibre filter paper and collect the filtrate in a conical flask.
- Pass 2ml of the filtrate through the DONPREP immunoaffinity column at a

flow rate of 1 drop per second or by gravity.

- Wash the column, by passing 5ml of HPLC grade water through it at a flow rate of 1 drop per second and dry by passing air through the column.
- Slowly elute the deoxynivalenol from the column using 1.5ml of 100% methanol and push air through the column to collect the last few drops of eluate in an appropriate glass tube.
- Place the glass tube in an evaporation system at 60°C and blow down to dryness.
- Reconstitute by pipetting 1ml of mobile phase into the glass tube. Mix using a vortex mixer.
- Remove 100µl of reconstituted eluate and inject onto a UV- HPLC system.

HPLC CONDITIONS:

Analytical column: ACE 5 C18 Hichrom (150 x 4.6mm i.d.), packed with a 5µm C18 deactivated reverse phase material or equivalent

Suggested mobile phase: HPLC grade water:methanol:acetonitrile (94: 3 : 3 v/v/v)

Flow rate: 1ml/minute

Oven Temperature 40°C

Wavelength UV detection: 218nm

Injection volume: 100µl

PREPARATION OF DEOXYNIVALENOL STANDARDS:

Preparation of DON Stock Solution:

Crystalline powder of Deoxynivalenol can be purchased from Sigma (catalogue number D0156).

Reconstitute the crystalline powder (5mg) in 5ml of Acetonitrile 100% to give a stock concentrate of approximately 1 mg/ml. Leave overnight at room temperature to ensure that the powder is completely dissolved. The DON stock concentrate can be stored for 1 year at -20°C.

To calculate the exact concentration of the DON stock concentrate, dilute 100µl of the DON stock concentrate in 900µl of acetonitrile. Measure the absorbance of this solution using a UV-spectrophotometer set at 218 nm and blanked against 100% acetonitrile. Readings are made in triplicate and the average calculated.

The concentration of DON stock concentrate is then calculated using the following equation:

$$[\text{DON}], \mu\text{g/ml} = \frac{\text{Abs (218nm)} \times \text{Mol Weight} \times 1000 \times 10}{6400}$$

$$[\text{DON}], \mu\text{g/ml} = \frac{\text{Abs (218nm)} \times 296.3 \times 1000 \times 10}{6400}$$

$$[\text{DON}], \mu\text{g/ml} = \text{Abs (218nm)} \times 463$$

Dilute the DON stock concentrate (calculated using the above equation) in acetonitrile to concentration of 20µg/ml. Blow down 100µl of DON solution (20µg/ml) and reconstitute in 1ml of mobile phase. This will give a 2µg/ml solution of DON.

Calibration Curve:

Prepare a six point calibration curve by performing a serial dilution in mobile phase with the 2µg/ml standard.; i.e. 2µg/ml, 1µg/ml, 0.5µg/ml, 0.25µg/ml, 0.125µg/ml and 0.0625µg/ml.

Inject 100µl of each standard onto the HPLC System.

A calibration curve should be performed at the beginning of analysis and whenever the chromatographic conditions change. Use the calibration curve to determine the amount of ng of DON in the aliquot of test solution injected onto the HPLC System.

Typical HPLC Trace For Analysis Of Deoxynivalenol In Cereals Using DONPREP Immunoaffinity Columns



R-Biopharm Rhône Ltd makes no warranty of any kind, express or implied, except that all products made by R-Biopharm Rhône Ltd are made with materials of suitable quality. If any materials are defective, R-Biopharm Rhône Ltd will provide a replacement product. The user assumes all risk and liability resulting from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products and procedures. R-Biopharm Rhône Ltd shall not be liable for any damages, including special or consequential damages, loss or expense arising directly or indirectly from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products or procedures.

Productos alimenticios ⁽¹⁾		Contenidos máximos (µg/kg)
2.3.2	Bebidas espirituosas ⁽¹⁵⁾ , sidra y otras bebidas fermentadas elaboradas con manzanas o que contengan zumo de manzana	50
2.3.3	Productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados al consumo directo a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.3.4 y 2.3.5	25
2.3.4	Zumo de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados a los lactantes y niños de corta edad ⁽¹⁶⁾ y vendidos y etiquetados como tales ⁽⁴⁾	10,0
2.3.5	Alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	10,0
2.4	Deoxinivalenol ⁽¹⁷⁾	
2.4.1	Cereales no elaborados ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾ que no sean trigo duro, avena y maíz	1 250
2.4.2	Trigo duro y avena no elaborados ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾	1 750
2.4.3	Maíz no elaborado ⁽¹⁸⁾	1 750 ⁽²⁰⁾
2.4.4	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales [incluida la harina de maíz, y el maíz triturado y molido ⁽²¹⁾], salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen, a excepción de los productos alimenticios enumerados en el punto 2.4.7	750
2.4.5	Pasta (seca) ⁽²²⁾	750
2.4.6	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno	500
2.4.7	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad ⁽³⁾ ⁽⁷⁾	200

ANEXO No. 12 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DON EN UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS MEJORADAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*). LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

NÚMERO	PARCELAS	PARCELAS	ENTRADA	CÓDIGO LAB.	DON (ng/g)
1	1238		1	12-0986	< LOQ
2	2266		1	12-0987	< LOQ
3	1120	2175	2	12-0988	< LOQ
4	1030	2255	3	12-0989	< LOQ
5	1084	2126	4	12-0990	< LOQ
6	1249	2016	5	12-0991	< LOQ
7	1278	2253	6	12-0992	< LOQ
8	1091	2163	7	12-0993	< LOQ
9	1145	2245	8	12-0994	< LOQ
10	1113	2043	9	12-0995	< LOQ
11	1005	2251	10	12-0996	< LOQ
12	1213	2237	11	12-0997	< LOQ
13	1230	2012	12	12-0998	< LOQ
14	1295	2069	13	12-0999	< LOQ
15	1095	2277	14	12-1000	< LOQ
16	1155	2077	15	12-1001	< LOQ
17	1032	2244	16	12-1002	< LOQ
18	1135	2008	17	12-1003	< LOQ
19	1143	2216	18	12-1004	< LOQ
20	1280	2197	19	12-1005	< LOQ
21	1288	2028	20	12-1006	< LOQ
22	1190	2259	21	12-1007	< LOQ
23	1285	2157	22	12-1008	< LOQ
24	1036	2192	23	12-1009	< LOQ
25	1073	2240	24	12-1010	< LOQ
26	1174	2015	25	12-1011	< LOQ
27	1041	2120	26	12-1012	< LOQ
28	1194	2059	27	12-1013	< LOQ
29	1013		28	12-1014	< LOQ
30	2104		28	12-1015	< LOQ
31	1282	2147	29	12-1016	< LOQ
32	1224	2013	30	12-1017	< LOQ
33	1124	2167	31	12-1018	< LOQ
34	1112	2162	32	12-1019	< LOQ
35	1236	2166	33	12-1020	< LOQ
36	1175	2009	34	12-1021	< LOQ

37	1008	2051	35	12-1022	< LOQ
38	1092	2188	36	12-1023	< LOQ
39	1056	2122	37	12-1024	< LOQ
40	1028	2018	38	12-1025	< LOQ
41	1096	2213	39	12-1026	< LOQ
42	1082	2123	40	12-1027	< LOQ
43	1063	2283	41	12-1028	< LOQ
44	1130	2119	42	12-1029	< LOQ
45	1185	2116	43	12-1030	< LOQ
46	1177	2044	44	12-1031	< LOQ
47	1181	2247	45	12-1032	< LOQ
48	2170		45	12-1033	< LOQ
49	1126		46	12-1034	< LOQ
50	1218	2084	47	12-1035	< LOQ
51	1263	2078	48	12-1036	< LOQ
52	1015	2209	49	12-1037	< LOQ
53	1179	2017	50	12-1038	< LOQ
54	1043	2208	51	12-1041	< LOQ
55	1064	2095	52	12-1042	< LOQ
56	2095		52	12-1043	< LOQ
57	1231	2217	53	12-1044	< LOQ
58	1093	2292	54	12-1045	< LOQ
59	1071	2225	55	12-1046	< LOQ
60	2225		55	12-1047	< LOQ
61	1211	2096	56	12-1048	< LOQ
62	1077	2231	57	12-1049	< LOQ
63	1171	2064	58	12-1050	< LOQ
64	1117	2151	59	12-1051	< LOQ
65	1210	2281	60	12-1052	< LOQ
66	1121	2233	61	12-1053	< LOQ
67	1173	2088	62	12-1054	< LOQ
68	1289	2011	63	12-1055	< LOQ
69	1042	2115	64	12-1056	< LOQ
70	1062	2198	65	12-1057	< LOQ
71	1100	2097	66	12-1058	< LOQ
72	1245	2222	67	12-1059	< LOQ
73	1140	2005	68	12-1060	< LOQ
74	1142	2196	69	12-1061	< LOQ
75	1044	2071	70	12-1062	< LOQ
76	1279	2159	71	12-1063	< LOQ
77	1038	2172	72	12-1064	< LOQ
78	2172		72	12-1065	< LOQ
79	1229	2171	73	12-1066	< LOQ

80	1268	2180	74	12-1067	< LOQ
81	1276	2081	75	12-1068	< LOQ
82	1134	2055	76	12-1069	< LOQ
83	1090	2264	77	12-1070	< LOQ
84	1272	2038	78	12-1071	< LOQ
85	1109	2164	79	12-1072	< LOQ
86	1046	2275	80	12-1073	< LOQ
87	1186	2273	81	12-1074	< LOQ
88	1246	2047	82	12-1075	< LOQ
89	1081		83	12-1076	< LOQ
90	2140		83	12-1077	< LOQ
91	1039	2127	84	12-1078	< LOQ
92	1168	2124	85	12-1079	< LOQ
93	1182	2220	86	12-1080	< LOQ
94	1099	2129	87	12-1081	< LOQ
95	1207		88	12-1082	< LOQ
96	2293		88	12-1083	< LOQ
97	1118		89	12-1084	< LOQ
98	2215		89	12-1085	< LOQ
99	1163	2211	90	12-1086	< LOQ
100	1080	2040	91	12-1087	< LOQ
101	1239		92	12-1088	< LOQ
102	2296		92	12-1089	< LOQ
103	1297	2144	93	12-1090	< LOQ
104	1101	2190	94	12-1091	< LOQ
105	1049	2187	95	12-1092	< LOQ
106	1267		96	12-1093	< LOQ
107	2002		96	12-1094	< LOQ
108	1277	2046	97	12-1095	< LOQ
109	1147	2042	98	12-1096	< LOQ
110	1189		99	12-1097	< LOQ
111	2286		99	12-1098	< LOQ
112	1191	2112	100	12-1099	< LOQ
113	1034	2117	101	12-1116	< LOQ
114	1259	2007	102	12-1117	< LOQ
115	1006	2099	103	12-1118	< LOQ
116	1035	2250	104	12-1119	< LOQ
117	1241	2139	105	12-1120	< LOQ
118	1128	2027	106	12-1121	< LOQ
119	1180	2229	107	12-1122	< LOQ
120	1247	2230	108	12-1123	< LOQ
121	1048	2193	109	12-1124	< LOQ
122	1243	2202	110	12-1125	< LOQ

123	1234	2135	111	12-1126	< LOQ
124	1122	2083	112	12-1127	< LOQ
125	1192	2161	113	12-1128	< LOQ
126	1106	2200	114	12-1129	< LOQ
127	1203	2079	115	12-1130	< LOQ
128	1108	2238	116	12-1131	< LOQ
129	1284	2048	117	12-1132	< LOQ
130	1012	2075	118	12-1133	< LOQ
131	1020	2032	119	12-1134	< LOQ
132	1078	2102	120	12-1135	< LOQ
133	1237	2054	121	12-1136	< LOQ
134	1275	2205	122	12-1137	< LOQ
135	1058	2204	123	12-1138	< LOQ
136	1060	2290	124	12-1139	< LOQ
137	1201	2249	125	12-1140	< LOQ
138	1133	2029	126	12-1141	< LOQ
139	1098	2173	127	12-1142	< LOQ
140	1166	2265	128	12-1143	< LOQ
141	1054	2045	129	12-1144	< LOQ
142	1205	2185	130	12-1145	< LOQ
143	1074	2236	131	12-1146	< LOQ
144	1221	2085	132	12-1147	< LOQ
145	1072	2010	133	12-1148	< LOQ
146	1037	2132	134	12-1149	< LOQ
147	1045	2206	135	12-1150	< LOQ
148	1158	2130	136	12-1151	< LOQ
149	1266	2228	137	12-1152	< LOQ
150	1076	2262	138	12-1153	< LOQ
151	1220	2207	139	12-1154	< LOQ
152	1244	2155	140	12-1155	< LOQ
153	1011		141	12-1156	< LOQ
154	2092		141	12-1157	< LOQ
155	1257	2282	142	12-1158	< LOQ
156	1040		143	12-1159	< LOQ
157	2271		143	12-1160	< LOQ
158	1157	2174	144	12-1161	< LOQ
159	1075	2094	145	12-1162	< LOQ
160	1014	2086	146	12-1163	< LOQ
161	1198	2128	147	12-1164	< LOQ
162	1256	2145	148	12-1165	< LOQ
163	1141	2287	149	12-1166	< LOQ
164	1002	2118	150	12-1167	< LOQ
165	1137	2146	151	12-1189	< LOQ

166	1001		152	12-1190	< LOQ
167	2024		152	12-1191	< LOQ
168	1104		153	12-1192	< LOQ
169	2257		153	12-1193	< LOQ
170	1167	2295	154	12-1194	< LOQ
171	1195	2103	155	12-1195	< LOQ
172	1290	2154	156	12-1196	< LOQ
173	1079	2203	157	12-1197	< LOQ
174	1016	2181	158	12-1198	< LOQ
175	1136	2280	159	12-1199	< LOQ
176	1269	2060	160	12-1200	< LOQ
177	1151	2080	161	12-1201	< LOQ
178	1184	2191	162	12-1202	< LOQ
179	1088	2101	163	12-1203	< LOQ
180	1270	2148	164	12-1204	< LOQ
181	1291	2169	165	12-1205	< LOQ
182	1094	2142	166	12-1206	< LOQ
183	1047	2052	167	12-1207	< LOQ
184	1176	2057	168	12-1208	< LOQ
185	1235	2195	169	12-1209	< LOQ
186	1222	2210	170	12-1210	< LOQ
187	1115	2076	171	12-1211	< LOQ
188	1294	2274	172	12-1212	< LOQ
189	1125	2053	173	12-1213	< LOQ
190	1292	2066	174	12-1214	< LOQ
191	1089	2063	175	12-1215	< LOQ
192	1144	2176	176	12-1216	< LOQ
193	1265	2184	177	12-1217	< LOQ
194	1242	2291	178	12-1218	< LOQ
195	1110	2189	179	12-1219	< LOQ
196	1258	2201	180	12-1220	< LOQ
197	1261	2030	181	12-1221	< LOQ
198	1057	2263	182	12-1222	< LOQ
199	1209	2199	183	12-1223	< LOQ
200	1025	2037	184	12-1224	< LOQ
201	1253	2125	185	12-1225	< LOQ
202	1216	2039	186	12-1226	< LOQ
203	1240		187	12-1227	< LOQ
204	2098		187	12-1228	< LOQ
205	1153	2114	188	12-1229	< LOQ
206	1007	2239	189	12-1230	< LOQ
207	1149		190	12-1231	< LOQ
208	2014		190	12-1232	< LOQ

209	1066	2110	191	12-1233	< LOQ
210	1059	2026	192	12-1234	< LOQ
211	1052	2160	193	12-1235	< LOQ
212	1262	2246	194	12-1236	< LOQ
213	1250	2105	195	12-1237	< LOQ
214	1219	2034	196	12-1238	< LOQ
215	1217	2111	197	12-1239	< LOQ
216	1251	2058	198	12-1240	< LOQ
217	1197	2182	199	12-1241	< LOQ
218	1264	2242	200	12-1242	< LOQ
219	1206		201	12-1245	< LOQ
220	2227		201	12-1246	< LOQ
221	1271	2149	202	12-1247	< LOQ
222	1293	2137	203	12-1248	< LOQ
223	1018	2212	204	12-1249	< LOQ
224	1187	2001	205	12-1250	< LOQ
225	1281	2285	206	12-1251	< LOQ
226	1204	2260	207	12-1252	< LOQ
227	1255	2267	208	12-1253	< LOQ
228	1225	2093	209	12-1254	< LOQ
229	1022	2214	210	12-1255	< LOQ
230	1199	2031	211	12-1256	< LOQ
231	1223	2074	212	12-1257	< LOQ
232	1131	2023	213	12-1258	< LOQ
233	1116	2131	214	12-1259	< LOQ
234	1254	2121	215	12-1260	< LOQ
235	1170	2022	216	12-1261	< LOQ
236	1033	2041	217	12-1262	< LOQ
237	1061	2177	218	12-1263	< LOQ
238	1188	2256	219	12-1264	< LOQ
239	1087	2194	220	12-1265	< LOQ
240	1132		221	12-1266	< LOQ
241	2272		221	12-1267	< LOQ
242	1273	2179	222	12-1268	< LOQ
243	1102	2252	223	12-1269	< LOQ
244	1156	2152	224	12-1270	< LOQ
245	1215	2219	225	12-1271	< LOQ
246	1214		226	12-1272	< LOQ
247	2224		226	12-1273	< LOQ
248	1226	2232	227	12-1274	< LOQ
249	1053		228	12-1275	< LOQ
250	2056		228	12-1276	< LOQ
251	1065	2036	229	12-1277	< LOQ

252	1068	2288	230	12-1278	< LOQ
253	1162		231	12-1279	< LOQ
254	2107		231	12-1280	< LOQ
255	1010		232	12-1281	< LOQ
256	2234		232	12-1282	< LOQ
257	1172	2106	233	12-1283	< LOQ
258	1119	2067	234	12-1284	< LOQ
259	1114	2113	235	12-1285	< LOQ
260	1027	2150	236	12-1286	< LOQ
261	1085		237	12-1287	< LOQ
262	2276		237	12-1288	< LOQ
263	1097		238	12-1289	< LOQ
264	2270		238	12-1290	< LOQ
265	1232	2254	239	12-1291	< LOQ
266	1139	2090	240	12-1292	< LOQ
267	1160		241	12-1293	< LOQ
268	2089		241	12-1294	< LOQ
269	1227	2082	242	12-1295	< LOQ
270	1069	2258	243	12-1296	< LOQ
271	1031	2141	244	12-1297	< LOQ
272	1146	2241	245	12-1298	< LOQ
273	1228	2091	246	12-1299	< LOQ
274	1067	2006	247	12-1300	< LOQ
275	1283	2221	248	12-1301	< LOQ
276	1127	2033	249	12-1302	< LOQ
277	1208	2049	250	12-1303	< LOQ
278	1105	2186	251	12-1306	< LOQ
279	1021	2025	252	12-1307	< LOQ
280	1233	2158	253	12-1308	< LOQ
281	1296	2279	254	12-1309	< LOQ
282	1152	2261	255	12-1310	< LOQ
283	1248	2100	256	12-1311	< LOQ
284	1212	2109	257	12-1312	< LOQ
285	1274	2070	258	12-1313	< LOQ
286	1159	2153	259	12-1314	< LOQ
287	1103	2003	260	12-1315	< LOQ
288	1070	2218	261	12-1316	< LOQ
289	1111	2021	262	12-1317	< LOQ
290	1169	2138	263	12-1318	< LOQ
291	1019		264	12-1319	< LOQ
292	2248		264	12-1320	< LOQ
293	1252	2178	265	12-1321	< LOQ
294	1003	2065	266	12-1322	< LOQ

295	1287	2020	267	12-1323	< LOQ
296	1196		268	12-1324	< LOQ
297	2269		268	12-1325	< LOQ
298	1107	2050	269	12-1326	< LOQ
299	1024	2068	270	12-1327	< LOQ
300	1193	2087	271	12-1328	< LOQ
301	1026	2223	272	12-1329	< LOQ
302	1154	2243	273	12-1330	< LOQ
303	1286	2165	274	12-1331	< LOQ
304	1086	2136	275	12-1332	< LOQ
305	1150	2073	276	12-1333	< LOQ
306	1023	2278	277	12-1334	< LOQ
307	1178	2133	278	12-1335	< LOQ
308	1164	2143	279	12-1336	< LOQ
309	1123	2035	280	12-1337	< LOQ
310	1004	2297	281	12-1338	< LOQ
311	1165	2183	282	12-1339	< LOQ
312	1138	2284	283	12-1340	< LOQ
313	1055	2062	284	12-1341	< LOQ
314	1083	2061	285	12-1342	< LOQ
315	1029	2134	286	12-1343	< LOQ
316	1009	2235	287	12-1344	< LOQ
317	1129	2289	288	12-1345	< LOQ
318	1183	2156	289	12-1346	< LOQ
319	1161	2004	290	12-1347	< LOQ
320	1050	2226	291	12-1348	< LOQ
321	1051	2294	292	12-1349	< LOQ
322	1148	2108	293	12-1350	< LOQ
323	1202	2072	294	12-1351	< LOQ
324	1260		295	12-1352	< LOQ
325	2019		295	12-1353	< LOQ
326	1200	2168	296	12-1354	< LOQ
327	1017	2268	297	12-1355	< LOQ

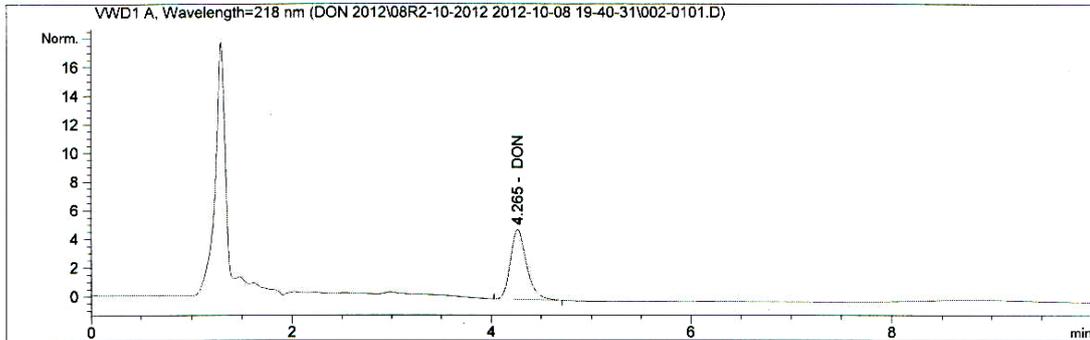
LOQ = Límite de Cuantificación = 228 ng/g ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (ppb).

Fuente: LSAIA-DNC-INIAP-EESC

ANEXO No. 13 CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE DON EN TRIGO (ESTÁNDAR DON 1500 ng/g). LABORATORIO DE SERVICIOS DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAHUA. FEBRERO DEL 2013.

Data File D:\LSAIA2\DATA\DON 2012\08R2-10-2012 2012-10-08 19-40-31\002-0101.D
Sample Name: estandar DON 1500 ng/g

```
=====
Acq. Operator   : ALEX PORTILLA / IVAN CANTOS      Seq. Line :    1
Acq. Instrument : INIAP LSAIA LC-2                 Location  : Vial 2
Injection Date  : 08-Oct-12 7:41:22 PM             Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.000 µl
Acq. Method     : D:\LSAIA LC-2\DATOS\DON 2012\08R2-10-2012 2012-10-08 19-40-31\
DEOXINIVALENOL.M
Last changed    : 08-Oct-12 7:51:05 PM by ALEX PORTILLA / IVAN CANTOS
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\LSAIA2\DATA\DON 2012\15-01-2013 2013-01-15 12-26-53\DEOXINIVALENOL.M
Last changed    : 18-Feb-13 2:25:58 PM
Method Info     : Metodo para determinar DON en trigo
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           :      Retention Time
Calib. Data Modified :      18-Feb-13 2:21:21 PM
Multiplier          :           30.0000
Dilution            :           1.0000
Sample Amount       :           3.33333e-2 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=218 nm

RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount	Grp	Name
4.265	1	BBA	55.09301	8.78610e-1	1452.15780		DON

Totals : 1452.15780

*** End of Report ***