

Tesis de Posgrado

Persistencia y/o transformación de tricotecnos durante algunas etapas del procesamiento de trigo

Samar, María Margarita

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Samar, María Margarita. (2003). Persistencia y/o transformación de tricotecnos durante algunas etapas del procesamiento de trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3560_Samar.pdf

Cita tipo Chicago:

Samar, María Margarita. "Persistencia y/o transformación de tricotecnos durante algunas etapas del procesamiento de trigo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3560_Samar.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Persistencia y/o transformación de
tricotecenos durante algunas etapas del
procesamiento de trigo**

María Margarita Samar



Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Directora: Dra. Silvia Resnik

2003



Ne 3560

A Mito, Guillermo y Mauro

Agradecimientos

A la Dra. Silvia L Resnik por su guía científica, dedicación y amistad.

A la Dra. Ana Pacin por su amistad y su valiosa colaboración en la concreción de este proyecto.

Al Magíster Marcelo Castillo, Dr. Héctor H. González, Magíster Gustavo Moltó, Lic. Carlos Somoza, Lic. Gustavo Funes por su inestimable colaboración y a Sra. Gabriela Cano, Sra. Daniela Taglieri por su apreciada ayuda.

Al Dr. Constantino Ferro Fontán por su valioso aporte en el análisis estadístico de los datos.

A Aníbal Álvarez, Cafagda y a todo el personal de Molinos Semino que colaboró en la toma de muestras.

A la dirección del Departamento Química Orgánica y el Centro de Investigación en Micotoxinas (CIM) donde se realizó el trabajo experimental.

RESUMEN

La finalidad del presente trabajo fue obtener información sobre la persistencia y / o transformación de tricotecenos durante algunas etapas de procesamiento del trigo para contribuir a la estimación de la exposición como consecuencia de la ingesta de alimentos elaborados con trigo potencialmente contaminados por tricotecenos en la Argentina. Las tendencias identificadas en los métodos analíticos para la determinación de tricotecenos, durante los años 1990-2000 en diferentes partes del mundo, muestran que la cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones o la cromatografía en capa delgada para deoxinivalenol (DON) son las más adecuadas. A través de los estudios de variabilidad, se determinaron por primera vez en el ámbito mundial las funciones de distribución que representan la contaminación por DON del afrechillo, harina de trigo y gluten. Los resultados adquieren gran relevancia para el trigo, ya que la función de distribución encontrada representa los datos de contaminación por DON en el trigo argentino. Otro aspecto relevante, es que estos resultados facilitan la discusión de estrategias para reducir la variabilidad asociada a la determinación de DON en trigo, afrechillo, harina de trigo y gluten y posibilitan el desarrollo de adecuados planes de muestreo. El DON se distribuye durante la molienda entre las diversas fracciones, en tanto que en la producción de gluten y almidón se observa una reducción, que se supone es la consecuencia de la extracción de la toxina por las aguas de lavado. Este es el primer estudio que cuantifica la retención de DON en gluten, demostrando que el DON no es detectado en el almidón.

El desarrollo de programas de control en micotoxinas implica disponer de datos precisos y exactos sobre la concentración de las mismas. La variabilidad en la determinación debida a la falta de homogeneidad de la distribución de la contaminación está relacionada con la matriz analizada y difiere para cada micotoxina. La varianza total del método se subdividió en varianza debida al muestreo, a la preparación de la muestra y al método analítico. Se determinaron por primera vez las funciones de distribución que representan la contaminación por DON del afrechillo, harina de trigo y gluten y la función de distribución de la contaminación en trigo. Basado en estos resultados pueden

discutirse estrategias para reducir la variabilidad asociada a la determinación de DON en estas matrices, considerando la relación costo-beneficio para decidir aumentar la cantidad o tamaño de las muestras analizadas.

Durante la fritura de masa de empanadas se observó una reducción de la contaminación por DON y de los resultados obtenidos se concluye que es conveniente freír las tapas de empanadas a la menor de las temperaturas ensayadas para obtener una disminución mayor en la contaminación de DON. El conocimiento de la reducción de la contaminación por DON en este proceso, en conjunto con el conocimiento de la contaminación de la harina y el consumo de empanadas por la población, permitirá estimar la contribución que este consumo tiene en la ingesta tolerable diaria de esta micotoxina y aportar datos para la evaluación de la exposición de la población a la ingesta de DON.

SUMMARY

“Persistence and / or transformation of trichothecenes along some processing stages of wheat”

The goal to present work was to get information upon the persistence and / or transformation of trichothecenes along some processing stages of wheat to contribute to exposure estimation, as a consequence to food intake of potentially contaminated wheat with trichothecene in Argentina. Identified trends in analytical methods to trichothecenes determination, during 1990-2000 in different countries around the world, show that gas chromatography with electron capture detection, or thin layer chromatography for deoxynivalenol (DON) are more adequate. Through variability studies, for the first time in the world, distribution functions were determined, that represent DON contamination in bran, wheat flour and gluten. Results achieve great relevance for wheat, as found distribution function are representative to data of DON contamination for wheat in Argentina. Another relevant aspect, it is that these results simplify strategy discussion to reduce variability associated to DON determination in wheat, bran, wheat flour and gluten, so making possible development of adequate sampling plans. The DON distributes during milling among different fractions, while a reduction is observed as a consequence of toxin extraction by washing waters, during gluten and starch production. This is the first study to quantify DON retention in gluten, while DON is not detected in starch

Programs development to mycotoxins control, suppose precise and accurate data on their concentrations. Variability in the determination ought to lack on homogeneity on contamination distribution, is related to analyzed matrix and it is different for each mycotoxin. Total variance of method was subdivided in variance due to sampling, sampling preparation and analytical method. For the first time distribution functions were determined, which represent bran, wheat flour and gluten contamination by DON and distribution function of wheat contamination. Based upon those results, strategies can be discussed to provide reduction on variability associated to DON determination in those

matrixes, considering cost benefit ratios, to establish increase quantity or size of analyzed samples.

Along the frying of the *empanadas* dough, a reduction on contamination by DON was observed, and from obtained results conclusion is convenience to fry *empanadas* dough to the lower temperature tested to obtain a larger reduction in contamination by DON. Knowledge about contamination by DON reduction in this process, together with knowledge in wheat contamination and *empanadas* consumption by population, will allow estimating contribution of this consumption in the tolerable daily feeding of this mycotoxin, and to supply with data to evaluate population exposure to intake of DON.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 La Contaminación Natural por Tricotecenos.....	3
I.2 Distribución de la Contaminación.....	61
I.3 Variación Anual.....	63
I.4 Evaluación de Riesgo.....	65
II. OBJETIVOS.....	71
III. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA OCURRENCIA NATURAL DE TRICOTECENOS.....	72
III.1 Introducción.....	72
III.2 Resultados.....	75
III.2.a. Extracción.....	93
III.2.b. Limpieza	95
III.2.c. Cuantificación.....	96
III.2.d. Límites de los métodos	98
III.3 Conclusión.....	99

IV. VARIABILIDAD ASOCIADA A LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN TRIGO, HARINA, AFRECHILLO Y GLUTEN	100
IV.1 Introducción.....	100
IV.2 Materiales y Métodos.....	101
IV.2.a. Diseño Experimental	101
IV.2.a.1. Muestreo.....	101
IV.2.a.2 Variabilidad Analítica.....	102
IV.2.b Equipamiento	102
IV.2.c. Reactivos	103
IV.2.d. Metodología Empleada en la Determinación de DON	104
IV.2.d.1 Extracción y Limpieza	104
IV.2.d.2 Derivatización	107
IV.2.d.3 Cuantificación por Cromatografía Gaseosa ..	107
IV.3 Resultados y Discusión	108
IV.4 Conclusiones.....	116

V. DISTRIBUCIÓN DE DEOXINIVALENOL EN LA MOLIENDA DE TRIGO Y EN LA PRODUCCIÓN DE ALMIDÓN Y GLUTEN DE TRIGO EN UNA PLANTA INDUSTRIAL.....	117
V.1 Introducción	117
V.2 Materiales y Métodos	121
V.2.a Diseño experimental	121
V.2.b Metodología Empleada en la Cuantificación de Tricotecenos y Zearalenona.	125
V.3 Resultados y Discusión	126
V.4 Conclusión	140
VI. ESTABILIDAD DE DON DURANTE LA FRITURA DE TAPAS DE EMPANADAS	142
VI.1. Introducción	142
VI.2. Materiales y Métodos	146
VI.2.a. Materiales y reactivos	146
VI.2.a.1. Equipamiento	146
VI.2.a.2. Reactivos	146
VI.2.b. Métodos	147
VI.2.b.1 Elaboración de las Tapas de Empanadas	147

VI.2.b.2. Determinación de la Humedad de las Tapas	148
VI.2.b.3. Mediciones de Color	148
VI.2.b.4. Determinación del Punto Final de Cocción por Colorimetría	150
VI.2.b.5. Análisis de Deoxinivalenol (DON)	150
VI.2.b.5.a. Extracción y Derivatización	150
VI.3. Resultados y Discusión	153
VI.3.a. Efecto del Tiempo de Tratamiento Sobre el Desarrollo del Color a las Tres Temperaturas de Cocción: Cinética de la Reacción de Pardeamiento	155
V.3.b. Efecto del Tiempo de Tratamiento Sobre la Reducción de DON Durante la Fritura	162
VI.4. Conclusión	165
VII. CONCLUSIONES	167
VIII. BIBLIOGRAFÍA	169
IX. ANEXO	188

I. INTRODUCCION

Las micotoxinas son sustancias producidas como metabolitos secundarios de hongos toxicogénicos, bajo condiciones ambientales favorables. Se han aislado e identificado un gran número de micotoxinas (más de 500), de muy variada estructura química y acción tóxica.

Son susceptibles a la contaminación por micotoxinas todos aquellos productos donde sea posible el desarrollo fúngico, pudiendo encontrarse en materias primas, desde la producción primaria hasta el alimento listo para consumir.

La principal fuente de micotoxinas en la dieta la constituyen los cereales, fundamentalmente maíz, trigo, cebada, centeno, avena y arroz.

La contaminación por micotoxinas acarrea consecuencias deletéreas para la salud e indeseables para la comercialización. El primer aspecto se basa en la toxicidad que estas sustancias presentan para el hombre. El segundo aspecto está relacionado con la disminución de la disponibilidad de alimentos, tanto de origen vegetal como animal, debido a la morbi-mortalidad de estos últimos. Por añadidura, la contaminación de productos agrícolas, no solo disminuyen la calidad de los mismos, sino que comprometen los intercambios comerciales.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que por lo menos un 25% de los cultivos, en el mundo entero, están contaminados por micotoxinas. La contaminación por micotoxinas de alimentos en general y productos agrícolas en especial, continúa afectando seriamente la disponibilidad y la inocuidad de los alimentos a nivel mundial.

Es imprescindible tener en cuenta que las micotoxinas son contaminantes naturales, por lo que es inevitable e imprevisible su presencia en materias primas y alimentos. Esto implica una gran dificultad para el manejo de los alimentos contaminados, ya que la destrucción o su utilización en otros fines, no siempre es factible.

Por lo tanto, la presencia de micotoxinas en los alimentos es un riesgo para la salud, siempre y cuando estos sean ingeridos. Este dato es fundamental, ya que la única vía de exposición conocida hasta el momento para la intoxicación por micotoxinas es la ingesta de alimentos contaminados por las mismas.

Teniendo en cuenta que por ahora es imposible evitar su aparición, se han elaborado diversas estrategias para minimizar los efectos perjudiciales de la presencia de micotoxinas en materias primas y alimentos elaborados.

Una primera estrategia está basada en los factores que posibilitan la contaminación por micotoxinas. Se sabe que esta contaminación se produce como resultado de las condiciones ambientales en el campo o de operaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y elaboración. Esto significa que las prácticas de labranza, la rotación de cultivos, el control de malezas, la lluvia en la temporada tardía, el viento y los vectores de plagas son factores que influyen en la cantidad y origen del inóculo fúngico que mantiene el ciclo de la enfermedad de los cereales.

Esta primera estrategia se llevaría a cabo durante el cultivo y la cosecha, mediante el desarrollo y utilización semillas resistentes sobre la base de modificaciones genéticas. Asimismo puede resultar útil el control mediante el empleo de agentes no toxigénicos y competitivos biológicamente.

Otra posibilidad es la prevención durante la etapa post cosecha, en la que el manejo durante el almacenamiento (por ejemplo la limitación de la infestación por insectos y del nivel de humedad de los productos almacenados) puede evitar o disminuir la contaminación por micotoxinas.

La decontaminación de lotes a través de procesos físico-químicos y/o biológicos, puede modificar el contenido de micotoxinas, o al menos disminuir sus efectos tóxicos.

Por último, todos los procesos a que son sometidas las materias primas, con el objeto de elaborar diferentes alimentos, son capaces de disminuir la contaminación en el alimento terminado. Este es un aspecto muy promisorio, ya que, el conocimiento de las variables operacionales de los procesos permitirán llevar a cabo aquellas modificaciones que posibiliten minimizar la contaminación.

La estrategia preferida para controlar la contaminación por micotoxinas es un enfoque polifacético integrado, que implica el conocimiento de lo mencionado en los párrafos anteriores.

Actualmente la evaluación de riesgo a la exposición por micotoxinas ha sido adoptada como la estrategia que abarca todas las facetas de la contaminación por estas sustancias.

La primera etapa para la estimación a la exposición es el conocimiento de la ocurrencia de la contaminación en los alimentos de consumo masivo. Por esa razón, el presente trabajo se inicia con la descripción de la contaminación natural por tricotecenos.

I. 1 La Contaminación Natural por Tricotecenos

Entre las micotoxinas, se decidió estudiar tricotecenos, por varias razones:

- son contaminantes muy frecuentes en esta región del mundo (Tabla I.1),
- existen estudios sobre las modificaciones de la contaminación debido a las variables operacionales aplicadas en algunos procesos de elaboración de alimentos y (Neira y col., 1997; Pacin y col., 1997; Samar y col., 2000)
- los cereales son consumidos en cantidad considerable por la población de nuestro país (Gallo y col., 1992; Pacin y col., 1999).

Se analizaron aquellos trabajos de la década de 1990-2000 sobre ocurrencia natural de tricotecenos que indicaran que las muestras fueran tomadas al azar o que describieran el procedimiento de muestreo.

Se tuvo en cuenta este criterio de selección, ya que para garantizar que se tomen muestras representativas de alimentos a fines de análisis, es importante seguir las normas establecidas en los planes de toma de muestras y existen muy pocos trabajos que mencionan los planes de muestreo.

Se tuvieron en cuenta, también, para la inclusión de datos de ocurrencia natural los métodos analíticos utilizados; lo más adecuado hubiera sido incluir sólo métodos de análisis validados (es decir, aquellos cuyas características de eficacia se han determinado de acuerdo con ensayos colaborativos entre laboratorios y que ahora son generalmente aceptados como indispensables a efectos de control y reglamentación). Sin embargo, en el caso de tricotecenos es difícil encontrar métodos validados y éste no fue un factor de selección en los datos sobre ocurrencia natural incluidos en esta Sección.

Los datos sobre la ocurrencia natural de DON se resumen en la Tabla I.1 Se incluyó en esta revisión trabajos que cumplieron con los criterios mencionados. Los datos de ocurrencia

fueron analizados caso por caso y los detalles acerca de los procedimientos seguidos con las muestras están incluidos en una columna en la misma Tabla I.1 o en la Tabla I.2.

Las referencias de los trabajos de la Tabla I.1. incluyen la referencia primaria (P), la referencia sobre muestreo (S) y las referencias analíticas (A) dadas por los autores.

Los valores de media han sido recalculados en los casos donde se había informado como media de muestras positivas y cuando los valores no detectados se computaron como la mitad del límite de detección. Por lo tanto el valor medio en las tablas indica la media de todas las muestras, tomando los valores indicados como debajo del límite de detección igual a cero con pocas excepciones citadas en la Tabla I.1.

En estudios llevados a cabo para la década de 1980-1990 se pudo comprobar que la ocurrencia de DON era frecuente, particularmente en trigo y maíz y a niveles usualmente por debajo de 1000 µg/kg (EHC 105, 1990). Este valor fue incluido en la tabla I.1 para facilitar la visualización de la contaminación de la década 1990-2000. Además, fue incluido un nivel de 100 µg/kg para comparar DON con los otros tricotecenos estudiados en el presente trabajo, que fueron las toxinas T-2 y HT-2.

Algunos estudios interesantes no fueron incluidos en la Tabla I.1 ya que no se podrían usar para estimar la ingesta de esta toxina. Estos trabajos incluyen reportes de ocurrencia de la toxina en áreas con epidemia, estimación de la variación de la contaminación por DON en diferentes lotes, estudios de variación genética, muestras de granos con síntomas de ataque fúngico y comparaciones de la presencia de DON en granos sanos y mohosos en diferentes partes de la planta. En otros casos, los resultados presentados no fueron incluidos por insuficientes como es el caso del DON expresado como el total de tricotecenos tipo B, después de la hidrólisis (Chelkowski y col., 2000, no publicado; Chu y Gy, 1994; Freese y col., 2000; Li y col., 1999, Luo y col., 1992; Menna y col., 1997; Okoye, 1993; Perkowski y col., 1990 y 1997; Perkowski, 1999; Sohn y col., 1999; Trigo-Stockli y col., 1995; Wetter y col., 1999).

Entre los trabajos analizados, se encontraron porotos contaminados por tricotecenos (DON, DAS y T-2) pero como las muestras no fueron recogidas al azar, no fueron incluidas en la Tabla I.1 sin embargo, es conveniente destacar que las cantidades de toxinas detectadas fueron sustanciales y por lo tanto, sería interesante estudiar la ocurrencia natural por tricotecenos en otras legumbres para establecer si existe contaminación (Tseng y col., 1995).

Tabla I. 1: Ocurrencia natural de deoxinivalenol (DON)

LOQ = Límite de cuantificación

Media: (para n valores analíticos, la media es la $\Sigma X_i / n_i$) donde X_i es el valor de cada resultado analítico

90p = 90th percentil

n = número

Max: máximo nivel

ref = referencias

Referencias: P= referencia original, S=método de muestreo, A=método analítico

* = Límite de detección

**= ng/ml

***= media de muestras positivas

País/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Africa										P/S/A	
Sudáfrica	Maíz amarillo	1993	236	150*		82/1092				P y S=Rava y col. (1996)/A=Scott y col. (1986), Truckses y col.(1987), Marasas y col.(1979)	Muestras tomadas de varios silos al levantar la cosecha en las zonas de mayor producción .
Sudáfrica	Maíz blanco	1994-1995	143	150*		157***/2750				P y S=Rava (1996)/ A= Scott y col. (1986)	Muestras tomadas de varios molinos en todo el país
Sudáfrica	Maíz amarillo	1994-1995	148	150*		169***/1800				P y S=Rava (1996)/ A= Scott y col. (1986)	Muestras tomadas de varios molinos en todo el país
Sudáfrica	Productos de maíz	1994-1995	156	150*	92	116/850				P y S=Rava (1996)/ A= Scott y col. (1986)	Muestras tomadas de varios molinos en todo el país
América											
EE.UU.	Maíz	1989	8	1000*	1	1575/3000				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Trigo	1989	12	1000*	11	158/1900				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
EE.UU.	Arroz	1989	4	1000*	1	5100/9500				P, S y A=Abouzied y col. (1991) P/S/A	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Avena	1989	5	1000*	3	760/2600				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Trigo y avena Galletas	1989	18	1000*	12	933/5400				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Hojuelas de Malz	1989	6	1000*	4	833/3000				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Pochoclo	1989	8	1000*	4	1950/4500				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Harina de trigo / Mezcla para pasteles	1989	17	1000*	4	3059/5800				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Harina de malz	1989	11	1000*	4	3691/19000				P, S y A=Abouzied y col. (1991)	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
EE.UU.	Cereales de grano surtido	1989	3	1000*	2	5333/16000				P, S y A=Abouzie y col. (1991) P/S/A	Productos alimenticios basados en granos adquiridos en negocios minoristas y de alimentos naturales . (envases unitarios de diferentes tamaños)
EE.UU.	Trigo	1991	81	40*	unk	1570***/9330				P, S y A=Fernyey y col. (1994)	Muestras tomadas por la Inspección Federal de granos. (USDA)
EE.UU.	cebada	1993	118	500	39	3000/14000				P, y S=Trucksess y col. (1995)/A=Veratox	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.
EE.UU.	Cebada de cerveza	1993	29	500	0	9000/25800				P, y S=Trucksess y col. (1995)/A=Veratox	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.

País/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
EE.UU.	Trigo duro de primavera	1993	201	500	21	3700/18400				P, y S=Trucksess y col. (1995)/A=Veratox P/S/A	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.
EE.UU.	Trigo duro de invierno	1993	194	500	100	800/7600				P, y S=Trucksess y col. (1995)/A=Veratox	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.
EE.UU.	Trigo surtido	1993	1	500	0	2300/2300				P, y S=Trucksess y col. (1995)/A=Veratox	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.

País/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
EE.UU.	Trigo blando de invierno	1993	59	500	9	1400/14600				P, y S=Trucksees y col. (1995)/A=Veratox P/S/A	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.
EE.UU.	Trigo blando blanco	1993	28	500	20	100/700				P, y S=Trucksees y col. (1995)/A=Veratox	Muestras tomadas por USDA, FGIS de 25 estados. Cada muestra conformada por múltiples submuestras seleccionadas de diferentes lugares. Las submuestras fueron reunidas y mezcladas por el recolector. Se envió aprox. 100gr. de cada muestra compuesta a la FDA para su análisis. Muestra analítica=50g.
EE.UU.	Harina blanca	1994	89	20*		500/1700		36	3	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Harina blanca	1994	23	20*	23	0		0	0	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Harina blanca	1994	160	20*		420/2630		105	25	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Harina integral de trigo	1994	54	20*		530/3800		24	12	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Harina integral de trigo	1994	29	20*		600/1400		7	2	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Harina integral de trigo	1994	7	20*		410/680		5	0	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Salvado de trigo	1994	63	20*		940/2580		32	11	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Salvado de trigo	1994	32	20*		600/800		1	0	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	
EE.UU.	Salvado de trigo	1994	68	20*		460/2920		49	9	P, S y A=Trucksees y col. (1996)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
EE.UU.	Productos de trigo	1994	5	20*		420/1200		3	0	P, S y A=Trucksess y col. (1996)	
EE.UU.	Productos de trigo	1994	18	20*		0/0		0	0	P, S y A=Trucksess y col. (1996)	
EE.UU.	Productos de trigo	1994	14	20*		320/1160		7	2	P, S y A=Trucksess y col. (1996)	
EE.UU.	Trigo	1996	14	500	1	5719/11900	11800	12	10	P y S=Hart L.P.(1998)/ A=Veratox method	Las muestras fueron tomadas de tres elevadores y de un total de 14 camiones que contenían trigo recién cosechado, insertando una probeta de metal (2m de largo y 3.5 cm de diámetro externo) al azar (500-800gr). Se envasaron separadamente 10 submuestras individuales de cada camión. de 5 camiones elegidos, se tomaron 5 submuestras de 50 gr. o granos enteros de cada una de las 10 submuestras, molidos en una moladora de café y se analizaron. El grano remanente fue molido más fino con un molino Romer para producir una mezcla de harina y salvado. Las submuestras se tomaron del flujo principal continuo (5-12%).
Canadá/Ontario	Trigo blanco de invierno	1979	4	4*	0	60/130				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blanco de invierno	1980	49	10*	1	421/3580				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blanco de invierno	1981	101	10*	0	250/3240				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1982	129	25*	1	744/5670				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981) P/S/A	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1983	13	30*	7	32/110				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1984	22	10*	3	129/830				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1985	45	50- 100*	35	15/160				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1986	25	100*	13	274/1730				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1987	24	100*	14	313/1650				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1988	20	100*	20					P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1989	28	100*	13	263/1360				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1990	28	100*	19	42/170				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1991	22	100*	8	204/1160				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1992	17	100*	8	127/390				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1993	15	100*	1	317/910				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá/Ontario	Trigo blando de invierno	1994	18	100*	5	339/1540				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989) P/S/A	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1981	49	30*	24	90/1040				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1982	35	5*	27	30/7				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1983	15	30*	13	7.8/60				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1984	20	10*	9	49.5/280				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1985	14	50- 100*	9	40/260				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1986	16	100*	14	80/1050				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1987	15	100*	12	14/100				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1988	12	100*	12					P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1989	29	100*	19	52/240				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1990	16	50*	10	156/1510				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1991	15	50*	14	13/190				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1993	18	50*	5	267/1300				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989) P/S/A	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo blando de primavera	1994	4	20*	4					P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1979	19	10- 40*	17	4/60				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1980	67	10*	63	1.2/35				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1981	66	30*	64	1.8/70				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1982	135	30*	135					P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1983	57	30*	57					P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1984	201	10*	114	134/10500				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1985	142	50- 100*	109	58/3800				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1986	147	100*	94	267/7120				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1987	121	100*	100	80/2100				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1988	82	100*	82					P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1989	80	100*	79	2.4/190				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1990	69	50*	69					P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1991	97	50*	78	92/3380				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1992	70	50*	53	75/1170				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1993	91	50*	70	136/2800				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1994	43	20*	35	108/1800				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Oeste	Trigo duro canadiense	1995	6	20*	4	127/480				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maiz	1980	43	25*	2	524/2240				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maiz	1981	26	25*	0	340/620				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maiz	1982	36	30*	0	200/880				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maiz	1983	18	30*	1	170/1190				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maiz	1984	13	10*	0	510/1020				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá/Ontario	Maíz	1985	16	50- 100*	2	1172/2280				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981) P/S/A	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1986	16	100*	4	1072/3050				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1987	18	100*	1	1086/4090				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1988	10	100*	7	273/1590				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1989	11	100*	3	218/650				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1990	15	50- 100*	0	920/2200				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1991	10	50- 100*	2	448/1500				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1992	12	100*	0	550/1530				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1993	20	100*	8	396/1800				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1994	11	100*	3	567/1970				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá/Ontario	Maíz	1995	8	100*	7	20/160				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1980-1981	10	4*	1	63/140				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá	Alimentos a base de trigo	1982-1983	270	25*	119	140/4060				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981) P/S/A	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1983-1984	155	10- 100*	54	143/1150				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1984-1985	167	10- 100*	92	81/1150				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1981)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1985-1986	87	10- 50*	56	61/750				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1986-1987	91	30- 280*	60	126/1600				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1987-1988	42	100*	33	122/1030				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1988-1989	55	100*	50	53/1080				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1986)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1989-1990	2	100*	1	110/220				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1990-1991	14	100*	11	66/700				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1991-1992	7	50- 100*	6	19/130				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1992-1993	57	50- 100*	36	192/1700				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1993-1994	54	20- 100*	36	57/400				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Canadá	Alimentos a base de trigo	1994-1995	59	20-100*	33	93/1000				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Alimentos a base de trigo	1995-1996	187	20-100*	124	108/2750				P y S=Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomado inmediatamente después de la cosecha o en los molinos. Tamaño de la muestra = 2 a 5 kg.
Canadá	Cerveza	1993	33	0.1*,**	13	3.7/503**	11.4**			P, S y A=Scott y col. (1993)	
Argentina	Maiz	1987-1989	100	100*	67	129/1200			2	P=Saubois y col.(1992) / S= Junta Nacional de Granos (1984), COPANT (1998), Jewers (1987)/A=Truckess y col.(1984)	Muestras =10kg. Muestra analítica = 50g
Argentina	Trigo	1985	123	30*	35	571/1730				P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1986	261	30*	82	329/2400				P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1989	102	30*	79	47/400	197	23	0	P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1990	159	30*	55	146/672.5	400	89	0	P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1991	189	30*	142	55/515	200	37	0	P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1992	222	30*	139	75/505	258	72	0	P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1993	40	100*	8	846/4500	2640	32	13	P y S=Daicero y col.(1997)/A= Truckess y col. (1984)	
Argentina	Trigo	1993	44	48	11	2594/30000	8000	33	24	P= González y col. (1996)/S= Apro y col. (1987)/A= Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1993	17	48	3	2147/8000	5200	14	13	S= Resnik y Pacin (2000) no publicado/P=Pacin y Resnik(2000) no publicado/A= Truckess y col. (1984)	Ver Tabla I.2 / muestra de Laboratorio = 100g.
Argentina	Harina de trigo	1994	61	48	15	1042/9000	2000	46	23	P, S y A= Pacin y col.(1997)	Comprado en molinos (1kg)
Argentina	Trigo	1994	73	48	8	2114/30000	5720	65	38	P, S y A= Pacin y col.(1997)/S= Apro y col. (1987)	Ver Tabla I.2
Argentina	Pan	1994	20	17	0	637.3/2800	1432	20	3	P, S y A=Neira y col.(1997)	Comprado en panaderías al azar 20 piezas (aproximadamente 25 g cada una)
Argentina	Maiz	1994-1995	30	48	30					P=González y col.(1999a)/S= Apro y col. (1987)/A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Harina de trigo	1995	14	17	0	292.6/436	410			P, S y A=Neira y col.(1997)	Comprado en panaderías (1kg)
Argentina	Maiz	1995	197	48	190	26.3/2250		6	2	S= Resnik y Pacin (2000)/P=Pacin y Resnik(2000)no publicado / A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Argentina	Harina de malz	1995	7	48	7					P=Pacin y Resnik (2000) no publicado / A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Harina de trigo	1996	5	48	5					P=Pacin y Resnik (2000) no publicado / A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Malz	1996	59	48	59					S= Resnik y Pacin (2000)no publicado/ P=Resnik y col.(2000) no publicado / A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1996	10	48	10					P=Pacin y Resnik(2000) no publicado / A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Trigo	1996	60	48	33	455/6400				S=Resnik y Pacin (2000) no publicado/P=González y col.(1999b)/A=Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2 / tamaño de muestra= 1kg.
Argentina	Cebada	1997	3	48	3					P=Pacin y Resnik (2000)no publicado/ A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Malz	1997	17	48	17					P,S y A=Solovey y col.(1999)	
Argentina	Harina de malz	1997	22	48	22					P,S y A=Solovey y col.(1999)	
Argentina	Harina de trigo	1997	33	17	17	56/193	171.4	10	0	P y S=Samar y col.(2000)/A=Neira y col. (1997)	
Argentina	Malz	1997	268	48	268					S= Resnik y Pacin (2000)no publicado/P=Pacin y Resnik(2000) no publicado / A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1997	52	48	23	698/6000	1920	29	13	S= Resnik y Pacin (2000)no publicado/P=Pacin y Resnik (2000)no publicado / A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Trigo	1998	8	48	3	516/3600		5	1	S= Resnik y Pacin (2000)no publicado/P=Pacin y Resnik (2000)no publicado / A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Malz	1998	116	48	113	4.6/250		2	0	S= Resnik y Pacin (2000)no publicado/P= Resnik y col.(2000) no publicado / A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Café	1998	3	48	3					P y S=Pacin y Resnik (2000)no publicado / A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Avena	1998	6	48	6					P y S=Pacin y Resnik (2000)no publicado /A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Arroz	1998	6	48	6					P y S= Broggi y col. (1999a,b) /A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Arroz	1998	5	48	5					P y S= Pacin y Resnik (2000) no publicado/A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Soja	1998	5	17	5					P y S=Boca y col.(2000) /A= Neira y col. (1997)	
Argentina	Malz	1998	34	48	31	78.4/1000	333	3	2	S=Resnik y Pacin (2000)no publicado/P= Broggi y col.(2000) no publicado /A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Malz	1999	363	48	355	9.4/1000		8	1	S=Resnik y Pacin (2000)no publicado/ P=Resnik y col.(2000) no publicado /A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Argentina	Harina de trigo	1999	3	48	0	905/1963		3	1	P y S=Pacin y Resnik (2000) no publicado /A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Arroz partido	1999	43	48	43					P y S=Broggi y col. (1999c) /A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Arroz pulido	1999	6	48	6					P y S=Broggi y col. (1999c) /A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Trigo	1999	6	48	6					P=Resnik y Pacin (2000) no publicado/S=Pacin y Resnik(2000) no publicado /A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Harina de maíz	1999	4	48	4					P y S= Broggi y col. (1999c)/A= Solovey y col. (1999)	
Argentina	Maíz	1999	73	48	73					P=Broggi y col.(2000) no publicado /S= Resnik y Pacin (2000)no publicado/A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Pochoclo	1999	42	48	42					P y S=Souza y col.(2000)/A= Solovey y col. (1999)	Tomado de cosecha en zigzag de la parte interna del bloque sembrado.
Argentina	Sorgo	1999	15	48	15					P=Pacin y Resnik(2000) no publicado /S=Resnik y Pacin (2000)no publicado/A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Maíz	2000	1025	48	967	35.5/2700		49	10	P=Pacin y Resnik(2000) no publicado /S=Resnik y Pacin (2000)no publicado/A= Solovey y col. (1999)	Ver Tabla I.2
Argentina	Cebada	2000	29	48	29					P y S= Martínez y col.(2000)/A= Solovey y col. (1999)	Tomada de la Industria Cervecera (muestra no menor a 1kg)
Argentina	Cerveza	1997	50	2	28	14/221	34.7			P y S= Molto y col (2000)/A=Scott y col.(1993)	Tomado de supermercado (tamaño de la muestra no menor a 2 botellas o latas)
Brasil	Trigo	1990	20	200*	16	110/590	578	4	0	P y S= Furlong y col. (1995 ^h)/A= Furlong y Valente Soares (1995)	Muestras de campos experimentales ubicados en áreas de producción de trigo en San Pablo=3-10kg. Muestra de laboratorio=1kg.
Brasil	Trigo	1999	67	100	1	238/15950		1	1	P, S y A= Mallman (2000) no publicado	Muestras de 200g a 1 kg.
Brasil	Trigo	2000	108	100	14	198/8500		14	6	P, S y A= Mallman (2000) no publicado	Muestras de 200g a 1 kg.
Brasil	Trigo y productos de trigos	1991	38	200*	38					P y S= Soares y Furlani (1996)/A= Furlong y Soares (1995)	muestras(1kg) compradas en negocios de alimentos naturales.
Brasil/Paraná	Maíz	1994-1995	80	111	75	7/542				P=Prado y col. (1997)/S=Fonseca(1991)/A=Trucksess y col.(1984)	
Brasil/Goiás	Maíz	1994-1996	8	111	8	8				P=Prado y col. (1997)/S=Fonseca(1991)/A=Trucksess y col.(1984)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Chile	Maiz	1995-1996	68	10*	68					P y A= Vega y col. (1998) /S=Olavarria (1992)	Ver Tabla I.2
Uruguay	Trigo y sus productos	1993-1994	40	40*	15	345/4000	667	20	1	P=Piñeiro y col. (1994), Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1993-1994	99	40*	58	1220/4000	1200	24	10	P=Piñeiro y col. (1994), Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	
Uruguay	Maiz y sus productos	1993-1994	10	40*	8	158/1500	80		1	P= Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	
Uruguay	Arroz y sus productos	1993-1994	3	40*	2	100/300		1		P=Piñeiro y col. (1994), Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	
Uruguay	Trigo y sus productos	1994-1995	168	40*	81	297/4000	844	58	13	P= Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1994-1995	51	40*	45	23/400	80	4		P= Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	
Uruguay	Maiz y sus productos	1994-1995	7	40*	4	43/120	100	1		P= Piñeiro y col. (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col. (1986)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Uruguay	Arroz y sus productos	1994-1995	10	40*	8	32/167	152	2		P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Trigo y sus productos	1995-1996	15	40*	6	164/945	440	6		P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1995-1996	77	40*	39	54/287	160	18		P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Maíz y sus productos	1995-1996	6	40*	3	33/120	40	1		P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Arroz y sus productos	1995-1996	10	40*	8	15/96	52			P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Trigo y sus productos	1996-1997	27	40*	3	325/1668	834	17	2	P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1996-1997	53	40*	16	152/1704	319	18	2	P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Arroz y sus productos	1996-1997	31	40*	18	184/956	574	13		P= Piñeiro y col (1996), Piñeiro y Silva (1997) y Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Uruguay	Trigo y sus productos	1997-1998	91	40*	32	316/5536	769	34	6	P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1997-1998	241	40*	58	1823/34462	4781	77	60	P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Maíz y sus productos	1997-1998	8	40*	1	697/4308	862	3	1	P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Arroz y sus productos	1997-1998	26	40*	21	29/431	48	2		P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Trigo y sus productos	1998-1999	11	20*	1	126/528	225	4		P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1998-1999	136	20*	62	63/862	161	18		P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Maíz y sus productos	1996-1999	7	20*	3	111/651	81	1		P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Arroz y sus productos	1998-1999	19	20*	19					P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Trigo y sus productos	1999-2000	9	20*	3	62/246	173	2		P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Cebada y sus productos	1999-2000	153	20*	133	4/98	21			P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Maíz y sus productos	1999-2000	9	20*	4	43/176	84	1		P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	
Uruguay	Arroz y sus productos	1999-2000	14	20*	13	6/80				P=Piñeiro (2000) no publicado/S=FAO (1994), UNEP/FAO/WHO (1988)/A= Trucksees y col. (1984), Eppley y col (1986)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Europa										P/S/A	
Austria	Malz	1996/Autumn	85	81*	4	694/2435				P y S=Eilend y col.(1997)/A=Weingaertner y col.(1997) Scott y col. (1986)	Muestras de más de 2 kg
Austria	Malz	1996	51	100	2	662/2570				Lew y col. (2000*) no publicado COST 835/ A=ELISA	Muestras (alrededor de 60 kg) tomadas como muestras compuestas . Homogeneizadas y divididas en muestras de 6 kg.cada una. Molidas en un molino casero (1 kg).
Austria	Malz	1996	46	50	5	575/2810	1380	32	10	Lew y col. (2000*) no publicado COST 835 /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras (alrededor de 60 kg) tomadas como muestras compuestas . Homogeneizadas y divididas en muestras de 6 kg.cada una. Molidas en un molino casero (1 kg).
Austria	Malz	1997	58	50	20	91/580	190	25	0	Lew y col. (2000) no publicado COST 835 /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras (alrededor de 60 kg) tomadas como muestras compuestas . Homogeneizadas y divididas en muestras de 6 kg.cada una. Molidas en un molino casero (1 kg).
Austria	Malz	1998	48	50	12	285/1360	710	31	2	Lew y col. (2000*) no publicado COST 835 /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras (alrededor de 60 kg) tomadas como muestras compuestas . Homogeneizadas y divididas en muestras de 6 kg.cada una. Molidas en un molino casero (1 kg).
Austria	Trigo	1998	15	50	7	52.7/145	123	4	0	Lew y col. (2000*) no publicado COST 835 / A=Weingaertner y col.(1997)	Muestras (alrededor de 30 kg) tomadas como muestras compuestas . Homogeneizadas y divididas en muestras de 6 kg.cada una. Molidas en un molino casero (1 kg).
Noruega/Importación	Trigo	1990	27	30*	19	98/660	570	4	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Noruega/Importación	Trigo	1992	16	30*	4	403/1300	950	10	2	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Trigo	1993	29	30*	15	383/2500	936	14	3	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Trigo	1994	30	30*	18	69/610	177	5	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Trigo	1995	40	30*	18	148/650	527	3	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Trigo	1996	34	20*	20	328/2700	625	6	1	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Trigo	1997	10	20*	3	353/1900	784	4	1	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Trigo	1998	24	20*	6	74/233	204	5	0	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1990	138	30*	28	101/890	215	50	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1991	107	30*	20	81/310	182	31	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1992	112	30*	16	189/900	449	71	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1993	102	30*	37	89/560	198	36	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1994	112	30*	86	29/370	93	11	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1995	26	30*	15	19.5/170	41	1	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1996	28	20*	28					P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1997	25	20*	19	8/73	28	0	0	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1998	35	20*	32	4/85	0	0	0	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Centeno	1990	18	30*	12	15/50	46.5	0	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Centeno	1993	12	30*	9	14/62	51	0	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Centeno	1994	12	30*	8	16/60	53	0	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Centeno	1995	11	30*	8	12.5/57	50	0	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega/Importación	Centeno	1996	10	20*	10					P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Cebada	1990	10	20*	2	30/60	51			P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n> 100 µg/kg	n> 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Noruega	Cebada	1990	10	20*	9	5.5/55				P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1990	20	30*	0	262/690	590	18	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Elen (1996)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1993	3	30*	0	470/670				P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1994	3	30*	0	538/1300				P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1995	26	30*	10	54/230	135	6	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1996	14	20*	5	101/266	244	7	0	P y S=Langseth y Elen (1997)/A=Langseth y Clasen (1992)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1997	14	20*	0	58/110	101	2	0	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1998	22	20*	10	129/850	309	8	0	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1999	20	20*	17	4/28	23	0	0	S= Langseth (2000) /Py A=Langseth (2000) y Langseth y col. (2000) no publicado (COST835)	Ver Tabla I.2
Finlandia	Avena	1987-1988	21	5*	0	168/861				P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	muestras (2-3kg) tomadas de Graneros Estatales de Finlandia y granjeros privados.
Finlandia	Cebada	1987-1988	30	5*	3	70/202				P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	muestras (2-3kg) tomadas de Graneros Estatales de Finlandia y granjeros privados.
Finlandia	Trigo	1987-1988	40	5*	3	75/356				P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	muestras (2-3kg) tomadas de Graneros Estatales de Finlandia y granjeros privados.
Finlandia	Centeno	1987-1988	31	5*	7	40/93				P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	muestras (2-3kg) tomadas de Graneros Estatales de Finlandia y granjeros privados.
Finlandia	Trigo	1998	31	10	5	29.6/190	57	2	0	P, S y A=Eskola y col. (2000a,b) no publicado	Ver Tabla I.2
Finlandia	Centeno	1998	49	10	9	24.5/144	52	2	0	P, S y A=Eskola y col. (2000a,b) no publicado	Ver Tabla I.2
Finlandia	Cebada	1998	15	10	6	20.7/55.9	40	0	0	P, S y A=Eskola y col. (2000a,b) no publicado	Ver Tabla I.2
Finlandia	Avena	1998	10	10	2	138.6/955	955	1	0	P, S y A=Eskola y col. (2000a,b) no publicado	Ver Tabla I.2
Países Bajos	Productos en base a trigo	1999	20	32	2	134/250	220	15	0	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado.	Ver Tabla I.2

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Holanda	Trigo	1999	54	32	4	358/1900	640	49	3	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado	Ver Tabla I.2
Holanda	Harina de trigo	1999	24	32	4	193/460	330	20	0	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado	Ver Tabla I.2
Holanda	Maiz y productos relacionados	1999	3	32	0	110/130		2	0	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado	Ver Tabla I.2
Holanda	Malta	1999	2	32	2	0/0		0	0	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado	Ver Tabla I.2
Holanda	Granos y sus productos	2000	171	32	91	55/570	128	32	0	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado	Ver Tabla I.2
Holanda	Varios granos (excepto trigo)	2000	25	32	20	40/385	186	5	0	P, S y A= Spanjer (2000) no publicado	Ver Tabla I.2
Suecia	Trigo	1990	88	10	63	9.5/90	35.5	0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avenas	1990	71	10	28	25/375	65	3	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Cebada	1990	39	10	12	16/45	40	0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Centeno	1990	5	10	0	22/30		0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Trigo	1991	92	10	40	17.7/240	43.5	2	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avena	1991	38	10	28	6/95	16.5	0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Trigo	1992	13	10	7	8/30		0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A=Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Mín/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Suecia	Avena	1992	2	10	0	40/40		0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993) PIS/A	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Trigo	1993	2	10	1	10/20		0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avena	1993	10	10	6	14.4/89		0	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avena	1994	34	10	2	136/538	269	18	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avena	1996	80	10	9	47/365	146	10	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avena	1997	84	10	5	86/406	195	30	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Avena	1998	33	10	18	14/120	45.8	1	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Cebada	1998	10	10	8	31/243		1	0	Py S=Pettersson (2000)no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestra analizada (20g).
Suecia	Trigo	10/1996- 06/1998	59	10	43	69/2153	173	7	1	P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas como muestras compuestas del flujo de entrada de cereales al molino, durante el almacenamiento o en el flujo de producción. Muestra analítica=50g.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Suecia	Trigo	1999	75	10	16	53/346	120	15	0	P y S=Thuyver y col. (2000) no publicado /A= Möller y Gustavsson(1992) P/S/A	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas como muestras compuestas del flujo de entrada de cereales al molino, durante el almacenamiento o en el flujo de producción. Muestra analítica=50g.
Suecia	Avena	10/1996-06/1998	23	10	17	9.3/70	42	0	0	P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas como muestras compuestas del flujo de entrada de cereales al molino, durante el almacenamiento o en el flujo de producción. Muestra analítica=50g.
Suecia	Avena	1999	10	10	6	6/19	18.9	0	0	P y S=Thuyver y col. (2000) no publicado /A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas como muestras compuestas del flujo de entrada de cereales al molino, durante el almacenamiento o en el flujo de producción. Muestra analítica=50g.
Suecia	Centeno	10/1996-06/1998	28	10	26	13/351		0	0	P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas como muestras compuestas del flujo de entrada de cereales al molino, durante el almacenamiento o en el flujo de producción. Muestra analítica=50g.
Suecia	Centeno	1999	19	10	9	13/47	41	0	0	P y S=Thuyver y col. (2000) no publicado /A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras (alrededor de 1kg) tomadas como muestras compuestas del flujo de entrada de cereales al molino, durante el almacenamiento o en el flujo de producción. Muestra analítica=50g.
Bulgaria	Trigo	1993	44	5*	7	37.9/137	91.5	3	0	P y S=Atanasov y col. (1995)/A=Luo y col. (1990)	
Bulgaria	Trigo	1995	140	50*	46	120.6/1800				P, S y A= Vrabcheba y col. (1996) Ridascreen™	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
						Mediana				P/S/A	
Rusia	Trigo	1986	14	50*	0	590/2510	2310		6	P, S y A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras obtenidas de 40 diferentes almacenes de granos en la región del Cáucaso Norte en Rusia. Submuestra=1k. muestra analítica=25 g.
Rusia	Trigo	1987	90	50*	34	260/9090	1460		14	P, S y A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras obtenidas de 40 diferentes almacenes de granos en la región del Cáucaso Norte en Rusia. Submuestra=1k. muestra analítica=25 g.
Rusia	Trigo	1988	120	50*	8	1130/13900	3800		62	P, S y A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras obtenidas de 40 diferentes almacenes de granos en la región del Cáucaso Norte en Rusia. Submuestra=1k. muestra analítica=25 g.
Rusia	Trigo recién cosechado	1989	251	50*	0	680/5800	1200			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo recién cosechado	1990	214	50*	90	570/3520	660			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo recién cosechado	1991	159	50*	39	520/3800	650			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Rusia	Trigo recién cosechado	1992	311	50*	3	880/8600	1600			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990) P/S/A	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo recién cosechado	1993	543	50*	4	710/4000	1200			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo recién cosechado	1994	154	50*	118	80/950	180			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo	1989	57	50*	42	230/6650	440			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo	1990/1991	67	50*	63	20/740	0			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Rusia	Trigo	1992	190	50* 118	118	330/5630	1060			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo	1993	169	50* 139	139	200/3950	630			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Rusia	Trigo	1994	267	50* 249	249	30/1130	0			P y S= Tutelyan (1998)/A= Tutelyan y col. (1990)	Muestras (2 kg) representativas de trigo y cebada recién cosechadas y de alimentos a base de granos obtenidas de diferentes plantas de almacenamiento en 10 regiones de Rusia.
Alemania	Pan y productos relacionados	1998/Jan-Jun	96	23 16	16	76.4/788				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras secadas a 40 °C, molidas en un molino casero (1.5 mm), muestra analítica=25g.
Alemania	Fideos	1998/Jan-Jun	29	23 2	2	146.9/1670				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm). Muestra analítica 25 g.
Alemania	Cereales para el desayuno	1998/Jan-Jun	32	23 14	14	42/238				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm). Muestra analítica 25 g.
Alemania	Alimento para bebés y niños	1998/Jan-Jun	25	23 10	10	36.6/314				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm). Muestra analítica 25 g.
Alemania	Arroz	1998/Jan-Jun	26	23 12	12	106.5/305				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm). Muestra analítica 25 g.
Alemania	Alimentos a base de cereal	1998/Jan-Jun	29	23 14	14	71.8/505				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm). Muestra analítica 25 g.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Alemania	Trigo	1998	56	23	4	647/7730	805	43	4	P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000a)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras tomadas al azar de almacenamientos. Submuestra=100 g (molda 1mm) muestra analítica=10g
Alemania	Harina de trigo blanca (contenido de cenizas 405 y 550 mg/100g)	1999	28	23	0	239/965				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000b)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras =5 kg tomadas al azar de negocios, mezcladas previamente para obtener una submuestra analítica de 10 g.
Alemania	Harina de trigo blanca (contenido de cenizas 1050 mg/100g)	1999	13	23	1	216/756				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000b)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras =5 kg tomadas al azar de negocios, mezcladas previamente para obtener una submuestra analítica de 10 g.
Alemania	Harina de trigo blanca (contenido de cenizas 1600-1700 mg/100g)	1999	19	23	0	404/1379				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000b)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras =5 kg tomadas al azar de negocios, mezcladas previamente para obtener una submuestra analítica de 10 g.
Alemania	Pan (Harina blanca)	1999	55	23	2	176/584				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000c)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras de más de 100 g, secadas a 40 °C, molidas en un Molino casero (1.5mm), y 10 g fueron analizados.
Alemania	Pan (harina de grano entero)	1999	52	23	7	103/690				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000c)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras de más de 100g, secadas a 40°C, molidas en un molino casero (1.5mm). muestra analítica= 10 g.
Alemania	Fideos (Harina blanca)	1999	27	23	1	220/1000				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000c)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras de más de 100g, molidas en un molino casero (1.5mm). muestra analítica= 10 g.
Alemania	Fideos (harina integral)	1999	12	23	3	791/4840				P y S= Schollenberger y col. No publicado (2000c)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras de más de 100g, molidas en un molino casero (1.5mm). muestra analítica= 10 g.
Alemania	Trigo	1987	84	1*	3	1574/20538		49	21	P y S=Müller y Schwadorf (1993)/A=Schwadorf y Müller(1991)	Muestras tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Alemania	Trigo	1989	78	1-5*	24	105/1187		24	8	P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991) P/S/A	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Trigo	1990	80	1-5*	3	573/8969		59	13	P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Trigo	1991	80	1-5*	3	346/4627		37	7	P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Trigo	1992	78	1-5*	4	318/5412		43	2	P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Trigo	1993	45	1-5*	2	374/6165		22	3	P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras 700g a 1 kg, tomadas rítmicamente 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Avena	1987	56	3*	18	91.9/1480				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Avena	1989	56	3*	15	99.7/536				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Avena	1990	54	3*	26	26.8/203				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Alemania	Avena	1991	51	3*	26	107.3/857				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991) P/S/A	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Avena	1992	55	3*	8	256.9/1224				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Cebada	1987	44	3*	1	391/4764		18	4	P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Cebada	1989	40	3*	11	75/483		16	0	P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Cebada	1990	47	3*	13	54/300		9	0	P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Cebada	1991	51	3*	15	38/530		4	0	P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Cebada	1992	58	3*	6	38/486		3	0	P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700 g a 1 kg tomadas al azar 1-4 semanas después de la cosecha por el Consejo Asesor Gubernamental en granjas.
Alemania	Productos a base de centeno; producción convencional	1991	50	50*	30	64/1250				P,S y A=Marx y col. (1995)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Alemania	Productos a base de centeno; producción orgánica	1991	50	50*	22	239/500				P, S y A=Marx y col. (1995)	
Alemania	Productos de trigo; producción orgánica	1991	51	50*	6	370/1200				P, S y A=Marx y col. (1995)	
Alemania	Productos de trigo; producción orgánica	1991	50	50*	12	369/1000				P, S y A=Marx y col. (1995)	
Alemania	Cerveza	1993	67	50*,**	17	183/569**				P, S y A=Niessen y col. (1993)	
Alemania	Cerveza	1993	123	50*,**	88	42/478**				P, S y A=Niessen y col. (1993)	
Alemania	Cerveza	1993	6	50*,**	6					P, S y A=Niessen y col. (1993)	
Italia/Norte	Trigo durum	1994-1995	64	500*	50	204/3085	800		3	P y S=Lops y col. (1998)/ A=Romer Labs. Inc.(1995) y Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades, muestras de laboratorio=200 g
Italia/Norte	Trigo blando	1994-1995	77	500*	71	59/920	0		0	P y S=Lops y col. (1998)/ A=Romer Labs. Inc.(1995) y Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades, muestras de laboratorio=200 g
Italia/Norte	Trigo blando	1998	42	50*	37	17/330	72.5	2	0	P y S= Pascale y col. (2000)/A=Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra=1 kg. Muestra compuesta =3 kg Muestra analítica=25 g.
Italia/Norte	Trigo durum	1998	26	50*	2	186/1000	463	19	1	P y S= Pascale y col. (2000)/A=Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra=1 kg. Muestra compuesta =3 kg Muestra analítica=25 g.
Italia/Norte	Cebada	1998	20	50*	18	80/1540		1	1	P y S= Pascale y col. (2000)/A=Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra=1 kg. Muestra compuesta =3 kg Muestra analítica=25 g.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Italia/Norte	Triticale	1998	10	50*	2	92/200	197	5	0	P y S= Pascale y col. (2000)/A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra=1 kg. Muestra compuesta =3 kg Muestra analítica=25 g.
Italia/Norte	Trigo blando (orgánico)	1998	35	50*	17	36/105	89	2	0	P y S= Pascale y col. (2000)/A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra=1 kg. Muestra compuesta =3 kg Muestra analítica=25 g.
Italia/Norte	Trigo blando (orgánico)	1998	20	50*	2	172/350	317	14	0	P y S= Pascale y col. (2000)/A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra=1 kg. Muestra compuesta =3 kg Muestra analítica=25 g.
Italia/Norte	Trigo blando (orgánico)	1999	48	50*	1	173/529	282	36	0	P y S =Pascale y col.(2000) no publicado /A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra de laboratorio=200 g.
Italia/Norte	Trigo (orgánico)	1999	30	50*	0	148/452	230	25	0	P y S =Pascale y col.(2000) no publicado /A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra de laboratorio=200 g.
Italia/Norte	Trigo blando	1999	112	50*	44	133/956	390	37	0	P y S =Pascale y col.(2000) no publicado /A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra de laboratorio=200 g.
Italia/Norte	Trigo durum	1999	111	50*	22	202/1206	446	78	1	P y S =Pascale y col.(2000) no publicado /A= Vicam (1996)	Muestra representativa de lotes para estudios de rendimiento de híbridos y variedades. Muestra de laboratorio=200 g.
Reino Unido	Trigo	1998	53	20*	2	175/1202	432	27	1	P, S y A=Home Grown Cereals Authority (1999) (COST835) No publicado	
Reino Unido	Trigo	1999	201	20*	3	86/600		52	0	P, S y A=Home Grown Cereals Authority (2000) (COST835) No publicado	
Reino Unido	Cebada	1999	106	20*	31	38/370		3	0	P, S y A=Home Grown Cereals Authority (2000) (COST835) No publicado	
Reino Unido	Avena	1999	13	20*	3	39/108		1	0	P, S y A=Home Grown Cereals Authority (2000) (COST835) No publicado	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n> 100 µg/kg	n> 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Polonia	Tngo	1993	78	10*	39	10.5/102		1	0	P, S y A= Golinski y col. (1996)	
Asia											
Corea	Cebada con cáscara	1990/Julio	10	2*	1	237/677	667	5	0	P, S y A= Park y col. (1992)	Muestras tomadas de diferentes granjas en 4 provincias
Corea	Cebada pelada	1990/Julio	27	2*	3	189/645	501	18	0	P, S y A= Park y col. (1992)	Muestras tomadas de diferentes granjas en 4 provincias
Corea	Cebada	1990/Julio	39	5*	4	153/1051	152.56			P, S y A= Kim y col. (1993)	Muestras tomadas de diferentes depósitos de granjeros en 4 provincias
Corea	Maiz	Nov. 1990- 1991	46	5*	16	202/2752	202.17			P, S y A= Kim y col. (1993)	Tomadas de 6 condados en 1 provincia
Corea	Cebada	1992/Julio	30	5*	10	70.6/361				P, S y A= Ryu y col. (1996)	Tomadas de 6 provincias
Corea	Maiz	1992/Marzo	15	5*	1	135/442				P, S y A= Ryu y col. (1996)	Tomadas de 6 provincias
Corea	Cebada	1993	48	5*	20	120/1522				P y S= Lee y col. (1995)/A= Kim y col. (1993)	Muestras (100 g cada una) tomadas de 5 provincias
Corea	Cebada	1993	11	5*	3	190/955				P y S= Lee y col. (1995)/A= Kim y col. (1993)	Muestras (100 g cada una) tomadas de 5 provincias
Corea	Cerveza	1995	42	0.5*, **	34	0.59/5.3**	2.7			P y S= Shim y col. (1997)/A= Scott y col. (1993)	
Indonesia	Maiz	1995	16	10*	14	3.3/32				P, S ans A= Ali y col. (1998)	Muestras tomada de 3 lugares (distancia 60km). Muestras molidas =200g. Muestra analítica = 20 g.
India	Maiz	1994-1997	197	100*	195	0.19/21				P y S= Janardhana y col. (1999)/A= Trucksess y col. (1984)	Muestras de 14 distritos representando diferentes zonas de cultivo, tomadas directamente de granjas, campos de producción y mercados reguladores.
Filipinas	Maiz	1992-1994	50	10*	50					P, S= Yamashita y col. (1995)/ A=Luo y col. (1990)	Tomadas al azar de almacenes mayoristas y minoristas, granjas universitarias y granjeros locales (para consumo animal y humano).
Tailandia	Maiz	1992-1994	27	10*	27					P, S= Yamashita y col. (1995)/ A=Luo y col. (1990)	Tomadas al azar de almacenes mayoristas y minoristas, granjas universitarias y granjeros locales (para consumo animal y humano).

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
Indonesia	Maíz	1992-1994	12	10*	12					P,S=Yamashita y col. (1995)/ A=Luo y col. (1990)	Tomadas al azar de almacenes mayoristas y minoristas, granjas universitarias y granjeros locales (para consumo animal y humano).
China/Linxian	Trigo	1995	25	5*	4	70/193		5	0	P y S= Gao y Yoshizawa (1997)/A= Luo y col. (1990)	
China/Shangqiu	Trigo	1995	15	5*	7	21/125		1	0	P y S= Gao y Yoshizawa (1997)/A= Luo y col. (1990)	
China/Linxian	Maíz	1995	34	5*	9	294/1160		17	2	P y S= Yoshizawa y Gao (1999)/A= Luo y col. (1990)	
China/Shangqiu	Maíz	1995	20	5*	16	10/87		0	0	P y S= Yoshizawa y Gao (1999)/A= Luo y col. (1990)	
China/Linxian	Maíz	1997	15	5*	1	120/393		7	0	P y S= Yoshizawa y Gao (1999)/A= Luo y col. (1990)	
China/Shangqiu	Maíz	1997	20	5*	11	40/171		4	0	P y S= Yoshizawa y Gao (1999)/A= Luo y col. (1990)	
China/Linxian	Trigo	1997	25	5*	8	19/138		1	0	P y S= Yoshizawa y Gao (1999)/A= Luo y col. (1990)	
China/Shangqiu	Trigo	1997	15	5*	15			0	0	P y S= Yoshizawa y Gao (1999)/A= Luo y col. (1990)	
China/Linqu	Maíz en granos	1996	12	500*	5	817/2700	2370		5	P,S y A=Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración
China/Linqu	Harina de maíz	1996	13	500*	5	615/1600	1560		6	P,S y A=Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración
China/Linqu	Panqueques cocidos	1996	14	500*	10	314/1500	1300		3	P,S y A=Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
China/Anhui	Trigo	1983	40	50*	0	1161/			9	P y S=Lu y col. (1994)/A=FAO/WHO (2000)submitted P/S/A	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China/Anhui	Trigo	1986	182	50*	100	312/			13	P y S=Lu y col. (1994)/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China/Anhui	Trigo	1989	81	50*	0	2640/			65	P y S=Lu y col. (1994)/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China/Anhui	Trigo	1991	26	50*	0	2106/			15	P y S=Lu y col. (1994)/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Trigo	1986/verano	214	100	48	211.3/1200	428.6			P=Cao y col.(1994)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Trigo	n/a	99	100	92	697.3/20000	1600			P y S=Guo y col. (1995)/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Harina de trigo	1988/verano	30	100	13	83.3/400	200			Lu y col. (1992)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Harina de trigo	1989/autumn	50	100	2	561/1428	1250			P=Cao y col.(1994)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Harina de trigo	1989/verano	70	100	0	1403/3130	2500			P=Lu y col. (1992)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Harina de trigo	1990/verano	50	100	32	56.2/173	173			P=Luo y Li (1991) no publicado/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Harina de trigo	1991/verano	50	100	31	302.4/1000	800			P=Luo y Li (1991) no publicado/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Trigo	1996/verano	100	100	60	272.7/2322.1	917.9			P = Li (1997) no publicado/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
China	Maiz	1988/unk	101	100	21	287.3/2500	625			P=Cao y col.(1994) y Guo y col. (1995)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1988/autumn	55	100	23	177.5/1100	432			P=Liu y col. (1992)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1989/verano	100	100	68	241.3/4000	800			P=Guo y col.(1995)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1989/autumn	140	100	111	35.2/800	130			P=Cao y col.(1994), Liu y col. (1992) y Lu y col.(1992)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1989/unk	50	100	12	136.4/1000	200			P=Guo y col.(1995)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1990/verano	85	100	62	69.2/48	240			P=Lu y col.(1992)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1990/invierno	20	100	15	163/1500	765			P=Luo y col.(1991)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Maiz	1991/verano	50	100	33	504.6/3200	1600			P=Luo y col.(1991)/S=GB5009/A=FAO/WHO (2000)/submitted	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
Japón	Trigo	1989-1994	151	5*	69	87/1620	198			P y S=Yoshizawa,T. (1997) y Yoshizawa y Jin (1995)/A=Luo y col. (1990)	
Japón	Cebada	1989-1994	94	5*	23	205/3780	280.4			P y S=Yoshizawa,T. (1997) y Yoshizawa y Jin (1995)/A=Luo y col. (1990)	
Japón/Hokkaido	Trigo	1991-1992	79	5	28	393/13002	553.6	31	5	P=Yoshizawa T. (2000) no publicado /S y A= Luo y col. (1990)	
Japón	Harina de Trigo	1996-1999	52	5	25	178.6/1884	638.7	15	2	P=Yoshizawa T. (2000) no publicado /S y A= Luo y col. (1990)	
Japón	Cebada prensada	1996-1999	20	5	12	37.25/223	159.2	3	0	P=Yoshizawa T. (2000) no publicado /S y A= Luo y col. (1990)	
Japón	Harina de cebada	1996-1999	30	5	28	6.77/190	0	1	0	P=Yoshizawa T. (2000)no publicado /S y A= Luo y col. (1990)	
Vietnam del Norte	Maiz	1993	15	100*	15					P y S= Wang y col. (1995)/A=Tanaka y col. (1985)	
Vietnam del Norte	Maiz en polvo	1993	17	100*	13	746/6510		4	4	P y S= Wang y col. (1995)/A=Tanaka y col. (1985)	

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90p µg/kg	n > 100 µg/kg	n > 1000 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestra
New Guinea	Alimentos a base de Cereales	1991	29	10	17	329/2270	1720	7	4	P, S=Yuwai y col. (1994)/A= Tanaka y col. (1985)	
Nueva Zelanda	Maíz	1987	29	30	8	760/3500		13		P y S= Lauren y col. (1991)/A= Lauren y Agnew (1991)	
Nueva Zelanda	Maíz	1988	34	30	5	446/1120		16		P y S= Lauren y col. (1991)/A= Lauren y Agnew (1991)	
Nueva Zelanda	Maíz	1989	28	30	5	286/710		16		P y S= Lauren y col. (1991)/A= Lauren y Agnew (1991)	
Nueva Zelanda	Maíz	1992	178	10*	0	920/8500	2265	145	45	P y S= Lauren y col. (1996)/A= Lauren y Agnew (1991)	
Nueva Zelanda	Maíz	1993	162	10*	12	310/3370	800	90	11	P y S= Lauren y col. (1996)/A= Lauren y Agnew (1991)	
Nueva Zelanda	Maíz	1994	276	10*	31	350/4790	730	162	16	P y S= Lauren y col. (1996)/A= Lauren y Agnew (1991)	

Tabla 1.2 Metodología de muestreo aplicada a estudios de ocurrencia descriptos en Tablas 1, 4 y 5 para tricotecenos: DON, T-2 y HT-2.

Referencia	Grano	Número de muestras	Lugar de recolección	Lotes	Método de recolección	Tamaño de la muestra	Tamaño primera submuestra (kg)	Segunda submuestra compuesta (kg)	Muestra de Laboratorio (kg)	Muestra analizada (kg)
Apro y col. (1987)	Todos	Proporcional a la producción de cada área			Porciones no mayores a 50 g Equipo de muestreo automático	Granos pequeños (trigo, sorgo, avena, maíz) = 10 Kg Maní, porotos de soja, girasol = 50 Kg Algodón = 60 Kg	3 (trigo) 5 (maíz)	1 (trigo) 2 (maíz)	0.2	0.025
Eskola (2000a,b)	Cereales		Molinos o malterías	4-1000 toneladas	Industria: Equipo de muestreo automático 100-200 g cada 50 a 1000kg Productores: Muestreador manual. Varias submuestras	3 a 100 Kg 0.5 a 1 Kg			0.5-1	
Fonseca (1991)	Maní Maíz Arroz	Proporcional al tamaño del lote	Paquetes o a granel	20 toneladas	El menor número de paquetes o puntos a granel a analizar es una función (√) del tamaño del lote, porciones de 200 g	Homogeneizado y molido Cada muestra = 4 Kg				
Langseth y Elen (1997)	Porotos Cebada Avena Trigo	Proporcional a la producción y al nivel de infección por <i>Fusarium</i>	Camiones, silos		Camiones y silos: Equipo de muestreo automático Productores: Muestreador manual				0.3-0.8	0.025
Olavarria (1992)	Maíz Trigo Arroz	Proporcional a la producción de cada área	Cosecha	Camiones 8-12 ton	Muestreador manual (probeta metálica de 130 cm) 12-15 porciones no mayores a 300 g	5 a 6 Kg				0.025
Quiroga y col. (1995)	Trigo	Proporcional a la producción de cada área	Cosecha		Porciones no mayores a 50 g Equipo de muestreo automático o muestreador manual	10 Kg	3	1	0.2	0.025
				max 2000 ha		Homogeneizado y molido	Tamiz de malla 14	Tamiz de malla 20		

Referencia	Grano	Número de muestras	Lugar de recolección	Lotes	Método de recolección	Tamaño de la muestra	Tamaño primera submuestra (kg)	Segunda submuestra compuesta (kg)	Muestra de Laboratorio (kg)	Muestra analizada (kg)
Resnik y Pacin (2000) No publicado	Trigo	Proporcional a la producción de cada área	Cosecha	max 2000 ha	Porciones no mayores a 50 g	10 Kg	3 (trigo) 5 (maiz) Taniz de malla 14			
	Maiz				Equipo de muestreo automático o Muestreador manual	Homogeneizado y molido	Molino Romer			0.05

También se detectó DON, en granos decolorados y dañados de porotos de soja y en algunos productos a base de soja producidos en una planta piloto; en estos casos las concentraciones variaron de no detectable a 490 µg/kg en granos enteros, de menos de µg/kg a 420 µg/kg en cutícula o cáscara, de menos de 5 µg/kg a 600 µg/kg en harinas y desde no detectable a 30 µg/kg en aceite no refinado (Jacobsen y col., 1995). En la Tabla I.1 se incluyen solamente cinco muestras con contaminación de DON no detectable.

Un estudio llevado a cabo en Inglaterra, en muestras de comidas étnicas demostró la contaminación por DON en niveles similares a los hallados en el trigo de ese mismo país (Patel y col., 1996).

Como se indica en Tabla I.1, DON fue hallado como contaminante frecuente de granos de cereales tales como trigo (11.444 muestras, 57,4% contaminadas), maíz (5.349 muestras, 40,5% contaminadas), avena (834 muestras, 67,8% contaminadas), cebada (1.662 muestras, 59,3% contaminadas), centeno (295 muestras, 49,2% contaminadas) y arroz (154 muestras, 26,6% contaminadas). También se ha detectado DON en algunos alimentos elaborados con trigo y maíz, tales como harina de trigo, pan, cereales para desayuno, fideos, comidas para bebés y niños y panqueques cocidos; así como en productos elaborados con cebada como la cerveza. Diversos trabajos realizados detectaron que un 50% en 321 muestras de cerveza estaban contaminadas por DON (Moltó y col., 2000, Niessen y col., 1993; Scott y col., 1993).

Estudios llevados a cabo en Alemania e Italia, detectaron que la contaminación por DON fue hallada no sólo en la producción convencional sino también en la producción orgánica de cereales. (Tabla I.1)

A pesar que la Tabla I.1 incluye 23.380 muestras en donde se estudió la contaminación por DON, continúan faltando algunos productos y varias regiones o países del mundo. (JECFA, 2001).

El tricoteceno más estudiado es el DON seguido por las toxinas T-2 y HT-2.

Con respecto a los estudios sobre T-2 y HT-2 revelaron su presencia en granos tales como trigo, maíz, avena, cebada, arroz, porotos y soja, así como en algunos productos preparados con estos cereales.

Existen reportes ocasionales sobre la contaminación por estas toxinas en alimentos destinados a consumo humano. Pan, cereales para desayuno u otras comidas a base de cereales fueron encontrados contaminados por T-2 y alimentos para bebés y niños, pan fideos y comidas a base de cereales contaminados por HT-2 (Patel y col., 1996; Scholenberger y col., 1999, 2000b,c).

Los datos referidos a las toxinas T-2 y HT-2 se presentan en las Tabla 1.3 y Tabla 1.4 respectivamente. Tal como fuera descripto para DON, en este caso tampoco fueron incluidos estudios donde no había información acerca del muestreo o de la metodología analítica.

Se recalcularon también los valores medios en los casos donde se informaron media de muestras positivas o con los valores no detectados como la mitad del límite de detección. Por lo tanto, los valores medios en las Tablas 1.3 y 1.4 indican la media de todas las muestras, considerando los que estaban debajo del límite de detección igual a cero.

Tabla I.3. Ocurrencia Natural de toxina T-2

LOQ = Límite de cuantificación

Media: (para n valores analíticos, la media es la $\bar{X} = \sum X_i / n$) donde X es el valor de cada resultado analítico

90p = 90th percentil

n = número

Max: máximo nivel

ref = referencias

Referencias: P= referencia original, S=método de muestreo, A=método analítico

* = Límite de detección

**= ng/ml

***= media de muestras positivas

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Africa									P/S/A	
Sudáfrica	Maíz Amarillo	1993	236	250*	236				P y S=Rava y col. (1996)/A= Sydenham y Thiel (1987)	Muestras tomadas durante la cosecha a la entrada de silos de las principales zonas de producción
Sudáfrica	Maíz blanco	1994/1995	143	250*	143				P y S=Rava (1996)/ A= Sydenham y Thiel (1987)	Muestras tomadas de molinos cubriendo todo el país
Sudáfrica	Maíz Amarillo	1994/1995	148	250*	148				P y S=Rava (1996)/ A= Sydenham y Thiel (1987)	Muestras tomadas de molinos cubriendo todo el país
Sudáfrica	Productos de Maíz	1994/1995	158	250*	158				P y S=Rava (1996)/ A= Sydenham y Thiel (1987)	Muestras tomadas de molinos cubriendo todo el país
América										
Argentina	Maíz	1987-1989	100	100*	85	163/2400			P=Saubois y col (1992)/ S= Junta Nacional de Granos(1984). COPANT (1998). Jewers (1987) A=Kamimura y col. (1981)	Muestras =10kg. Muestra analítica = 50g
Argentina	Trigo	1986	261	500*	241	12.7/NA			P=Quiroga y col. (1995)/S= Apro y col. (1987)/A=Trucksess y col. (1984)	Ver Tabla I.2
Brasil	Trigo	1990	20	100*	18	60/800	360	2	P y S= Furlong y col. (1995)/A= Furlong y Valente Soares (1995)	Muestras de campos experimentales ubicados en las zonas de producción de San Pablo=3-10kg. Muestra para laboratorio= 1kg.
Brasil	Trigo y productos de trigo	1991	38	100*	38				P y S=Soares y Furlani 1996/A Furlong y Valente Soares (1995)	Muestras (1kg) compradas en negocios de comida "saludable".
Brasil/Paraná	Maíz	1994-1995	80	50*	79	1.3/104		1	P=Prado y col. (1997)/S=Fonseca(1991)/A=ELISA	Ver Tabla I.2
Brasil/Goiás	Maíz	1994-1995	8	50*	8				P=Prado y col. (1997)/S=Fonseca(1991)/A=ELISA	Ver Tabla I.2
Canadá	Trigo durum	1987	29	400	29				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de muestra= 2 a 5 kg.

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Canadá	Trigo blando de invierno	1988	17	400	17				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de Muestra= 2 a 5 kg.
Canadá	Maíz	1989	16	400	16				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de Muestra= 2 a 5 kg.
Canadá	Trigo duro del oeste	1991	108	400	108				P y S= Scott (1997)/A= Scott y col(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de Muestra= 2 a 5 kg.
Canadá	Trigo	1990	29	150*	29				P, S y A= Stratton y col. 1993	Tomada en la cosecha. 3Kg. de muestra molida en un molino Romer. Submuestras=250g.
Canadá	Cebada	1990	23	150*	23				P, S y A= Stratton y col. 1993	Tomada en la cosecha. 3Kg. de muestra molida en un molino Romer. Submuestras=250g.
Chile	Maíz	1995-1996	68	10*	68				P y A= Vega y col. (1998) /S=Olavarría (1992)	Ver Tabla 1.2
Ecuador	Arroz	1992-1994	99	50	93	27/NA			P=Mühlemann y col. (1997a,b)/S=Mühlemann y col (1997 a)/ A= Veratox™	Muestras mezcladas (1.2-3 kg) tomadas al azar de diferentes regiones climáticas de Ecuador tomando en consideración variedad y tipo de almacenamiento.
Ecuador	Porotos	1992-1994	76	50	65	30/NA			P=Mühlemann y col. (1997 a,b)/S=Mühlemann y col (1997 a)/ A= Veratox	Muestras mezcladas (1.2-3 kg) tomadas al azar de diferentes regiones climáticas de Ecuador tomando en consideración variedad y tipo de almacenamiento.
Ecuador	Maíz	1992-1994	90	50	78	30.7/NA			P=Mühlemann y col. (1997 a,b)/S=Mühlemann y col (1997 a)/ A= Veratox	Muestras mezcladas (1.2-3 kg) tomadas al azar de diferentes regiones climáticas de Ecuador tomando en consideración variedad y tipo de almacenamiento.
Europa										
Austria	Maíz	1996	46	100	45	5.6/260		1	Lew y col. (2000a) no publicado (COST 835) /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras compuestas (~60kg). Homogeneizadas y cuarteadas a 6 kg de muestra. Molidas en un molino casero (1kg)
Austria	Maíz	1997	58	100	58				Lew y col. (2000a) no publicado COST 835 /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras compuestas (~60kg). Homogeneizadas y cuarteadas a 6 kg de muestra. Molidas en un molino casero (1kg)
Austria	Maíz	1998	48	100	46	6/150		2	Lew y col. (2000a) no publicado COST 835 /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras compuestas (~60kg). Homogeneizadas y cuarteadas a 6 kg de muestra. Molidas en un molino casero (1kg)
Finlandia	Avena	1987-1988	21	15*	19	5.6/73			P, S y A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg) tomadas de silos del Estado Finlandés y de productores privados.

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Finlandia	Cebada	1987-1988	30	15*	30				P/S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg) tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Trigo	1987-1988	40	15*	40				P/S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg) tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Centeno	1987-1988	31	15*	30	0.55/17			P/S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg) tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Avena	1998	10	20	9	2.3/23	23	0	P/S y A=Esola y col. (2000a,b) no publicado	Ver Tabla I.2
Bulgaria	Trigo	1995	140	40*	139	0.39/55			P/S y A= Vrabcheda y col. (1996)	
Alemania	Trigo	1987	84	1-3*	62	21/249			P y S=Müller y Schwadof (1993)/A=Schwadof y Müller(1991)	Muestras tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1989	78	1-5*	73	0.66/12			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1990	80	1-5*	71	5.7/136			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1991	80	1-5*	77	0.4/16			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1992	78	1-5*	78				P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1993	45	1-5*	27	8/94			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1989	40	1-5*	39	0.4/16			P y S=Müller y col. (1997b)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1990	47	1-5*	46	0.1/6			P y S=Müller y col. (1997b)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1991	51	1-5*	40	6.3/106			P y S=Müller y col. (1997b)/A=Schwadof y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Alemania	Cebada	1992	58	1-5*	41	20.8/305			P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1987	56	1-5*	30	10/57			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1989	56	1-5*	39	8.2/86			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1990	54	1-5*	21	12.2/26			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1991	51	1-5*	37	15.3/224			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1992	55	1-5*	38	75.8/1686			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg. tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1998	56	6	56				P y S= Schollenberger y col. (2000a) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Tomadas al azar de almacenamientos. Submuestra=100gr. molidas (1mm) y 10gr de muestra analítica
Alemania	Harina de trigo blanca (contenido de ceniza 405 y 550 mg/100g)	1999	28	6	28				P y S= Schollenberger y col. (2000b) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras= 5 kg. tomadas al azar de negocios, mezcladasprevio a la toma de 10 gr analítica.
Alemania	Harina de trigo blanca (contenido de cenizas 1050 mg/100g)	1999	13	6	13				P y S= Schollenberger y col. (2000b) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras= 5 kg. tomadas al azar de negocios, mezcladasprevio a la toma de 10 gr analítica.
Alemania	Harina de trigo blanca (contenido de cenizas 1600-1700 mg/100g)	1999	19	6	18	0.21/4			P y S= Schollenberger y col. (2000b) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras= 5 kg. tomadas al azar de negocios, mezcladasprevio a la toma de 10 gr analítica.
Alemania	Pan	1999	107	6	105	0.07/4			P y S= Schollenberger y col. (2000c) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras mayores de 100 gr secadas a 40° molidas en un molino casero (1.5mm) y 10 gr. muestra analítica
Alemania	Fideos	1999	39	6	36	0.8/12			P y S= Schollenberger y col. (2000c) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras mayores de 100 gr , molidas en un molino casero (1.5mm) y 10 gr. muestra analítica

Pais/Region	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Alemania	Pan y productos relacionados	1998/Ene-Julio	96	6	95	0.04/4			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras secadas 40°C, molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr
Alemania	Fideos	1998/Ene-Julio	29	6	29				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Cereales para desayuno	1998/Ene-Julio	32	6	30	0.19/7			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Alimento para bebés y niños	1998/Ene-Julio	25	6	25				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Arroz	1998/Ene-Julio	26	6	25	0.73/19			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Alimentos en base de cereales	1998/Ene-Julio	29	6	23	3.8/39			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Noruega	Avena	1996	14	30*	9	41/320	95	2	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1997	14	30*	6	47/195	113	3	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1998	22	30*	18	7/42	38	0	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1999	20	30*	12	26/91	79	0	S=Langseth (2000)/P=Langseth y col. (2000) no publicado/A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1996	34	30*	34				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1997	10	30*	10				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1998	24	30*	24				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1996	28	20*	28				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1997	25	20*	25				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)	Ver Tabla I.2

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Noruega	Trigo	1998	35	20*	35				P/S/A S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberg (2000)	Ver Tabla 1.2
Suecia	Trigo	1990	88	50	88				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1990	71	50	44	43/430	118	17	P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Cebada	1990	39	50	39				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Centeno	1990	5	50	5				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	1991	92	50	92				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1991	38	50	33	10/90		0	P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	1992	13	50	13				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1992	2	50	2	-			P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	1993	2	50	2				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1993	10	50	10				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1994	34	30	25	34/532	82	3	P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1996	80	30	71	18/271	39	6	P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1997	84	20	65	8/94	26.5	0	P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1998	33	20	23	10/58	43.2	0	P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Cebada	1998	10	20	10				P y S=Pettersson (2000)/no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (n1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
Suecia	Trigo	10/1996- 06/1998	59	10	59				P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992) P/S/A	Muestras compuestas (n1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Avena	10/1996- 06/1998	23	10	23				P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (n1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Centeno	10/1996- 06/1998	28	10	28				P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (n1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Trigo	1989	75	25	75				P y S=Thuyver y col. (2000) no publicado/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (n1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Avena	1999	10	25	10				P y S=Thuyver y col. (2000) no publicado/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (n1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Centeno	1999	19	25	19				P y S=Thuyver y col. (2000) no publicado/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (n1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Reino Unido	Trigo	1999	53	20*	53				P.S y A=Home Grown Cereals Authority (2000) no publicado (COST836)	
Asia										
Corea	Maiz, cebada arroz, mijo	1989	28	15*	28				P.S y A=Park y col. (1991)	Muestras tomadas de distintos productores en 4 provincias
Corea	Cebada	1992/Julio	30	5*	30				P y S= Ryu y col. ((1996)/A= Tanaka y col. (1985)	Muestras tomadas de 6 provincias
Corea	Maiz	1992/Marzo	15	5*	15				P y S= Ryu y col. ((1996)/A= Tanaka y col. (1985)	Muestras de 14 distritos de Karnataka representando diferentes cultivos directamente de productores y mercados de comercialización.
India	Maiz	1994-1997	197	100*	188	NA/40			P y S= Eneardhana y col. (1999)/A= ELISA	Muestras from 14 districts of Karnataka representing different cultivars directly from farmers, production plots y regulating markets.
China/Linxian	Trigo	1995	25	100*	25				P y S= Gao y Yoshizawa (1997)/A= Luo y col. (1990)	
China/Linqu	Maiz en grano	1986	12	500*	12				P. S y A= Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración

Pais/Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n< LOQ	Min/ Max µg/kg	90th µg/kg	n>100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de Muestreo
China/LinquCounty	Harina de maíz	1996	13	500*	13				P. S y A= Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques, se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración
China/LinquCounty	Panqueques cocidos	1996	14	500*	14				P. S y A= Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques, se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración
China	Trigo	1990/verano	330	1	66	53.3/122	126.2		P y A=Yang y col. (1992)/S=GB5009	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Trigo	1992/ verano	147	1	34	unk/824.6	unk		P=Chen y col. (1995)/A= Yang y col. (1992)/S=GB5009	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.
China	Trigo	1994/ verano	157	1	62	14.2/100	46.8		P =He y col. (1998)/A= Yang y col. (1992)/S=GB5009	Estándares Nacionales de métodos químicos para alimentos en China. Submuestras 100 g.

Tabla I.4. Ocurrencia Natural de toxina HT-2

LOQ = Límite de cuantificación
 Media: (para n valores analíticos, la media es la $\bar{X}_n / n$) donde $\bar{X}$ es el valor de cada resultado analítico
 90p = 90th percentil
 n = número
 Max: máximo nivel
 ref = referencias
 Referencias: P= referencia original. S=método de muestreo, A=método analítico
 * = Límite de detección
 ***= media de muestras positivas
 **= ng/ml

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90th µg/kg	n >100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestreo
America									P/S/A	
Brasil	Trigo	1990	20	500*	20				P y S= Furlong y col. (1995)/A= Furlong y Valente Soares (1995)	
Brasil	Trigo y productos de trigo	1991	38	500*	38				P y S=Soares y Furlam. 1996/A Furlong y Valente Soares (1995)	
Canadá	Maiz blando de invierno	1988	17	100	16	5.9/100			P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de Muestra= 2 a 5 kg.
Canadá	Maiz	1989	16	100	15	14/230			P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de Muestra= 2 a 5 kg.
Canadá	Maiz duro del oeste	1991	108	100	106	5/310			P y S= Scott (1997)/A= Scott y col.(1989)	Tomadas inmediatamente después de cosechadas o en los molinos. Tamaño de Muestra= 2 a 5 kg.
Chile	Maiz	1995-1996	68	10*	68				P y A= Vega y col. (1998) /S=Olaveria (1992)	Ver Tabla I.2
Europa										
Austria	Maiz	1996	46	50	45	2.4/110		1	P, S y A=Lew y col. (2000a) no publicado (COST 835) /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras compuestas (~60kg). Homogeneizadas y cuarteadas a 6 kg de muestra. Molidas en un molino casero (1kg).
Austria	Maiz	1997	58	50	58				P, S y A=Lew y col. (2000a) no publicado (COST 835) /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras compuestas (~60kg). Homogeneizadas y cuarteadas a 6 kg de muestra. Molidas en un molino casero (1kg).
Austria	Maiz	1998	48	50	46	4/120		1	P, S y A=Lew y col. (2000a) no publicado (COST 835) /A=Lew y col.(2000b) no publicado	Muestras compuestas (~60kg). Homogeneizadas y cuarteadas a 6 kg de muestra. Molidas en un molino casero (1kg).
Alemania	Trigo	1987	84	1-3*	78	0.7/20			P y S=Müller y Schwadorf (1993)/A=Schwadorf y Müller(1991)	Muestras tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90th µg/kg	n >100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestreo
Alemania	Trigo	1989	78	1-5*	72	1.4/22			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1990	80	1-5*	79	0.2/17			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1991	80	1-5*	80				P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1992	78	1-5*	73	3/150			P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1993	45	1-5*	45				P y S=Müller y col. (1997a)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1987	56	1-5*	40	59.3/2018			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1989	56	1-5*	52	20.7/518			P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1990	54	1-5*	54				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1991	51	1-5*	51				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Avena	1992	55	1-5*	55				P y S=Müller y col. (1998)/A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1987	44	1-5*	42	1.0/32			P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1989	40	1-5*	37	1.1/18			P y S=Müller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90th µg/kg	n >100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestreo
Alemania	Cebada	1990	47	1-5*	45	0.4/10			P y S=Muller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1991	51	1-5*	51				P y S=Muller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Cebada	1992	58	1-5*	53	12.6/288			P y S=Muller y col.(1997b)/ A=Schwadorf y Müller (1991)	Muestras de 700g a 1 kg, tomadas al azar de 1-4 semanas de cosechadas de productores privados por el Consejo asesor gubernamental
Alemania	Trigo	1998	56	18	44	3.7/51	12	0	P y S= Schollenberger y col. (2000a) no publicado/ A= Schollenberger y col.(1998)	Tomadas al azar de almacenamientos. Submuestra=100gr. molidas (1mm) y 10gr de muestra analítica
Alemania	Harina blanca de trigo (contenido de cenizas 405 y 550 mg/100g)	1999	28	18	28				P y S= Schollenberger y col. (2000b) no publicado /A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras= tomadas al azar de negocios, mezcladas, previo a la toma de 10 gr analítica
Alemania	Harina blanca de trigo (contenido de cenizas 1050 mg/100g)	1999	13	18	12	0.9/12			P y S= Schollenberger y col. (2000b) no publicado /A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras= tomadas al azar de negocios, mezcladas, previo a la toma de 10 gr analítica
Alemania	Harina blanca de trigo (contenido de cenizas 1600-1700 mg/100g)	1999	19	18	16	1.9/12			P y S= Schollenberger y col. (2000b) no publicado /A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras= tomadas al azar de negocios, mezcladas, previo a la toma de 10 gr analítica
Alemania	Pan	1999	107	18	105	0.22/12			P y S= Schollenberger y col. (2000c) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras mayores de 100 gr secadas a 40° molidas en un molino casero (1.5mm) y 10 gr. muestra analítica
Alemania	Fideos	1999	39	18	37	0.6/12			P y S= Schollenberger y col. (2000c) no publicado/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras mayores de 100 gr , molidas en un molino casero (1.5mm) y 10 gr. muestra analítica
Alemania	Pan y productos relacionados	1998/Ene-Julio	96	18	83	2.2/32			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras secadas a 40° molidas en un molino casero (1.5mm) y 25 gr. muestra analítica
Alemania	Fideos	1998/Ene-Julio	29	18	21	3.6/25			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Cereales para desayuno	1998/Ene-Julio	32	18	22	4/22			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Alimentos para bebés y niños	1998/Ene-Julio	25	18	24	0.5/12			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Alemania	Arroz	1998/Ene-Julio	26	18	26				P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col.(1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.

País/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90th µg/kg	n >100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestreo
Alemania	Alimentos en base a cereales	1998/Ene-Julio	29	18	18	8/51			P y S= Schollenberger y col. (1999)/A= Schollenberger y col. (1998)	Muestras molidas en un molino casero (1.5mm) y muestra analítica de 25gr.
Finlandia	Avena	1987-1988	21	15*	19	3.7/44			P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg)tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Cebada	1987-1988	30	15*	30				P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg)tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Trigo	1987-1988	40	15*	40				P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg)tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Centeno	1987-1988	31	16*	30	0.03/23			P, S ans A=Hietaniemi y Kumpulainen (1991)	Muestras (2-3 kg)tomados de silos del Estado Finlandés y de productores privados.
Finlandia	Cebada	1998	15	20	13	4.1/41	20	0	P, S y A=Eskola y col. (2000a,b)no publicado data	Ver Tabla I.2
Finlandia	Avena	1998	10	20	7	21.4/95	95	0	P, S y A=Eskola y col. (2000a,b)no publicado data	Ver Tabla I.2
Noruega/ importación	Centeno	1996	4	20*	4				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega/ importación	Trigo	1996	34	20*	33	0.6/20			S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega/ importación	Trigo	1997	10	20*	10				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega/ importación	Trigo	1998	24	20*	24				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1996	14	20*	0	142/400	295	8	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1997	14	20*	0	201/710	546	7	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1998	22	20*	6	64/522	93	2	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Avena	1999	20	20*	3	91/237	187	8	S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1996	28	20*	28				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1997	25	20*	25				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2
Noruega	Trigo	1998	35	20*	36				S=Langseth (2000)/P y A=Langseth (2000) y Langseth y Rundberget (2000)(COST835)	Ver Tabla I.2

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Min/Max µg/kg	90th µg/kg	n >100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestreo
Suecia	Trigo	1990	88	30	88				P y S=Pettersson (2000); no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1990	71	30	35	70/330	230	18	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Cebada	1990	39	30	33	15/140		3	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Centeno	1990	5	30	5				P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	1991	92	10	51	12/70	33.5	0	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1991	38	10	13	95/365	291	13	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	1992	13	10	13				P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1992	2	10	0	40/40		0	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	1993	2	10	2				P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1993	10	10	10				P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1994	34	20	22	30/339	91.5	3	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1996	80	10	48	23/303	75.7	6	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1997	84	10	45	21/175	78	4	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Avena	1998	33	10	22	12/92	37.2	0	P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Cebada	1998	10	10	10				P y S=Pettersson (2000) no publicado/A= Pettersson (1993)	Muestras (~1kg) tomadas de campos experimentales, secadas y molidas. Submuestras analíticas 20gr.
Suecia	Trigo	10/1996-06/1998	59	10	59				P y S=Thuyver y col. (2000)/A= Møller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (~1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el

Pais/ Región	Producto	Año/ Temporada	n número de muestras	LOQ µg/kg	n<LOQ	Mini/Max µg/kg	90th µg/kg	n >100 µg/kg	Referencias	Procedimiento de muestreo
									P/S/A	almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Avena	10/1996- 06/1998	23	10	23				P y S=Thuvyer y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (~1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Centeno	10/1996- 06/1998	28	10	28				P y S=Thuvyer y col. (2000)/A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (~1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Trigo	1999	75	25	75				P y S=Thuvyer y col. (2000) no publicado /A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (~1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Avena	1999	10	25	10				P y S=Thuvyer y col. (2000) no publicado /A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (~1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Suecia	Centeno	1999	19	25	19				P y S=Thuvyer y col. (2000) no publicado /A= Möller y Gustavsson(1992)	Muestras compuestas (~1kg) tomadas a la entrada de molinos durante el almacenamiento y la producción. Muestra analítica=50gr.
Reino Unido	Trigo	1999	53	20*	36	19.7/171	69.8	3	P. S y A=Home Grown Cereals Authority (2000) (COST835) No publicado data	
Asia										
Corea	Cebada	1992/Julio	30	5*	30				P y S= Ryu y col. ((1996)/A=Tanaka y col. (1985)	
Corea	Maiz	1992/Marzo	15	5*	15				P y S= Ryu y col. ((1996)/A=Tanaka y col. (1985)	
China/Linxian	Trigo	1995	25	100*	25				P y S= Gao y Yoshizawa (1997)/A= Luo y col. (1990)	
China/Linqu	Maiz crudo	1996	12	500*	12				P. S y A= Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración
China/Linqu	Harina de maíz	1996	13	500*	13				P. S y A= Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración
China/Linqu	Panqueques cocidos	1996	14	500*	14				P. S y A= Groves y col. (1999)	7 villas se seleccionaron al azar, en cada una de ellas se eligieron 3 casas también al azar, entre las que preparaban panqueques. se muestrearon 5 veces las etapas de elaboración

Estudios en muestras de porotos de soja presentaron niveles de contaminación entre no detectable a 1070 µg/kg (Jacobsen y col., 1995); sin embargo no fueron incluidas en las Tablas porque pertenecían a una muestra sesgada y no al azar.

En el documento EHC 105 (1990) se presentaron datos sobre 999 muestras de T-2 y ocasionalmente se hallaron valores superiores a 100 µg/kg; por esta razón se eligió ese nivel para observar el comportamiento de las toxinas T-2 y HT-2 entre décadas. En este documento, en que se analizaron un total de 8918 muestras, el 63,8% fue para determinar contaminación por T-2 y el 36,2% para determinar HT-2, y sólo unas pocas muestras contenían T-2 (77 muestras) y HT-2 (37 muestras) en niveles superiores a 100 µg/kg.

Niveles altos de toxinas se encontraron en pocas ocasiones, por ejemplo en Asia (Chen y col., 1995), 820 µg/kg en trigo para T-2, en Europa 1686 µg/kg en avena para T-2 y 2018 µg/kg en avena para HT-2 (Muller y col. 1998) y en América (Saubois y col., 1992) 2400 µg/kg en maíz para T-2.

Cuando los límites de detección (LOD) o cuantificación (LOQ) son mayores a 100 µg/kg la oportunidad de detectar las toxinas es baja. Es interesante señalar que cuando el LOQ disminuye hay una tendencia a incrementar la frecuencia de contaminación y también los valores promedio. Por ejemplo, cuando el LOQ está entre 1-50 µg/kg los valores medios en avena son 201 µg/kg para HT-2 (Langseth, 2000) y 75,8 µg/kg para T-2 (Muller y col., 1998). Hay otros trabajos con LOQ mayor que 100 µg/kg en los cuales las toxinas no son detectadas o el promedio sobre todas las muestras es muy pequeño. Por ejemplo, se informó un valor medio de 12,7 µg/kg (Quiroga y col., 1995) en un trigo altamente contaminado en el año 1986 en donde la LOQ = 500 µg/kg.

Este documento (EHC 105) mostró que en la década 1980-1990 un 7% de las muestras estaban contaminadas por T-2, aunque la metodología usada en la investigación era bastante variable, ya que en la gran mayoría de los casos, no se incluía evidencia indicando que los métodos analíticos usados fueran testeados rigurosamente y que la identidad fuera confirmada adecuadamente.

En cambio, los análisis llevados a cabo en la década 1990-2000, en su mayoría, incluían la confirmación de las toxinas. Entre las muestras estudiadas en Europa, el 52,3% de las mismas fueron positivas para T-2 y el 88,4% para HT-2 (LOQ o LOD menor o igual a 100

$\mu\text{g/kg}$) y una frecuencia de contaminación de 10,9% para T-2 y 14% para HT-2. A pesar que el número de muestras analizadas es escasa, las contaminaciones son elevadas.

Cuando los datos de contaminación van a ser tenidos en cuenta para cálculos de ingesta, es conveniente contar con LOQ bajos y recuperaciones mayores de 60%. Por esta razón, es importante continuar mejorando la metodología analítica para obtener mejor cuantificación a bajo costo, particularmente desde el punto de vista de la recuperación en distintas matrices.

Un análisis de los planes de muestreo, permitió descubrir que en ninguno de los mismos se han basado en la distribución de la contaminación por tricotecnos.

Por esta razón, y con el objeto de definir dichos planes se hace necesario el conocimiento de la distribución de la contaminación en dichas matrices.

I. 2 Distribución de la Contaminación

El análisis de los los planes de muestreo utilizados para determinar la contaminación con tricotecnos en diferentes matrices (Tablas I.1, I.2, I.3 y I.4), mostró una falta de planes de muestreo. Por ello se llevó a cabo sobre los datos bibliográficos el análisis de la distribución de la contaminación.

Algunos autores presentaron datos sobre la distribución en tablas de frecuencia o histogramas (por ejemplo Müller y col., 1997, Park y col, 1996). Fontán y col. (1994) plantearon que la distribución Fisher-Tippett ajustaba adecuadamente los datos de contaminación por DON de las cosechas de trigo en Argentina en 1990-92.

El inconveniente que se plantea para el estudio de la distribución, es que la mayoría de los datos individuales de contaminación, especialmente con respecto a T-2 y HT-2 presentan valores discretos y por consiguiente no pueden ser utilizados en el análisis de dicha distribución.

Por esta razón se pueden tener en cuenta solamente algunos de los datos hallados en bibliografía o suministrados por investigadores sobre la contaminación por DON en trigo para el estudio de la distribución.

La figura I.1 presenta gráficos Q-Q de los datos transformados logarítmicamente para las cosechas entre 1994 y 1997 en Argentina, la cosecha 1999 en Italia y la de 1998 en el Reino

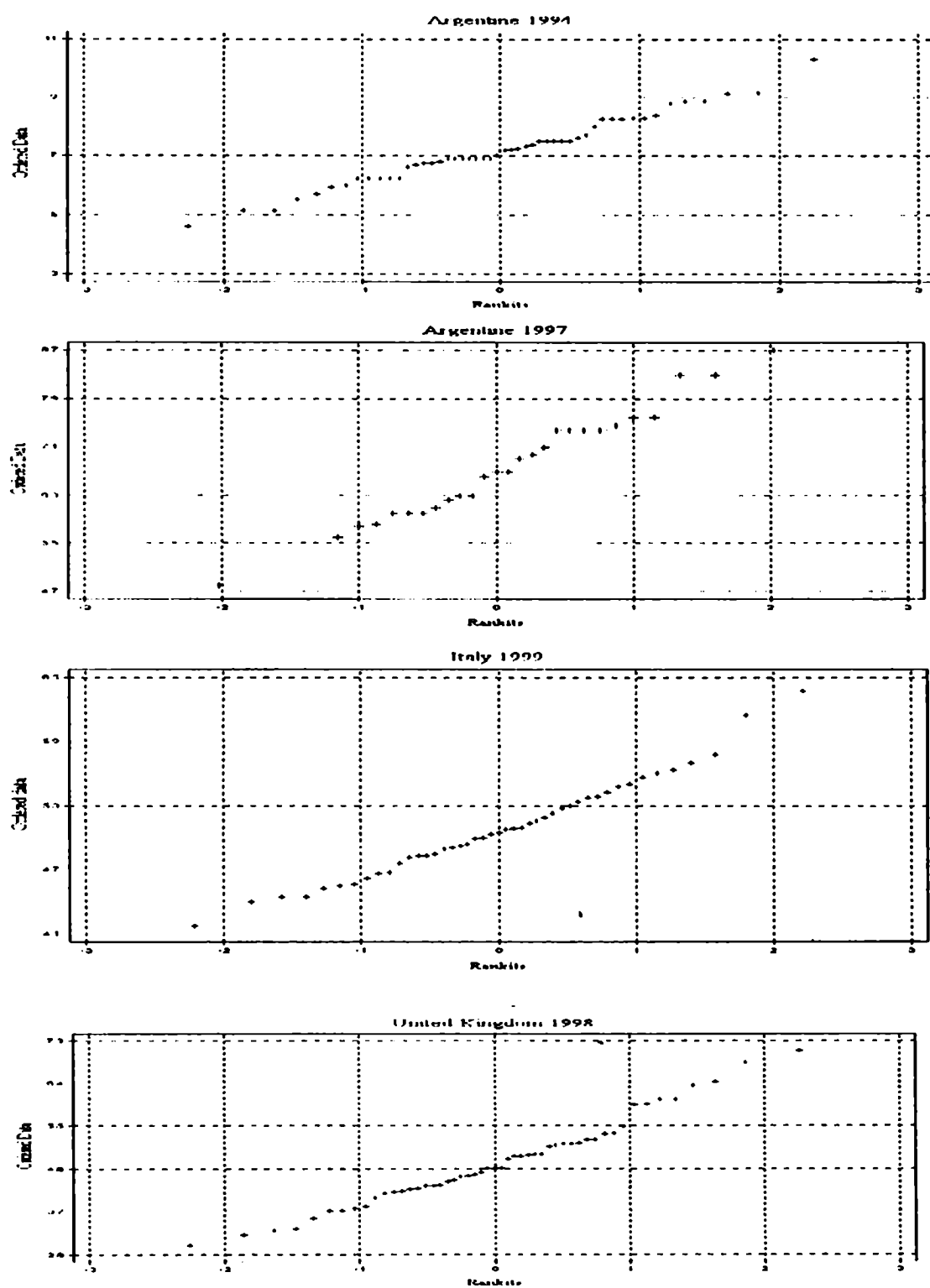


Figura I.1 – Gráficos Q-Q de los datos de la contaminación por DON transformados logarítmicamente

Unido. Patrones similares se observan para la cosecha de 1998 en Finlandia (no se incluyeron estos datos). En este trabajo, solamente se consideraron para su análisis los valores superiores a 20 µg/kg (LOD) en el Reino Unido, 50 µg/kg (LOD) en Italia y 48 µg/kg (LOQ) en Argentina.

En todos los casos se aplicaron test de bondad de ajuste. Los p valores (≥ 0.5) mostraron que el modelo de distribución log normal es adecuado para estos datos de contaminación.

La función de distribución de productos procesados como pan, puede ser diferente de la adoptada para granos, dado que la contaminación se vuelve más homogénea durante el proceso. La función que se adopte podría, en consecuencia, pertenecer a otras familias de distribución diferentes a la distribución log normal. (Schollenberger y col., 2000a).

I. 3 Variación Anual

Casi toda la información que se conoce sobre contaminación por deoxinivalenol se refiere al trigo (11.000 muestras) y al maíz (6.000 muestras). Gracias a esta cantidad de datos se pudo analizar la variación anual de los niveles de contaminación.

El trigo cosechado en Alemania, Noruega y Rusia mostró variaciones anuales similares de contaminación durante varios años (Tabla I.1).

Por otra parte, los datos obtenidos en Canadá en años consecutivos mostraron que la contaminación en trigo duro fue más baja que en trigo blando, pero la variación anual en los dos productos fue similar. La variación anual de ocurrencia de deoxinivalenol en maíz en Canadá se observa en la Figura I.2. (No existen datos disponibles para Nueva Zelandia en los años 1990, 1991 y 1995.)

Una investigación llevada a cabo en el área principal de producción de Argentina entre 1985-1999 muestra la variación anual en el promedio de contaminación de trigo y la frecuencia de contaminación (Figura I.3). No se encontraron datos para los años 1987, 1988 y 1995.

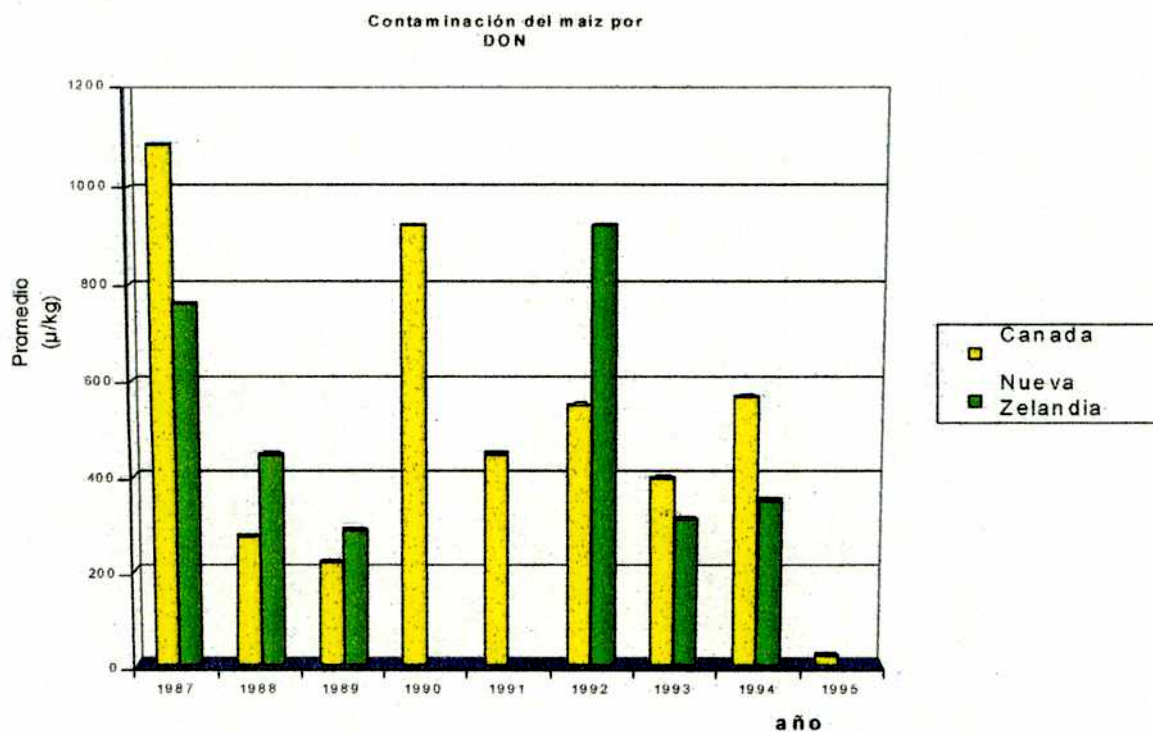


Figura I.2 Variación anual en la contaminación por DON en maíz (Lauren y col. 1991, 1996 y Scott 1997).

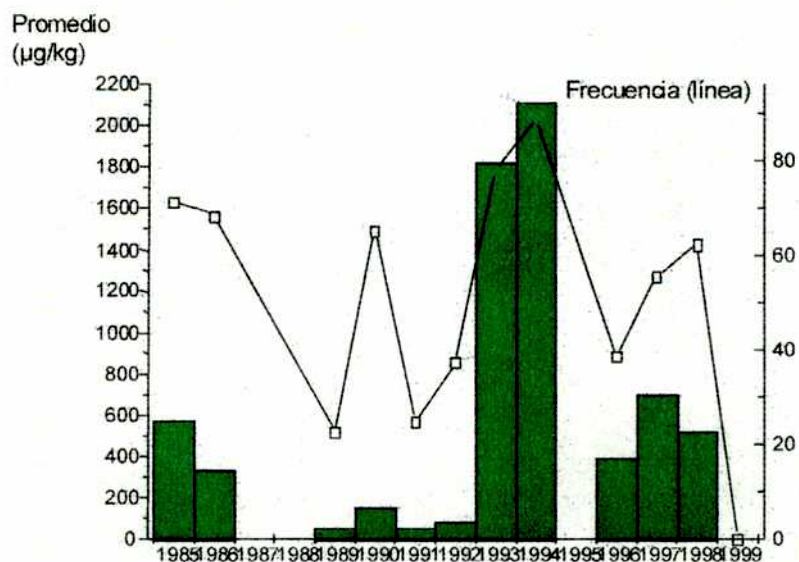


Figura I.3 Variación anual en Argentina de la contaminación por DON en trigo. (Dalcero y col. 1997, González y col. 1996, Quiroga y col. 1995 y Resnik y Pacin 2000 (no publicado)).

A pesar de las variaciones anuales, los valores medios de deoxinivalenol en Argentina, Canadá y Uruguay fueron inferiores a 120 $\mu\text{g/kg}$ en los últimos cinco años (Tabla I.1).

También se observan variaciones anuales para cebada y avena. (tabla I.1)

Estos resultados enfatizan la necesidad de una vigilancia regular del deoxinivalenol en el cultivo de cereales. La variación anual observada pudo deberse a fuertes lluvias entre la floración y la cosecha, lo que habría facilitado la infección con *F.graminearum* y la acumulación de deoxinivalenol (Trigo-Stockli y col., 1998).

Con respecto a T-2 y HT-2 también se han observado variaciones estacionales, como se observa en la figura I.4

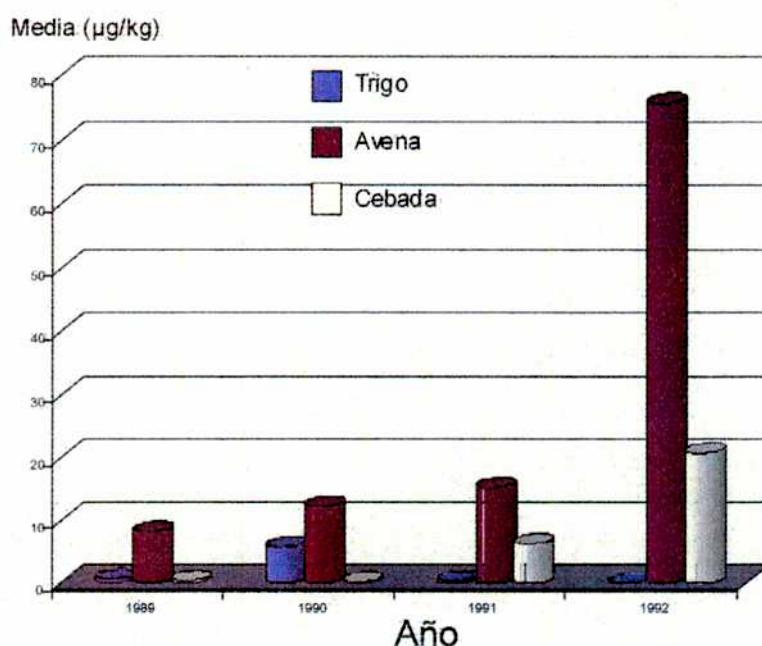


Figura I.4 Variación anual en Alemania de la contaminación por Toxina T-2.

I. 4 Evaluación de Riesgo

La evaluación de riesgo es un enfoque que se utiliza en diversas áreas del conocimiento, desde la economía hasta la toxicología, e implica la asociación de informaciones obtenidas previamente.

Ya se dijo que la presencia de micotoxinas en los alimentos es la consecuencia de la colonización de hongos en un sustrato (alimentos) cuando las condiciones ambientales son propicias. Estas condiciones se refieren tanto a las condiciones meteorológicas durante el cultivo, como a aquellas que se encuentran durante la postcosecha: transporte, almacenamiento, elaboración de productos.

Asimismo se mencionó en los puntos anteriores, no sólo la ocurrencia de contaminación, sino también la variabilidad de la misma dentro de un lote, cosecha, silo, región; las variaciones anuales y el estudio de algunos procesos que afectan el contenido final de micotoxinas.

La FAO, define como evaluación de riesgos al proceso científico que consiste en los pasos siguientes: i) identificación de peligros; ii) caracterización de peligros; iii) evaluación de exposición; y iv) caracterización de riesgos (www.fao.org)

La "identificación de peligros" son, en este caso, las micotoxinas, que poseen algunas características muy especiales como:

Ser tóxicas en cantidades muy bajas, ya que la LD50 en la mayoría de los animales es del orden de mg/kg de peso corporal.

Ser contaminantes naturales de los alimentos, no habiéndose desarrollado aún suficientes medidas de prevención para controlar su aparición en los mismos;

Ser contaminantes de alimentos de consumo masivo por la población como es el trigo y que hasta la actualidad es difícil, costoso, cuando no imposible ser eliminadas de los mismos;

Producir pérdidas de alimentos de origen proteico, debido a la mortalidad y morbilidad que ocasiona en los animales intoxicados por micotoxinas;

Ocasionar pérdidas económicas en la comercialización de materias primas contaminadas, tanto para los países exportadores como para los importadores.

Por esta razón, a pesar que la intoxicación en el hombre (en los animales) por micotoxinas sería el último eslabón de la cadena alimentaria, mientras no existan medidas de prevención que imposibiliten el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas, o un control eficiente o adecuado que impida la llegada de estas toxinas al organismo humano, es necesario, como se expresara, un enfoque multifacético, expresado en la evaluación del riesgo de intoxicación a que está expuesta la población.

La "caracterización de peligros" son en este caso, algunos de los puntos relacionados con la metodología analítica (propiedades fisicoquímicas de las sustancias), con la variabilidad de la contaminación (relacionado con las etapas, hongo, colonización, producción de metabolitos). La "evaluación de exposición" se lleva a cabo mediante la asociación de los siguientes conocimientos:

(1) La estimación de la ingesta de los alimentos contaminados, por lo menos aquellos de consumo masivo o de mayor consumo por la población, se hace a través de una encuesta de consumo de alimentos.

(2) El conocimiento de la ingesta de alimentos contaminados implica conocer el nivel de contaminación de los mismos, expresado en los estudios de incidencia y/o ocurrencia de la contaminación. En el punto I.1 se muestran los datos de ocurrencia natural y el cálculo de la contaminación media de DON arrojó los siguientes valores: para el trigo 531 µg/kg, con 61,6% de muestras positivas, para maíz de 230 µg/kg, con 60,3% de positivas y para los productos derivados del trigo 314 µg/kg con el 52,2% de muestras positivas. Con respecto a la toxina T-2, de las 3.873 muestras (Tabla I.3.), las muestras de trigo comprendieron el 34,3% de los análisis y se obtuvo una media de 5,44 µg/kg, con un 6% de muestras positivas, las muestras de maíz presentaron una media de 17,2 µg/kg, con 3,3% de muestras positivas, las de avena arrojaron una media 22,4 µg/kg, con 35% de muestras positivas y para cebada el cálculo de la media resultó ser de 4,86 µg/kg, con 10,5% de muestras positivas. Se encontraron solamente 2.032 muestras analizadas para detectar la presencia de la toxina HT-2 (Tabla I.4.), 42,8% de las mismas correspondían a trigo, con una media de 1,24 µg/kg, y un 3% de muestras positivas, el 19% eran de avena y presentaron una media de 32,6 µg/kg, con un 22% de muestras positivas, y el 14,8% eran de centeno, con una media de 2,8 µg/kg, y un 4% de muestras positivas.

- la estabilidad de la micotoxina frente a los diferentes procesos a que está sometido el alimento previo a su consumo, expresado en los **diferentes trabajos que estudian las modificaciones del contenido de micotoxinas**, como consecuencia de las variables operacionales (moliendas seca o húmeda, secado spray, panificación, cocción, fritado, etc) .
- el metabolismo de la/las micotoxinas.

- la cantidad y frecuencia de alimento consumido.
- el efecto sinérgico o antagónico de las micotoxinas entre sí y con otros contaminantes y/o aditivos.
- otros factores de la dieta.
- biodisponibilidad del alimento.

(3) La estimación de la exposición en el hombre se expresa como Ingesta Diaria para determinada/s micotoxina/s.

La evaluación de la exposición implica comparar los datos de Ingesta Diaria con valores definidos de Ingesta Tolerable Diaria (TDI) o si no los hubiera de Ingesta Provisional Media Tolerable Diaria (PMTDI).

El dato de **TDI** se usa para comparar con la ingesta de la población, y es la que se supone produce la respuesta de más baja frecuencia. Algunos valores de TDI han sido determinados: para aflatoxinas totales se consideran entre 0.04 a 0.14 ng/kg de peso corporal por día; para ocratoxina A, se consideran entre 0.2 a 4.2 ng/kg de peso corporal por día; para zearalenona, entre 50 a 100 ng/kg de peso corporal por día y para deoxinivalenol 1 µg/kg de peso corporal por día.

Cuando se analiza la exposición a micotoxinas, se puede observar que es mucho más frecuente de lo que sospechamos, y que por lo tanto es necesario, evaluar el riesgo de intoxicación a que está expuesta la población.

Las Tablas I.5 y I.6 muestran la exposición de la población, teniendo en cuenta valores de contaminación de productos que se consumen en Argentina, para datos de consumo de alimentos de encuestas llevadas a cabo en nuestro país.

Tabla I. 5

**Estimación de la exposición a tricotecenos a través
de la ingesta de trigo contaminado por
deoxinivalenol, toxina T2 y HT-2**

Contaminación						Exposición expresada en µg/kg p.c. día			
Ingesta encuesta 1999									
toxina	Pan	Galletitas	Tapas de	Pizza	Peso	Pan	Galletitas	Tapas	Pizza
año	µg/kg	blanco	saladas	empanadas		blanco	saladas	empanadas	
T2- 86	12.7	69.3	43.8	13.5	23.4	0.01252	0.00791	0.00244	0.00423
HT2-86	21.8	69.3	43.8	13.5	23.4	0.02149	0.01358	0.00419	0.00726
DON-85	570.9	69.3	43.8	13.5	23.4	0.56278	0.35570	0.10963	0.19003
DON-86	329.52	69.3	43.8	13.5	23.4	0.32483	0.20531	0.06328	0.10968
DON-89	47.53	69.3	43.8	13.5	23.4	0.04685	0.02961	0.00913	0.01582
DON-90	145.85	69.3	43.8	13.5	23.4	0.14378	0.09087	0.02801	0.04855
DON-91	54.67	69.3	43.8	13.5	23.4	0.05389	0.03406	0.01050	0.01820
DON-92	75.3	69.3	43.8	13.5	23.4	0.07423	0.04692	0.01446	0.02506
						Porcentaje de contribución			
						de 4.7 %	de 3.4 %	de 0.9 %	de 1.5 %
						a 56.3 %	a 35.6 %	a 10.9 %	a 19 %

Tabla I. 6

**Estimación de la exposición a deoxinivalenol
a través del consumo de cerveza**

Contaminación promedio		Ingesta encuesta 1998 cerveza grs				Peso grs				Exposición expresada en µg/kg p.c. día				
toxina	año	µg/kg	mg1	mg2	vg1	vg2	mg1	mg2	vg1	vg2	mg1	mg2	vg1	vg2
DON 97	51	29.9	5.9	80.6	4.7	58900	62500	70300	73900	0.0259	0.0048	0.0585	0.0032	
DON 98	7	29.9	5.9	80.6	4.7	58900	62500	70300	73900	0.0036	0.0007	0.0080	0.0004	
DON 99	5	29.9	5.9	80.6	4.7	58900	62500	70300	73900	0.0025	0.0005	0.0057	0.0003	
Porcentaje de contribución al TDI de 5.85 % a 0.03 %														

Contaminación promedio		Ingesta encuesta 1992 consumidores cerveza grs				Peso grs				Exposición expresada en µg/kg p.c. día				
toxina	año	µg/kg	mg1	mg2	vg1	vg2	mg1	mg2	vg1	vg2	mg1	mg2	vg1	vg2
DON 97	51	747.5	169	301	111.9	58900	62500	70300	73900	0.6472	0.1376	0.2181	0.0772	
DON 98	7	747.5	169	301	111.9	58900	62500	70300	73900	0.0888	0.0189	0.0299	0.0106	
DON 99	5	747.5	169	301	111.9	58900	62500	70300	73900	0.0635	0.0135	0.0214	0.0076	
Porcentaje de contribución al TDI de 64.7 % a 0.76 %														

mg1	Mujeres 18 a 24 años
mg2	Mujeres 25 a 50 años
vg1	Varones 18 a 24 años
vg2	Varones 25 a 50 años

El objetivo fundamental de realizar la evaluación de riesgo para las micotoxinas, es la posibilidad que este dato brinda para establecer valores límites de seguridad a nivel internacional, que puedan ser utilizados en la comercialización, con el objeto de evitar o por lo menos disminuir la posibilidad de epidemias y/o micotoxicosis aisladas. (Pacin, 2002).

II. OBJETIVOS

La finalidad del presente trabajo es obtener información sobre la persistencia y/ o transformación de tricotecenos durante algunas etapas del procesamiento del trigo y de la harina para contribuir a la estimación de la exposición como consecuencia de la ingesta de alimentos elaborados con trigo potencialmente contaminado por tricotecenos en la Argentina.

Para alcanzar este objetivo se cumplieron los siguientes objetivos parciales

- ☺ analizar los métodos analíticos durante los años 1990-2000 en diferentes partes del mundo, usados en la determinación cuantitativa de tricotecenos, para que utilizando la información existente y observando las tendencias actuales en el análisis de estos metabolitos, poder definir la metodología que se aplica en la cuantificación del trabajo experimental llevado a cabo durante la ejecución del trabajo doctoral.
- ☺ evaluar la variabilidad en la determinación de deoxinivalenol y estimar la distribución de la contaminación por DON en trigo, harina, afrechillo y gluten.
- ☺ cuantificar el efecto del proceso de molienda seca y húmeda, en una planta industrial argentina sobre la contaminación natural por micotoxinas en trigo
- ☺ estimar la estabilidad del DON durante la fritura de tapas de empanadas, elaborada con harina contaminada a escala piloto.

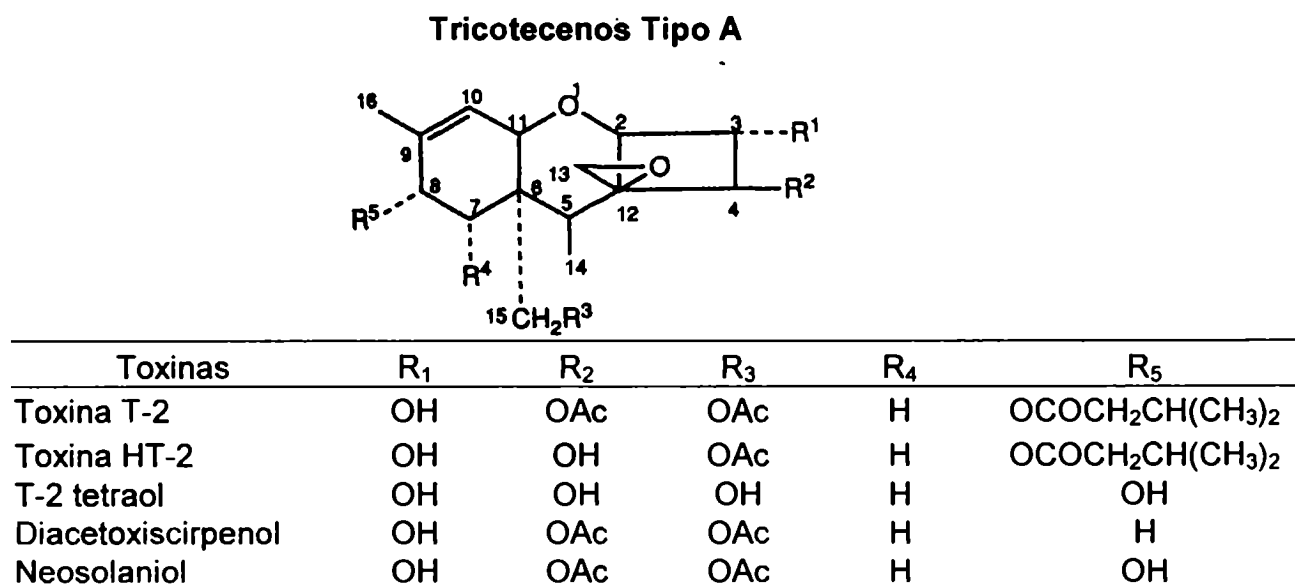
III. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA DETERMINACION DE LA OCURRENCIA NATURAL DE TRICOTECENOS

III.1 Introducción

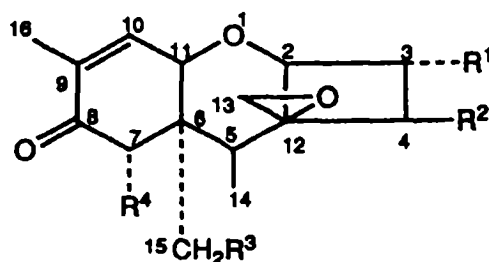
Varios géneros de hongos (*Fusarium*, *Trichotecium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*), contienen especies capaces de producir metabolitos secundarios (Marasas y col., 1985) conocidos con el nombre de tricotecenos, caracterizados por un núcleo de tres ciclos, llamado **tricoteceno** y contienen generalmente un anillo de seis centros con un oxígeno en la posición 1, una doble ligadura en la posición C-9 y C-10 y un epóxido en el C-12 y C-13.

Estas micotoxinas, los tricotecenos, están divididas en 4 grupos, de acuerdo a las similitudes de sus grupos funcionales (tipos A, B, C y D). Los tricotecenos encontrados más frecuentemente en alimentos son del tipo B (por ejemplo deoxinivalenol, nivalenol, 3-acetil deoxinivalenol y 15-acetil deoxinivalenol) y tipo A (por ejemplo toxina T-2 y HT-2, T-2 tetraol, diacetoxiscirpenol y neosolaniol) (Ueno, 1983; Figura III.1)).

Figura III.1: Tricotecenos Tipo A y Tipo B



Tricotecenos Tipo B



Toxinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH
3-acetil-deoxinivalenol	OAc	H	OH	OH
15-acetil-deoxinivalenol	OH	H	OAc	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Fusarenona-X	OH	OAc	OH	OH

Su presencia en alimentos es un riesgo desde el punto de vista del consumo humano y animal dado que pueden tener efectos tóxicos, como inmunotoxicidad, hematotoxicidad, menor consumo de alimentos y síntomas diversos gastrointestinales (FAO/WHO, 2001): La Comisión Mixta FAO/WHO de Expertos en Aditivos en Alimentos fijó un máximo tolerable provisorio de ingesta diaria (PMTDI) de 1 µg/kg de peso corporal para el deoxinivalenol (DON) y 0,06 µg/kg para las toxinas T-2 y HT-2, solas o combinadas (FAO/WHO, 2001).

Para la determinación de tricotecenos se hace una extracción de las toxinas de la matriz, un paso de limpieza previo a la detección y posterior cuantificación. Han sido publicados muchos métodos analíticos diferentes para estas micotoxinas y en particular, para el deoxinivalenol, basados en cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía gaseosa (CG), cromatografía líquida (HPLC) o métodos inmunológicos (Langseth y Rundberget, 1998; WHO, 1990; Yoshizawa, 2001); así como otras publicaciones sobre revisiones de métodos de análisis de micotoxinas que incluyen métodos para tricotecenos (Scott,

1995^a; Sydenham y Shephard, 1996; Lin y col., 1998; Wilson y col., 1998; Gilbert, 1999).

Actualmente están disponibles comercialmente nuevas columnas para la etapa de limpieza de los extractos y se han aplicado costosas y sofisticadas técnicas instrumentales para el análisis de tricotecenos en muestras complejas, tales como espectrometría de masa tándem (Plattner y Bennett, 1983), cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masa (Voyksner y col., 1985), cromatografía de fluido supercrítico acoplada a detección por espectrometría de masa (Young y Games, 1992) o cromatografía gaseosa y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (Mossoba y col., 1996). En los últimos años se desarrollaron métodos inmunológicos que actualmente se encuentran disponibles en el mercado, a partir de la producción de anticuerpos monoclonales (Pestka, 1988; Chu, 1990; Dietrich y col. 1995).

Solamente dos métodos analíticos para tricotecenos están incluidos en los métodos oficiales de la "Association of Official Analytical Chemists International" (AOAC), ambos para la determinación de DON en trigo. Un método utiliza TLC y el otro CG. Existe un método basado en cromatografía líquida que fue adoptado recientemente por la AOAC International como método preverificado (paso previo a la oficialización, Trucksess y col., 1998) para determinar DON en harina de trigo, harina integral y salvado de trigo. Se han hecho algunos estudios inter-laboratorios para comparar diferentes métodos para la determinación de DON (Gilbert y col, 1992; Schumacher y col., 1997; Pettersson, 1998; Josephs y col., 2001) en los que se destaca la dificultad para establecer fehacientemente la concentración de soluciones patrones en el análisis de tricotecenos.

El objetivo de este capítulo, fue analizar los métodos usados en la determinación cuantitativa de tricotecenos, para disponer de la información existente y observar las tendencias en el análisis de estos metabolitos. Para esto, se consideraron aquellos trabajos sobre la contaminación natural por tricotecenos, ya que el objetivo final es la estimación de la exposición a estos contaminantes.

III.2 Resultados

Fueron seleccionados numerosos trabajos sobre la contaminación natural de tricotecenos publicados entre los años 1990-2000 para generar una base de datos, con la condición que los estudios y/o trabajos incluyeran información detallada (o esta fuera suministrada por lo propios autores) sobre la metodología analítica y las muestras hubieran sido tomadas al azar.

DON fue el tricoteceno más extensamente estudiado en este período, por lo que se lo eligió como ejemplo de los tricotecenos tipo B. En el mismo período, la mayor parte de los datos de los tricotecenos tipo A, fueron sobre las toxinas T-2 y HT-2, por lo que los datos de estas toxinas se tomaron como ejemplo del grupo A.

En la tabla III.1 se resumen, de los trabajos seleccionados, las etapas de los métodos analíticos utilizados.

Tabla III.1
Metodología analítica aplicada a los estudios de ocurrencia para DON y toxinas T-2 y HT-2

* = Límite de detección
 NA = no disponible

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
Abouzied y col.. (1991)	Alimentos con cereales	25	CH ₃ CN:H ₂ O 9:1		ELISA	DON	1000				
Ali y col.. (1998)	Malz	20	CH ₃ CN:H ₂ O 3:1 100 ml	Columna Florisil	GC-MS TMS-derivados	DON NIV	10/NA 10/NA				
Eskola y col.. (2000a,b) no publicado	Cereales			Columna de Mycosep 227	GC-MS TMS-derivados	DON 3Ac-DON NIV FX DAS HT-2 T-2	NA/10 NA/20 NA/20				
FAO/WHO (2000) enviado a publicar	Cereales Productos con cereales	20	H ₂ O 8 ml Cloroformo+ etanol (8+2) 100 ml	Eter de petróleo/etanol:H ₂ O	TLC						

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
Fernández y col.(1994) (Trucksess y col. (1984) modificado)	Trigo	50	CH ₃ CN:H ₂ O	Columna de carbón/celite/ alúmina	HPTLC	DON	40/NA	200	83		
			84:16 200 ml		cloroformo-acetona-2-propanol 8:1:1			400 800	82 72		
Furlong & Valente Soares (1995)	Trigo Maíz Productos de trigo		metanol:4% KCl 9:1	Cloroformo Columna de carbón/celite/ alúmina	GC-FID HFB-derivados	DON NIV DAS T-2 HT-2 T-2 TRIOL T-2 TETRAOL	200/NA 100/NA 100/NA 100/NA 500/NA 300/NA 400/NA		85 87 83 87 91		
Golinski y col.. (1996)	Trigo	20	Tanaka y col.. (1985)	Tanaka y col.. (1985)	HPLC Columna C-R4A C-18 UV (229nm) metanol agua 20%	DON NIV	10/NA				
Groves y col.. (1999)	Maíz Productos de maíz	5	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 20 ml	Mezcla de óxido de Al neutro y C-18 Material de empaque	GC-MS TMS-derivados	17 toxinas Fusarium	500/NA	1000	80-100		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
			agitar 60 min.								
Hietaniemi & Kumpulainen(1991)	Granos y balanceado	20	CH ₃ CN:H ₂ O 95:5 100 ml homogeneizar 5 min.	Hexano isobutanol Columna Silica gel Columna Florisil o columna Sep Pak C18	GC-MS TMS-derivados	DON	5	72-128 (media=100)			
						DAS	5				
						3Ac-DON	5				
						FX	5				
						NIV	5				
						T-2 HT-2	15 15				
Home Grown Cereales Authority (1999) Home Grown Cereales Authority (2000)	Trigo	20	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 mL 120 min. agitar	Columna de Mycosep No.225	GC-MS TMS-derivados	DON	20/NA				
						T-2	20/NA				
						HT-2	20/NA				
Kamimura y col.. (1981)	Cereales Granos Materias primas de alimentos	100	CH ₃ OH: H ₂ O 95:5 200 ml agitar 30 min.	Columna 1- Amberlite XAD-4 2-Florisil	TLC Solventes de desarrollo: 1-CHCl ₃ -metanol 93:7 2-Tolueno: acetona:metanol 5:3:2	DON	20-50/NA	maíz 1000	93		
						T-2	100-500/NA	maíz 2000	83		
						HT-2	100-500/NA	maíz 2000	92		
						NIV	20-50/NA	maíz 1000	82		
						FX	20-50/NA	maíz 1000	90		
						Zen	10-50/NA	maíz 2000	88		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
Kim y col.. (1993) (Tanaka 1985 modificado)						Das	100-500/NA	maíz 2000	102		
						Neo	100-500/NA	maíz 2000	108		
						Butenólido	100-500/NA	maíz 2000	92		
						Moniliformina	200-500/NA	maíz 2000	76		
						DON	5	200	92-105 (cebada)		
	Cebada	40	CH ₃ CN:H ₂ O	Hexano	GC-MS	3Ac-DON	5		87-95 (maíz)		
	Maíz		3:1	Columna Florisil	TMS-derivados	15Ac-DON	5				
			160 ml			NIV	5				
			30 minutos			4ANIV	5				
						DON	20-30	400	90		
Langseth (2000) Langseth (2000) no publicado (Cost 835)	Cereales	25	CH ₃ CN:H ₂ O	Mycosep 225	GC-MS	3Ac-DON					
			84:16		PFPA- derivados	NIV		400	72		
			homogeneizar			FX		400	90		
						T-2	30	400	91		
						HT-2	20	400			
Langseth & Clasen (1992)						scirpentriol					
						MAS					
						DAS					
	Cereales	25	CH ₃ CN:H ₂ O	Columna de carbón/celite/ alúmina	GC-ECD	DON	10/30	400	80-110		
			84:16		TMS- derivados	3Ac-DON		400			
Referencia	Matriz	Masa	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas	LOD/LOQ	Precisión		RSD _r	RSD _R
								400			

		de muestra (g)					analizadas	ng/g	Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
Langseth & Elen (1996)	Cereales	25	CH ₃ CN:H ₂ O	Columna de Carbón /celite / alúmina	GC-ECD							
			84:16 homogeneizar	Hexano Cartucho de Silica	TMS- derivados							
Lauren & Agnew (1991)	Granos	20	CH ₃ CN:CH ₃ OH: H ₂ O 80:5:15 100 ml 2 hours	Alúmina-carbon resina de intercambio catiónico hidrólisis de las toxinas	HPLC C-8 GC-ECD TFAA derivados		DON	10*				
Lew y col.. (2000) no publicado	Maíz	25	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 mL agitar 80 min.	Columna de Mycosep No.227	GC-ECD tipo B=TMS- derivados tipo A=HFBI- derivados		DON NIV 3Ac-DON 15Ac-DON	50 50 50 50				
Luo y col.. (1990)	Maíz Trigo	40	CH ₃ CN:H ₂ O 3:1 160-ml agitar 30 min.	Hexano Columna Florisil	GC-MS TMS- derivados		DON NIV T-2 15Ac-DON HT-2	5 5 100 100 100		97-103 97-104 97-105 97-106 97-107		
Mallman (2000) no publicado	Cereales	50	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 mL	Mycosep No.224 Automática	HPLC C-18		DON	100				
Marasas y col.. (1979)	Maíz	50	hexano 100 mL metanol:1% KCl	Hexano Cloroformo	GC-MS TMS- derivados		DON DAS T-2	100/NA 100/NA 100/NA		60 90 87		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
			55:45 200 mL								
Marx y col., (1995)		20	CH ₃ CN:H ₂ O 3:1 200 ml	Hexano -florisil -Sep-pak	HPTLC	DON	50				
Möller & Gustavsson (1992)	Cereales	50	acetato de etilo: acetonitrilo	Hexano	GC-ECD	DON		250	89		
			4:1	Cartucho Sep Pak Florisil	TMS- derivados	FX		250	87		
			250 ml + 10 ml agua agitar 30 min.			NIV 3Ac-DON DAS Tricotecina NEO HT-2 T-2 DON FX NIV 3Ac-DON DAS Tricotecina NEO HT-2 T-2		250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250 250	72 93 89 115 97 94 84 86 84 68 89 105 81 93 77 79		
Neira y col. (1997)	Productos de trigo	Pacin y col. (1997)	Pacin y col.(1997)	Pacin y col.(1997)	GC-ECD HFB- derivados	DON	6/17				

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
Niessen y col.. (1993)	Cerveza	20 ml			ELISA	DON	50 ng/ml.	50 500 1000	45 77 83		
Pacín y col..(1997)Romer® MY 8402s modificado	Productos de trigo (con grasa)	25	1-n-hexano 2-acetonitrilo:agua 84:16 100 mL	Mycosep No. 225	TLC	DON	25/48	100 250 500	102 87 92.4		
			3 min blender								
Park y col.. (1992)	Cebada	Luo y col.. (1990)	Luo y col.. (1990)	Florisil Cartucho sílica	GC-ECD TMS derivados	DON NIV	2		88-90		
Pettersson (1993)	Cebada Avena Trigo	20	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16	Columna de carbón/alúmina	GC-ECD TMS-derivados	DON NIV T-2 HT-2 DAS 3Ac-DON	10 20-50 10/30				
Romer método (1994): Lops y col.. (1998)	Trigo	25	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 ml 3 min.blender	Mycosep No. 224	TLC Tolueno: acet. de etilo:ác.fórmico 5:4:1	DON	500/NA		>85		
Ryu y col.. (1996)	Cebada	20	CH ₃ CN:H ₂ O	Hexano	GC-MS	DON	5		83.8		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _i	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
	Maíz		3:1 200 ml agitar 30 min.	Columna Florisil	TMS-derivados	T-2	5		88.2		
						HT-2	5		91.3		
						NIV	5		91.8		
						FX	5		90.9		
						3Ac-DON	5		87.9		
Schollenberger y col. (1998)	Cereales Cereales Alimentos	10	Tanaka y col. (1985)	Hexano -florisil cartucho de intercambio catiónico	GC-MS TFAA derivados	DON	7/23	50-500	83-98		
						T-2	2/6	50-500	87-110		
						HT-2	5/18	50-500	74-109		
						NIV	12/38	50-500	71-107		
						FUS	6/21	50-500	82-120		
						15-ADON	7/22	50-500	73-108		
						3-ADON	5/16	50-500	88-110		
						DAS	7/22	50-500	82-116		
						NIV	15		84.7		
						DON	15		89.1		
Schwadorf & Müller (1991)	Cebada Avena Trigo	20	Tanaka y col. (1985)	GC-MS TFA-derivados	3Ac-DON	15	15	81.3			
					FX	15	15	79.6			
					HT-2	15	15	80.2			
					T-2	15					

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
						DAS 15Ac-DON	15 15		77.8 83.2		
Scott y col.. (1981)	Cereales	50	metanol:agua 1+1 250 ml	Partición: amonio acuoso Sulfato 30%/acetato de etilo Columna silica gel	GC-ECD HFB-derivados	DON	10	100 (harina)	72, 73, 86, 70		
								1000 (harina)	85, 59, 78, 68		
								100 (trigo)	101, 102		
								500 (trigo)	77, 88		
								1000 (trigo)	78, 86		
Scott y col.. (1986)	Cereales	50	metanol:agua	Partición: amonio acuoso	GC-ECD	DON	150/NA				
			7:3 150 ml	Columna sulfato 30%/acetato de etilo Silica gel	TMS-derivados	NIV					
Scott y col.. (1989)	Cereales	50	metanol:agua 7:3 150 ml	Partición: amonio acuoso Sulfato 30%/acetato de etilo Columna silica gel	GC-ECD TMS-derivados: DON y NIV HFB-derivados: other trichothecenes	DON NIV T-2 HT-2 DAS	20/50 200 200/400 50/200 200	800 (trigo)	81		
								4000 (trigo)	86		
								2000 (trigo)	82		
Scott y col.. (1993)	Cerveza	10	(Chem Elut CE 1020, Varian)	C-18 SPE (Supelco)	GC-MS HFB-derivados	DON NIV	0.1-1.5 0.01-0.3	5-20 ng/ml	103		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
Solovey y col. (1999) Romer® MY 8402s modificado	Malz Trigo Productos de malz Productos de trigo	25	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 mL 3 min licuar	Mycosep No. 225	TLC	DON	25/48	100	82		
								300	86		
Spanjer (2000) no publicado.	Cereales Productos de cereales	25	PEG/ H ₂ O 5g/400 ml H ₂ O	Columna de Inmunospecificidad DON test™ HPLC (VICAM)	HPLC-UV RP18	DON	16/32	146-1070	92-103	13	
Stratton y col. (1993)	Trigo y cebada	50	acetónitrilo-agua 21:4 250 ml 2 hs. Agitarr	n-hexano CLAB-NH2 columna de extracción carbón/celite/ alúmina	HPLC C-18 columna UV DON = 220 nm T-2 y HT-2 = 200 nm fase móvil= metanol: agua	T-2 DON HT-2 DAS	150/NA 50/NA 120/NA 70/NA	400 (trigo)	84.7		
								100 (trigo)	89.8		
								400 (trigo)	84.9		
Sydenham & Thiel (1987)	Malz Avena	50	Metanol:agua 1:1 agitar 30min	Extrelut 20 columna Silicagel cartucho	GC-ECD HFBI-derivados	T-2 DAS	100/NA 100/NA		88.0	5	
									88.2	4.4	
Tanaka y col. (1985)	Cereales	20	CH ₃ CN:H ₂ O 3:1	Hexano -florisil	GC-ECD TMS-derivados	DON NIV	2/NA 2/NA	300	87		
								300	86		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
			200 ml agitar 30 min.	-Sep-pak							
Trucksess y col. (1984)/Eppley y col. (1986)	Trigo	50	CH ₃ CN:H ₂ O	Columna de carbón/celite/ alúmina	TLC	DON	50/NA		77-93	50ppb =45	87
	Maíz		84:16		cloroformo-acetona-2-propanol 8:1:1					300ppb =39	40
			200 ml							1000ppb =64	64
Trucksess y col. (1987)	Cebada	50	acetónitrilo:agua:metanol	Acetato de Pb	HPTLC	DON	50	trigo 50	61.3		
	Trigo		70:25:5	Columna de carbón/celite/ alúmina	1-cloroformo-acetona-2-propanol 8:1:1	DON		trigo 100	85		
	Maíz		200 mL	Columna C-8	2-cloroformo-acetona-2-propanol 7:1.5:1.5	DON		trigo 200	81.5		
			60 min. agitar			NIV FX					
Trucksess y col. (1996)	Harina blanca	25	CH ₃ CN:H ₂ O	Columna de Mycosep No. 225	HPLC	DON	20/500	harina 500	95	7.52	11.46
	Harina integral de trigo		84:16		Columna= Novapack C ₁₈			harina 1000	84	5.72	18.98
	Salvado		100 mL 3 min. licuar o 30 min. Agitar					harina 2000	85	3.14	12.72
Tutelyan y col. (1990)	Trigo	25	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16	Columna de carbón/alúmina	HPLC columna=silica gel UV (224 nm)	DON	50/NA	500	90		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
			125 mL		fase móvil: hexano: isopropanol: agua 75:25:1.5						
Vega y col. (1994)(Romer método®)	Trigo	25	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 ml 3 min. blender	Mycosep No. 227	HPTLC Tolueno: acet. de etilo:ác.fórmico 6:3:1	DON DAS HT-2 T-2	10				
Veratox® (1998) Trucksess y col.. (1995)	Trigo Cebada	50	agua 250 ml 2 min. Blender		ELISA (Veratox método)	DON	300/500	1000 2000 4000 1000 2000 4000	65 70 78 40 70 68		
Vicam ®(1996): Lops y col.. (1998)	Trigo	25	polietilenglicol 5g/400 mL agua	Columna de inmunospecificidad DON test™ HPLC (VICAM)	HPLC Supelcosil LC-18 DAD 220 nm acetonitrilo agua 10:90	DON	50	500 1000 2000	75 84 85		
Vrabcheva y col.. (1996)	Trigo	2	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16		ELISA (Ridascreen DON método)	DON	50		70-110		

Referencia	Matriz	Masa de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Cuantificación	Toxinas analizadas	LOD/LOQ ng/g	Precisión		RSD _r	RSD _R
								Niveles agregados (ng/g)	Recuperación (%)		
			10 ml.		Acetilación de la toxina						
		2	120 min. agitar metanol:agua 70:30 8 mL 60 min. agitar CH ₃ OH:PBS 70:30 30 min. agitar		Previo al análisis	3-AcDON 15-AcDON T-2 DAS	>= 40				
Weingartner y col. (1997)	Trigo	25	CH ₃ CN:H ₂ O 84:16 100 mL 80 min. agitar	Columna Mycosep No.225	GC-ECD TMS-derivados	DON NIV 3Ac-DON 15Ac-DON FX	36/124 33/144 41/123 35/124 35/117	DON 100 DON 1000 DON 2000	98 80 81	3.95	
Yang y col. (1992)	Cereales Productos de cereales	20	H ₂ O 8 ml Cloroformo+ etanol (8+2) 100 ml	Columna - Carbón/alúmina	ELISA	T-2					

TMS: trimetilsilil HFB; heptafluorobutiril TFAA: trifluoroacetil PFPA: pentafluoropropionil

En la Tabla III.2 se agrupan los métodos de cuantificación que fueron utilizados para el análisis de DON en 15.187 muestras, de las cuales 48,1 % fueron de trigo; 20,0% para maíz y 18,5% para productos derivados del trigo; así como algunos datos de DON en otros cereales como cebada, avena, centeno y arroz, y en alimentos procesados tales como cerveza, panqueques cocidos, alimentos para bebés, cereales para desayuno, fideos y galletitas.

Tabla III.2 Resumen de las metodologías empleadas para cuantificar ocurrencia natural de Deoxinivalenol

Producto	Número de muestras	Método	LOQ µg/kg	Referencia
Maíz	8	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Trigo	12	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Arroz	4	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Avena	5	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Trigo & avena galletitas saladas y dulces	18	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Copos de maíz	6	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Pochoclo	8	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Trigo harina/budín mezclas	17	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Harina de maíz	11	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Cereales mixtos	3	ELISA	1000*	Abouzied y col.. (1991)
Maíz	16	GC-MS	10*	Ali y col.. (1998)
Trigo	44	GC-MS	5*	Atanassov y col.. (1995)
Soja	5	GC-ECD	17	Boca y col..(2000)
Arroz	6	TLC	48	Broggi y col.. (1999a,b)
Arroz	54	TLC	48	Broggi y col.. (1999b)
Harina de maíz	4	TLC	48	Broggi y col.. (1999b)
Trigo	214	TLC	100	Cao y col..(1994)
Harina de trigo	50	TLC	100	Cao y col..(1994)
Maíz	101	TLC	100	Cao y col..(1994) y Guo y col.. (1995)
Maíz	140	TLC	100	Cao y col..(1994), Liu y col.. (1992); Lu y col.. (1992)
Trigo	40	TLC	100*	Dalcero y col..(1997)
Maíz	85	GC-ECD	81*	Ellend y col..(1997)
Trigo	81	TLC	40*	Fernandez y col.. (1994)
Trigo	20	GC-FID	200*	Furlong y col.. (1995)
Trigo	40	GC-MS	5*	Gao y Yoshizawa (1997)
Trigo	78	HPLC-UV	10*	Golinski y col.. (1996)
Trigo	44	TLC	48	González y col.. (1996)
Trigo	60	TLC	48	González y col..(1999a)
Maíz	30	TLC	48	González y col..(1999b)
Maíz	12	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Harina de maíz	13	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Panqueques cocidas	14	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Trigo	99	TLC	100	Guo y col.. (1995)
Maíz	150	TLC	100	Guo y col..(1995)
Trigo	14	ELISA	500	Hart L.P.(1998)

Producto	Número de muestras	Método	LOQ µg/kg	Referencia
Avena	21	GC-MS	5*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Cebada	30	GC-MS	5*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Trigo	40	GC-MS	5*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Centeno	31	GC-MS	5*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Malz	197	TLC	100*	Janardhana y col.. (1999)
Cebada	39	GC-MS	5*	Kim y col.. (1993)
Malz	46	GC-MS	5*	Kim y col.. (1993)
Trigo	801	GC-ECD	20-30*	Langseth y Elen (1997)
Centeno	63	GC-ECD	30*	Langseth y Elen (1997)
Cebada	20	GC-ECD	20*	Langseth y Elen (1997)
Avena	63	GC-ECD	30*	Langseth y Elen (1997)
Avena	3	GC-ECD	30*	Langseth y Elen (1997)
Malz	91	HPLC-UV	30	Lauren y col.. (1991)
Malz	616	HPLC-UV	10*	Lauren y col.. (1996)
Cebada	59	GC-MS	5*	Lee y col.. (1995)
Malz	55	TLC	100	Liu y col.. (1992)
Trigo	141	TLC	500*	Lops y col.. (1998)
Harina de trigo	100	TLC	100	Lu y col.. (1992)
Malz	155	TLC	100	Lu y col.. (1992)
Trigo	182	TLC	50*	Lu y col.. (1994)
Trigo	81	TLC	50*	Lu y col.. (1994)
Trigo	66	TLC	50*	Lu y col.. (1994)
Cebada	29	TLC	48	Martínez y col.. (2000)
Centeno	100	TLC	50*	Marx y col.. (1995)
Trigo	101	TLC	50*	Marx y col.. (1995)
Cerveza	50	GC-ECD	2	Moltó y col. (2000)
Trigo	84	GC-MS	1*	Müller y Schwadorf (1993)
Trigo	361	GC-MS	1-5*	Müller y col.. (1997a)
Avena	272	GC-MS	3*	Müller y col.. (1998)
Cebada	240	GC-MS	3*	Muller y col.. (1997b)
Parí	20	GC-ECD	17	Neira y col.. (1997)
Harina de trigo	14	GC-ECD	17	Neira y col.. (1997)
Cerveza	196	ELISA	50*,**	Niessen y col.. (1993)
Harina de trigo	61	TLC	48	Pacin y col.. (1997)
Trigo	73	TLC	48	Pacin y col.. (1997)
Cebada	37	GC-ECD	2*	Park y col.. (1992)
Trigo	123	HPLC-UV	50*	Pascale y col.. (2000)
Cebada	20	HPLC-UV	50*	Pascale y col.. (2000)
Triticale	10	HPLC-UV	50*	Pascale y col.. (2000)
Malz	88	TLC	111	Prado y col.. (1997)
Trigo	1056	TLC	30*	Quiroga y col.. (1995)
Productos de malz	156	GC-ECD	150*	Rava (1996)
Malz	527	GC-ECD	150*	Rava (1996)
Cebada	30	GC-MS	5*	Ryu y col.. (1996)
Malz	15	GC-MS	5*	Ryu y col.. (1996)
Harina de trigo	33	GC-ECD	17	Samar y col.. (2001)
Malz	100	TLC	100*	Saubois y col.. (1992)
Pan y productos relacionados	96	GC-MS	23	Schollenberger y col.. (1999)
Fideos	29	GC-MS	23	Schollenberger y col.. (1999)
Cereales de desayuno	32	GC-MS	23	Schollenberger y col.. (1999)
Alimentos para bebés y niños	25	GC-MS	23	Schollenberger y col.. (1999)

Producto	Número de muestras	Método	LOQ µg/kg	Referencia
Arroz	26	GC-MS	23	Schollenberger y col.. (1999)
Alimentos con cereales	29	GC-MS	23	Schollenberger y col.. (1999)
Trigo	1128	GC-ECD	20-100*	Scott (1997)
Maíz	131	GC-ECD	50-100*	Scott (1997)
Alimentos a base de trigo	655	GC-ECD	10-100*	Scott (1997)
Cerveza	33	GC-MS	0.1*,**	Scott y col.. (1993)
Cerveza	42	GC-MS	0.5*,**	Shim y col.. (1997)
Trigo y productos de trigo	38	GC-FID	200*	Soares y Furlani (1996)
Copos de maíz	17	TLC	48	Solovey y col..(1999)
Harina de maíz	22	TLC	48	Solovey y col..(1999)
Pochoclo	42	TLC	48	Souza y col..(2000)
Trigo	59	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Avena	23	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Centeno	28	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Cebada	147	ELISA	500	Trucksess y col.. (1995)
Trigo	483	ELISA	500	Trucksess y col.. (1995)
Harina de trigo	362	HPLC-UV	20*	Trucksess y col.. (1996)
Salvado de trigo	163	HPLC-UV	20*	Trucksess y col.. (1996)
Productos de trigo	37	HPLC-UV	20*	Trucksess y col.. (1996)
Trigo	2382	HPLC-UV	50*	Tutelyan (1998)
Trigo	224	HPLC-UV	50*	Tutelyan y col. (1990)
Maíz	68	TLC	10*	Vega y col.. (1998)
Trigo	140	ELISA	50*	Vrabcheva y col.. (1996)
Maíz	15	GC-ECD	100*	Wang y col.. (1995)
Harina de maíz	17	GC-ECD	100*	Wang y col.. (1995)
Maíz	89	GC-MS	10*	Yamashita y col.. (1995)
Maíz	89	GC-MS	5*	Yoshizawa y Gao (1999)
Trigo	40	GC-MS	5*	Yoshizawa y Gao (1999)
Trigo	151	GC-MS	5*	Yoshizawa,T. (1997)
Cebada	94	GC-MS	5*	Yoshizawa,T. (1997)
Alimentos con cereales	29	GC-ECD	10	Yuwai y col.. (1994)

* =Límite de detección

**= ng/ml

LOQ=Límite de cuantificación

Con respecto a la toxina T-2, se encontraron datos de 3.873 muestras (Tabla III.3), 34,3% de trigo, 28,7% de maíz, 10% de avena y 8,3% de cebada.

Tabla III.3: Resumen de las metodologías empleadas para cuantificar la ocurrencia natural de toxina T-2.

Producto	Número de muestras	Método	LOQ µg/kg	Referencia
Trigo	20	GC-FID	100*	Furlong y col.. (1995)
Trigo	25	GC-MS	100*	Gao y Yoshizawa (1997)
Panqueques cocidos	14	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Maíz	12	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Harina de maíz	13	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Cebada	30	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Avena	21	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Centeno	31	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Trigo	40	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Maíz	197	ELISA	100*	Janardhana y col.. (1999)
Avena	70	GC-MS	30*	Langseth (2000)
Trigo	156	GC-MS	20-30*	Langseth (2000)
Porotos	76	ELISA	50	Mühlemann y col.. (1997)
Maíz	90	ELISA	50	Mühlemann y col.. (1997)
Arroz	99	ELISA	50	Mühlemann y col.. (1997)
Trigo	84	GC-MS	1-3*	Müller y Schwadorf (1993)
Trigo	361	GC-MS	1-5*	Müller y col.. (1997a)
Avena	272	GC-MS	1-5*	Müller y col.. (1998)
Cebada	240	GC-MS	1-5*	Müller y col.. (1997b)
Maíz, cebada arroz, mijo	28	GC-FID	15*	Park y col.. (1991)
Maíz	88	ELISA	50*	Prado y col.. (1997)
Trigo	261	TLC	500*	Quiroga y col.. (1995)
Maíz	291	GC-ECD	250*	Rava (1996)
Productos de maíz	158	GC-ECD	250*	Rava (1996)
Maíz	236	GC-ECD	250*	Rava y col.. (1996)
Cebada	30	GC-MS	5*	Ryu y col.. (1996)
Maíz	15	GC-MS	5*	Ryu y col.. (1996)
Maíz	100	TLC	100*	Saubois y col.. (1992)
Alimentos de bebés y niños	25	GC-MS	6	Schollenberger y col.. (1999)
Pan y productos de cereales	186	GC-MS	6	Schollenberger y col.. (1999)
Arroz	26	GC-MS	6	Schollenberger y col.. (1999)
Maíz	16	GC-ECD	400	Scott (1997)
Trigo	154	GC-ECD	400	Scott (1997)
Trigo y productos de trigo	38	GC-FID	100*	Soares y Furlani 1996
Cebada	23	HPLC	150*	Stratton y col.. 1993
Trigo	29	HPLC	150*	Stratton y col.. 1993
Avena	23	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Centeno	28	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Trigo	59	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Maíz	68	HPTLC	10*	Vega y col.. (1998)
Trigo	140	ELISA	40*	Vrabcheba y col.. (1996)

N = número

* = Límite de detección

LOQ = limit of quantification

Entre 1990 y 2000 se encontraron solamente 2.032 muestras, en que se estudió la presencia de la toxina HT-2 (Tabla III.4). El 42,8% corresponde a muestras de trigo, el 19% de avena y el 14,8% de centeno.

Tabla III.4. Resumen de las metodologías empleadas para cuantificar la ocurrencia natural de toxina HT-2.

Producto	Número de muestras	Método	LOQ µg/kg	Referencia
Trigo	20	GC-FID	500*	Furlong y col.. (1995)
Trigo	25	GC-MS	100*	Gao y Yoshizawa (1997)
Granos de maíz	12	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Harina de Maíz	13	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Panqueques cocidos	14	GC-MS	500*	Groves y col.. (1999)
Avena	21	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Cebada	30	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Trigo	40	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Centeno	31	GC-MS	15*	Hietaniemi y Kumpulainen (1991)
Centeno	4	GC-MS	20*	Langseth (2000)
Trigo	68	GC-MS	20*	Langseth (2000)
Avena	70	GC-MS	20*	Langseth (2000)
Trigo	88	GC-MS	20*	Langseth (2000)
Trigo	84	GC-MS	1-3*	Müller y Schwadorf (1993)
Trigo	361	GC-MS	1-5*	Müller y col.. (1997a)
Avena	272	GC-MS	1-5*	Müller y col.. (1998)
Cebada	240	GC-MS	1-5*	Muller y col..(1997b)
Cebada	30	GC-MS	5*	Ryu y col.. (1996)
Maíz	15	GC-MS	5*	Ryu y col.. (1996)
Pan y productos de cereales	186	GC-MS	18	Schollenberger y col.. (1999)
Alimentos para bebés y niños	25	GC-MS	18	Schollenberger y col.. (1999)
Arroz	26	GC-MS	18	Schollenberger y col.. (1999)
Trigo blando de invierno	17	GC-ECD	100	Scott (1997)
Maíz	16	GC-ECD	100	Scott (1997)
Trigo duro del Oeste	108	GC-ECD	100	Scott (1997)
Trigo y productos de trigo	38	GC-FID	500*	Soares y Furlani (1996)
Trigo	59	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Avena	23	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Centeno	28	GC-ECD	10	Thuvander y col.. (2001)
Maíz	68	HPTLC	10*	Vega y col.. (1998)

*N = número * = Limite de Detección LOQ = limit of quantification*

III.2.a. Extracción

El primer paso en el análisis de los tricotecnos implica una eficiente extracción de la toxina. Los métodos usados en la última década diferían en la combinación de solventes utilizados. La combinación de solventes de

extracción más usada para DON fueron acetonitrilo:agua (61,4%), metanol:agua (17,5%) y cloroformo:etanol:agua (9,2%). En el caso de acetonitrilo:agua se emplearon varias proporciones: 84:16 (66,9%), 3:1 (23,8%), 9:1 (0,9%), 95:5 (1,2%), con pequeñas cantidades de metanol (7,1%) o mezclado con acetato de etilo (1,1%). Se usó agua como solvente de extracción para las metodologías que emplearon ELISA como método de detección y cuantificación, aunque también se utilizó acetonitrilo:agua, evaporando el solvente y disolviendo en agua antes del análisis.

La evolución en el uso de solventes de extracción para DON durante la década 1990-2000 puede verse en la Tabla III.5. En el caso de las muestras de cerveza, la concentración de etanol fue variada, dependiendo del contenido de alcohol previo al proceso de limpieza, por lo cual en la Tabla III.5 se consideró como extracción etanol:agua.

Tabla III.5. Porcentaje de muestras extraídas por diferentes sistemas de solventes para el análisis de DON y toxinas T-2 y HT-2, en el último período.

Solventes	DON				T-2		HT-2	
	1990-92	1993-95	1996-98	1999-2000	1995-97	1998-2000	1995-97	1998-2000
Acetonitrilo : agua	58.9	47.3	64.3	83.5	40.6	82.9	77.1	100
Agua	-	16.9	0.2	12.4				
Agua : etanol		6.2	0.5	4.1				
Metanol : agua		0.5	28.4		59.4	17.1	22.9	
Agua: cloroformo: etanol	31.8	29.1						
Metanol: agua: acetonitrilo	9.3	-	6.6	-				

Hubo pocas muestras analizadas para los tricotecenos tipo A en los años 1990-1995, por lo cual solamente se consideran dos períodos al discutir los cambios en los solventes de extracción: 1995-1997 (toxina T-2 = 2366 muestras, toxina HT-2 = 870 muestras) y 1998-2000 (toxina T-2 = 1149 muestras, toxina HT-2 = 956 muestras). Debido a una fuerte tendencia mundial a reemplazar el cloroformo por solventes menos tóxicos por sus efectos cancerígenos, citados por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) en el

Grupo 2 B como probable carcinogénico en humanos (Agencia de Protección Ambiental, EPA, 2001), al terminar esos períodos, el cloroformo se había dejado de usar y el acetonitrilo:agua era el sistema de solventes elegido tanto para tricotecnos tipo A como tipo B (Tabla III.2.5). Además que los extractos obtenidos por este último sistema de solventes son mucho más limpios (Trenholm y col., 1985) que los obtenidos con cloroformo, no existen evidencias de que el acetonitrilo pueda tener el potencial para causar cáncer en humanos (EPA, 1999).

III.2.b Limpieza

La naturaleza de la matriz y el método elegido para detectar la toxina determinan el tipo de limpieza que debería aplicarse al extracto. En el caso del análisis de DON las columnas de limpieza más utilizadas en la década pasada fueron, la columna de carbón-alúmina o la de carbón-alúmina-celite que en total representan un 41,9% de los análisis y fuera descrita por Trucksess y colaboradores en 1984. Las columnas de sílica gel y de silicato de magnesio (Florisil) fueron usadas solas o combinadas en 31,6% de las muestras. Un paso adicional de purificación se observó en las publicaciones al utilizar una columna rellena con una resina de intercambio catiónico o un cartucho de extracción en fase sólida C-18 (6,4 y 0,9% de las muestras, respectivamente). En algunos casos (17,3%) se realizó una extracción previa con hexano para eliminar la grasa antes del proceso de limpieza propiamente dicha.

Como se muestra en la Tabla III.6, en los primeros años de la década del noventa las columnas de sílica gel o las de alúmina-carbón-celite fueron usadas ampliamente para la limpieza de DON. Las columnas de limpieza preparadas en los laboratorios tenían problemas de reproducibilidad y fueron reemplazadas en los últimos años por columnas "listas para usar" disponibles comercialmente. En los últimos dos años han comenzado a adoptarse las columnas Mycosep (Romer, 1995), que contienen carbón activado, celite y una resina de intercambio iónico. Las columnas C-18 han sido usadas en menor medida. Las columnas de inmutioafinidad comenzaron a usarse en los últimos años para reemplazar las de limpieza convencional (Scott y Trucksess, 1997) aunque su costo es mucho más elevado.

Tabla III.6: Porcentaje de columnas de limpieza utilizadas para el análisis de DON en el último período.

Columna	1990-1992	1993-1995	1996-1998	1999-2000
Mycosep	-	-	11.0	24.5
Silica gel/ florisil	16.3	16.7	42.4	19.4
Intercambio catiónico	9.3	0.9	6.6	19.2
Carbón / alúmina	65.0	60.2	37.8	17.3
Inmunoafinidad	-	-	-	12.4
C-18	-	-	0.5	7.2
Ninguna	9.4	22.2	1.7	-

El proceso de limpieza en el caso de las toxinas T-2 y HT-2 (Tabla III.7) durante los períodos 1995-1997 y 1998-2000 mostró que no hay ninguna tendencia preponderante en el proceso de limpieza. Los hechos demuestran que todavía hay problemas para obtener buenas recuperaciones para ambos grupos, sobre todo cuando se busca determinar varios tricotecenos simultáneamente.

Tabla III.7. Porcentaje de columnas de limpieza utilizadas para el análisis de toxinas T-2 y HT en el último período.

Columna	T-2		HT-2	
	1995-1997	1998-2000	1995-1997	1998-2000
Silica gel/ florisil	65.7	33.2	93.3	40.0
Mycosep		25.6	-	31.2
Intercambio catiónico	-	20.6		24.8
Ninguna	20.8	17.1		-
C-18	-	3.4	-	4.1
Carbón / alúmina	13.5	-	6.7	-

III.2.c. Cuantificación

La técnica más comúnmente usada para la cuantificación de DON ha sido la cromatografía gaseosa (CG), 40,8% de las muestras, seguida en orden decreciente por la cromatografía líquida (HPLC) con detector UV, 27% de las muestras; cromatografía en capa delgada (TLC), 25,1% y ELISA, 7,1% de las

muestras (Tabla III.2). En los primeros años de la década se usaron los métodos ELISA para la cuantificación de esta toxina, pero en los últimos años la GC y la TLC fueron los métodos predominantes, y en menor grado HPLC, debido a que ésta técnica es menos sensible que las anteriores mencionadas.

La cromatografía gaseosa fue la metodología más usada para la cuantificación de tricotecenos tipo A, 69,8%, y en el caso de las toxinas T-2 y HT-2 un 96,7%. En el caso de la toxina HT-2, el otro método disponible fue TLC, que fue utilizado en 3,3% de las muestras. Un método ELISA desarrollado para toxina T-2 se usó en 17,8% de las muestras, TLC en 11,1% y sólo unas pocas, 1,3%, fueron analizadas con HPLC (Tablas III.3 y III.4).

Entre esos trabajos en los que se usó cromatografía gaseosa para la cuantificación de DON, el 63,9% de las muestras fueron analizadas con detector de captura de electrones (GC-ECD) y el 35,2% con espectrometría de masa (GC-MS). En pocos casos (0,9%) se utilizó un detector de ionización de llama (GC-FID). GC-MS también fue usado para identificación y confirmación de DON (Tabla III.2). Por otra parte, para las toxinas T-2 y HT-2, GC-MS fue usado en 61,1% y 82% de las muestras y GC-ECD en 35,7 y 15,1 de las muestras, respectivamente (Tablas III.3 y III.4).

Todos los métodos GC usados se basaron en la derivatización de los grupos hidroxilos de las toxinas para que puedan ser detectadas con mayor sensibilidad. Ellos diferían en la elección del agente derivatizante. Los derivados éter trimetilsilil (TMS) y éteres heptafluorobutiril (HFB) y trifluoroacetil (TFAA) han sido los más regularmente empleados en el caso de DON. El TMS fue usado en 56% y 41,8% y el HFB en el 44% y 3,4% de las muestras analizadas por GC-ECD y GC-MS respectivamente. El TFAA fue utilizado en el 54,7% de las muestras evaluadas por GC-MS. Para los tricotecenos tipo A el agente derivatizante más utilizado en el caso de CG-MS fue el TFAA (72% de las muestras). Cuando el detector fue ECD, el derivado HFB de la toxina T-2 fue usado en 88,6% de las muestras, mientras que los derivados HFB y TMS de la toxina HT-2 fueron usados en 56,2% y 43,8% de las muestras, respectivamente.

III.2.d Límites de los métodos

Con respecto al límite de detección (LOD), algunos autores expresaron este valor como dos o tres veces el ruido, mientras que otros lo definieron como la menor cantidad de estándar que puede ser detectada. El límite de cuantificación (LOQ) o determinación fue definido por algunos autores, como cinco o seis veces el ruido (medido con soluciones estándar), no teniendo en cuenta los datos de recuperación en la matriz en estudio, mientras que otros investigadores incluyeron el dato de recuperación en su estimación del LOQ. Por ejemplo, para estimar la ingesta de tricotecenos, es necesario considerar los datos para los cuales la recuperación es mayor que 60%.

El límite de detección de los métodos de CG empleados para la determinación de DON varían de 2 a 150 $\mu\text{g/kg}$ en el caso de CG-ECD, de 1 a 23 $\mu\text{g/kg}$ en CG-MS y 200 $\mu\text{g/kg}$ en CG-FID. Para tricotecenos tipo A, los límites de detección fueron de 1 a 30 $\mu\text{g/kg}$ y de 5 a 400 $\mu\text{g/kg}$ en GC-MS y GC-ECD respectivamente. En un caso un valor inusualmente alto de 500 $\mu\text{g/kg}$ fue informado para tricotecenos tipos A y B detectados por GC-MS (Groves y col., 1999).

Varios autores que utilizaron HPLC-UV para la cuantificación de DON con el detector a 220 nm, informaron valores de límite de detección de 10 a 50 $\mu\text{g/kg}$ (Tabla III.2), sin embargo Trucksess y col. (1995) definieron un límite de cuantificación de 500 $\mu\text{g/kg}$ (pero con una recuperación mayor de 60%). Tutelyan (1998) y colaboradores (1998) analizaron el 63,5% de las muestras mediante cromatografía en fase normal con columnas de sílica gel. Todos los demás autores emplearon cromatografía en fase reversa, muchos de ellos con un gradiente de agua y metanol como fase móvil. Como los tricotecenos tipo A tienen absorción a longitud de onda menor de 205 nm, resulta muy difícil la detección con HPLC-UV. Solamente un trabajo usó el procedimiento HPLC-UV para monitorear estas toxinas (Stratton y col., 1993).

TLC fue utilizado para cuantificar DON (Tabla III.2) y los límites encontrados en la bibliografía consultada varían de 30 $\mu\text{g/kg}$ a 100 $\mu\text{g/kg}$. Todos los autores que eligieron TLC para cuantificar DON usaron una solución de cloruro de aluminio para visualizar los tricotecenos tipo B, ya sea impregnando previamente las placas o pulverizándolas después del desarrollo del solvente. Solamente en

tres casos la toxina T-2 fue cuantificada por TLC, con límites de detección de 10, 100 y 500 µg/kg (Tabla III 2.3).

El límite de detección de los métodos ELISA empleados para la cuantificación en granos fueron de 50 µg/kg, 500 µg/kg y 1000 µg/kg y para la determinación de DON en muestras de cerveza de 50 µg/kg (Tabla III.2).

Para la cuantificación de la toxina T-2 en muestras de granos los límites de detección informados fueron de 40 a 100 µg/kg (Tabla III 2.3).

III.3 Conclusión

Cuando los datos de ocurrencia van a ser considerados para la estimación de la exposición, la metodología de detección debe tener un límite de cuantificación no mayor que 50 µg/kg para deoxinivalenol y menor que 10 µg/kg para toxinas T-2 y HT-2.

El sistema de solventes mas adecuado parece ser acetronitrilo : agua en una relación 84:16.

Las columnas de limpieza actualmente aceptadas son las Romer 225 o en un envase con mayor masa de relleno (Romer 227).

Las metodologías mas adecuadas para la cuantificación son cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones o cromatografía en capa delgada para DON, mientras que para los tricotecenos tipo A el método de cuantificación obligado es la cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones y en algunos casos se puede utilizar un detector de masa, si se trata de los equipos actuales que son mas sensibles que los de la década anterior.

IV. VARIABILIDAD ASOCIADA A LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN TRIGO, HARINA, AFRECHILLO Y GLUTEN.

IV. 1 Introducción

La contaminación natural por deoxinivalenol en trigo y productos derivados ha sido observada en todo el mundo (Neira y col., 1997; Pacin y col., 1997; Quiroga y col., 1995; Scott, 1997; Trucksess y col., 1995; Trucksess y col., 1996 Yoshizawa y Jin, 1995 Tabla I.1) Por otra parte, la ingesta de DON ocasiona diversos efectos locales debidos a la irritación de las mucosas gastrointestinales, así como efectos sistémicos debido a una potente inhibición de la síntesis proteica. A estos efectos se agrega, otro de mayor importancia asociado a la posibilidad de desarrollar nefropatías, debido al incremento de IgA (Greene y col., 1994; Prelusky y col., 1994; Rasooly y Pestka, 1994; Warner y Petska, 1994), que es una de las nefropatías más comunes en el mundo.

La estimación de ingesta de micotoxinas implica establecer con la mayor precisión posible, el contenido de estas toxinas en grandes lotes de granos o productos derivados, destinados al consumo humano o animal.

La contaminación de los granos individuales varía ampliamente debido a que la distribución no es uniforme, ya que pueden existir granos con alto contenido de micotoxinas; lo que origina la posibilidad de hallar gran variabilidad en la determinación del nivel de contaminación. El diseño de un eficiente plan de muestreo depende del conocimiento de la distribución de la contaminación, función matemática que permite representar la distribución de la contaminación dentro de un lote (silo, camión, buque) o entre lotes (región, cosecha, planta de almacenamiento). Esta función de distribución es específica para cada micotoxina y para cada matriz (alimentos, fracción de molienda, maíz en grano) analizada.

La variabilidad en la determinación de deoxinivalenol en lotes de trigo de 20 Kg fue estudiada por Whitaker y col. (2000). La variabilidad total se expresa como la suma

de la variabilidad debida al muestreo, a la preparación de la muestra y al método analítico.

En esta parte del trabajo se estudió la variabilidad asociada a la determinación de DON, analizada por cromatografía gaseosa, en lotes de varias toneladas de trigo, harina, afrechillo y gluten, y se determinó las funciones de distribución de la contaminación en cada producto mencionado.

IV. 2 Materiales y Métodos

IV. 2 a Diseño experimental

IV. 2. a. 1 Muestreo

Durante la limpieza de 20 toneladas de trigo se tomaron muestras cada 10 minutos de trigo sucio (5 muestras de 2.5 Kg) y de “screenings” (5 muestras de 1 Kg). Durante el proceso de molienda de trece toneladas de trigo limpio y acondicionado, se tomaron muestras cada 5 minutos: 24 muestras de 3 Kg de trigo limpio, 24 muestras de 1 Kg de harina y 24 muestras de 1 Kg de afrechillo.

En la planta de producción de almidón y gluten, donde se procesó la harina obtenida en la molienda, se tomaron muestras cada 30 minutos de gluten y de almidón de trigo (9 muestras de cada producto de 1 Kg cada una).

Cada muestra se dividió en 6 submuestras de igual peso. Las muestras de trigo y afrechillo se molieron en un Molino Romer (Figura IV.1). De cada submuestra se tomó una porción de 25g (muestra analítica). Los resultados de la cuantificación de DON (anexo) en 144 muestras de trigo limpio, 144 muestras de afrechillo, 144 muestras de harina y 54 muestras de gluten fueron utilizados para estimar la función de distribución de la contaminación por DON en los lotes como así también la variabilidad en la determinación (análisis estadístico ANOVA).



Figura IV.1: Molino Romer

IV.2.a.2 Variabilidad Analítica

Se seleccionaron muestras de "screenings", trigo sucio, trigo limpio, harina y gluten de manera de tener un amplio rango de concentraciones de DON para estudiar la variabilidad de la determinación analítica. Se analizaron diez alícuotas de cada extracto.

IV.2.b Equipamiento

a) *Homogeneizador.* — Osterizer

- b) *Columna de limpieza.* —columna Mycosep N° 225 (Romer Labs, Inc.).
- c) *Cromatógrafo gaseoso (CG o GC)*—Hewlett-Packard Model 5890 Serie II equipado con un muestreador automático, controlador HPG1512 A, módulo de inyección HPG1513A, detector de captura de electrones (ECD o CDE) y para el análisis de datos un HP3398A GC-ChemStation.



Figura IV.2: Cromatógrafo gaseoso - Hewlett-Packard Model 5890 Serie II

- d) *Columna CG*— columna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m espesor de película)
- e) *Plancha calefactora:* baño de arena equilibrado a 62 ± 2 °C.

IV.2.c. Reactivos

- a) *Solventes.* — grado “cromatografía líquida” metanol, tolueno, acetato de etilo y acetonitrilo (Merck).

- b) *Estándar Deoxinivalenol*. —Sigma Chemical Co. St. Lois, MO.
- c) *4-(N,N-dimetilamino)-piridina (DMAP)*. — Sigma Chemical Co. St. Lois, MO.
- d) *Anhídrido Heptafluorobutirico (HFBA)*. —Sigma Chemical Co. St. Lois, MO.
- e) *Bicarbonato de sodio*. —solución acuosa 5% (w/v) (Merck)
- f) *Catalizador*. — 2 mg/ml de 4-DMAP en tolueno: acetonitrilo (80:20).

IV.2.d. Metodología Empleada en la Determinación de DON

IV.2.d.1 Extracción y Limpieza

El método utilizado para la extracción y limpieza fue el descrito por Trucksess et al. (Trucksess y col., 1996) con modificaciones:

- 1) se pesaron 25 gramos de muestra y se realizó la extracción con 100 ml de acetonitrilo: agua 84:16 (Figura IV.3)



Figura IV.3: Extracción de las toxinas de la matriz alimentaria. Pesada

2) La proporción de agua agregada se ajustó teniendo en cuenta la humedad de las muestras y se agitó durante 3 minutos (Figura IV.4)



Figura IV.4: Extracción de las toxinas de la matriz alimentaria. Agitación

3) Aproximadamente 4 ml. del extracto se colocaron en un tubo de 8x15 mm y cuatro porciones de 0.5 ml se pasaron sucesivamente a través de la columna de limpieza siendo transferidos a otro tubo, evaporados a sequedad en un baño de agua a 60 °C con vacío y guardados a -18 °C. (Figuras IV.5 y IV.6)



Figura IV.5: Limpieza a través de columna Mycosep N°225 o 227



Figura IV.6: Concentración del extracto con vacío

IV.2.d.2 Derivatización

El extracto seco se derivatizó por la técnica descrita por Croteau y col. (1994). Brevemente, se agregó la solución del catalizador al extracto seco, se agitó y luego se añadió 50 μl de HFBA. El tubo se colocó en el bloque calefactor a 62 ± 2 °C por 20 minutos. El exceso del agente derivatizante se destruyó por agregado de 1 ml de la solución de bicarbonato y luego se agregaron 400 μl de tolueno. Luego de centrifugar, la capa superior orgánica (480 μl) se transfirió a un vial y el mismo se colocó en el muestreador automático del GC para su análisis.

IV.2.d. 3 Cuantificación por Cromatografía Gaseosa

Con el objeto de obtener una buena resolución del cromatograma, se ajustó el programa de temperatura de la siguiente manera: 1 minuto a 80 °C, luego un incremento de 80-160 °C a 30 °C min^{-1} seguido de otra rampa de 160-183 °C a 1 °C min^{-1} y luego de 183-280 °C a 12 °C min^{-1} (manteniendo esta temperatura 5 minutos).

La presión de cabeza de columna fue de 12 psi. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250 °C y 300 °C respectivamente.

El volumen de inyección fue de 2 μl .

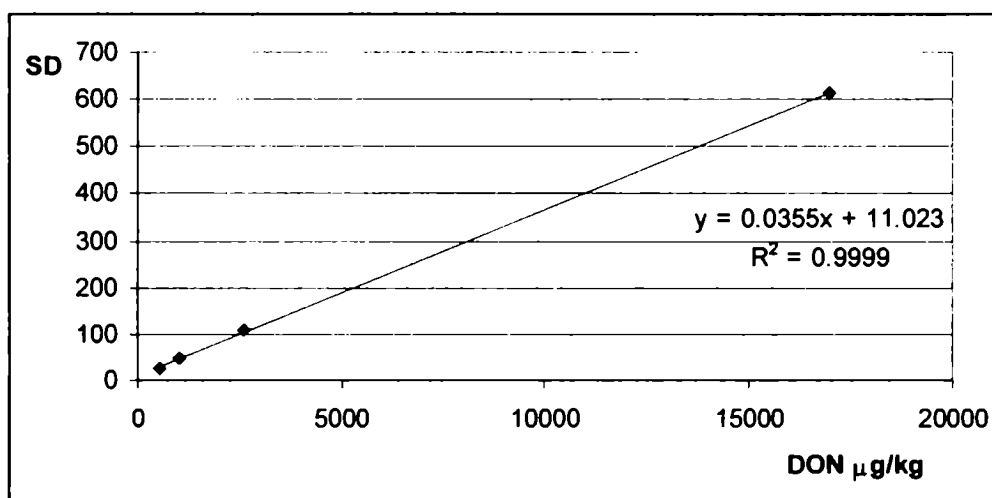
Se inyectaron diferentes concentraciones de DON, diariamente para determinar la respuesta del detector de captura de electrones y generar curvas de calibración.

El límite de detección y cuantificación de DON fue de 11 y 18 $\mu\text{g/kg}$ a una relación señal: ruido de 3:1 y 5:1 respectivamente.

Además, se evaluó la variabilidad para las etapas de derivatización y cuantificación con el cromatógrafo gaseoso. Se analizaron 10 alícuotas de cada muestra para determinar el desvío estándar de los resultados. Los promedios están expresados en $\mu\text{g/kg}$ de DON y fueron calculados basados en las áreas o en las alturas de los picos. El desvío estándar (DS) en función de la concentración (figura IV.6) da una relación lineal. Cada punto es el promedio de diez determinaciones (tabla IV.1).

Tabla IV.1: Variabilidad en la derivatización y la cuantificación de DON.

muestra	Media (µg/Kg)		DS		DSR %	
	área	altura	área	altura	Área	altura
I	17005.8	17455.1	614.2	718.8	3.6	4.1
II	2595.6	2438.3	106.9	82.3	4.1	3.4
III	1023.9	1013.7	47.7	62.7	4.7	6.2
IV	559.7	590.7	27.3	41.8	4.9	7.1

Figura IV.6: Relación entre el DS y la concentración de DON (media de 10 determinaciones)

Se decidió cuantificar por áreas ya que las alturas a bajas concentraciones tienen mayor dispersión de los resultados.

IV.3 Resultados y Discusión

Se realizó un análisis estadístico de los datos por el test de ANOVA. La variación relativa se define como el cociente del cuadrado medio "entre lotes" sobre el cuadrado medio "dentro de los lotes" y como se observa en la tabla IV.2 para trigo el valor de F es 3.56, con un nivel de 95% de confianza el F teórico para el número de muestras analizadas es 1.62. Suponiendo que la hipótesis nula es H_0 : "no hay diferencia significativa entre lotes" del análisis de la tabla IV.2 se concluye que hay

que hay diferencia entre los lotes (error de muestreo), ya que los "F" obtenidos son mayores que el valor teórico (1.62).

Tabla IV.2: Resultados del test ANOVA.

	Fuente de variación	Suma de cuadrados (ppm ²)	Grados de libertad	Cuadrado medio (ppm ²)	F
trigo (<c>=1.928ppm)	Entre lotes	15.39	23	0.669	3.56
	Dentro de los lotes	22.55	120	0.188	
	total	37.94	143		
Harina de trigo (<c>=0.994ppm)	Entre lotes	13.35	23	0.58	17.34
	Dentro de los lotes	4.02	120	0.0335	
	total	17.37	143		
afrechillo (<c>=4.68ppm)	Entre lotes	251.9	23	10.95	26.05
	Dentro de los lotes	50.4	120	0.42	
	total	302.4	143		
gluten (<c>=0.293ppm)	Entre lotes	0.163	8	0.02	14.1
	Dentro de los lotes	0.062	43	0.00144	
	total	0.225	51		

El cuadrado medio dentro de los lotes es atribuible al error en el cuarteo (6 submuestras), a la preparación de la muestra (molienda, separación de 25g, extracción y limpieza del extracto) y al error analítico (derivatización y cuantificación por CG). El valor 0.188 ppm² (desviación estándar DS=0.434 ppm) concuerda muy bien con las ecuaciones de Whitaker y col (2000) que para una concentración de 1.928 ppm predicen una varianza de 0.205 ppm² (DS=0.45ppm).

El error analítico depende del nivel de la contaminación (Figura IV.2), se obtuvo la siguiente ecuación que expresa su dependencia como $V = 0.002 \times c^{1.825}$.

Para trigo limpio una concentración de 1.928 ppm da una varianza de 0.007 ppm.

El método cromatográfico se evaluó calculando la relación de HORRAT

$$Horrat = \frac{RSD_r, observado}{RSD_r, teórico}$$

Desviación estándar relativa experimental (RSD_r , observado) / la desviación estándar relativa calculada (RSD_r , teórico) con la ecuación de Horwitz que a continuación se describe:

$$RSD_r(\%) = 2^{(1-0.5\log C)}$$

siendo C la concentración.

Un método se considera aceptable si el HORRAT es aproximadamente 1.0 (+/- 0.5) para estudios íter laboratorios y la mitad de ese valor para estudios dentro de un mismo laboratorio (Boyer y col., 1985). Los valores obtenidos indican una precisión aceptable del método (Tabla IV.3).

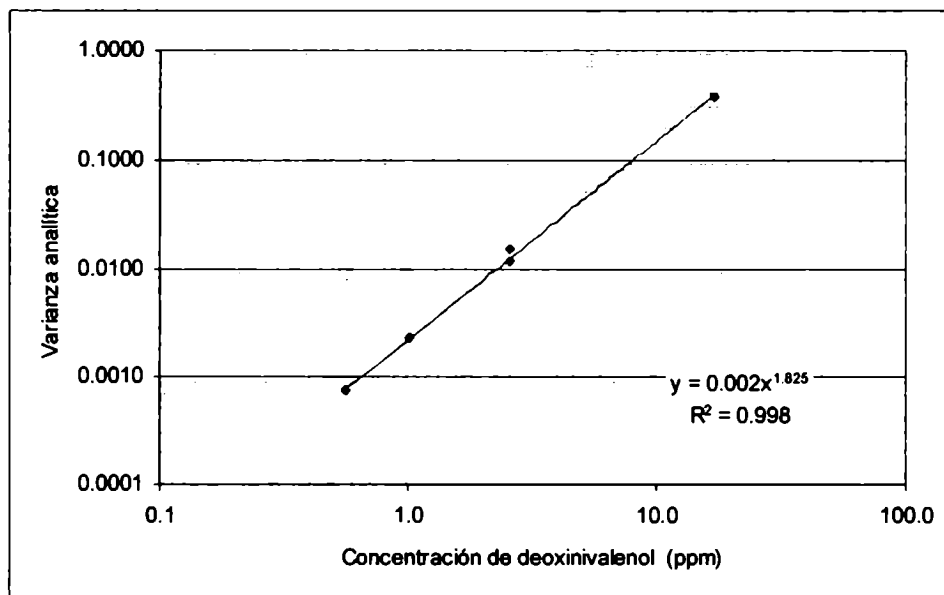


Figura IV.7: Gráfico log-log de la varianza analítica versus la concentración de deoxinivalenol. Cada punto es el promedio de diez determinaciones.

Tabla IV.3: Evaluación del método analítico dentro del laboratorio

Varianza analítica (ppm ²)	Concentración (ppm)	RSDr teórico	RSDr observado	Horrat
0.0073	1.93	14.49	4.43	0.31
0.0022	0.99	16.01	4.72	0.29
0.0368	4.68	12.68	4.10	0.32
0.0002	0.29	19.25	4.83	0.25

Para estimar la función de distribución de la concentración de DON en el lote de 13 toneladas de trigo limpio se utilizó el siguiente procedimiento. Las muestras ($N=24$) de 3 kg, numeradas con $i = (1, 2, \dots, N)$, se cuarteán en $r = 6$ submuestras de 500 g ($j = 1, 2, \dots, r$). Estas submuestras son molidas y se separa una porción de 25 g para el análisis. Se determina una matriz de la concentración de DON c_{ij} , que tiene $N \times r = 144$ elementos. El estimador de la concentración media de la muestra i es

$$\hat{c}_i = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r c_{ij} \quad (1)$$

y la varianza del estimador es

$$s_i^2 = \frac{1}{r(r-1)} \sum_{j=1}^r (c_{ij} - \hat{c}_i)^2 \quad (2)$$

Ahora si c es la concentración verdadera y formamos la variable reducida

$x_i = (c - \hat{c}_i) / s_i$, es sabido que x_i tiene una distribución t de Student con $r-1$ grados de libertad, asumiendo que c sigue una distribución normal en la muestra de 3 kg (pero no en la muestra de 13 ton). En consecuencia, la PDF (probability density function) para la muestra i sola valdrá

$$\frac{dp}{dc} = \frac{1}{\hat{\Sigma}_i} t_{r-1}(x_i) \quad (3)$$

donde

$$t_{r-1}(x) = \frac{\Gamma\left(\frac{r}{2}\right)}{\pi(r-1)\Gamma\left(\frac{r-1}{2}\right)} \left(1 + \frac{x^2}{r-1}\right)^{-\frac{r}{2}}$$

es la distribución PDF de Student y Γ es la función gamma de Euler.

La ecuación (1) da un pico simétrico de probabilidad alrededor de $\bar{c}_i$. Sin embargo tenemos una colección de muestras con $i = 1, \dots, N$, el conjunto de los picos correspondiente a ellas es exactamente el histograma experimental del lote, cada contribución es ponderada con la inversa de la desviación estándar $1/\hat{s}_i$ de las muestras individuales.

La función normalizada PDF para todo el lote es

$$\frac{dp}{dc} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{1}{\hat{s}_i} t_{r-1}(x_i) \quad (4)$$

Es más conveniente promediar las fluctuaciones aleatorias trabajando con la CDF (cumulative distribution function) que es la integral de la ecuación (4), luego

$$p(c) = \frac{1}{N} \sum_i T_{r-1}(x_i) \quad (5)$$

donde

$$T_{r-1}(x) = \frac{1}{2} + \frac{\Gamma\left(\frac{r}{2}\right)}{\Gamma\left(\frac{r-1}{2}\right)} \cdot \frac{x}{\pi(r-1)} F\left(\frac{1}{2}, \frac{r}{2}; \frac{3}{2}; \frac{x^2}{r-1}\right)$$

y F es la función hipergeométrica.

La función $p(c)$ es una función suave de c que puede representarse convenientemente de la siguiente forma. A fin de investigar si la distribución posee una cola asimétrica conviene transformar a la variable $\eta(c) = -\ln(-\ln p)$ que resulta ser una función lineal de c y creciente a valores elevados de la concentración, es decir, una distribución extreme-value type I o de Fisher-Tippett, usada en hidrología para estimar probabilidades de flujo (Linsley y col., 1975).

De hecho observamos en todas las distribuciones determinadas que η es una función lineal de la concentración a valores elevados de c . Sin embargo para valores de concentración bajos,

De hecho observamos en todas las distribuciones determinadas que η es una función lineal de la concentración a valores elevados de c . Sin embargo para valores de concentración bajos, cerca del límite de detección $\eta(0)$ es negativa y $\eta'(0) \approx 0$. En todo el rango investigado η se puede ajustar con un polinomio de grado 3. Esta polinomial tiene suficiente flexibilidad para acomodar hasta distribuciones bimodales (ver el caso de afrechillo, figura IV 10). Con esta expresión de $\eta(c)$ la CDF y la PDF puede ser calculada de las ecuaciones siguientes:

$$p = \exp\left[-e^{-\eta(c)}\right]$$

$$\frac{dp}{dc} = -(p \ln p) \frac{d\eta}{dc}$$

y el promedio, la desviación estándar, coeficiente de asimetría y curtosis se calculan por integración numérica directa. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla IV.4

Tabla IV.4: Media, desviación estándar, coeficiente de asimetría y curtosis de trigo, harina de trigo, afrechillo y gluten calculado por integración numérica.

	Trigo	Harina de trigo	afrechillo	gluten
Media (ppm)	1.91	1.02	4.66	0.29
Desviación estándar (ppm)	0.39	0.34	1.29	0.05
Coeficiente de asimetría μ_3/σ^3	0.30	0.015	-0.69	-0.03
Curtosis $\mu_4/\sigma^4 - 3$	0.32	-0.47	0.24	0.34

Las funciones de distribución de la concentración de DON observadas en trigo se comparan con una distribución normal de igual valor medio y desviación estándar en la figura IV.8. Las funciones de distribución de la contaminación en los otros productos se estimaron de la misma manera y las funciones obtenidas a partir de los datos experimentales se compararon con distribuciones normales de igual valor medio y desviación estándar (figura IV.9, harina de trigo; figura IV.10, afrechillo y figura IV.11, gluten). En el caso de harina de trigo, la función de distribución presenta una cola asimétrica para valores elevados de concentración como se observó también en la función de distribución de la contaminación en granos de trigo.

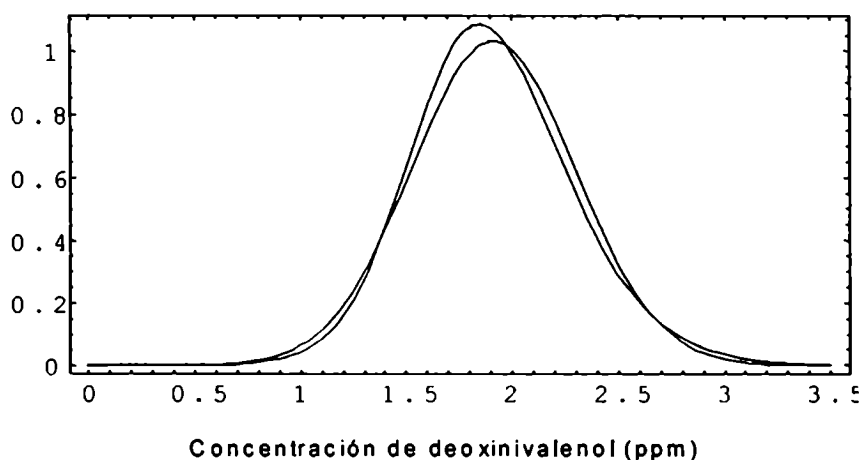


Figura IV.8: Comparación de la función de distribución propuesta y graficada con los datos experimentales de la contaminación por DON en trigo con una función de distribución normal de igual media y desviación estándar.

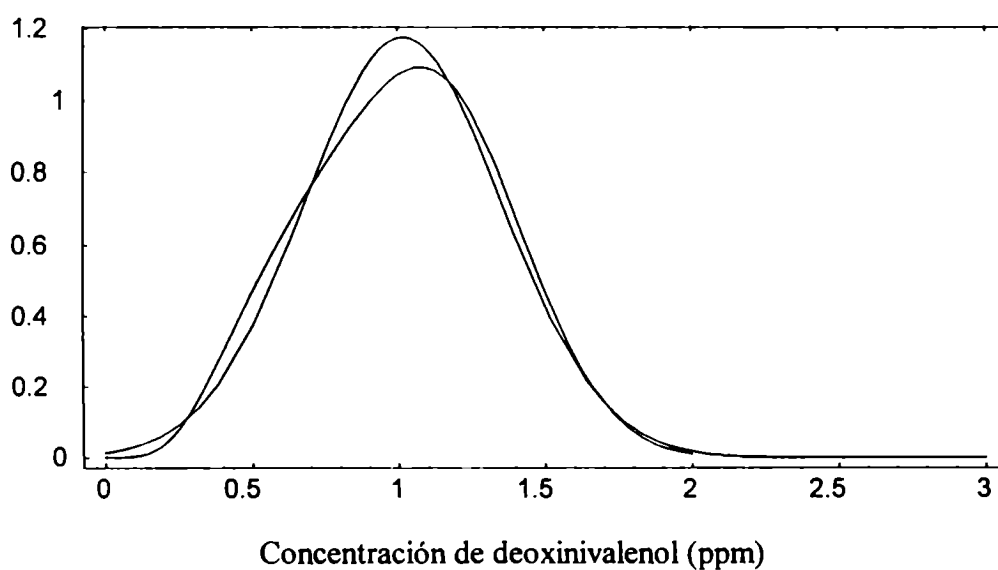


Figura IV.9: Comparación de la función de distribución propuesta y graficada con los datos experimentales de la contaminación por DON de harina de trigo con una función de distribución normal de igual media y desviación estándar.

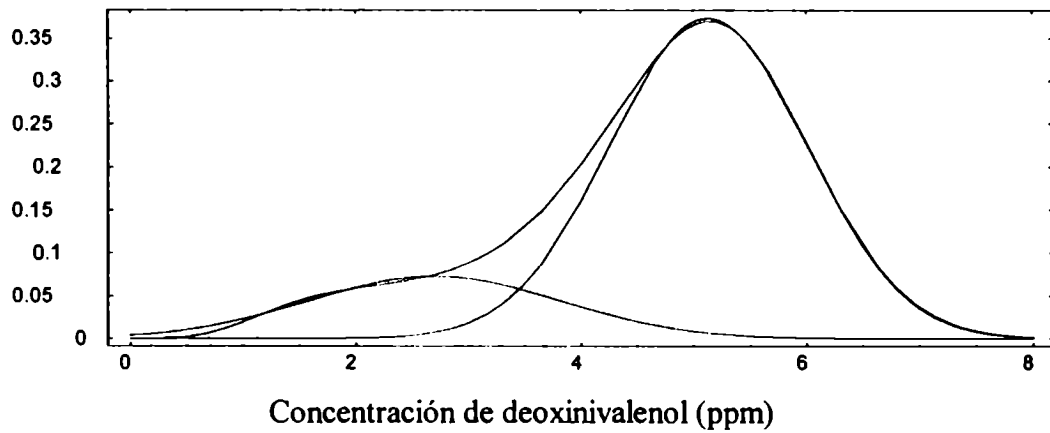


Figura IV.10: Comparación de la función de distribución propuesta y graficada con los datos experimentales de la contaminación por DON de afrecho con la suma de dos distribuciones normales. ($p = 0.0732 \times e^{-0.4(2.7-c)^2}$ y $p = 0.373 \times e^{-0.66(5.13-c)^2}$).

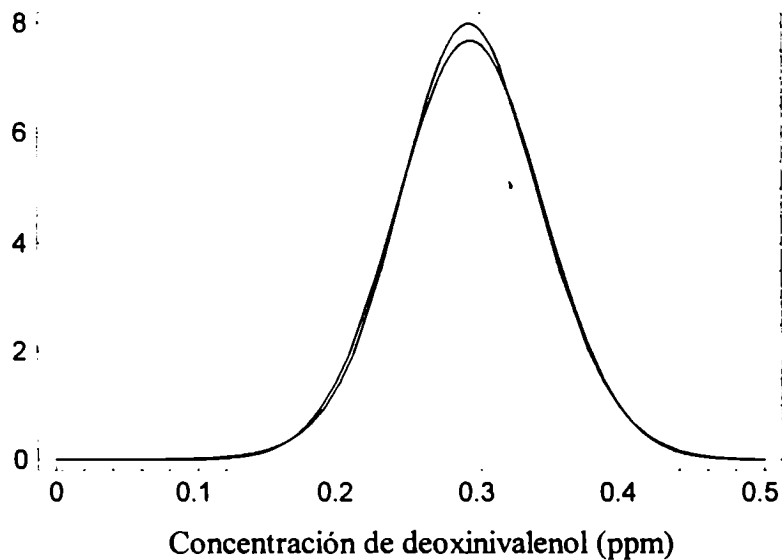


Figura IV.11: Comparación de la función de distribución propuesta y graficada con los datos experimentales de la contaminación por DON de gluten con una distribución normal de igual media y desviación estándar.

La función de distribución de la contaminación observada en el lote de trigo, que en este trabajo proviene de silos de almacenamiento, coincide con resultados anteriores de Ferro Fontán y col. (1994) para la contaminación por DON en el trigo en el momento de las cosechas de los años 1990, 1991 y 1992 en Argentina.

IV.4 Conclusiones

Se determinó la dependencia del error analítico con la concentración del DON. Se evidenció, por el cálculo de la relación de Horrat, que la precisión del método analítico es aceptable para los fines de este estudio.

Se determinaron por primera vez en el ámbito mundial las funciones de distribución que representan la contaminación por DON del afrechillo, harina de trigo y gluten. Con respecto al trigo, los resultados adquieren gran relevancia ya que la función de distribución encontrada representa los datos de contaminación de trigo argentino.

Otro aspecto relevante, es que estos resultados posibilitan la discusión de estrategias para reducir la variabilidad asociada a la determinación de DON en trigo, afrechillo, harina de trigo y gluten.

V. DISTRIBUCIÓN DE DEOXINIVALENOL EN LA MOLIENDA DE TRIGO Y EN LA PRODUCCIÓN DE ALMIDÓN Y GLUTEN DE TRIGO EN UNA PLANTA INDUSTRIAL

V.1 Introducción

La preocupación por la contaminación de este cereal, basada en que la ingesta de alimentos manufacturados con trigo es la principal fuente de energía en nuestro país (Pacín y col., 1998), llevó a la necesidad de investigar el comportamiento de la contaminación por DON presente en el trigo durante los diferentes procesos de elaboración de alimentos.

La etapa previa a la utilización de trigo en la elaboración de alimentos es la molienda. El grano sucio, infestado o en malas condiciones por almacenamiento defectuoso, se recomienda que no sea destinado a molienda para impedir el ingreso de producto muy contaminado por toxinas. Al principio del proceso, se debe eliminar la presencia de piezas metálicas mediante separadores magnéticos para que no deterioren los equipos que se utilizan en la molienda. La limpieza consiste, en un separador que elimina piedras, palos, y todo material extraño de tamaño mayor o menor que el grano; para la separación de granos de densidad semejante a la del cereal que se quiera moler, se utilizan discos separadores.

Con el objeto de separar la suciedad adherida, se utiliza un equipo cuyo diseño hace que se froten los granos entre sí, contra una pantalla metálica perforada y para la eliminación de piedras pequeñas de tamaño semejante al del grano, se suelen utilizar 2 sistemas en seco; uno es básicamente un aspirador con corriente de aire suficientemente fuerte para levantar el grano y que deja caer las piedras y el otro es una mesa de gravedad que separa los granos basado en la diferencia de peso específico ("screenings"). Este último sistema, favorece también la separación de granos infestados debido a que tienen bajo peso específico, por lo que esta etapa constituye una forma de disminuir la cantidad de toxinas que llegarían a la harina y otras fracciones.

La siguiente etapa es el acondicionamiento que consiste en añadir agua al grano seco y dejarlo reposar durante un período de tiempo previo a la molienda. El acondicionamiento tiene 2 finalidades: 1) poner correoso el salvado para que se resista a ser dividido en pequeños trozos durante la molienda, y 2) ablandar o suavizar el endosperma para facilitar la molienda. La cantidad de agua que se añade al trigo y el tiempo que se concede (reposo) para que el agua penetre en el grano, varían dependiendo del contenido acuoso y dureza del mismo. El trigo blando, generalmente se acondiciona a 15-15,5 % de humedad, los trigos duros de invierno o de primavera a 16,5 % y el trigo "durum" a niveles de humedad más altos. El tiempo necesario para alcanzar una distribución adecuada de humedad varía desde 6 horas para el grano blando hasta más de 24 horas para el grano duro.

La molienda de la mayoría de los granos de trigo, se hace con molino de rodillos, sistema que se basa en un proceso de reducción gradual. Los rodillos giran en sentidos opuestos y funcionan generalmente con velocidades distintas, así, además de la acción de compresión al pasar una partícula suficientemente grande por el estrecho espacio entre los 2 rodillos, hay una acción de corte a causa de la velocidad diferencial.

La molienda de harina, se inicia separando el salvado (afrechillo) y el germen del endosperma, que se consigue en su mayor parte en el sistema de fragmentación. Este sistema se compone de varios juegos de rodillos estriados y, tras cada amoladura el producto molido, se separa sobre tamices y purificadores.

La etapa siguiente es reducir el endosperma a la finura de la harina, por eso se denomina sistema de reducción. Los rodillos de reducción suelen ser lisos, en lugar de estriados. Tras cada paso de molienda, se criba el producto, se separa la harina y las partículas más groseras son enviadas a los rodillos de reducción apropiados. Tras los rodillos de reducción, también se utilizan los purificadores para el tamizado final de la harina.

Varios autores han estudiado la distribución de DON durante la molienda del trigo. La mayoría de los trabajos fueron realizados en molinos experimentales o en plantas piloto y los datos publicados presentan divergencias respecto al porcentaje de retención en la harina y su relación con el nivel de contaminación

o el grado de extracción, a pesar de que hay coincidencias en que las fracciones de las partes externas del grano son las más contaminadas (Tabla V.1).

Tabla V.1: Estudios de la distribución de la contaminación de DON durante la molienda del trigo.

Referencia	País	Trigo	Molino	[DON] en trigo (mg/kg)		Grado de extracción (%)	[DON] en harina de trigo (mg/kg)	Retención de DON en harina (%) en relación con		% de cambio en la concentración de DON	
				TS	TL			TS	TL	TS	TL
Scott y col. 1983	Canadá	Duro rojo de primavera FN=115, MP=73.5 kg/hl	Laboratorio (2kg)	4.62		75.9	4.25	67.2*		-8*	-14.3*
Young y col. 1984	Canadá	Blando de invierno	Laboratorio (5kg)	0.81	0.58	44.4	0.43	23.6*	33.2*	-46.9*	-25
		Duro de primavera	Laboratorio (8kg)	8.66	0.97	51.75	7.32	43.7*	38.9*	-15	-24
		Blando de invierno	Planta piloto (18 kg)	0.81	0.62	73.4	0.49	44.4*	58*	-39.5*	-19
Scott y col. 1984	Canadá	Blando de invierno	Planta industrial (11.4 ton)	0.45	0.42		0.34			-24.4*	-17
		Variedades de primavera	laboratorio (2kg)	1.39	1.19	71.7/71.6	1.29/1.46	69*	83*	-1.08*	15.5*
		Duro rojo de primavera	Planta piloto (20 kg)	6.98/7.97	7.61	73.9/74.6	6.44/7.13	64.7*	70*	-9.2*	-10.8*
Abbas y col. 1985	USA	Variedades de primavera		1.39	1.19	71.3/71.8	0.99/0.99	51.1*	30.3*	-28.8*	-16.8*
		Variedades de primavera	Pequeña planta comercial (1 ton)	1.39	0.80	69.5/72.0	0.77	38.5*	68*	-44.6*	-3.75*
Seitz y col. 1986	USA	Duro rojo de invierno	laboratorio	8.8	7.9	60.7	3.5	24.1*	26.9*	-60.2*	-55.7*
		Duro rojo de invierno		7.9	6.4	60.0	3.8	28.9*	35.6*	-51.9*	-40.6*
		Duro rojo de invierno		9.6	7.8	56.1	3.7	21.6*	26.6*	-61.5*	-52.6*
		Blando rojo de invierno		9.1	8.6	57.8	5.9	37.5*	39.6*	-35.2*	-31.3*
		Duro rojo de invierno	Planta piloto (81kg)	0.64	0.50	69.7	0.35	38.3	49.1	-45	-30
Nowicki y col. 1988	Canadá	Rojo de primavera	Laboratorio (9 kg)	12.5	11.1	72.9/72.8	4.51	26.2*	29	-63.9*	-59.4*
		Limpeza normal		0.79	0.49	73.4	0.19	17.6	28.4	-76	-61

* Calculado a partir de los datos publicados, TS= trigo sucio, TL= trigo limpio, FN= falling number, MP= masa pesada.

$$Retención = 100 \times \frac{[DON]_{\text{harina}} \times \text{relación de extracción}}{[DON]_{\text{I,T}}} \times 100$$

No se encontraron publicaciones que muestren la distribución de la contaminación por DON en la molienda de trigo en la Argentina, como tampoco sobre la distribución durante el proceso de producción a partir de harina, de gluten y almidón en ningún país.

El objetivo de esta parte del trabajo fue caracterizar el comportamiento de las toxinas de *Fusarium* presentes en el trigo como contaminación natural durante la molienda y durante la producción de gluten y almidón en una planta industrial en Argentina utilizando lotes de trigo de las cosechas 2001 y 2002.

V.2 Materiales y Métodos

V.2.a Diseño experimental

Fueron seleccionados para este estudio algunos lotes comerciales de trigo argentino de las cosechas 2001 (experimento I) y de la cosecha 2002 (experimento II) que presentaron visualmente ataque por *Fusarium*. Las muestras analizadas se consideran representativas de los lotes estudiados ya que fueron tomadas a intervalos regulares durante los procesos de limpieza, molienda y producción de gluten y almidón. Este método de muestreo puede ser considerado como un "mezclado en el tiempo".

La planta de molienda de trigo estudiada se encuentra ubicada en Rosario, Provincia de Santa Fe y procesa del orden de 100.000 toneladas por año de trigo. Aproximadamente un 40 % de la harina producida se destina (dependiendo del mercado) para obtener gluten y almidón. Una representación esquemática de la planta se encuentra en la figura V.1; en amarillo se indican las fracciones analizadas.

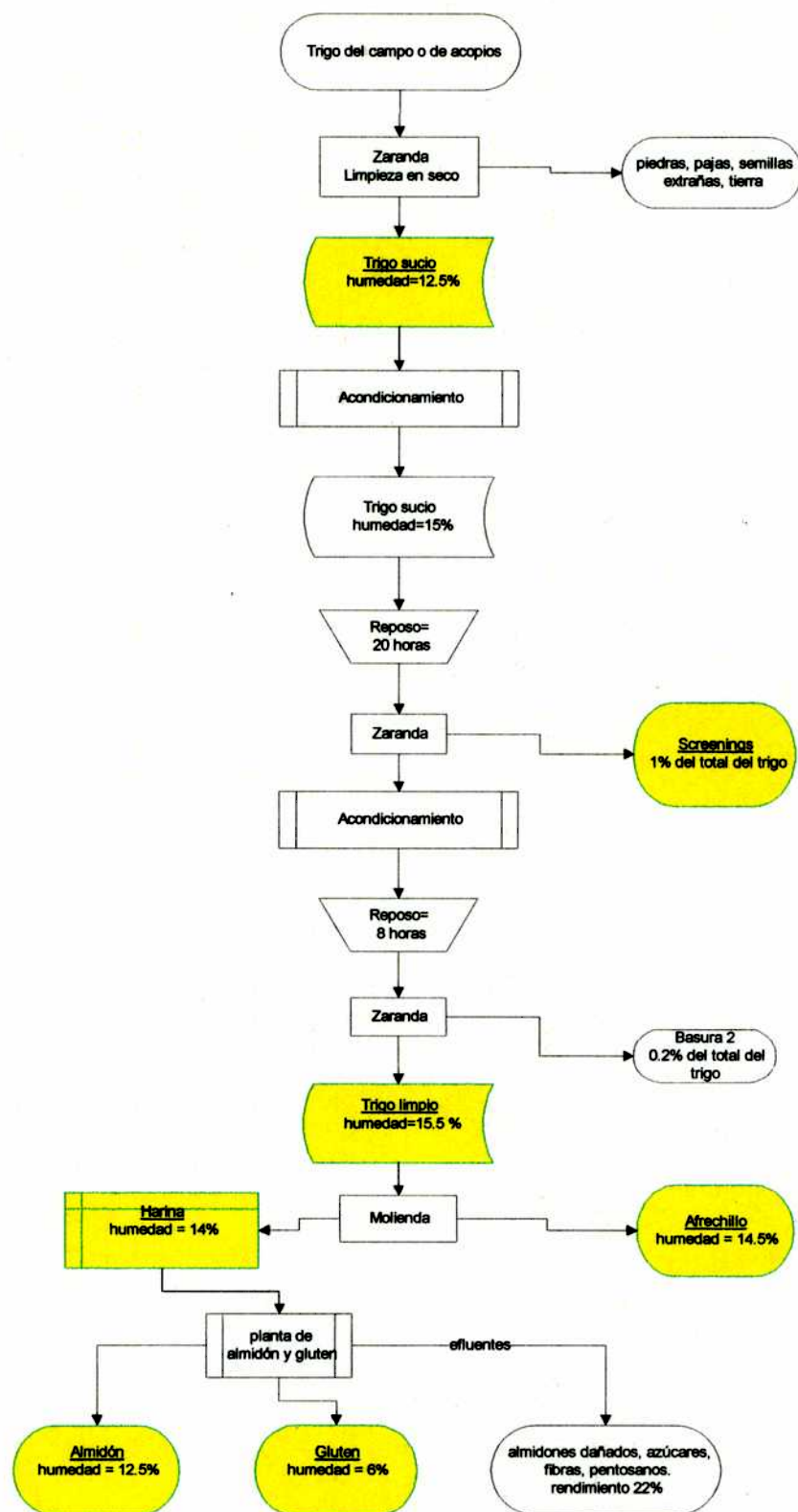


Figura V.1: Esquema de una planta de Molienda.

Experimento I

Ocho camiones de aproximadamente 30 toneladas de trigo fueron mezclados para este trabajo. El porcentaje de granos infectados varió de 2.2% a 4.5%. Se tomaron muestras cada 10 minutos de **trigo sucio** (2.5 kg) y **screenings** (1kg) durante el proceso de limpieza de 20 toneladas de trigo sucio y muestras cada 5 minutos de **trigo limpio** (3 kg), **harina** (1kg) y **afrechillo** (1kg) durante el proceso de molienda de 13 toneladas de trigo limpio. Cada muestra se dividió en 6 submuestras de igual peso, y de cada submuestra se analizó una porción de 25 g. Un esquema del plan de muestreo de las 13 toneladas de trigo limpio se observa en la figura V.2.

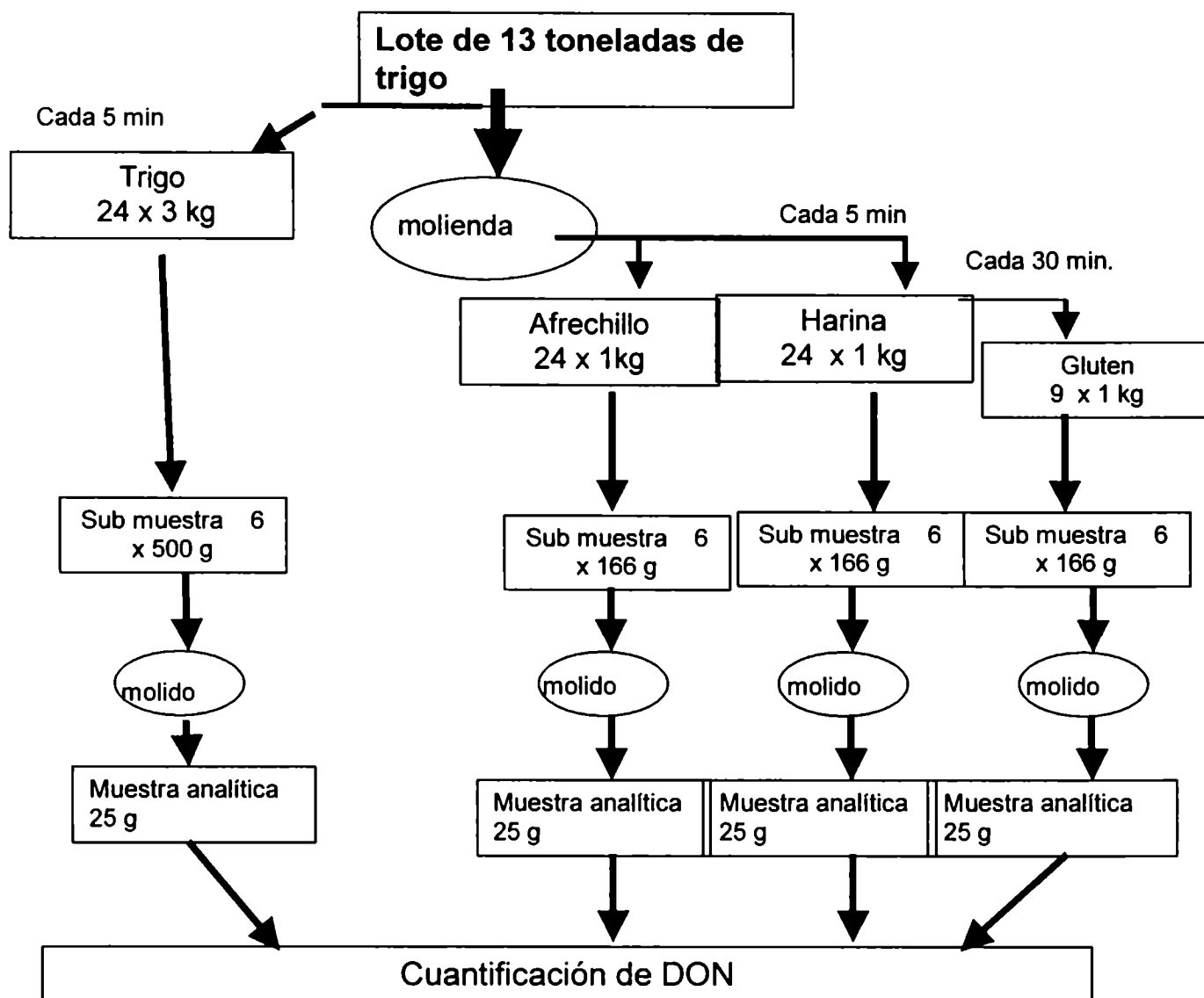


Figura V.2 Esquema de Muestreo

Experimento II

Se usó trigo proveniente de 6 camiones de aproximadamente 20 toneladas cada uno. Se tomaron 6 muestras de trigo sucio, seis de trigo limpio y seis de harina de trigo durante la molienda de 20 toneladas de trigo sucio.

V.2.b Metodología Empleada en la Cuantificación de Tricotecenos y Zearalenona.

Las muestras de trigo y afrechillo fueron molidas en un molino Romer antes de tomar la muestra analítica. El método utilizado en las distintas fracciones se encuentra resumido en la figura V.3 y el detalle del mismo se encuentra en el punto IV.2.d. El almidón se extrajo con una pequeña modificación que consistió en reemplazar el licuado por agitación mediante un agitador orbital (200rpm) durante 30 minutos, para obtener una mejor recuperación.

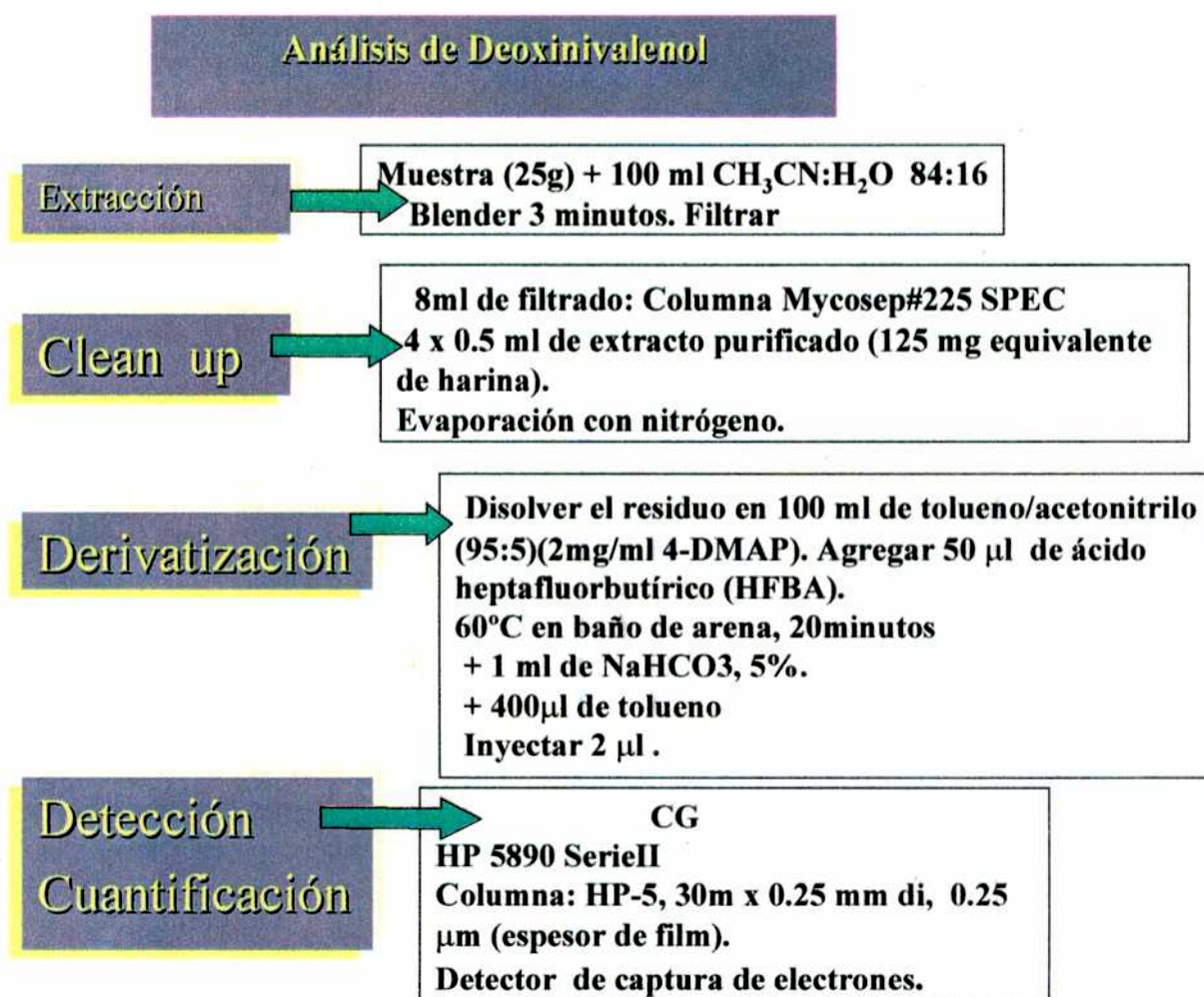


Figura V.3 Metodología analítica para la cuantificación de tricotecenos y zearalenona.

La recuperación promedio de DON fue de 80% en las muestras de trigo y afrechillo (2000 µg/kg), 90% en muestras de trigo (300 µg/kg) y almidón (100 µg/kg) y 85% en muestras de gluten (100 µg/kg). El límite de cuantificación de DON fue de 18 µg/kg.

En la tabla V.2 se encuentran detallados los límites de cuantificación para las otras toxinas analizadas.

Toxina	LOQ µg/kg
3-acetil DON	100
NIV	35
T-2	66
HT-2	59
DAS	93
Neo	65
T-2 tetraol	14
Zea	150

Tabla V.2: Límites de cuantificación

V.3 Resultados y Discusión

En la figura V.4 se muestra el ingreso de materia prima a la planta de molienda. El trigo es descargado luego de una limpieza a seco (figura V.1), a los silos (Figura V.5) donde permanecerá hasta su molienda. Durante la descarga de los camiones se toma la muestra de trigo sucio.



Figura V.4: Pesaje del trigo que ingresa a la planta.

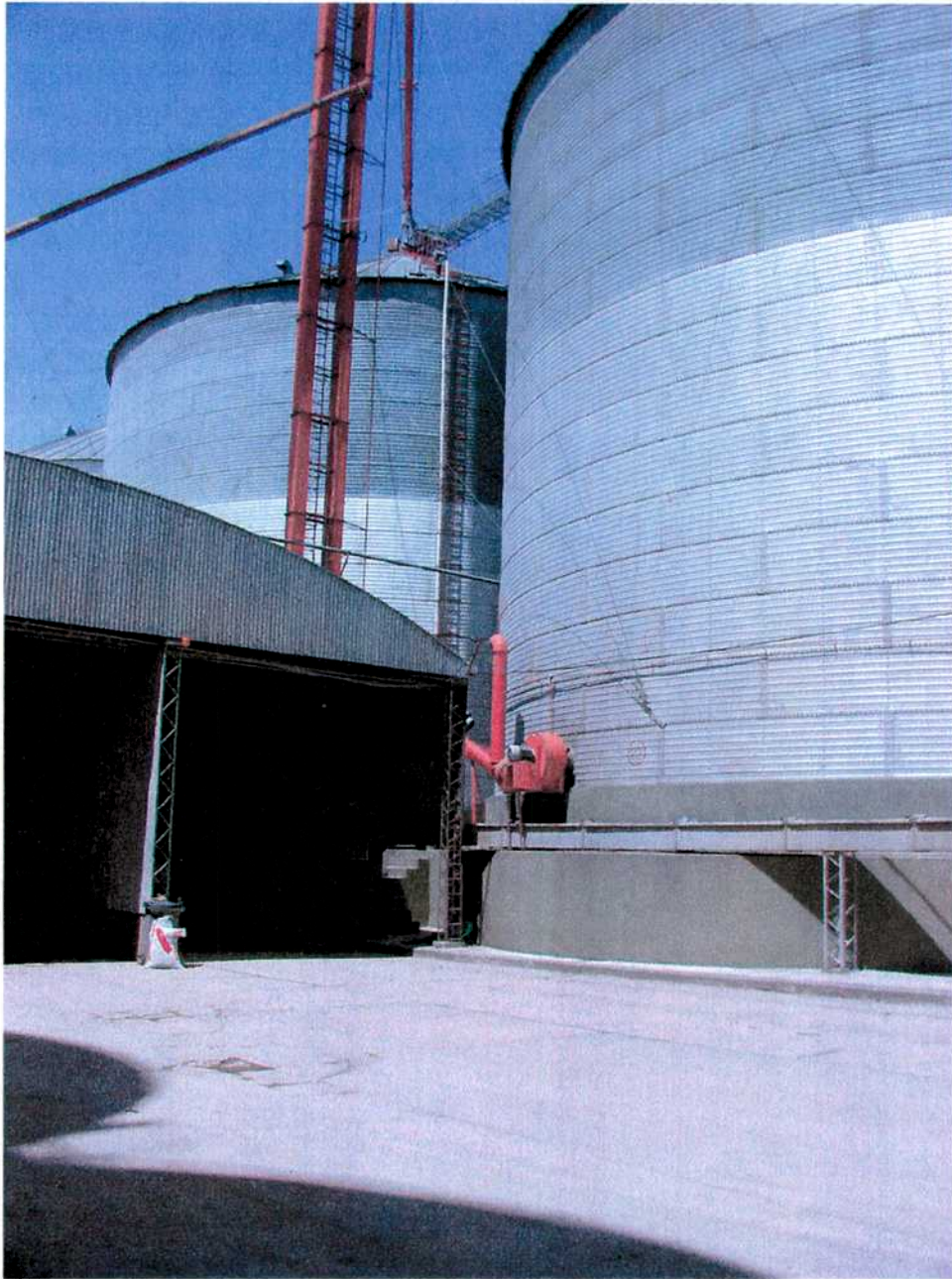


Figura V.5 Silos.

El trigo (Figura V.6) con un contenido de humedad de 12.5%, se acondiciona por el agregado de agua en tanques preparados a tal efecto para lograr una humedad del orden del 15%.



Figura V.6 Trigo previo a la molienda.

Se muestra en la Figura V.7 los tanques de menor capacidad.



Figura V.7 Tanques o silos de acondicionamiento.

Luego de reposar durante 20 horas, el material pasa por una zaranda y se separan los "screenings" (aproximadamente 1 %). Al pasar por la zaranda el movimiento mezcla el trigo y luego se continúa el acondicionamiento por 8 horas, previo agregado de agua para alcanzar 15,5% de humedad.

El trigo vuelve a pasar por una zaranda, previo a la molienda, pero el material de descarte de esta zaranda no se pudo muestrear (Basura 2 en la figura V.1). El trigo limpio obtenido luego de esta zaranda se muele (figura V.8) y se separa por una parte el afrechillo (figura V.9) y por otra parte, luego de sucesivos pasos (figura V.10) harinas de diferente grado de molienda (figuras V.11 y V.12).



Figura V.8 : Molino



Figura V.9 Afechillo



Figura V.10: Multizaranda



Figura V.11: Material luego de sucesivos pasajes por los molinos

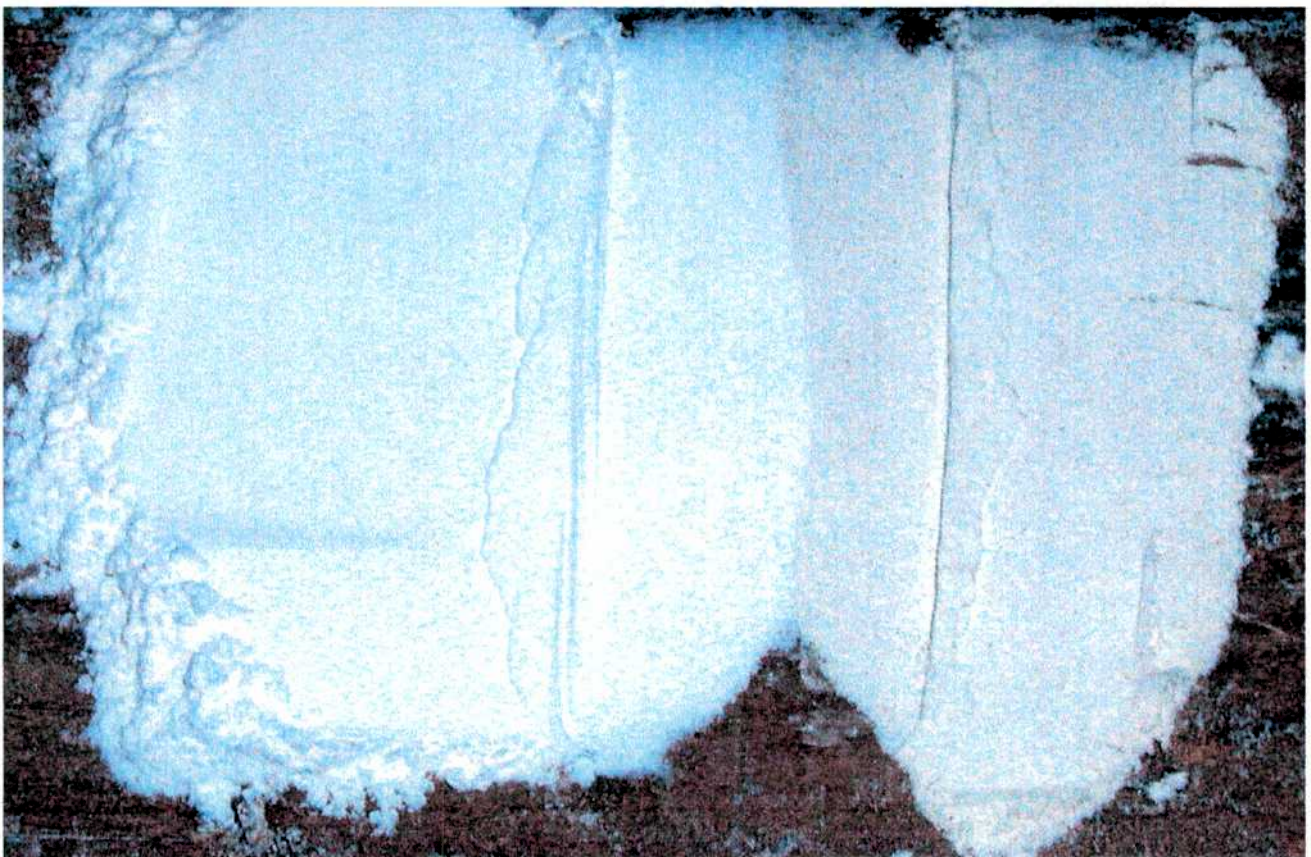


Figura V.12: Harina "0000" (izquierda) y harina "00" (derecha).

Experimento I:

El “screening” es la fracción que presenta la contaminación por DON más elevada (Tabla V.1), por esta razón se investigó la presencia de otras micotoxinas, producidas por *Fusarium*: zearalenona, 3-acetil-deoxinivalenol, nivalenol, neosolaniol, diacetoxiscirpenol, toxina T-2, toxina HT-2, T-2 tetraol, (cuyos límites de cuantificación se encuentran en la Tabla V.2) pero no se detectó ninguna de estas toxinas, por lo tanto no se analizaron en las otras fracciones. La baja recuperación de zearalenona, no permite asegurar la ausencia de esta toxina. En la figura V.13, se observan las cantidades de DON en el trigo y las diferentes fracciones, en función del tiempo del proceso de molienda.

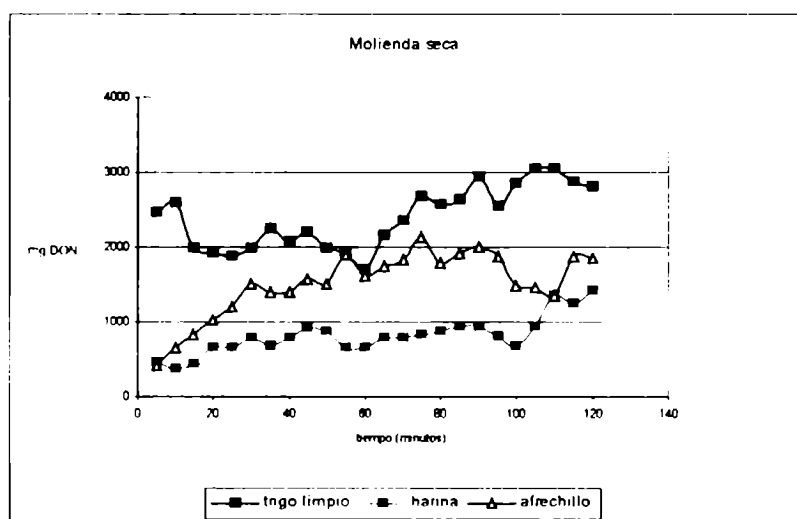


Figura V.13 Cantidad de DON en trigo, harina y afrechillo en función del tiempo de molienda

La Tabla V.3 muestra las contaminaciones de DON en trigo sucio, limpio y en las diferentes fracciones estudiadas.

**Tabla V.3 Resultados obtenidos en el proceso de limpieza y molienda de trigo.
(experimento I)**

	Rendimiento (%)	n	media mg/kg	RSD %	DON		Retención de DON En relación con	
					rango mg/kg	mg por 1000 Kg TS	Trigo sucio %	Trigo limpio %
Trigo sucio	100	5	5.86	20.3	4.2-7.4	5858	100	
Trigo limpio	101	24	2.41	17.3	1.7-3.1	2435	41.6	100
"Screenings"	1	7	27.37	16.9	21.4-41.6	274	4.7	
Afrechillo	26.05	24	5.85	28.9	1.6-8.3	1523	26.0	62.6
Harina	73.95	24	1.10	31.3	0.5-1.9	817	13.9	33.5

n = número de muestras

El 95.2% de DON presente en el trigo limpio se distribuyó entre el afrechillo y la harina (Tabla V.3) El trigo se controla cuando ingresa al molino, antes de la limpieza, por lo que es más conveniente comparar los resultados en relación al trigo sucio.

Es interesante observar que en la harina, sólo se retiene el 13.9 % de la contaminación por DON con respecto al trigo sucio.

El porcentaje de reducción de DON como consecuencia del proceso de limpieza fue de 58.4%.

El balance de masa de la contaminación por DON en la molienda seca, se expresa como

$$[DON]_{\text{trigo}} \times \text{masa}_{\text{trigo}} = [DON]_{\text{harina}} \times \text{masa}_{\text{harina}} + [DON]_{\text{afrechillo}} \times \text{masa}_{\text{afrechillo}} + \text{pérdida} \times [DON]_{\text{trigo}} \quad (1)$$

La masa de trigo se expresa como

$$masa_{trigo} = masa_{harina} + masa_{afrechillo} + masa_{agua} + pérdida \quad (2)$$

y los datos de rendimiento obtenidos en el molino permiten plantear

$$masa_{harina} = masa_{trigo} \times 0.80 \quad (3)$$

$$masa_{afrechillo} = masa_{trigo} \times 0.11 \quad (4)$$

$$masa_{agua} = masa_{trigo} \times 0.08 \quad (5)$$

$$pérdida = masa_{trigo} \times 0.01 \quad (6)$$

El reemplazo de los términos de la masa de las distintas fracciones en función de la masa de trigo nos permite obtener la ecuación

$$[DON]_{trigo} - ([DON]_{harina} \times 0.8 + [DON]_{afrechillo} \times 0.11 + [DON]_{trigo} \times 0.01) = reducción \quad (7)$$

Considerando que la planta tiene una pérdida de masa entre 1 a 2 % (basura, piedras, etc), los valores de la Tabla V.3 y el balance de masa de la contaminación, se puede afirmar, en coincidencia con otros autores (Scott y col.1983, 1984; Young y col. 1984), que no hay pérdida de toxina durante la molienda seca, sino que se distribuye en las diferentes fracciones que se obtienen (Figura V.14). Es conveniente tener en cuenta que, previo a la molienda se llevó a cabo una segunda limpieza sobre las que no se tomaron muestras.

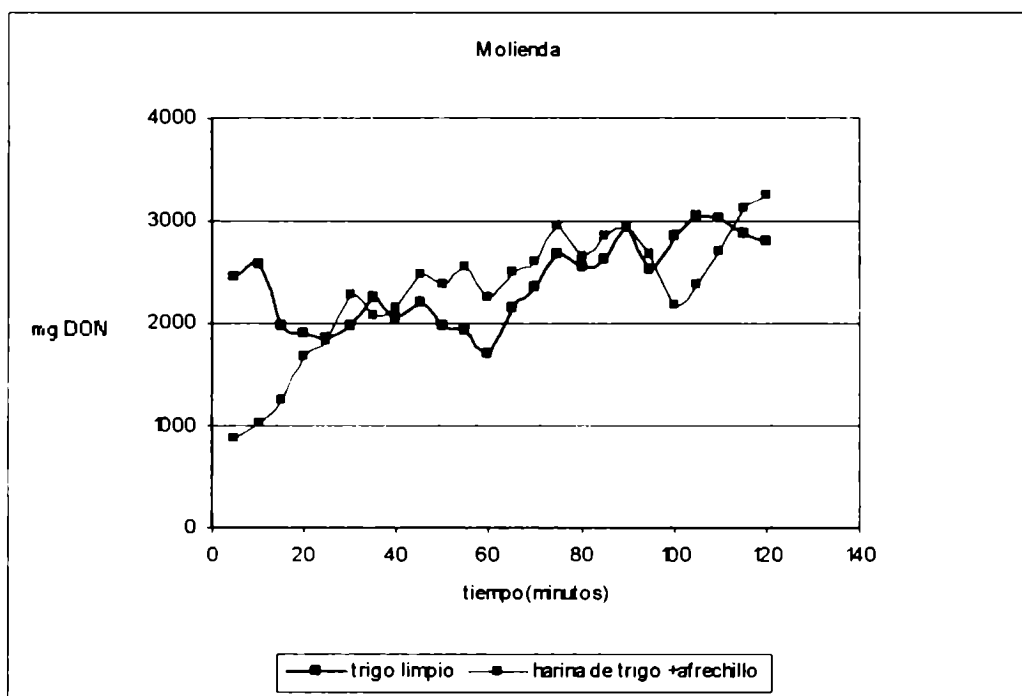


Figura V.14 Cantidad de DON en las muestras de trigo limpio y en la suma del contenido de DON en las muestras de trigo limpio y afrechillo.

La recuperación de DON durante el proceso de molienda fue muy consistente luego de un periodo de estabilización como se observa en la Figura V.14, donde se visualiza la cantidad de DON en cada muestra tomada cada 5 minutos durante la molienda de 13 ton de trigo limpio, comparado al contenido de toxina en trigo limpio sumado al contenido en harina y afrechillo.

La harina obtenida en la molienda seca fue procesada posteriormente para obtener gluten y almidón (Figura V.1). Los efluentes de la molienda húmeda (Figura V.15) no fueron analizados.

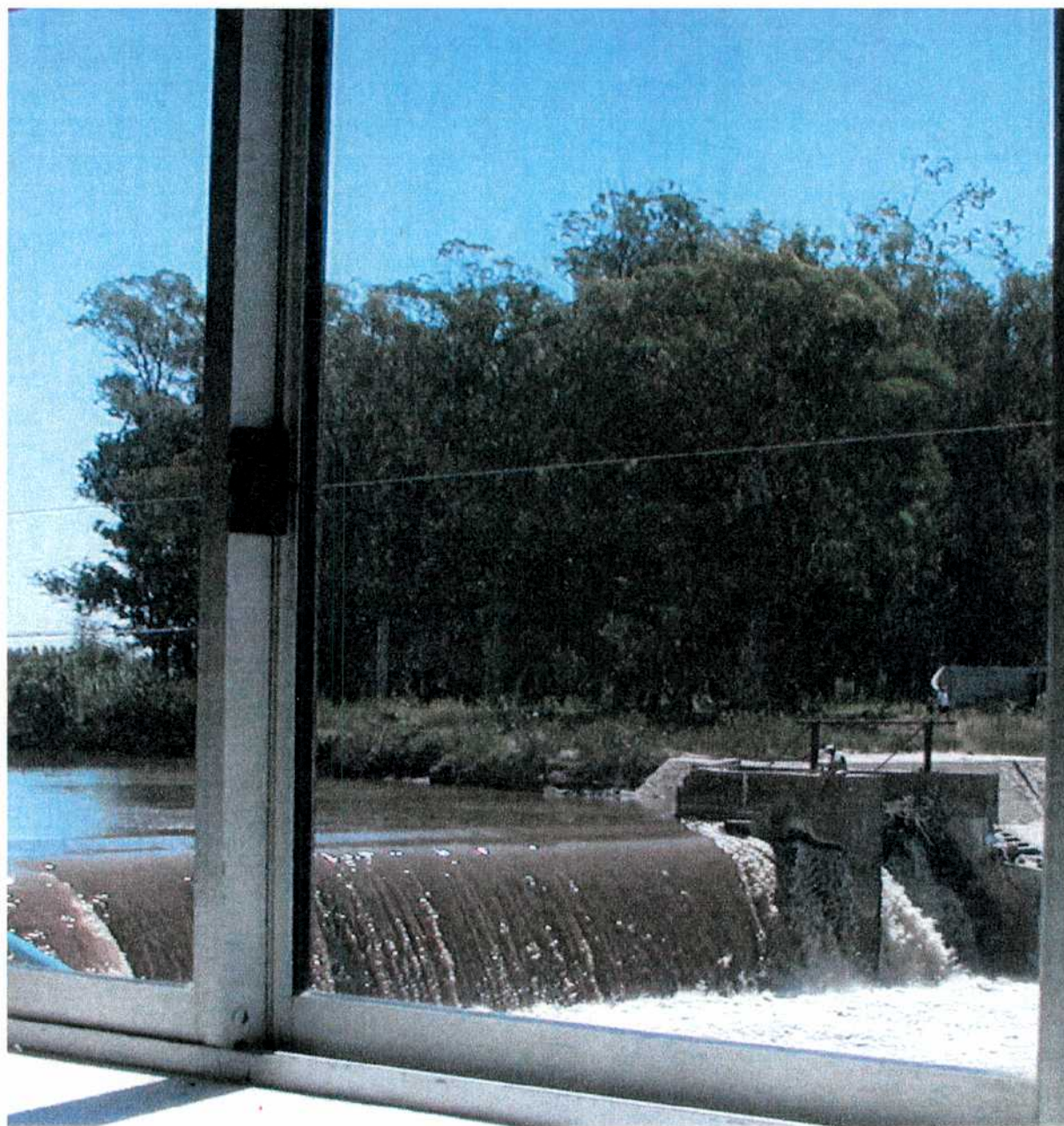


Figura V.15: Efluentes del proceso de obtención de gluten y almidón

No se detectó DON en ninguna de las muestras de almidón (Tabla V.4).

Tabla V.4: Resultados obtenidos en el proceso de producción de gluten y almidón

	Rendimiento (%)	n	DON			
			media mg/kg	RSD %	rango mg/kg	cantidad mg *
Harina	100	24	1.10	31.3	0.5-1.9	1100
Gluten	13	9	0.35	16.8	0.2-0.4	45.1
Almidón	65	9	ND	-	-	-
Efluentes	22	NA	-	-	-	-

n = número de muestras

* Basado en 1000 kg de harina

ND = no detectado

NA = no analizado

La concentración media de la contaminación por DON en las muestras de gluten fue de 0.35 mg/kg.

El balance de masa para el proceso de molienda húmeda es:

$$masa_{harina} = masa_{gluten} + masa_{almidón} \quad (1)$$

$$masa_{gluten} = masa_{harina} \times 0.15 \quad (2)$$

$$masa_{almidón} = masa_{harina} \times 0.85 \quad (3)$$

Balance de la contaminación.

$$[DON]_{harina} \times masa_{harina} = [DON]_{gluten} \times masa_{gluten} + [DON]_{almidón} \times masa_{almidón} + [DON]_{agua} \times masa_{agua} \quad (4)$$

De las ecuaciones 2,3, y 4 se obtiene:

$$[DON]_{harina} = [DON]_{gluten} \times 0.15 + [DON]_{almidón} \times 0.85 + [DON]_{agua} \times \frac{masa_{agua}}{masa_{harina}} \quad (5)$$

La concentración de DON en el agua de lavado se obtiene por diferencia. Se corrigieron los datos obtenidos de contaminación del gluten, teniendo en cuenta una recuperación de 85% y los datos de harina considerando la recuperación de 94%. Este balance permite afirmar que el lavado con agua durante el proceso, extrae el DON que pasa a los efluentes.

La retención de DON en el gluten fue de 0.6% en relación al trigo sucio y de 4.1% en relación a la harina.

Experimento II:

El efecto de la limpieza es difícil de evaluar por ello se decidió realizar un segundo experimento, en el que se tomaron seis lotes (Tabla V.5); se tomó una sola muestra por lote y se analizó por duplicado.

Tabla V.5 Lotes analizado para el experimento II

Muestra número	1	2	3	4	5	6
Procedencia :	Carcaraña	Ordoñez	Alicia	Cañada de Gómez	La Playosa	Pueblo Muños
Humedad	13,20%	12,80%	11,70%	14,00%	11,90%	12,50%
Peso H.	76,6	79,3	75,5	75,00	78,4	78,40
Gluten	35,00%	31,30%	38,50%	33,80%	33,70%	36,00%
Proteína	13,48%	12,27%	14,52%	12,85%	13,08%	13,45%
"Falling Number"	413	457	500	365	443	388
<i>Fusarium</i>	3,50%	1,60%	2,60%	3,00%	2,50%	2,70%

Aunque los lotes de trigo sucio, analizados en este segundo experimento, presentaban el mismo nivel de contaminación que el trigo analizado en el primer experimento, la reducción en la contaminación de DON durante el proceso de limpieza (9 %, Tabla V.6) fue diferente al experimento I, cuya reducción con respecto al trigo sucio se estimó en 58.4% (Tabla V.3). La diversidad de resultados en relación con la reducción de DON durante la limpieza del trigo fue atribuida a diferentes grados de infección por *Fusarium* (Seitz y col.. 1985).

Tabla V.6: Resultados obtenidos en el proceso de limpieza y molienda del trigo (Experimento II). Rendimiento en harina = 73.5%.

	n	DON			Retención de DON
		media	RSD	cantidad	
		mg/kg	%	mg *	(%)
Trigo sucio	6	5.7	17	5741	100
Trigo limpio	6	5.2	25	5237	91
Harina	6	1.3	20	940	16

n= número de muestras
Basado en 1000 kg de trigo sucio

A pesar de las diferencias mencionadas es interesante destacar que se encontraron valores similares de retención de DON en harina respecto de la concentración en trigo sucio: 13.9 para el experimento I y 16% para II.

V.4 Conclusión

Este es el primer estudio que cuantifica la retención de DON en gluten; así como el primero sobre la distribución de esta toxina, durante la molienda en un molino argentino.

Ya que es inevitable la presencia de DON en el trigo cuando las condiciones climáticas son adversas, estos resultados aportan una herramienta para establecer los valores de contaminación por deoxinivalenol que puedan ser procesados.

La Tabla V.7, muestra los valores esperables en las diferentes fracciones, a partir del ingreso de trigo sucio con una contaminación conocida, basada en los datos del proceso de la planta de molienda donde se llevó a cabo este estudio.

Tabla V.7: Concentración de DON en ppm esperable en cada fracción a partir de determinada contaminación del trigo sucio:

Muestra	[DON] ppm				
	1	2	3	5	10
trigo sucio					
trigo limpio	0.41	0.82	1.23	2.06	4.11
Harina	0.19	0.38	0.56	0.94	1.88
afrechillo	1.00	2.00	2.99	4.99	9.98
glúten	0.06	0.12	0.18	0.30	0.60

VI. ESTABILIDAD DE DON DURANTE LA FRITURA DE TAPAS DE EMPANADAS

VI.1. Introducción

Como se discutió en I.1, el deoxinivalenol es una micotoxina que se encuentra frecuentemente en alimentos, especialmente en aquellos elaborados a base de cereales. Ciertos productos tales como la harina de trigo son susceptibles a estar contaminados con este metabolito secundario, ya que los hongos capaces de producirlo (ej. *Fusarium graminearum*) se aíslan frecuentemente del grano entero y en los subproductos de aquel.

Se ha mostrado que productos de panadería están frecuentemente contaminados, por ej. en la tabla VI.1 y VI.2. se ven ejemplos de los valores de contaminación por DON obtenidos en distintos productos de consumo masivo en Argentina.

Tabla VI.1. Contaminación por DON en diferentes productos de panadería expresado en base seca (Pacín y col.; 1997)

Productos	Muestras contaminadas/total	promedio (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Sobre muestras positivas (µg/kg)	
				Mínimo	Máximo
Medialunas de manteca	8/8	453.1	395.5	326	648
Medialunas de grasa	4/5	377.0	429.0	336	563
Figazas	8/8	851.4	387.0	212	2800
Pan francés	10/12	263.2	294.0	198	436
Pan casero	4/4	326.5	326.5	269	384
Libritos	4/4	581.0	545.5	210	1023

**Tabla VI.2. Niveles de DON en cerveza
(Moltó y col.; 2000)**

Fecha	Muestras contaminadas (total)	Promedio (ng/ml)	Mediana (ng/ml)
1997	8/9	51	16
1998	8/26	7	0
1999	6/14	5	0

Debido a las costumbres culinarias, que varían de país en país, y considerando que en la Argentina se consumen cantidades apreciables de alimentos elaborados con trigo, es importante establecer cuales procesos son capaces de disminuir la contaminación por DON.

Se han realizado estudios sobre el comportamiento del DON durante la elaboración de alimentos tales como la panificación (Neira y col., 1997), y los trabajos previos mostraron un efecto positivo al aumentar la temperatura de fermentación en cuanto a la reducción de DON (ver tabla VI.3.):

Tabla VI.3. Reducción de la contaminación (%) de DON para pan francés y para pan de Viena a distintas temperaturas y tiempos de fermentación (contaminación inicial 150 µg/kg, SD=28. (Samar y col. ; 2000)

Tipo de pan	Temperatura (°C)	Tiempo de fermentación (minutos)	DON (µg/kg ⁻¹)	SD	Reducción DON (%)
Pan francés	30	30	146	17	0
		60	154	5	0
	40	23	127	28	15
		45	89	15	40
	50	20	106	19	29
		40	89	5	41
Pan de viena	30	45	153	14	0
		90	112	3	25
	40	35	120	2	20
		70	96	6	36
	50	30	76	12	49
		60	66	27	56

En otro estudio, se evaluó la presencia de deoxinivalenol en las distintas etapas de la fabricación de tapas de empanadas para horno y para freír, desde las materias primas hasta el producto final a la fecha de vencimiento, con el objetivo de evaluar el efecto del procesamiento en la estabilidad de la toxina en una planta de procesamiento nacional.

El control de los factores de proceso que tienen incidencia directa o indirecta sobre dicha contaminación permitirá disminuir el contenido de micotoxinas de los alimentos más representativos de la dieta, pero no se han encontrado referencias sobre la influencia del proceso de fritura en particular, en la estabilidad y niveles de dicha micotoxina en los productos anteriormente mencionados.

La tapa de empanada es una masa cruda, achatada y con forma de disco, cuyo componente principal es la harina de trigo, que se utiliza para la elaboración de empanadas. Dicho alimento se prepara con distintos tipos de rellenos que se envuelven con la tapa y se cocinan al horno, o friendo en aceite.

Se presentan en envases del tipo termoformado cerrados con un film flexible pero sin ningún tipo de atmósfera modificada. Cada envase contiene varias unidades separadas con films de polietileno. El producto debe conservarse entre 2 y 8°C siendo su vida útil de 25 días. El consumo promedio diario de tapas de empanada varía entre 135 y 217 gr considerando solamente a los consumidores según la encuesta de consumo de alimentos en la población realizada en la Universidad de Luján (Pacín y col., 1998).

La Ingesta Diaria Máxima Tolerable Provisional (IDMTP) según la última actualización del JECFA (2001) es de 1 µg/kg p.c./día, por lo tanto, para una persona de 70 kg de peso que consuma 217 gr de tapas de empanadas diariamente, la contaminación máxima de dichas tapas no debería superar una concentración de DON de 322,6 µg/kg.

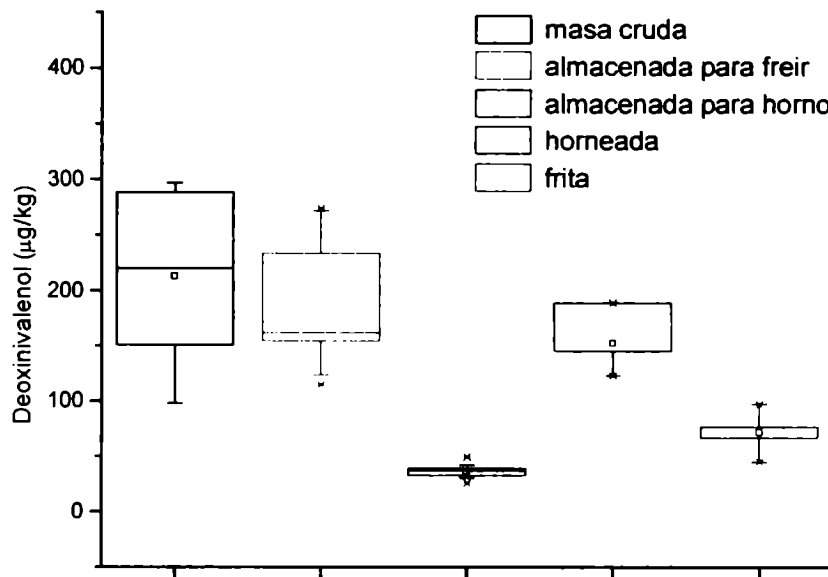


Figura VI.1. Box plot de la contaminación de DON en tapas de empanadas en distintos estadios del procesamiento.

(Pelo, D.; Pacin, A. y Samar, M., Comunicación personal; 2003)

La masa horneada no presenta diferencias significativas con respecto a la masa cruda mientras que la masa frita presentó una diferencia significativa con respecto a la misma masa cruda. Como durante el proceso de fritura la masa es sometida a condiciones de proceso diferentes que durante la cocción en horno, en especial en lo que respecta a la temperatura, esta reducción de la contaminación podría deberse a las condiciones del proceso. Pero como el número de muestras tanto horneadas como fritas fue reducido, y en algunas muestras de masa cruda se encontraron valores muy bajos de contaminación, no es posible con este único experimento cuantificar el efecto sobre la toxina.

A partir de la observación que se podría producir degradación de la toxina en el proceso de fritura se diseñó una experiencia a escala de laboratorio para confirmar esta hipótesis.

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar la estabilidad del DON durante la fritura de masa de empanadas elaborada con harina contaminada por dicha

micotoxina y evaluar posibles modificaciones en las variables operacionales que permitan minimizar el nivel de contaminación.

VI.2. Materiales y Métodos

VI.2.a. Materiales y reactivos

VI.2.a.1. Equipamiento

- a) *Freidora*. — Yelmo cilíndrica, capacidad 10 litros.
- b) *Estufa de vacío*. — LAB-Line DUO VAC OVEN Modelo 3610-1
- c) *Desecador*. — Scienceware, Bel-Art Products, Modelo F42025
- d) *Termocupla calibrada*. — CHY 502 tipo K
- e) *Espectrofotómetro*. — Minolta Modelo CM-508d
- f) *Homogeneizador*. — Osterizer
- g) *Columna de limpieza*. —columna Mycosep N° 225 (Romer Labs, Inc.).
- h) *Cromatógrafo gaseoso (CG o GC)*.— Hewlett-Packard Model 5890 Serie II equipado con un muestreador automático, controlador HPG1512 A, módulo de inyección HPG1513A, detector de captura de electrones (ECD o CDE) y para el análisis de datos un HP3398A GC-ChemStation.
- i) *Columna CG*.— columna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espesor de película).
- j) *Bloque de calentamiento*.— baño de arena equilibrado a 62 ± 2 °C

VI.2.a.2. Reactivos

- a) *Solventes*. — grado "cromatografía líquida" metanol, tolueno, acetato de etilo y acetonitrilo (Merck).
- b) *Estándar de Deoxinivalenol*. —Sigma Chemical Co. St. Lois, MO.
- c) *4-(N,N-dimetilamino)-piridina (DMAP)*. — Sigma Chemical Co. St. Lois, MO.

- d) *Anhídrido Heptafluorobutírico (HFBA)*. —Sigma Chemical Co. St. Lois, MO.
- e) *Bicarbonato de sodio*. —solución acuosa 5% (w/v) (Merck)
- f) *Catalizador*. — 2 mg/ml de 4-DMAP en tolueno : acetonitrilo (80:20).

VI.2.b. Métodos

VI.2.b.1 Elaboración de las Tapas de Empanadas

Se utilizaron dos diferentes harinas en la preparación de los discos o tapas de empanadas:

1. harina naturalmente contaminada por DON (1200 µg/kg).
2. harina no contaminada: se agregó estándar de DON para tener una concentración de toxina de 260 µg/kg.

La masa se preparó utilizando como ingredientes 500 g de harina, 75 g de grasa bovina comestible y 207 g agua. Los mismos se mezclaron manualmente y la masa se colocó en un recipiente plástico, se dejó reposar durante 15 minutos y a continuación se procedió al amasado para obtener tapas de empanadas de 10 cm of diámetro, 2 mm de ancho y 30 g de peso de apariencia suave y de consistencia no pegajosa. Paralelamente, y mediante el mismo procedimiento, se prepararon tapas de empanadas con harina no contaminada con el objeto de determinar las pérdidas de humedad y desarrollo de color durante el tiempo de cocción.

La fritura de los discos se realizó en aceite vegetal en una freidora con control de temperatura a diferentes tiempos. Las tres temperaturas fueron medidas con una termocupla calibrada (169 °C, 205 °C y 243 °C). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado con excepción del punto inicial y final de las tapas donde la concentración de toxina se analizó por quintuplicado. Se utilizaron tres muestras de masa no contaminada cocida como controles negativos y tres muestras de masa contaminada no tratada (cruda) como controles positivos.

VI.2.b.2. Determinación de la Humedad de las Tapas

Se determinó la curva de humedad en función del tiempo de cocción a cada temperatura, utilizando masa no contaminada. De esta manera se pudo calcular la humedad en los tiempos elegidos de cocción. Conocida la humedad, se calcularon las cantidades de acetonitrilo y agua necesarios para mantener una relación 84:16 durante el proceso de extracción.

La metodología utilizada fue la siguiente: Se pesaron 2 g de muestra y se colocaron en un pesafiltro para su secado en estufa de vacío a 60 °C hasta peso constante ($\Delta P < 0.05\%$). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

VI.2.b.3. Mediciones de Color

Las mediciones se realizaron en ambos lados de las tapas sometidas al tratamiento descrito en VI.2.a.3.b.

Los cálculos se hicieron con el iluminante estandar CIE y las funciones de color se calcularon a partir de los valores X, Y, y Z mediante las siguientes ecuaciones:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

Luminosidad:

$$L^*_{ab} = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16$$

$$u' = \frac{4X}{X + 15Y + 3Z}$$

$$v' = \frac{9Y}{X + 15Y + 3Z}$$

$$u^* = 13 \times L^* \times (u' - u'_n)$$

$$v^* = 13 \times L^* \times (v' - v'_n)$$

Saturación métrica:

$$s_{uv} = 13 \times \left[(u' - u'_n)^2 + (v' - v'_n)^2 \right]^{1/2}$$

$$a^* = 500 \times \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right]$$

$$b^* = 200 \times \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right]$$

Croma métrico:

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Angulo de tono:

$$h_{ab} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

Diferencia de color CIE 1976:

$$\Delta E_{ab}^* = \left[(\Delta L_{ab}^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2}$$

Diferencia de ángulo de tono:

$$\Delta H_{ab}^* = \left[(\Delta E_{ab}^*)^2 + (\Delta L_{ab}^*)^2 + (\Delta C_{ab}^*)^2 \right]^{1/2}$$

Δ = diferencia entre la muestra y el estándar ("tapa" no cocida)

Indice de Browning:

$$BR = \frac{100 \times (x - 0.31)}{0.172}$$

$$\text{donde: } x = \frac{X}{X + Y + Z}$$

VI.2.b.4. Determinación del Punto Final de Cocción por Colorimetría

Las tapas de empanadas no son superficies de cromaticidad uniforme, por ello se determinó por duplicado el color en ambas caras de las tapas de empanadas fritas a diferentes tiempos de cocción (4 tiempos) para cada temperatura (3 temperaturas) y en la masa cruda (total= 26 muestras). Se calculó la mediana de los valores medidos X, Y y Z de cada lado de las muestras. Luego la mediana de los dos lados y por último la mediana de los duplicados de cada tiempo y temperatura. Sobre estos valores se calcularon las funciones de color.

VI.2.b.5. Análisis de deoxinivalenol (DON)

VI.2.b.5.a. Extracción y derivatización

La determinación de DON se realizó sobre las muestras que fueron conservadas a -18°C hasta el momento de ser analizadas.

La extracción de las muestras se realizó según como lo describió Trucksess y col. (1996) con pequeñas modificaciones. Se pesaron 25 g de los discos de empanadas y se colocaron en un vaso de licuadora a la cual se adicionó a continuación 100 ml de una mezcla de acetonitrilo : agua (84:16). La cantidad de agua que se agregó a dicha mezcla se calculó en función del contenido de humedad de las tapas. Se procedió a la extracción mediante licuado durante 3 minutos.

La limpieza y extracción se realizó para las muestras con contaminación natural (1200 $\mu\text{g/kg}$) como se describe a continuación: 8 ml del extracto de cada una de las muestras se colocó en un tubo de cultivo de 8x15 mm y se pasaron sucesivamente 4 porciones de 0.5 ml a través de una columna Mycosep 225 (Romer Labs. Inc., MO, USA).

Para determinar la recuperación de DON de las tapas de empanadas se trabajó con dos niveles de contaminación y un control de masa no contaminada por triplicado.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla VI.4.

nivel de contaminación $\mu\text{g/kg}$	% Recuperación	
	masa cruda	masa cocida
50	ND	ND
300	$88\% \pm 20$	$74\% \pm 13$

Tabla VI.4. Recuperación de DON

Como se puede observar, el método no permite trabajar a niveles bajos de contaminación (baja sensibilidad, altos límites de detección y cuantificación). Debido a que la presencia de aceite disminuye la recuperación en la masa cocida, se realizaron diversas pruebas para mejorar la recuperación. Se probó realizar una extracción con hexano del extracto de acetonitrilo : agua; una extracción con hexano previo al agregado de acetonitrilo : agua; y se probaron diferentes columnas de limpieza. Se observó que las mejores recuperaciones para bajas contaminaciones se consiguen con una columna de inmunoafinidad, y esta metodología se aplicó sólo a las tapas contaminadas por agregado de toxina con niveles equivalentes a $260 \mu\text{g/kg}$. Las columnas de inmunoafinidad no se pudieron aplicar a contaminaciones mayores ($1200 \mu\text{g/kg}$) debido a que era superada la capacidad de retención de la columna a esos niveles de contaminación.

Por ello la extracción (para las tapas que presentaban baja contaminación inicial de la harina utilizada como materia prima en su fabricación) entonces se realizó de la siguiente manera:

Se pesaron 25 g de los discos de empanadas y se colocaron en un vaso de licuadora a la cual se adicionó a continuación 100 ml de agua con 5 g de PEG. Se procedió a la extracción mediante licuado durante 1 minuto. Se filtra por papel de filtro tipo Whatman N°1 y por filtro de microfibra antes de pasar por la Columna de inmunoafinidad Vicam. Se aplican 2 ml del filtrado en la columna manteniendo un flujo constante de 1 gota/ seg. Se lava con 5 ml de agua destilada manteniendo un flujo de 2 gotas por segundo. Se deja eluir

completamente el líquido de lavado y se eluye la toxina con 1.5 ml de metanol manteniendo un flujo constante de 1 gota por segundo.

Los extractos obtenidos por ambas metodologías se llevan a sequedad con vacío en un baño de agua a 60 °C y se almacenaron a -18 °C.

Los extractos secos fueron derivatizados como fuera descrito por Croteau y col.(1994). En la figura VI.2 se muestra un diagrama de flujo de la metodología utilizada.

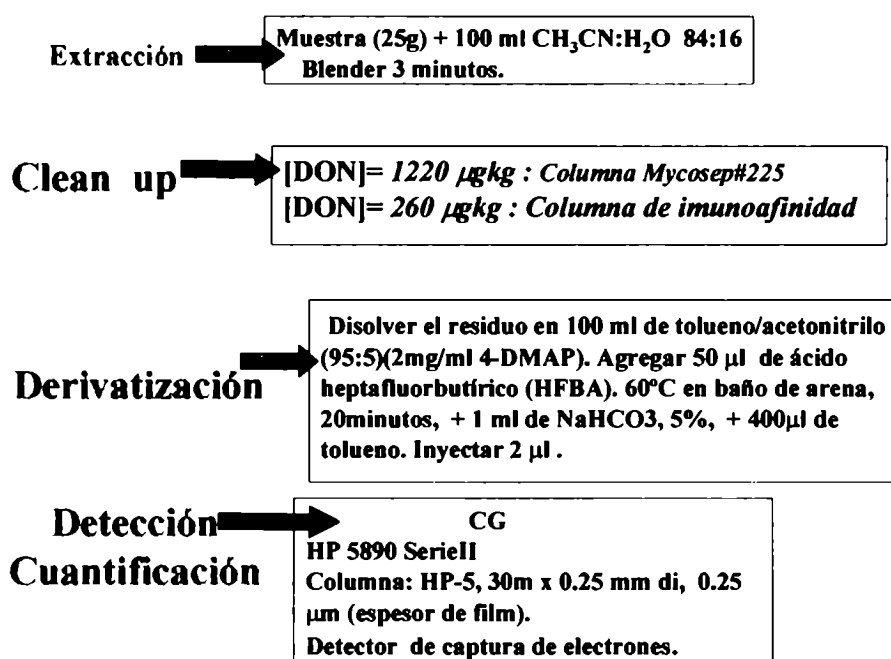


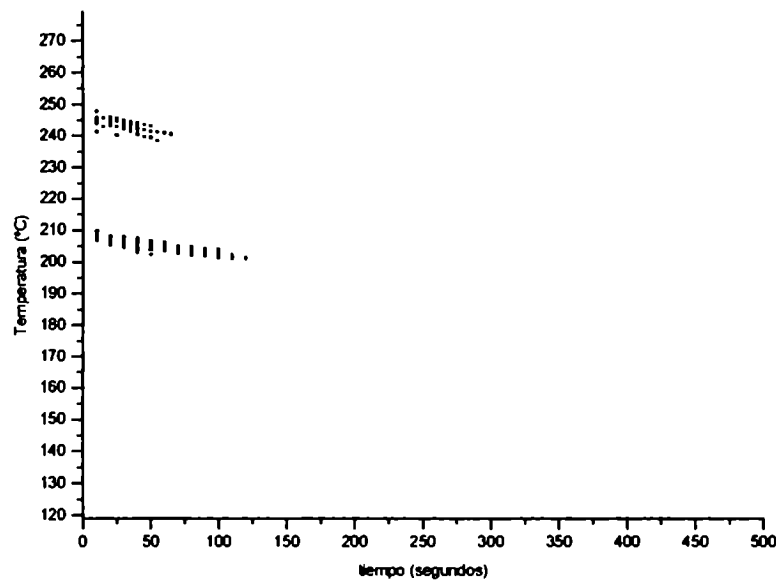
Figura VI.2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el análisis de DON por Cromatografía Gaseosa

La separación cromatográfica fue realizada de acuerdo a lo descrito en el punto IV.2.d.3. (LOD= 9 µg/kg, LOQ= 12 µg/kg). La cuantificación de las muestras se realizó mediante el método de estándar externo, con curvas de calibración construidas en rango de 40 a 100 pg de DON inyectados.

VI.3. Resultados y discusión

Se midió la variación de la temperatura del aceite durante la cocción de las tapas de empanadas con la termocupla calibrada, que en el rango de trabajo tiene una precisión de $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Esta medida se realizó a las tres temperaturas elegidas, para la cocción de 14 muestras de tapas de empanadas a cada temperatura de trabajo (total 42 muestras), durante el tiempo de cocción establecido para cada una. El tiempo inicial corresponde a la introducción de la muestra en el aceite. En la figura VI.3 se observan las variaciones obtenidas para cada temperatura.

Figura VI.3.:Temperatura del aceite durante la fritura



Las curvas de humedad obtenidos se presentan en la figura VI.4.

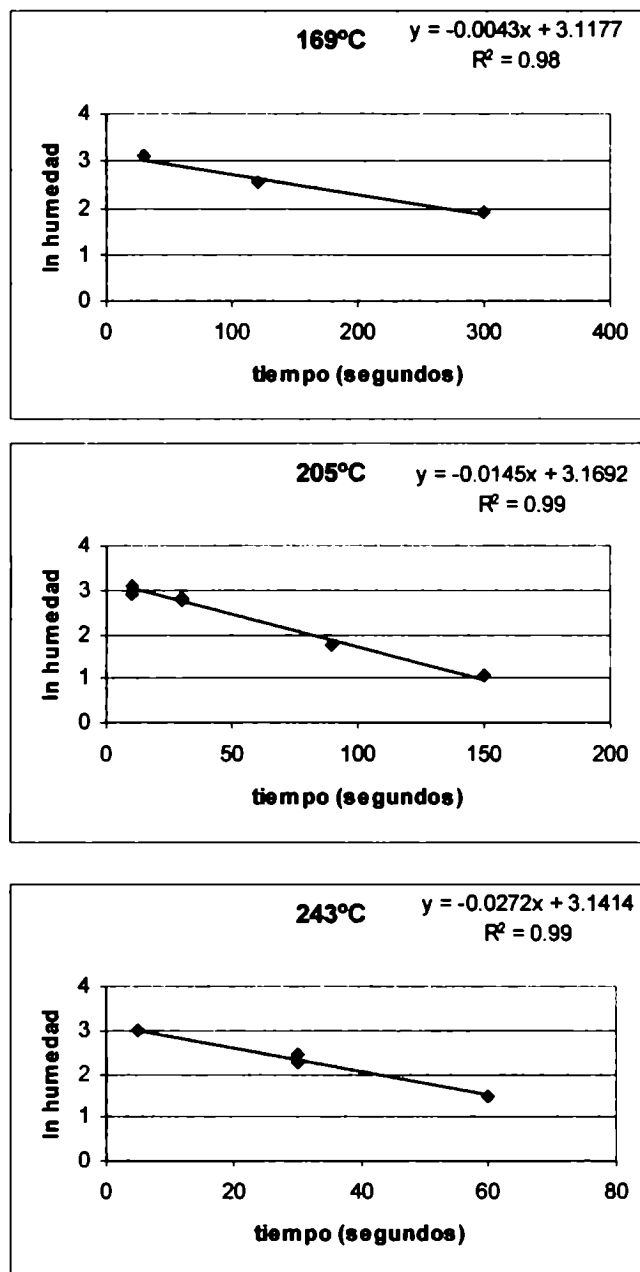


Figura VI.4. : Variación de la humedad en función del tiempo de cocción para tapas de empanadas a distintas temperaturas de cocción.

Se estudió la cinética de pardeamiento midiendo la evolución del color de la fritura para establecer el tiempo final de cocción a cada temperatura de acuerdo al desarrollo de color. En la figura VI.5 se observan tapas de empanadas con distinto grado de cocción.

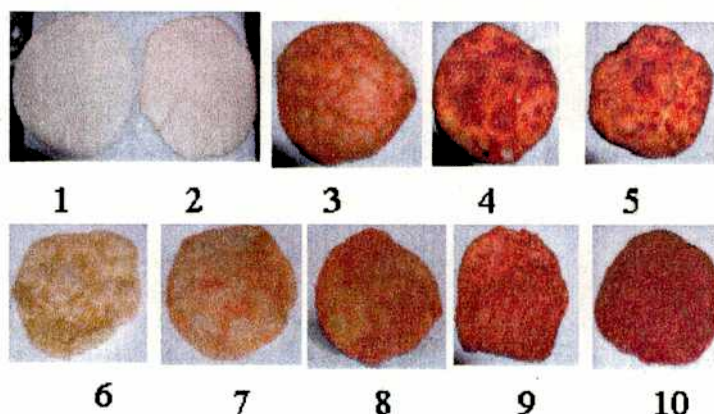


Figura VI.5. : Color adquirido por las tapas en los distintos tratamientos aplicados

1. masa cruda no contaminada
2. masa cruda [DON]= 1000 $\mu\text{g/kg}$
3. masa cocida no contaminada, 15 minutos a 169°C
4. masa cocida contaminada, 2.5 minutos a 205°C
5. masa cocida contaminada, 1 minuto a 243°C
6. masa cocida contaminada, 0.5 minutos a 169°C
7. masa cocida contaminada, 2 minutos a 169°C
8. masa cocida contaminada, 5 minutos a 169°C
9. masa cocida contaminada, 9 minutos a 169°C
10. masa cocida contaminada, 15 minutos a 169°C

VI.3.a. Efecto del Tiempo de Tratamiento Sobre el Desarrollo del Color a las Tres Temperaturas de Cocción: Cinética de la Reacción de Pardeamiento.

Se midió el color de acuerdo a lo descrito en el punto VI.2.b.3 y las funciones de color calculadas fueron graficadas en función del tiempo de cocción a las tres temperaturas estipuladas en el diseño experimental (figura VI.6).

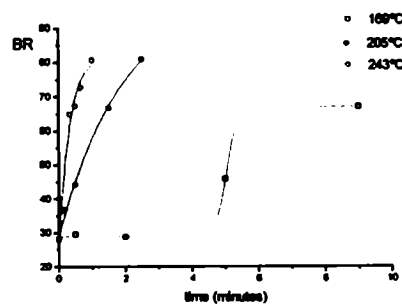
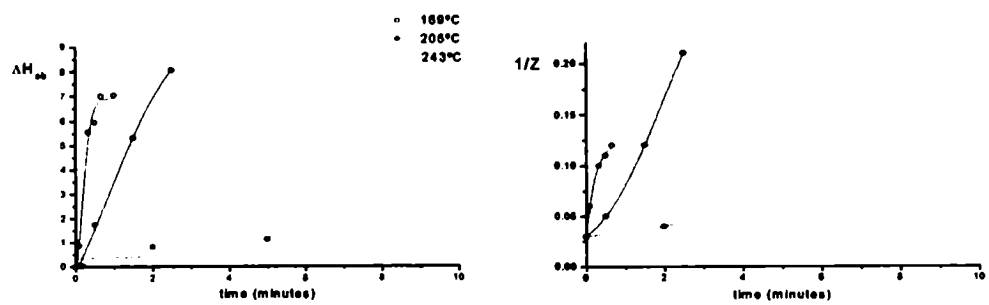
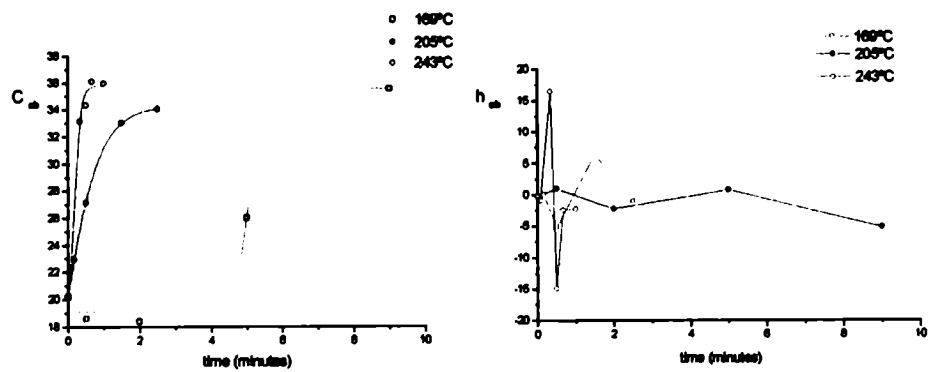
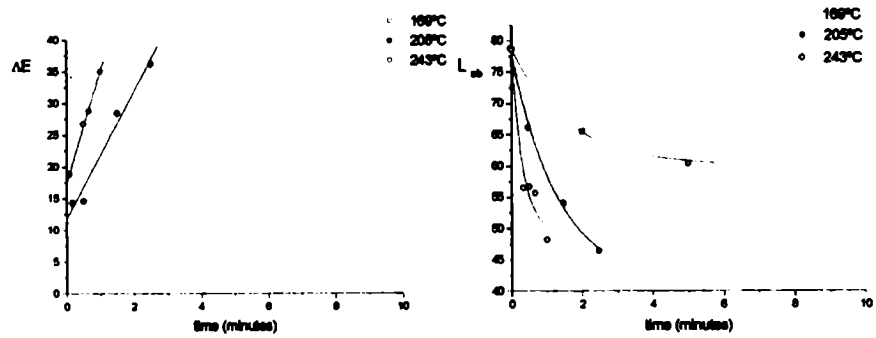


Figura VI.6: Funciones de color calculadas a partir de las lecturas colorimétricas realizadas en las tapas de empanadas vs tiempo de cocción.

En la figura VI.7 se graficó la saturación métrica s_{uv} en función del tiempo a las tres temperaturas de trabajo utilizando como valores de referencia u_0 y v_0 los valores de masa cruda. La s_{uv} es una función de color adecuada para describir los cambios de color durante el pardeamiento no enzimático en soluciones acuosas (Petriela y col ,1985).

$$s_{uv} = 13 \left[(u' - u_0)^2 + (v' - v_0)^2 \right]^{1/2}$$

donde

$$u' = \frac{4X}{X + 15Y + 3Z}$$

$$v' = \frac{9Y}{X + 15Y + 3Z}$$

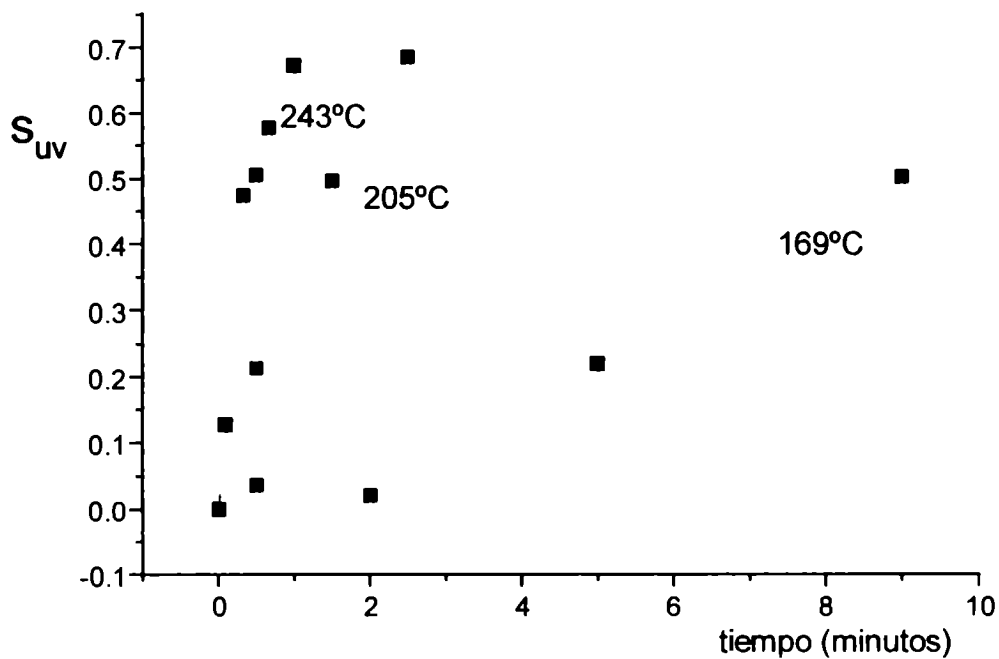


Figura VI. 7: Efecto del tiempo de tratamiento sobre el desarrollo de color expresado como S_{uv} a las tres temperaturas de cocción

La curva obtenida del gráfico s_{uv} en función del tiempo parece indicar que hay contribuciones de diferentes ordenes de reacción lo que resultaría en un orden fraccionario. La ecuación de Boltzman $y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$ ajusta adecuadamente los puntos experimentales obtenidos a las tres temperaturas, según se muestra en la tabla VI.5.

Sigmoidal(Boltzman) fit to Data243

Chisqr 0.00182

Init(A1)	-3.8163	31.7	
Final(A2)	0.68199	0.0884	
XatY50(x0)		-0.50895	2.88
Width(dx)	0.29686	0.269	
XatY20	-0.92048		
XatY80	-0.09742		

Sigmoidal(Boltzman) fit to Data205

Chisqr

Init(A1)	-4.5845	
Final(A2)	0.93126	
XatY50(x0)		-2.7445
Width(dx)	1.7157	
XatY20	-5.12291	
XatY80	-0.36609	

Sigmoidal(Boltzman) fit to Data169

Chisqr 7.06777E-4

Init(A1) 0.017087 0.0235

Final(A2) 0.50759 0.0402

XatY50(x0) 5.2678 0.446

Width(dx) 0.77961 1.09

XatY20 4.18699

XatY80 6.34852

Tabla VI.5. Ajuste de la ecuación de Boltzman

Se decidió utilizar esta función para el cálculo de la Energía de activación pero se prefirió, tal como se observa en la figura VI.8, el ΔE para el cálculo del tiempo final de cocción debido a la linealidad de esta función respecto a la temperatura, ya que la variación de color durante la fritura de las tapas de empanadas se encuentra sobre la misma curva de desplazamiento cromático, tal como se ve en la figura VI.9

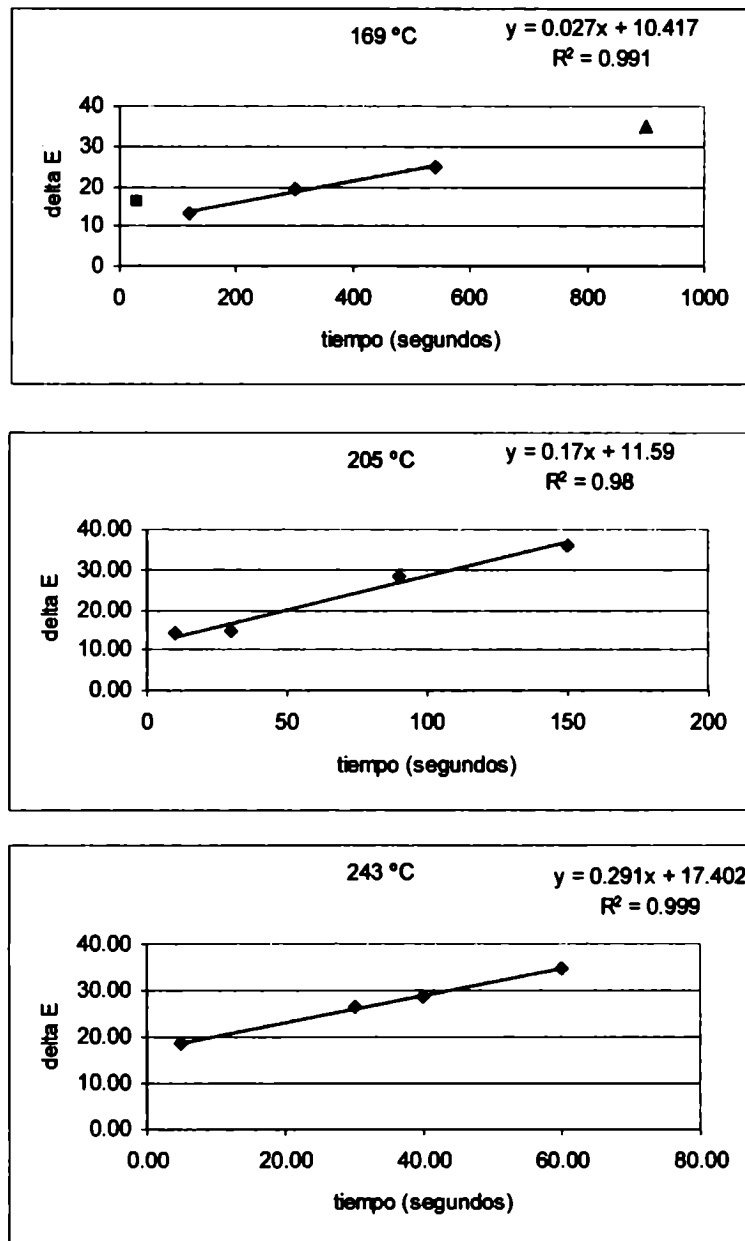


Figura VI. 8: Variación de la energía de activación a las distintas temperaturas

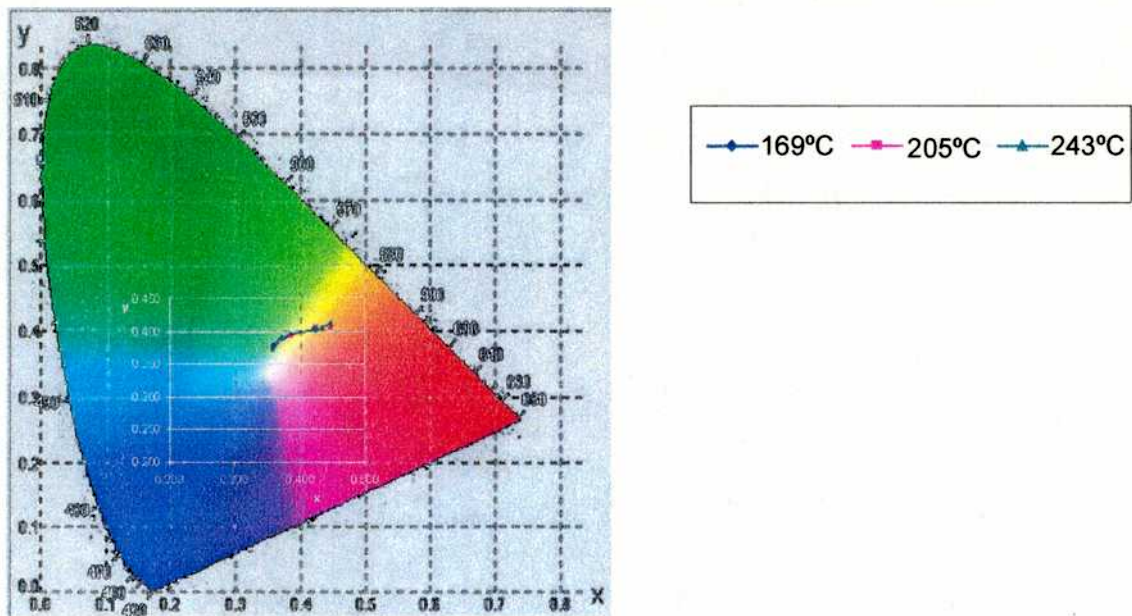
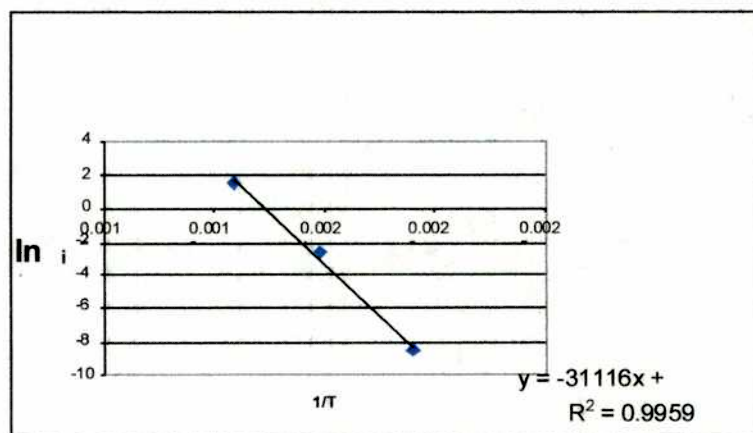


Figura VI. 9. Curva del desplazamiento cromático durante la fritura de las tapas de empanadas.

Se definió el color del punto final de la cocción como el correspondiente a un ΔE de 35.3 (SD=0.8) respecto al color de la masa cruda.

Se determinó la pendiente del gráfico en la zona de crecimiento rápido : (figura VI 10)

Figura VI. 10: Dependencia de la velocidad de pardeamiento con la temperatura



La Energía de activación obtenida ($E_a = 61.8$ kcal/mol) es mayor que la esperada para reacciones de pardeamiento no enzimático (30 – 40 kcal/mol).

V.3.b. Efecto del Tiempo de Tratamiento Sobre la Reducción de DON Durante la Fritura

Se presentan los datos de reducción de DON por el proceso de fritura conjuntamente con el desarrollo del color y la pérdida de humedad (figura VI.11)

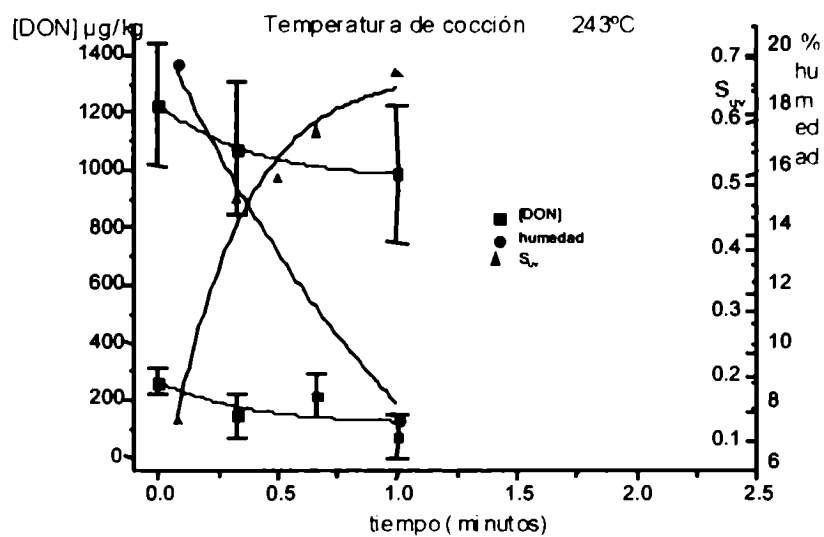
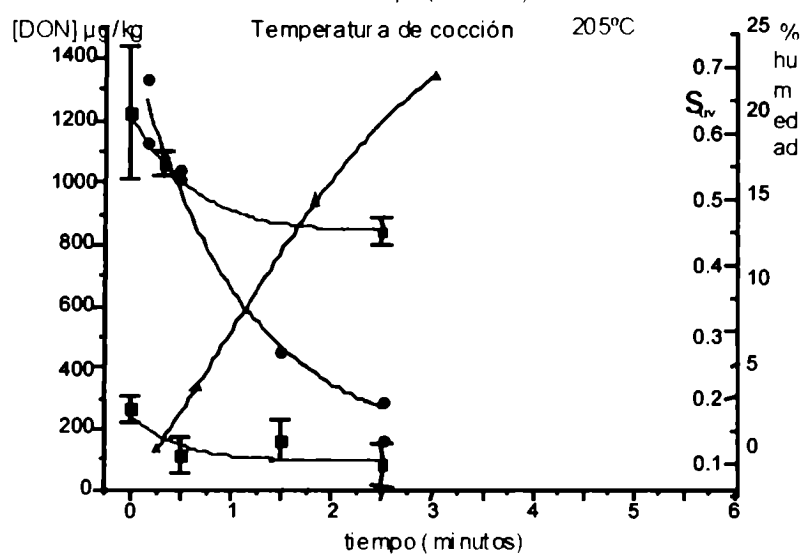
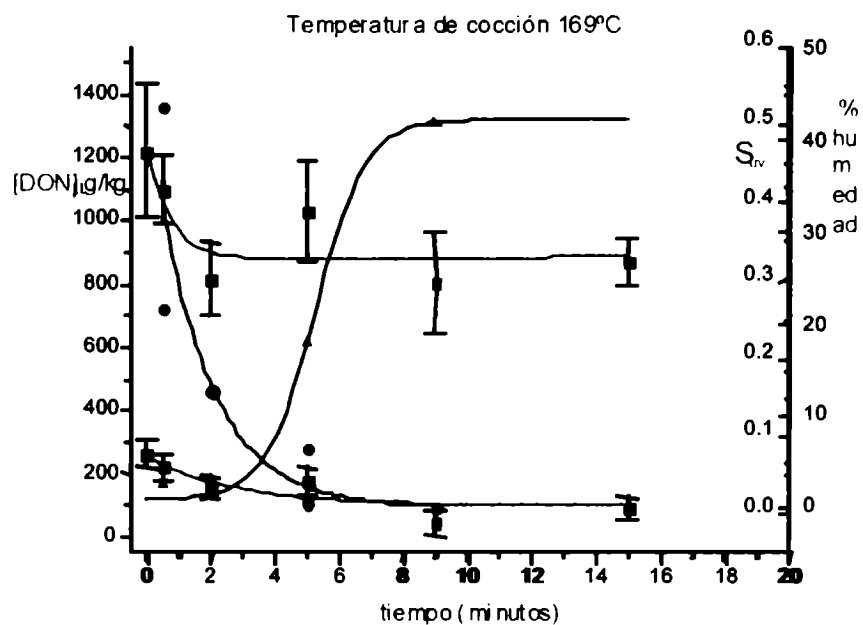


Figura VI. 11. Efecto de la temperatura de cocción sobre las variables medidas

La reacción de reducción de DON no presenta una cinética sencilla. Al progresar la reacción, la velocidad desciende más rápidamente de lo que se podría esperar. Este descenso puede significar que algún producto intermedio de esta reacción o de la reacción de pardeamiento provocó algún tipo de inhibición. Este efecto es más pronunciado a concentraciones más elevadas. En nuestro caso no podemos determinar el orden de reacción, ya que deberíamos utilizar el método diferencial aplicado a datos correspondientes a diferentes concentraciones iniciales. Sin embargo, se cuenta con sólo dos concentraciones, una de contaminación natural y la otra agregada, que pueden presentar diferentes comportamientos.

Los valores de DON encontrados en la masa cruda son significativamente diferentes de los valores encontrados en la masa tratada a 169°C ($p=0.028$), a 205°C ($p=0.051$), y a 243°C ($p=0.15$) a pesar de no ser significativa la diferencia, existe una tendencia a la disminución de la contaminación. Comparando los valores encontrados en los tratamientos a 169°C y a 205°C entre sí, se concluye que los promedios son significativamente diferentes, tal como se observa en la figura VI.12, donde se representan los valores de contaminación determinados a tiempo inicial y final para las distintas temperaturas.

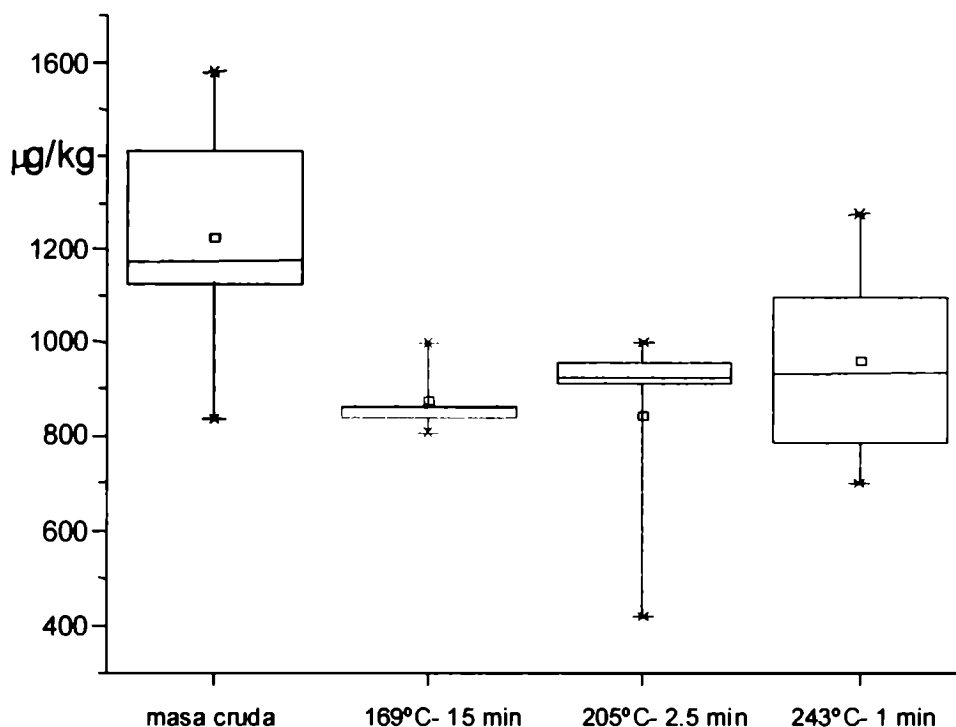


Figura VI. 12: Box plot de la contaminación medida a tiempo inicial y tiempo final a las tres temperaturas (concentración inicial = 1226 µg/kg)

El porcentaje de reducción fue en promedio de 28% para el nivel de 1220 µg/kg y 66% para el nivel de 260 µg/kg, cuando la masa fue cocida a 169°C.

VI.4. Conclusión

Durante la fritura de masa de empanadas se observó una reducción de la contaminación por DON que parece ser dependiente de la concentración inicial de la toxina; esta hipótesis no pudo ser confirmada debido a que un ensayo fue realizado sobre muestras contaminadas naturalmente y el otro sobre harina libre de contaminación, a la que se le agregó toxina.

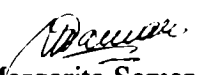
De los resultados obtenidos se concluye que es conveniente freír las tapas de empanadas a la menor de las temperaturas ensayadas para obtener una disminución mayor en la contaminación de DON.

El conocimiento de la reducción de la contaminación por DON en este proceso, en conjunto con el conocimiento de la contaminación de la harina y el consumo de empanadas por la población, permitirá estimar la contribución que este consumo tiene en la ingesta tolerable diaria de esta micotoxina y aportar datos para la evaluación de la exposición de la población a la ingesta de DON.

VII. CONCLUSIONES

- ☺ Las tendencias identificadas en los métodos analíticos para la determinación de tricotecenos muestran que la cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones o la cromatografía en capa delgada para DON son las mas adecuadas.
- ☺ Con respecto a los tricotecenos tipo A, el método de cuantificación obligado es la cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones o con detector de masa.
- ☺ Estas metodologías son imprescindibles para los niveles que se consideran necesarios para la estimación de la exposición (límite de cuantificación no mayor que 50 µg/kg para deoxinivalenol y menor que 10 µg/kg para tricotecenos tipo A).
- ☺ Otras tendencias detectadas para la cuantificación son la limpieza de los extractos con columnas Romer #225 (o en un envase con mayor masa de relleno Romer #227) y acetronitrilo : agua en una relación 84 : 16. como sistema de solventes mas adecuado para la extracción.
- ☺ El método analítico aplicado, que presentó bajos valores de Horrat, permitió determinar la dependencia del error analítico con la concentración del DON.
- ☺ A través de los estudios de variabilidad, se determinaron por primera vez en el ámbito mundial las funciones de distribución que representan la contaminación por DON del afrechillo, harina de trigo y gluten.

- ☺ Los resultados adquieren gran relevancia para el trigo, ya que la función de distribución encontrada representa los datos de contaminación por DON en el trigo argentino.
- ☺ Otro aspecto relevante, es que estos resultados facilitan la discusión de estrategias para reducir la variabilidad asociada a la determinación de DON en trigo, afrechillo, harina de trigo y gluten y posibilitan el desarrollo de adecuados planes de muestreo.
- ☺ Este es el primer estudio que cuantifica la retención de DON en gluten, demostrando que el DON no es detectado en el almidón. El DON se distribuye durante la molienda seca entre las diversas fracciones, en tanto en la molienda húmeda se observa una reducción, que se supone es la consecuencia de la extracción de la toxina por las aguas de lavado. Por esta razón partidas de trigo muy contaminadas podrían ser derivadas para la obtención de gluten y almidón.
- ☺ Durante la fritura de masa de empanadas se observó una reducción de la contaminación por DON y los resultados obtenidos permiten concluir que es conveniente trabajar a la menor temperatura de las ensayadas para obtenerse una mayor degradación de DON.
- ☺ El conocimiento de la reducción de la contaminación por DON en este proceso, en conjunto con el conocimiento de la contaminación de la harina y el consumo de empanadas por la población permitirá estimar la contribución que este consumo tiene en la ingesta tolerable diaria de esta micotoxina y colaborar en la evaluación de la exposición de la población a la misma.


María Margarita Samar


Silvia Liliana Resnik

VIII. BIBLIOGRAFIA

Abouzied M.M., Azcona J.I., Braselton W.E. and Pestka J.J. (1991). Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 672-677.

Ali N., Sardjono Yamashita A. and Yoshizawa T. (1998). Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additives and Contaminants*, 15, 377-384.

Apro N., Resnik S. and Ferro Fontán C. (1987). Obtención de muestras representativas para el análisis de micotoxinas (Representative samples for mycotoxins analysis). *Anales de la Asociación Química Argentina* 75, 501-510.

Atanassov Z., Nakamura Ch., Petkov P., Panayotov I., Kaneda Ch. and Yoshizawa T. (1995). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat grain collected from Dobroudja, the biggest wheat-producing region in Bulgaria. *Wheat Information Service*, 81, 13-17.

Boca R.T., González H. H. L., Pacin A.M., Resnik S. and Souza J. (2000). Micoflora contaminante y ocurrencia natural de micotoxinas en ensayos de evaluación de variedades de soja en pampa ondulada, provincia de Buenos Aires. III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. 6-10 de Noviembre, Córdoba, Argentina.

Boyer K.W., Horwitz W. and Albert R. (1985). Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. *Analytical Chemistry*, 57, 454-459

Broggi L.E., Pacin A., González H.H.L., Resnik S.L., Cano G., and Taglieri D. (1999). Distribución de la micoflora contaminante y ocurrencia natural de micotoxinas en las distintas fracciones de la industrialización del arroz. 2^{do} Simposio y 65^{ta} Reunión de Laboratorios de Alta Complejidad, ALAC 99, 18 al 20 de Noviembre, Buenos Aires, Argentina.

Broggi L.E., González H.H.L., Moltó G., Pacin A., Resnik S.L. and Cano G. (1999). Ocurrencia natural de micotoxinas y capacidad toxicogénica de aislados de *Fusarium graminearum* y *Microdochium nivale* en arroz. VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Rafaela, Santa Fe, 13-16 de Mayo.

Cao Y.J., Cai M., Zhou S.N. and Yan X.P. (1994). A survey of natural occurrence of vomitoxin in corn and wheat flour in Jiangsu Province. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 6, 36-37.

Castillo M.D., Samar M.M., Moltó G., Resnik S. and Pacin A. (2002). Trichothecenes and Zearalenone production by *Fusarium* spp isolated from Argentinean black beans. *Mycotoxin Research*, 18, 31-36.

Chelkowski J. , Perkowski J., Grabarkiewicz-Szcesna J., Kostecki M., and Golinski P. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins in cereals grains and feeds in Poland. Cost 835. Unpublished data submitted by A. Logrieco

Chen Y.F., Zhao P., Wei G.L. and Wang W. (1995). A survey of T-2 toxin in wheat in Guizhou province. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 7, 43-44.

Chu F.S. (1990). Immunoassays for mycotoxins: current state of the art, commercial and epidemiological applications. *Veterinary and Human Toxicology*, 32, 42-50.

Chu F.S. and GY Li. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 847-852

COPANT (1998). Norma Panamericana 989/78. Panamerican Committee of Technical Norms, Buenos Aires, Argentina.

Croteau S.M., Prelusky D.B. and Trenholm H.L. (1994). Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 928-933.

Dalcero A., Torres A., Etcheverry M., Chulze S. and Varsavsky E. (1997). Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Additives and Contaminants*, 14, 11-14.

Dietrich R., Schneider E., Usleber E., and Märtlbauer E. (1995). Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. *Natural Toxins*, 3, 288-293.

EHC 105 (1990) Environmental Health Criteria 105. Selected mycotoxins: ochratoxin, trichothecenes, ergot. World Health Organization, Geneva, 90-101.

Ellend N., Binder J., Krska R. and Horvath E.M. (1997) Contamination of Austrian corn with *Fusarium* toxins in Autumn 1.996. Fifth European *Fusarium* Seminar, Szeged, Hungary. *Cereal Research Communications*, 25, N°3/1, 359-360.

Environmental Protection Agency, EPA (1999). Toxicological review of Acetonitrile. Created 03-03-1.999. Visited 07-15-2.002.
www.epa.gov/iriswebp/iris/subst/0025.htm

Environmental Protection Agency, EPA (2001). Toxicological review of Chloroform. Created 10-19-2.001. Visited 7-15-2.002.
www.epa.gov/iriswebp/iris/subst/0205.htm

Eppley R.M., Trucksess M.W., Nesheim S., Thorpe C.W., Pohland A.E. (1986). Thin layer chromatographic method for determination of deoxynivalenol in wheat: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 69, 37-40.

Eskola M., Parikka P. and Rizzo A. (2000a). Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1.998. Submitted for publication in *Food Additives and Contaminants*, Unpublished. Department of Chemistry. National Veterinary and Food Research Institute. Helsinki, Finland. Unpublished data submitted by Aldo Rizzo.

Eskola M., Rizzo A. and Soupas L. (2000b). Occurrence and amounts of some *Fusarium* toxins in Finnish cereal samples in 1.998. Submitted for publication in *Acta Agriculturae Scandinavica, Sect. B*. Unpublished. Department of Chemistry. National Veterinary and Food Research Institute. Helsinki, Finland. Unpublished data submitted by Aldo Rizzo.

FAO (1994). Food Agriculture Organization. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. FAO Food and Nutrition paper N° 55.

FAO/WHO (2000) submitted. Method of determination of DON in cereals and cereal products- TLC method to WHO and FAO for JECFA 56.

FAO/WHO (2001). *Mycotoxins*. Summary and Conclusions of the Fifty-six meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 6- 15 February 2.001.

www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/jecfa/jecfa56.pdf

Fernandez C., Stack, M. and Musser S. (1994). Determination of Deoxynivalenol in 1.991 U.S Winter and Spring wheat by High-performance thin-layer chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 3, 628-630.

Fonseca, H. (1991). Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos (Sampling system for aflatoxins analysis in grains). *Revista de Microbiologia*, 21, 66-70.

Fontán F. C., Resnik S., Pacin A. and Quiroga N.(1994). Funciones de distribución de la contaminación por deoxinivalenol en trigo de las cosechas de 1990 a 1992 (Distribution functions of DON in wheat, harvest 1990 to 1992). Proceedings of VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos y 1^{er}. Encuentro de los Técnicos de Alimentos del Cono Sur, Buenos Aires, Argentina. 6-9 abril 1994, 105-107.

Freese L., Friedrich R., Kendall D. and Tanner S. (2000). Variability of deoxynivalenol measurements in barley. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 83(5), 1259-1263.

Furlong E., Valente Soares L., Lasca C. and Kohara E. (1995). Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 131, 185-190.

Furlong E. and Valente Soares L. (1995). Gas chromatographic method for quantitation and confirmation of trichothecenes in wheat. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 78, 386-390.

Gallo A., Pacin A. y Resnik S.L. (1991). Modificaciones de la contaminación de micotoxinas durante el procesamiento y elaboración de alimentos. *La Alimentación Latinoamericana*, 189, 51-56.

Gallo A., Bordignon, F., Pacin, A., Barbieri T. and Resnik S. (1992) Evaluation of food intake by means of 24 hour dietary recall in a town of the Province of Buenos Aires, Argentina, outline of data base on food consumption. *Ecology of Food and Nutrition*, 28, 299-317.

Gao H.P. and Yoshizawa T. (1997). Further study on *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat from a high-risk area for human esophageal cancer in China. *Mycotoxins*, 45, 51-55.

GB5009. National Standard Methods for Food Chemistry of China.

Gilbert J. (2000). Overview of mycotoxin methods, present status and future needs. *Natural Toxins*, 7, 347-352.

Gilbert J., Sharman M., Patel S., Boenke A. and Wagstaffe P.J. (1992). Deoxynivalenol in wheat and maize flour reference materials. 2. Preparation and certification. *Food Additives and Contaminants*, 9, 119-35.

Golinski P., Perkowski J., Kostecki M., Grabarkiewicz-Szcesna J., and Chelkowski J. (1996). *Fusarium* species and *Fusarium* toxins in wheat in Poland- a comparison with neighbour countries. *Sydowia*, 48, 12-22.

González H.H.L., Resnik S.L., Boca R.T. and Marasas W.F.O. (1995). Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 130, 29-36.

González H.H., Pacin A., Resnik S. L. and Martínez E. (1996). Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia*, 135, 129-134.

González H.H.L., Martínez E.J., Pacin A.M., Resnik S.L. and Sydenham E.W. (1999a). Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 16, 565-569.

González H.H.L., Martínez E.J., Pacin A.M. and Resnik S.L. (1999b). Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinean durum wheat. *Mycopathologia*, 144, 97-102.

Greene D.M., Azcona-Olivera J.I. and Pestka J.J. (1994). Vomitoxin (deoxynivalenol)-induced IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse: dose response and male predilection. *Toxicology*, 92, 245-260.

Groves F., Zhang L., Chang Y., Ross P., Casper H., Norred W., You W. and Fraumeni F. (1999). *Fusarium* mycotoxins in corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong province, China. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 82, 657-662.

Guo H.W., Zhu Y.Z. and Liu Q.P. (1995). A survey of natural occurrence of deoxynivalenol in corn and wheat flour in Shanghai. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 7, 39-40.

Hart L.P. (1998). Variability of Vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year. *Plant disease*, 82: 625-630.

He Y.M., Zhang Z. and Jia Z.Z. (1998). A survey of natural occurrence of T-2 toxin in wheat in Beijing. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 10, 22-24.

Hietaniemi V. and Kumpulainen J. (1991). Contents of *Fusarium* toxins in Finnish and imported grains and feeds. *Food Additives and Contaminants*, 8, 171-182.

Home Grown Cereals Authority (1999). Investigation of *Fusarium* infection and mycotoxin levels in harvested wheat grain (1998). Project Report N° 207. Unpublished data supplied by the UK Home Grown Cereals Authority. United Kingdom.

Home Grown Cereals Authority (2000). Survey of mycotoxins in stored grain from the 1999 harvest in the UK. Project Report N° 230. Unpublished data supplied by the UK Home Grown Cereals Authority. United Kingdom.

Jacobsen B., Harlin S., Swanson R., Lambert R., Beasley V. and Sinclair J. (1995). Occurrence of fungi and mycotoxins associated with field mold damaged soybeans in the midwest. *Plant disease*, 79, 86-89.

Janardhana G.R., Raveesha K.A. and Shetty H.S. (1999). Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). *Food and Chemical Toxicology*, 37, 863-868.

JECFA (2001). Canady R., Coker R., Egan S.K., Krska R., Kuiper-Goodman T., Olsen M., Pestka J., Resnik S. and Schlatter J. Deoxynivalenol (DON). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. ISBN 92 5 104664 6. FAO Food and nutrition paper, 74, 419-555.

Jewers K. (1987). Problemas relacionados con la toma de muestras de los envíos para la determinación del contenido en micotoxinas y con la interpretación de los resultados (Related problems with sample collection for mycotoxins quantification and results interpretation). In: Second International Conference on Mycotoxins FAO/WHO/UNEP (MYC 87/8.1). Tailand.

Josephs R.D., Schuhmacher R. and Krska R. (2001). International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. *Food Additives and Contaminants*, 18, 417-430.

Junta Nacional de Granos (1984). Resolución N° 26120/84. Método de Muestreo de Granos. (Sampling grains methodology). Buenos Aires, Argentina.

Kamimura H., Nishijima M., Yasuda K., Saito K., Ibe A., Nagayama T., Ushiyama H. and Naoi Y. (1981). Simultaneous Detection of Several *Fusarium* Mycotoxins in Cereals, Grains and Foodstuffs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64(5), 1067-1073.

Kim J., Kang H., Lee D., Lee Y. and Yoshizawa T. (1993). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3798-3802.

Langseth W. (2000). Kartlegging av mykotoksiner i norsk matkorn, 1990-1998. (A survey on the occurrence of mycotoxins in cereals on the Norwegian market). Report from National Veterinary Institute, Norway.

Langseth W. and Clasen P. (1992). Automation of the clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using the charcoal alumina column. *Journal of Chromatography A*, 603, 290-293.

Langseth, W. and Elen O. (1996). Differences between barley, oats and wheat in the occurrence of deoxynivalenol and other trichothecenes in Norwegian grain. *Journal of Phytopathology*, 144, 113-118.

Langseth W. and Elen O. (1997). The occurrence of deoxynivalenol in Norwegian cereals differences between years and districts, 1988-1996. *Acta Agriculturae. Scandinavia, sect. B Soil and plant Science*, 47, 176-184.

Langseth W. and Rundberget T. (1998). Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A*, 815, 103-121.

Langseth W. and Rundberget T. (2000). The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147, 157-165.

Langseth. W., Elen. O. and Rundberget. T. (2000). Occurrence of mycotoxins in Norwegian cereals 1.988-1.999. National Veterinary Institute, Department of Chemistry, Norway. Unpublished data submitted by Wenche Langseth.

Lauren D.R. and Agnew M.P. (1991). Multitoxin screening method for *Fusarium* mycotoxins in grains. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39, 502-507.

Lauren D.R., Agnew M.P., Smith W.A. and Sayer S.T. (1991). A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals in New Zealand in 1986-1989. *Food Additives and Contaminants*, 8, 599-605.

Lauren D.R., Jensen D.J., Smith, W.A. and Dow B.W. (1996). Mycotoxins in New Zealand maize: a study of some factors influencing contamination levels in grain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24, 13-20.

Lee Y., Kim J., Lee D., Kang H. and Yoshizawa T. (1995). Natural occurrence of trichothecenes and Zearalenone in the 1993 barley crop in Korea. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 36, 85-88.

Lew H., Adler A., Thimm N., Krska K., Wiedner G. and Schuh M. (2000a). Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in Austria. COST 835. Unpublished. Submitted by A. Logrieco.

Lew H., Adler A., Thimm N., Krska K., Wiedner G. and Schuh M. (2000b). *Fusarium* species and *Fusarium* toxins in Austrian maize. Die Bodenkultur (under review). Unpublished data submitted by A. Logrieco.

Li F.Q., Luo X.Y. and Yoshizawa T. (1999). Mycotoxins (trichothecenes, zearalenone and fumonisins) in cereals associated with human red-mold intoxications stored since 1989 and 1991 in China. *Natural Toxins*, 7, 93-97.

Lin L., Zhang J., Wang P., Wang Y. and Chen J. (1998). Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815, 3-20.

Li Y.W. (1997). A survey of natural occurrence of deoxynivalenol in wheat. Unpublished data submitted to WHO and FAO, GEMS/FOOD.

Linsley R.K., Kohler M.A. and Paulhus J.L.H. (1975). In *Hydrology for Engineers*, second edition Mc Graw-Hill.

Liu G.H., Hou G.L., Guo Z.H., Wang W.R., Zhang R.A. and Hou F.L. (1992). A survey of natural occurrence of deoxynivalenol in corn and wheat flour in Shanghai. *Chinese Journal of Hygiene Research*, 21, 205-207.

Lops R., Pascale M., Pancaldi D. and Visconti A. (1998). Infezioni fungine e presenza di deossinivalenolo in cariossidi di frumento prodotte in diverse regioni italiane. *Informatore Fitopatologico*, 4, 60-66.

Lu G., Li L. and Xue Y. (1994). Studies on deoxynivalenol contamination in grain and its products in Anhui Province. *Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih.*, 28, 27-30. Chinese.

Lu G., Xie Y. and Li F.L. (1992). A survey of natural occurrence of deoxynivalenol in cereals in Anhui Province. *Chinese Journal of Hygiene Research*, 21, 260-262.

Luo Y., Yoshizawa T. and Katayama T. (1990). Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied Environmental Microbiology*, 56(12), 3723-3726.

Luo Y., Yoshizawa T., Yang J.S., Zhang S.Y. and Zhang B.J. (1992). A survey of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes, zearalenone and fusarochromanone) in corn and wheat samples from Shaanxi and Shanxi Provinces, China. *Mycotoxin Research*, 8, 85-91.

Mallman, C.(2000). Mycotoxins in Brasil. LAMIC. Submitted by C.Mallman.

Marasas W. F.O., Van Rensburg S. and Mirocha C. (1979). Incidence of *Fusarium* species and their mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1108-1112.

Marasas W.F.O., Nelson P.E. and Toussoun T.A. (1984). *Toxigenic Fusarium Species-Identity and Mycotoxicology*. University Park: Pennsylvania State University Press.

Martinez. N.S., Barreto. D., Carmona M., Cano G., and Pacin, A.M. (2000). Estudio de la contaminación fúngica y por micotoxinas en cebada. (Study of fungal contamination and mycotoxins in barley) III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología (III Latinamerican Congress of micotoxicology). 6-10 November of 2.000, Córdoba. Argentina.

Marx H., Gedek B. and Kollarczik B. (1995). Comparative investigations on mycotoxicological status of alternatively and conventionally grown crops. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 201, 83-86.

Menna M., Lauren D. and Hardacre A. (1997) *Fusaria* and *Fusarium* toxins in New Zeland maize plants. *Mycopathologia*, 139, 165-173.

Möller T. and Gustavsson H. (1992). Determination of type A and B trichothecenes in cereals by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 75, 1049-1053.

Moltó G., Samar M.M., Resnik S., Martinez E.J. and Pacin A. (2000). Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer. A preliminary exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, 17, 809-813.

Mossoba M.M., Adams S., Roach J.A. and Trucksess M.W. (1996). Analysis of trichothecene mycotoxins in contaminated grains by gas chromatography/matrix isolation/Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 79, 1116-1123.

Mühlemann M., Lüthy J. and Hübner P. (1997a). Mycotoxin contamination of food in Ecuador. A: Aflatoxins. *Mitteilungen aus dem Gebiete Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 88, 474-496.

Mühlemann M., Lüthy J. and Hübner P. (1997b). Mycotoxin contamination of food in Ecuador. B: Ochratoxin A, Deoxynivalenol, T-2 toxin and fumonisin. *Mitteilungen aus dem Gebiete Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 88, 593-612.

Müller H.M., Reimann J., Schumacher U. and Schwadorf K. (1997). *Fusarium* toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany. *Natural Toxins*, 5, 24-30.

Müller H.M., Reimann J., Schumacher U. and Schwadorf K. (1998). Natural occurrence of *Fusarium* toxins in oats harvested during five years in an area of southwest Germany. *Food Additives and Contaminants*, 15, 801-806.

Müller H. and Schwadorf K. (1993). Natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. *Mycopathologia*, 121, 115-121.

Neira S. (1995) Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentinean wheat. *Food Control*, 6, 201-204.

Neira M.S., Pacin A., Martinez E.J., Molto G., and Resnik S.L. (1997). The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 21-25.

Niessen L., Böhm-Schrami M., Vogel H. and Donhauser S. (1993). Deoxynivalenol in commercial beer- screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research*, 9, 99-108.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International, 1995, chapter 49, pp 35-37.

Okoye. Z. S. (1993). *Fusarium* mycotoxins nivalenol and 4-acetyl-nivalenol (fusarenon-X) in mouldy maize harvested from farms in Jos district, Nigeria. *Food Additives and Contaminants*, 10, 375-379.

Olavarria J. (1992). Cuantificación de Micotoxinas en granos y derivados. Problemas asociados al muestreo y procedimiento para la aplicación de límites de tolerancia. (Mycotoxins quantification in grain and subproducts. Problems associated with sampling and procedure for application limits). *IPA La Platina*, 67, 18-25.

Pacin A. (2003). Estimación de la exposición y Evaluación de riesgo a micotoxinas, VIII Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana, 27 al 30 de noviembre, 2002, Quito Ecuador, en prensa.

Pacin A., Resnik S. L., Neira M. S., Moltó G., and Martínez E. J. (1997). Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 14, 327-331.

Pacin, A.; Martinez, E.; Portela, M.L.; y Neira M.S. (1998). Consumo de alimentos en la población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. *La Alimentación Latinoamericana* 221:28-36.

Pacin, A., Martinez E., Pita Martín de Portela M.L. y Neira M.S. (1999). Consumo de alimentos e ingesta de algunos nutrientes en la población de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49, 31-39.

Pacin A., Resnik S.L., Espin S., Vivas L., Cano G., Taglieri D. y Molto G. (1999). Ocurrencia de la contaminación por micotoxinas en Ecuador. VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. I Simposio Internacional de Tecnología Alimentaria. Rafaela Santa Fe, 13-16 de Mayo.

Pacin A. and Resnik S. L. (2000). Mycotoxins in Argentina. Unpublished data submitted to WHO and FAO, GEMS/FOOD file, by Ana Pacin.

Pacin A.M., Broggi L.E., Resnik S.L. and González H.H.L. (2001). Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Ríos province, Argentina. *Mycotoxin Research*, 17. 31-38.

Park J.C., Zong M.S. and I.M. Chang. (1991). Survey of the presence of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and T-2 toxin in Korean cereals of the 1989 harvest. *Food Additives and Contaminants*, 8, 447-451.

Park J.J., Smalley E.B. and Chu F. S. (1996). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1642-1648.

Park K.J., Park A.R. and Lee Y.W. (1992). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins of the 1990 barley crop in Korea. *Food Additives and Contaminants*, 9, 639-45.

Pascale M., De Girolamo A., Visconti A. and Pancaldi D. (2000). Indagine sulla presenza di deossinivalenolo in cereali prodotti in alcune aree del nord Italia nel 1998 (Occurrence of deoxynivalenol in cereal products in 1998 from some areas of Northern Italy). *Informatore Fitopatologico*, 10, 68-73.

Patel S., Hazel C.M., Winterton A.G. and Mortby E. (1996). Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 13 (7), 833-841.

Perkowski J. (1999). Badania zawartosci toksyn fuzaryjnych w ziarnie zbóz. (*Fusarium* toxins) Roczn. AR Pozn. *Rozprawy Naukowe*, 295, 1-136. COST835

Perkowski J., Plattner R.D., Golinski P., Vesonder R.F. and Chelkowski J. (1990). Natural occurrence of Deoxynivalenol, 3-acetyl Deoxynivalenol, 15-acetyl Deoxynivalenol, Nivalenol, 4,7-Dideoxynivalenol and Zearalenone in Polish Wheat. *Mycotoxin Research*, 6, 7-12.

Perkowski J., Jelen H., Kiecana I. and Golinski P. (1997). Natural contamination of spring barley with group A trichothecene mycotoxins in south-eastern Poland. *Food Additives and Contaminants*, 4, 321-325.

Pestka J.J. (1988). Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 71, 1075-81.

Pettersson H. (1993). Trichothecene analysis in Swedish cereals 1987-1990. Spec Ed, Proc 3:d European Seminar on *Fusarium*. *Hod Rosl Aklim Nasien*, 37, 37-41.

Pettersson H. (1998). Intercomparison of trichothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference material. Official publication of the European Communities, Belgium, pp. 5-72.

Pettersson, H. (2000). Department of Animal Nutrition and Management at the Agricultural University, Sweden. Unpublished data submitted to WHO and FAO, GEMS/FOOD file. Submitted by Hans Pettersson.

Piñeiro M. (2000). Mycotoxins in Uruguay. Unpublished. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Submitted by Maya Piñeiro.

Piñeiro M., Giribone A.G. and Silva G. (1994). Niveles de DON en alimentos y raciones a base de cereales en Uruguay (DON levels in cereal based foods and feeds in Uruguay). Proceeding of the 1st Latinamerican Congress of Micotoxology, pp.97.

Piñeiro M., Dawson R. and Costarrica M.L. (1996). Monitoring program for mycotoxin contamination in Uruguayan food and feeds. *Natural Toxins*, 4, 242-245.

Piñeiro M. and Silva G. (1997). *Fusarium* Toxins in Uruguay: Head blight, Toxin levels and grain quality. *Cereal Research Communications*, 25, 805-806.

Plattner R.D. and Bennett G.A. (1983). Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadruple MS/MS. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 67, 734-738.

Prado G., Oliveira M., Ferreira S., Corrêa T. and Affonso B. (1997). Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós- colheita (Natural occurrence of deoxinivalenol and T-2 toxin in post harvest corn). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 17, 259-262.

Prelusky D.B., Rotter B.A. and Rotter R.G. (1994). In *Mycotoxin in Grain. Compounds Other Than Aflatoxin*, J. D. Miller and H. L. Trenholm (Eds), Eagan Press, St.Paul, MN, pp. 359-403.

Quiroga N., Resnik S.L., Pacin A., Martinez E., Pagano A., Riccobene I. and Neira S. (1995). Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. *Food Control*, Vol 6 No4 201-204.

Ramakrishna Y., Bhat R. and Vasanthi S. (1990). Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in India. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 1857-1859.

Rasooly L. and Pestka J.J. (1994). Polyclonal autoreactive IgA increase and mesangial deposition during vomitoxin-induced IgA nephropathy in the BALB/c mouse, *Food and Chemical Toxicology*, 32, 329-336.

Rava E. (1996). Mycotoxins in maize products of the 1994-1995 marketing season. *Mycotoxin Research*, 12, 25-30.

Rava E., Viljoen J.H., Kailmeyer H. and de Jager A. (1996). Fungi and mycotoxins in South African maize of the 1993 crop. *Mycotoxin Research*, 12, 15-24.

Resnik S., Neira M.S., Pacin A., Martínez E., Apro N. and Latreite S. (1996). A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1.983-1.994. *Food Additives and Contaminants*, 13, 115-120.

Resnik S. L., Espin S., Vivas L., Cano G., Taglieri D. y Molto G. (1999). Ocurrencia de la contaminación por micotoxinas en Ecuador. A. Pacin, S.L. VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. I Simposio Internacional de Tecnología Alimentaria. Rafaela, Santa Fe, 13-16 de Mayo.

Resnik S.L., Martinez J.E. and Pacin A. (2000). Storage influence on corn aflatoxins, zearalenone and deoxynivalenol contamination, in Argentina. Submitted to publication. Unpublished data submitted to WHO and FAO, GEMS/FOOD file, by Ana Pacin.

Resnik S. L. and Pacin A. (2000). Sampling plans for mycotoxins. Unpublished data submitted to WHO and FAO, GEMS/FOOD file, by Ana Pacin.

Romer T. (1994). Romer Labs. Inc.® Manual. Quantitative method for DON, AFT B1 and Zearalenone. Method My 840, version 94.2.

Romer T. (1995). Method My 8402s, version 94.2. Quantitative method for DON, AFT B1 and Zearalenone. In: South American Mycotoxin Conference. Reference Handbook. Buenos Aires, April 7, 1995.

Ryu J.C., Yang J.S., Song Y.S., Kwon O.S., Park J. and Chang I.M. (1996). Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 13(3), 333-341.

Samar M.M., Neira M.S., Resnik S.L. and Pacin A. (2001). Effect of fermentation on naturally occurring Deoxynivalenol (DON) in the Argentinean bread processing technology. *Food Additives and Contaminants*, 18, 1004-1010.

Samar, M.M. and Resnik, S.L. (2002). Analytical methodology for trichothecenes surveillance: Evolution in quantitative methods over the years 1990-2000. *Food Science and Technology International*, 8 (5), 257-268.

Saubois A., Nepote M.C. and Basilico J.C. (1992). Incidence of *Fusarium* toxins in corn and milling byproducts. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 42, 168-172.

Schollenberger M., Lauber U., Jara H.T., Suchy S., Drochner W. and Muller H.M. (1998). Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 815 (1), 123-132.

Schollenberger M., Suchy S., Jara H.T., Drochner, W. and Muller H.M. (1999). A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 147, 49-57.

Schollenberger M., Jara H.T., Suchy S., Drochner W. and Muller H.M. (2000a). Occurrence of *Fusarium* toxins in wheat for food use harvested 1998 in southwest Germany. Institute of Animal Nutrition, Hohenheim, Stuttgart, Germany. Unpublished data submitted to WHO and FAO by U. Lauber.

Schollenberger M., Jara H.T., Suchy S., Drochner W. and Muller H.M. (2000b). *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area of southwest Germany. Institute of Animal Nutrition, Hohenheim, Stuttgart, Germany. Unpublished data submitted to WHO and FAO by U. Lauber.

Schollenberger M., Suchy S., Jara H.T., Rühle M., Drochner W. and Muller H.M. (2000c). Further survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. Institute of Animal Nutrition, Hohenheim, Stuttgart, Germany. Unpublished data submitted to WHO and FAO by U. Lauber.

Schumacher R., Krska R., Weingaertner J. and Grasserbauer M. (1997). Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 359, 510-515.

Schwadorf K. and Müller H. M. (1991). Determination of trichothecenes in cereals by gas chromatography with ion trap detection. *Journal of Chromatographia*, 32, 137-142.

Scott P.M. (1995a). Mycotoxin methodology. *Food Additives and Contaminants*, 12, 395-403.

Scott P.M. (1995b). Natural toxins. In: Cunniff P. (ed), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*, 16th edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, chapter 49, pp. 35-37.

Scott P.M. (1997). Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, 14, 333-339.

Scott P.M. and Trucksess M.W. (1997). Application of Immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 80, 941-949.

Scott P.M., Lau P.Y. and Kanhere S.R. (1981). Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and others grains. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64, 1364-1371.

Scott, P. M., Kanhere, S. R., Dexter, J. E., Brennan, P. W., and Trenholm, H. L. (1984). Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. *Food Additives and Contaminants*, 1, 313-323.

Scott P.M., Kanhere S.R. and Tarter E.J. (1986). Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron-capture gas chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 69, 889-893

Scott. P.M., Lombaert. G.A., Pellaers. P., Bacler S., Kanhere S.R., Sun W.F., Lau P.Y. and Weber D. (1989). Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes. *Food Additives and Contaminants*, 6, 489-500.

Scott P.M., Kanhere R.S. and Weber D. (1993). Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 10, 381-389.

Seitz L. M., Eustace W. D., Mohr H. E., Shogren M. D. and Yamazaki W. L. (1986). Cleaning, milling and baking tests with hard red winter wheat containing deoxynivalenol. *Cereal Chemistry*, 63, 146-150.

Shim W.B., Kim J.C., Seo J.A. and Lee Y.W. (1997). Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. *Food Additives and Contaminants*, 14, 1-5.

Soares L. M. and Furlani R. (1996). Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food stores of the city of Campinas, state of Sao Paulo. *Revista de Microbiologia*, 27, 41-45.

Sohn H. B., Seo J. A. and Lee Y. W. (1999). Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Additives and Contaminants*, 16, 153-158.

Solovey M.M.S, Somoza C., Cano G., Pacin A. and Resnik S. (1999). A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in corn-based food products in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 16, 325-329.

Souza J.C.de, Resnik S.L., Pacin A.M., González H.H.L., Boca R.T., Burak R. and Broccoli A.M. (2000). Contaminant mycoflora and natural mycotoxins co-occurrence in field trial popcorn in Argentina. X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Mayo 21-25, Guarujá- Sao Paulo- Brasil.

Spanjer M.C. (2000). Deoxynivalenol in grains and grain products. Dutch Inspectorate for Health Protection, Amsterdam, The Netherlands. Unpublished data. Submitted to WHO and FAO by H.P. van Egmond.

Stratton G.W., Robinson A.R., Smith H.C., Kittilsen L. and Barbour M. (1993). Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography. *Archives of Environmental Contaminant Toxicology*, 24, 399-409.

Sydenham E. W. and Shephard G. S. (1996). Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: Gilbert J. (ed), *Progress in Food Contaminant Analysis*. London: Chapman & Hall, pp. 65-146.

Sydenham E.W. and Thiel P.G. (1987). The simultaneous determination of diacetoxyscirpenol and T-2 toxin in fungal cultures and grain samples by capillary gas chromatography. *Food Additives and Contaminants*, 4, 277-284.

Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Rheeder J.P., Peralta Sanhueza C.E., González H.H.L. and Resnik S.L. (1993). Fumonisin in Argentinean Field-Trial corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6), 891-895.

Tanaka T., Hasegawa A., Matsuki Y., Ishii K. and Ueno Y. (1985). Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals *Food Additives and Contaminants*, 2, 125-137.

Thuvander A., Möller T., Enghardt Barbieri H., Janson A., Salomonsson A.C. and Olsen M. (2000). Unpublished data submitted to WHO and FAO, GEMS/FOOD file, by the Swedish National Food Administration, Uppsala, Sweden. Unpublished data submitted by M. Olsen.

Thuvander A., Möller T., Enghardt Barbieri H., Janson A., Salomonsson A.C., and Olsen M. (2001). Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Additives and Contaminants*, 18, 696-706.

Trenholm H.L., Warner R.M., and Prelusky D.B. (1985). Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 68, 645-649.

Trigo-Stockli D., Sanchez-Mariñez R., Cortez-Rocha M. and Pedersen J. (1998). Comparison of the distribution and occurrence of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in hard red winter wheat for 1993-1996. *Cereal Chemistry*, 75, 841-846.

Trucksess M.W., Nesheim S., and Epply R. (1984). Thin Layer Determination of Deoxynivalenol in Wheat and Corn. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 67, 40-43.

Trucksess M.W., Flood M., Mossoba M. and Page S. (1987). High performance thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol, fusarenone-X and nivalenol in barley, corn and wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 445-448.

Trucksess M.W., Thomas F., Young K., Stack M.E., Fulgueras W.J., and Page S.W. (1995). Survey of Deoxynivalenol in U.S. 1993 Wheat and Barley Crops by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (English). *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 78, 631-636.

Trucksess M.W., Ready D.W., Pender M.K., Ligmond C.A., Wood G.E. and Page S.W. (1996). Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole-wheat flour, and bran. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 79, 883-887.

Trucksess M.W., Page S., Wood G.E. and Cho T.H. (1998). Determination of deoxynivalenol in white flour, whole-wheat flour and bran by solid phase extraction/liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 81, 880-886.

Tseng T.C., Tu J.C., Soo L.C. (1995). Natural occurrence of mycotoxins in *Fusarium* infected beans. *Microbios*, 84, 21-28.

Tutelyan V. A. (1998). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins incereals in Russia. In Miraglia M., van Egmond H., Brera C. & Gilbert J. (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins- Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. Alaken Publishers, Colorado. USA., pp. 99-104.

Tutelyan V., Eller K., Sobolev V., Pimentova V., Zakharova L. and Muzychenko N. (1990). A survey of the occurrence of deoxynivalenol in wheat from 1986-1988 harvest in the USSR. *Food Additives and Contaminants*, 7, 521-525.

Ueno Y. (1983). *Trichothecenes- Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. New York: Elsevier Science Publishers pp. 7-111.

UNEP/FAO/WHO (1988). Manual of Food Quality Control. Introduction to Food Sampling, Food and Nutrition Paper 14/9.

Vega H.M., Saelzer F.R., Herlitz B.E., Rios G.G., Bastias T.C., Olavarria M. J., Madariaga B.R. and Rebufel A.P. (1998). Micotoxinas de *Fusarium* spp. en maiz (*zea mays*) cultivado en Chile, Cosecha 1.995-1.996. (Mycotoxins from *Fusarium* spp. In corn grown in Chile. 1995-1996 harvest). *Alimentos*, 23, 43-58.

Vicam (1996). HPLC Protocol Manual Vicam, Doc. GN-MC 9505-0 DON test, Massachusetts, USA., pp.1-8.

Voyksner R.D., Hager W.M., Tyczkowska K., and Haney C.A. (1985). Thermospray high performance liquid chromatographic/mass spectrometric analysis of some *Fusarium* mycotoxins. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, 8, 119-125.

Vrabcheva T, Gessler R, Usleber E and Martlbauer E. (1996). First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat. *Mycopathologia*, 136, 47-52.

Wang D.S., Liang, Y.X., Nguyen, T.C., Le, D.D., Tanaka, T. and Ueno Y. (1995) Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in north Vietnam. *Natural Toxins*, 3, 445-449.

Warner R.L. and Pestka J.J. (1994). In vitro effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on T-cell interleukin production and IgA secretion. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 617-625.

Weingaertner J., Krska R., Praznik W., Grasserbauer M. and Lew H. (1997). Use of mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron-capture gas chromatography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 357, 1206-1210.

Wetter M.T., Trucksess M.W., Roach J.A. and Bean G.A. (1999). Occurrence and distribution of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in sweet corn ears. *Food Additives and Contaminants*, 16, 119-124.

Whitaker T.B., Hagler W.M., Giesbrecht F.G. and Johansson A.S. (2000). Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 83, 1285-1292.

WHO (1990). *Environmental Health Criteria 105. Selected mycotoxins: ochratoxin, trichothecenes, ergot*. Geneva: World Health Organization pp. 73-89.

Wilson D.M., Sydenham E.W., Lombaert G.A., Trucksess M.W., Abramson D., and Bennett G.A. (1998). Mycotoxin Analytical Techniques. In: Sinha K.K. and Bhatnagar D. (eds), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. New York: M. Decker Inc. pp 135-182.

World Health Organization (1990). Ed. International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria 105. Selected mycotoxins: ochratoxin, trichothecenes, ergot*. Vanmala, Finland, pp 73-89.

Yamashita A., Yoshizawa T., Aiura Y., Sanchez P., Dizon E., Arim R. and Sardjono (1995). *Fusarium* mycotoxins (Fumonisin, nivalenol and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 1804-1807.

Yang C.H., Luo X.Y., Ji R. and Liu C. (1992). A survey of natural occurrence of T-2 toxin in wheat. *Acta Microbiologica sinica*, 32, 450-455.

Yoshizawa T. (1997). Geographic difference in Trichothecene Occurrence in Japanese Wheat and Barley. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University*, 5, 25-30.

Yoshizawa T. (2000). Mycotoxins in Japan. Department of Bioresource Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japan. Unpublished data submitted to WHO and FAO by T. Yoshizawa.

Yoshizawa T. (2001). Chromatographic method for trichothecenes. *Methods in Molecular Biology*, 157, 115-129.

Yoshizawa T. and Gao H.P. (1999). Risk assessment of mycotoxins in staple foods from the high-risk area for human esophageal cancer in China. Proceeding of International Symposium of Mycotoxicology'99. *Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project*. Sept. 9-10, Chiba, Japan pp. 55-62.

Yoshizawa T. and Yin-Zhe J. (1995). Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and barley in Japan. *Food Additives and Contaminants*, 12, 689-694.

Young J.C. and Games D.E. (1992). Supercritical fluid chromatography of *Fusarium* mycotoxins. *Journal of Chromatography*, 627, 247-254.

Young J.C., Fulcher G.R., Hayoe J.H., Scott P.M. and Dexter J.F. (1984). Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 659-664.

Yuwai K.E., Rao KS, Singh K, Tanaka T and Ueno Y. (1994). Occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea. *Natural Toxins*, 2(1), 19-21.

IX. ANEXO**TABLAS DE DATOS MOLINO****Trigo Limpio**

tiempo (minutos)	Concentración de deoxinivalenol (µg/kg)						media	DS	CV%
	1	2	3	4	5	6			
5	1813	2089	2031	2189	2122	1687	1988	196	9,8
10	2077	2027	2049	2077	2146	2120	2083	44	2,1
15	1188	2303	1958	609	1819	1738	1602	607	37,9
20	1174	1938	2030	758	1895	1458	1542	505	32,8
25	1208	1834	1589	1307	1548	1539	1504	222	14,7
30	1113	1973	2108	732	1919	1784	1605	552	34,4
35	1697	2374	2195	759	2066	1773	1810	575	31,7
40	1510	1896	2074	1106	1853	1528	1661	350	21,1
45	1741	2343	1878	1229	2168	1290	1775	452	25,5
50	1521	2036	1883	906	1710	1494	1592	395	24,8
55	1382	2153	1821	1017	1176	1764	1552	433	27,9
60	1457	887	1532	1126	1515	1674	1365	297	21,7
65	1938	2134	1552	1337	1601	1915	1746	297	17,0
70	1897	2224	2263	1452	1600	1932	1894	325	17,2
75	1813	2223	2132	2126	2257	2392	2157	195	9,0
80	2173	1859	2251	2071	1834	2201	2065	179	8,7
85	2172	2278	2052	2137	2142	1985	2128	101	4,7
90	2351	2988	3345	1859	1763	1892	2366	662	28,0
95	1867	2525	2598	1411	2144	1740	2047	463	22,6
100	2121	2944	3293	1658	1786	1970	2295	666	29,0
105	2128	2684	3153	2011	2342	2483	2467	414	16,8
110	2124	2936	2671	2175	2789	2011	2451	394	16,1
115	2287	2784	2969	1902	2346	1620	2318	510	22,0
120	1729	3152	3059	1968	2081	1624	2269	669	29,5

Gluten

tiempo (minutos)	Concentración de deoxinivalenol (µg/kg)						media	DS	CV%
	1	2	3	4	5	6			
30	167	170	208	181			181	18	10,2
60	169	227	271	253	206	235	227	36	15,9
90	208	283	258	284	291	279	267	31	11,6
120	259	272	252	342	315	323	294	37	12,7
150	299	306	318	403	302	396	337	49	14,4
180	279	275	388	296	339	349	321	45	14,0
210	449	304	316	363	423	341	366	58	16,0
240	303	285	290	265	285	299	288	13	4,6
270	364	374	365	348	358	416	371	24	6,4

Afrechillo

tiempo (minutos)	Concentración de deoxinivalenol (µg/kg)						media	DS	CV%
	1	2	3	4	5	6			
5	1098	1240	1460	1405	880	1610	1282	265	20,7
10	1975	1771	2178	1917	2143	2036	2003	150	7,5
15	2904	2730	2524	2814	2325	2015	2552	336	13,2
20	3006	3088	2908	3071	3237	3673	3164	272	8,6
25	3885	3391	3528	3960	3710	3637	3685	214	5,8
30	5270	4381	4296	4881	4254	4839	4653	407	8,7
35	4948	4903	3922	3784	4752	3613	4320	611	14,1
40	4987	3814	4456	4875	3567	4093	4299	573	13,3
45	5284	4501	4924	5016	4195	5175	4849	419	8,6
50	4670	4667	4303	4768	4683	4962	4675	214	4,6
55	6067	6156	5742	5604	5513	6303	5898	322	5,5
60	4375	4824	4277	5149	5276	5875	4963	600	12,1
65	4890	6235	5185	5688	5122	5097	5370	500	9,3
70	4510	5299	5040	6703	6034	6283	5645	831	14,7
75	5905	6886	5995	6708	6856	7280	6605	542	8,2
80	4795	6006	4918	6263	5651	5579	5535	582	10,5
85	5790	6397	5654	4933	6356	6632	5960	629	10,6
90	6474	6383	5493	7780	6131	4770	6172	1015	16,4
95	6518	6652	6259	5080	4294	5928	5788	923	15,9
100	3433	5918	5335	3664	5707	3594	4609	1162	25,2
105	4471	5174	4628	3817	5016	4134	4507	575	12,8
110	4489	3881	4081	3854	4290	4606	4200	314	7,5
115	6920	6039	4575	6087	6149	5172	5824	825	14,2
120	7308	4685	4500	5433	4836	7584	5724	1373	24,0

Harinas

tiempo (minutos)	Concentración de deoxinivalenol (µg/kg)								
	1	2	3	4	5	6	media	DS	CV%
5	458	815	615	501	551	464	567	135	23,8
10	408	679	591	426	329	363	466	138	29,6
15	409	732	525	799	342	413	537	188	35,0
20	983	656	522	657	815	1130	794	228	28,7
25	853	692	549	772	890	981	789	154	19,5
30	967	958	585	949	1135	1111	951	197	20,7
35	791	803	658	764	1091	910	836	148	17,8
40	929	716	742	916	1089	1309	950	223	23,4
45	1152	1088	807	1073	1268	1324	1118	182	16,3
50	1087	912	829	1210	1173	1250	1077	171	15,8
55	941	660	616	621	945	1082	811	203	25,0
60	805	676	771	721	913	926	802	101	12,6
65	1019	798	741	859	1151	1171	957	184	19,2
70	1062	914	617	847	1078	1221	956	212	22,2
75	976	984	711	904	1230	1302	1018	217	21,3
80	1093	1022	825	1061	1187	1257	1074	149	13,9
85	1190	1049	927	1008	1322	1368	1144	178	15,6
90	1158	1135	908	931	1366	1331	1138	192	16,9
95	822	1182	837	1126	945	1012	987	148	15,0
100	882	853	895	770	809	808	836	48	5,8
105	747	881	1150	1153	1479	1423	1139	289	25,4
110	1536	1456	1773	1557	1968	1628	1653	188	11,4
115	1923	1431	1389	1520	1461	1393	1520	204	13,4
120	1992	1664	1646	1902	1577	1603	1731	173	10,0

VARIABILIDAD ANALITICA

muestra	µg/kg repetición											mean	SD	CV%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1	áreas	17570	17801	17730	17147	16879	15915	16642	16523	16529	17323	17006	614	4
1	alturas	17656	18591	18107	17492	17324	16042	17400	16991	16898	18049	17455	719	4
2	áreas	2823	2861	2909	2741	3040	2684	2824	3035		2953	2874	122	4
2	alturas	2617	2660	2789	2722	2843	2680	2833	2811		2750	2745	81	3
3	áreas	2664	2412	2540	2660	2625	2632	2484	2494	2717	2728	2596	107	4
3	alturas	2482	2395	2513	2450	2446	2349	2308	2368	2496	2574	2438	82	3
4	áreas	968	986	1052	1007	1052	1032	1092	1071	1037	941	1024	48	5
4	alturas	973	967	1087	1001	1036	923	1081	1086	1048	934	1014	63	6
5	áreas	540	526	558	516	572	558	569	563	586	608	560	27	5
5	alturas	555	550	561	536	609	608	612	581	674	621	591	42	7

HUMEDAD DE TAPAS DE EMPANADAS

muestra		Temp	tiempo	peso (g)		peso	tara	peso (g)		
				crudo	cocido			peso 72 horas	muestra	peso seco
70		masa cruda				39,233	37,1092	38,6391	2,1238	1,5299
71		masa cruda								
72		169	0.5´	30,9	34	101,746	99,6704	101,2959	2,0756	1,6255
73		169	0.5´	29,2	32,4	99,8846	96,6011	98,4537	3,2835	1,8526
74		169	2´	29,4	31,1	96,1022	94,5139	95,9021	1,5883	1,3882
75		169	2´	30	31,6	103,5467	101,913	103,3385	1,6342	1,426
76		169	5´	28,8	30,6	99,3573	97,6203	99,3498	1,737	1,7295
77		169	5´	30,8	30,1	98,9876	97,1354	98,8664	1,8522	1,731
78		169	9´	29,8	28,8	43,0037	41,0558	43,0037	1,9479	1,9479
79		169	9´	30,3	31,2	61,3495	58,4752	61,3806	2,8743	2,9054
80		205	10 seg	30,6	31,7	98,109	95,7138	97,6743	2,3952	1,9605
81		205	10 seg	29,6	31	103,3601	101,476	102,9461	1,8841	1,4701
82		205	0.5´	30,4	30,7	55,6172	53,4525	55,257	2,1647	1,8045
83		205	0.5´	29,8	30,4	103,3445	101,654	103,0719	1,6908	1,4182
84		205	1,5	29,4	27,9	40,5175	38,3924	40,3957	2,1251	2,0033
85		205	1,5	27,7					0	
86		205	2.5´		28	98,0502	96,576	98,0087	1,4742	1,4327
87		205	2.5´	28	26	102,519	100,702	102,5121	1,8169	1,81
88		243	5´	28	31,4	102,4096	99,8857	101,9128	2,5239	2,0271
89		243	5´							
90		243	20´´	28,4	29,2	62,3271	60,6825	62,1689	1,6446	1,4864
91		243	30´´	31	31,4	40,0228	37,6479	39,7513	2,3749	2,1034
92		243	40´´	29,1	28,4	109,129	107,032	108,7931	2,0975	1,7616
93		243	40´´	29,8	30	39,7197	37,5681	39,4239	2,1516	1,8558
94		243	60´´	29,6	28,2	62,0502	59,903	61,8145	2,1472	1,9115
95		243	60´´	28,8	27,6	59,8655	57,1925	59,7469	2,673	2,5544

TIEMPOS DE COCCION DE LAS TAPAS DE EMPANADAS

Tapas		
Temp	tiempo	muestra
° C	minutos	Número
	cruda	70
	0,5	72
	0,5	73
169	2	74
	2	75
	5	76
	5	77
	9	78
	9	79
	10	80
	10	81
	30	82
205	30	83
	90	84
	150	86
	150	87
	5	88
	20	90
243	30	91
	40	92
	40	93
	60	94
	60	95

MEDICIÓN DE COLOR DE TAPAS DE EMPANADAS

Muestra =70							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	53,07	55,29	40,3	1	51,63	53,75	38,63
2	52,38	54,6	39,78	2	51,71	53,82	38,8
3	51,5	53,65	39,1	3	51,71	53,97	38,69
4	51,59	53,73	39,12	4	50,48	52,53	37,39
5	51,83	53,98	39,3	5	51,73	53,89	38,99
6	51,72	53,83	39,08	6	51,17	53,23	38,16
7	51,63	53,77	39,91	7	50,65	52,69	37,53
8	51,83	53,96	38,77	8	51,04	53,1	38,17
9	50,03	52,05	36,93	9	50,97	52,98	37,58
10	51,29	53,4	38,53	10	51,06	53,13	37,94
media	51,69	53,83	39,08		51,22	53,31	38,19
mediana	51,68	53,80	39,11		51,12	53,18	38,17

Muestra =72							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	29,49	31,01	20,79	1	31,94	33,5	24,56
2	22,96	23,84	14,41	2	31,44	32,89	25,21
3	28,6	29,85	20,48	3	34,2	35,99	24,32
4	27,8	29,12	19,75	4	32,88	34,39	22,86
5	26,63	27,75	18,76	5	34,83	36,53	25,37
6	35,11	36,85	26,71	6	23,81	24,62	14,81
7	31,75	33,47	24,06	7	27,47	28,67	20,3
8	31,89	33,64	22,71	8	26,33	27,49	18,9
9	23,44	24,37	16,62	9	22,35	23,22	15,32
10	25,85	26,85	17,48	10	25,33	26,55	20,1
media	28,35	29,68	20,18		29,06	30,39	21,18
mediana	28,20	29,49	20,12		29,46	30,78	21,58

Muestra =73							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	31,66	38,08	22,53	1	32,3	33,98	25,74
2	32,3	33,78	19,84	2	29,38	30,74	22,62
3	33,77	35,36	25,29	3	28,92	30,38	23,06
4	36,26	38,07	26,56	4	28,82	30,08	19,38
5	28,34	29,57	18,31	5	32,15	33,62	24,51
6	33,07	34,5	22,82	6	28,02	29,24	21,14
7	32,08	33,44	20,71	7	24,4	28,18	15,13
8	25,99	27,15	19,12	8	27,75	28,98	18,02
9	32,94	34,48	25,12	9	24,9	25,88	17,97
10	31,16	32,75	24,79	10	28,33	29,62	21,6
media	31,76	33,72	22,51		28,50	30,07	20,92
mediana	32,19	34,13	22,68		28,58	29,85	21,37

Muestra =74							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	25,57	26,93	17,83	1	40,03	42,18	31,29
2	26,69	27,93	19,37	2	25,11	26	16,45
3	29,45	30,63	20,77	3	41,45	43,57	29,93
4	26,99	28,18	18,79	4	24,25	25,11	16,45
5	37,56	39,52	27,5	5	33,78	35,56	25,31
6	40,85	42,35	32,04	6	42,23	44,47	34,53
7	40,07	42,02	29,11	7	37,21	39,31	29,83
8	43,31	46,04	34,25	8	30,85	32,69	25,13
9	22,41	23,43	15,88	9	42,51	44,84	32,68
10	38,31	40,08	27,47	10	21,27	21,82	13,27
media	33,12	34,71	24,30		33,87	35,56	25,49
mediana	33,51	35,08	24,12		35,50	37,44	27,57

Muestra =75

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	30,77	32,28	21,66	1	38,24	39,71	25,75
2	29,09	30,55	21,11	2	33,21	34,61	22,64
3	28,53	29,8	20,07	3	24,53	25,18	15,23
4	42,34	44,89	33,49	4	30,4	31,76	21,43
5	42,19	44,67	33,12	5	43,61	45,99	34,06
6	30,49	32,32	23,71	6	31,14	32,65	23,25
7	24,44	26,02	30,29	7	41,86	43,92	29,82
8	29,9	31,52	24,39	8	32,86	34,08	22,06
9	18,14	19,09	15,06	9	18,58	18,92	10,95
10	16,84	17,53	11,72	10	32,42	33,4	20,47
media	29,27	30,87	23,46		32,69	34,02	22,57
mediana	29,50	31,04	22,69		32,64	33,74	22,35

Muestra =76

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	24,53	24,74	12,79	1	20,96	21,16	11,39
2	12,07	12,19	6,22	2	33,07	34,21	20,85
3	7,3	7,2	2,92	3	26,41	26,67	14,53
4	4,17	3,97	1,44	4	22,29	22,78	13,44
5	6,43	6,34	2,51	5	12,66	12,64	6,14
6	2,97	2,71	0,78	6	14,22	13,74	5,53
7	5,35	5,53	3,26	7	26,6	26,43	12,85
8	38,31	38,98	20,98	8	17,1	17,63	7,38
9	5,17	4,87	1,63	9	13,69	13,07	5,24
10	17,92	18	8,91	10	38,84	40,14	24,18
media	12,42	12,45	6,14		22,58	22,85	12,15
mediana	6,87	6,77	3,09		21,63	21,97	12,12

Muestra =77

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	43,14	44,47	26,35	1			
2	38,58	39,4	22,52	2			
3	52,14	53,3	29,48	3			
4	46,34	47,82	28,18	4			
5	42,58	43,46	24	5	42,75	44,86	31,94
6	45,91	47,25	27,6	6	30,81	32,3	22,67
7	34,85	35,56	19,61	7	40,93	41,15	20,31
8	34,79	35,42	20,34	8	34,91	34,92	17,04
9	37,64	38,03	20,37	9	30,36	31,59	21,04
10	44,43	45,26	24,39	10	38,88	40,65	27,99
media	42,04	43,00	24,28		36,44	37,58	23,50
mediana	42,86	43,97	24,20		36,90	37,79	21,86

Muestra =78

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	35,19	33,59	14,18	1	20,34	20,37	10,54
2	29,76	28,39	11,93	2	16,08	15,46	6,25
3	22,07	20,52	8,09	3	16,54	15,42	6,27
4	20,08	18,96	7,66	4	24,43	23,68	10,73
5	28,03	26,18	11,07	5	24,94	23,87	9,84
6	33,36	31,79	14,74	6	32,64	33,47	20,62
7	34,69	33,08	14,39	7	25,24	24,58	11,3
8	35,53	33,91	14,1	8	17,42	16,68	7,45
9	32,35	30,41	12,78	9	26,05	25,33	11,4
10	27,95	26,19	11,41	10	23,66	22,37	9,42
media	29,90	28,30	12,04		22,73	22,12	10,38
mediana	31,06	29,40	12,36		24,05	23,03	10,19

Muestra =79

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	29,22	27,82	12	1	21,87	20,55	8,6
2	32,79	30,7	12,26	2	25,79	25,01	11,32
3	31,22	29,39	12,14	3	15,41	14,64	6,35
4	30,61	28,66	11,48	4	23,46	22,21	9,31
5	30,82	29,26	11,86	5	18,91	17,71	7,52
6	25,73	23,91	9,81	6	23,28	23,25	12,11
7	25,38	23,71	9,95	7	20,78	19,69	8,88
8	26,52	25,07	10,57	8	21,13	20,49	9,18
9	23,1	21,98	9,12	9	30,81	29,3	11,64
10	30,99	29,21	12,01	10	24,47	23,31	9,96
media	28,64	26,97	11,12		22,59	21,62	9,49
mediana	29,92	28,24	11,67		22,58	21,38	9,25

Muestra =80

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	30,39	31,18	18,04	1	28,5	29,44	17,75
2	34,91	36,68	25,74	2	25,01	25,49	14,31
3	29,86	30,95	19,77	3	27,81	28,69	17,85
4	34,63	36	23,37	4	30,32	30,59	17,46
5	27,5	28,02	17,16	5	34,59	35,37	21,39
6	29,65	30,46	19,07	6	32,53	33,48	21
7	32,31	33,13	19,92	7	37,4	38,62	25,02
8	34,11	34,95	20,74	8	25,06	25,65	13,78
9	28,65	29,22	17,21	9	25,4	26,02	15,48
10	27,22	27,77	16,5	10	27,55	28,23	17,29
media	30,92	31,84	19,75		29,42	30,16	18,13
mediana	30,13	31,07	19,42		28,16	29,07	17,61

Muestra =81

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	25,95	26,78	15,18	1	30,14	31,29	19,94
2	33,85	35,24	23,34	2	30,41	31,47	19,55
3	35,84	37,32	25,18	3	36,7	38,38	28,46
4	31,29	32,29	18,95	4	39	40,79	30,48
5	39,32	41,21	28,88	5	36,41	37,93	26,5
6	33,93	35,16	23,17	6	40,37	42,23	31,86
7	32,98	34,22	21,05	7	33,97	35,28	23,75
8	37,33	38,99	26,32	8	40,04	41,9	20,73
9	29,13	30,22	19,2	9	32,32	33,51	22,01
10	26,46	27,25	15,43	10	30,64	31,77	19,68
media	32,61	33,87	21,67		35,00	36,46	24,30
mediana	33,42	34,69	22,11		35,19	36,61	22,88

Muestra =82

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	45,09	46,88	30,97	1	38,09	38,71	21,09
2	34,57	34,95	20,1	2	32,44	32,79	18,85
3	28,08	27,79	14,13	3	34,05	34,58	19,6
4	33,36	33,28	17,68	4	27,83	28,39	16,55
5	29,1	29,28	15,96	5	30,64	31,75	19,9
6	34,48	35,1	20,06	6	38,42	40,11	28,12
7	40,41	41,82	26,81	7	35,73	36,33	20,37
8	28,79	28,71	14,93	8	31,79	32,17	18,52
9	26,74	26,43	13,66	9	31,38	32,1	19,63
10	38,53	39,73	26,38	10	34	34,71	19,76
media	33,92	34,40	20,07		33,44	34,16	20,24
mediana	33,92	34,12	18,87		33,22	33,69	19,70

Muestra =83

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	31,55	31,76	16,99	1	38,53	39,83	24,28
2	34,16	35,07	20,78	2	34,72	35,55	21,05
3	33,23	34,18	20,98	3	34,66	35,37	19,72
4	27,12	27,11	14,18	4	36,35	36,6	18,67
5	31,75	32,56	19,13	5	29,73	30,08	16,97
6	31,95	32,48	18,71	6	35,48	36,55	21,78
7	31,29	31,52	16,86	7	33,83	34,12	18,03
8	30,74	31,06	17	8	36,3	37,64	25,95
9	27,03	27,5	16,27	9	33,87	35,75	25,14
10	31,87	32,62	19,74	10	28,33	29,38	18,89
media	31,07	31,59	18,06		34,18	35,09	21,05
mediana	31,65	32,12	17,86		34,69	35,65	20,39

Muestra =84							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	23,22	11,23	10,35	1	17,54	16,54	6,29
2	11,23	10,35	3,66	2	30,78	29,53	12,36
3	13,24	12,28	4,22	3	41,32	41,39	20,35
4	11,34	10,49	3,45	4	24,95	23,55	9,81
5	10,17	9,37	3,19	5	30,49	29,87	12,96
6	7,61	7,86	4,94	6	27,98	27,68	12,99
7	11,76	11,53	4,99	7	31,17	30,08	12,82
8	4,18	4,28	2,46	8	25,53	27,22	11,85
9	9,73	9,07	3,14	9	32,2	31,38	14,52
10	6,59	6,19	2,2	10	35,46	34,57	15,41
media	10,91	9,27	4,26		29,74	29,18	12,94
mediana	10,70	9,86	3,56		30,64	29,70	12,89

Muestra =86							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	20,24	18,96	7,9	1	10,1	9,27	3,07
2	25,06	23,74	9,27	2	10,74	10,06	3,52
3	23,45	21,45	7,55	3	5,85	5,41	1,81
4	15,94	15,07	5,68	4	9,73	8,97	3,25
5	22,41	20,98	8,35	5	4,75	4,34	1,27
6	19,33	17,92	6,42	6	7,46	7,08	2,89
7	23,3	21,08	6,93	7	10,96	10,33	4,09
8	24,47	22,85	9,47	8	11,83	10,93	3,79
9	25,6	23,86	8,85	9	20,22	19,28	7,4
10	23,64	21,56	7,76	10	9,02	8,39	2,96
media	22,34	20,75	7,82		10,07	9,41	3,41
mediana	23,38	21,27	7,83		9,92	9,12	3,16

Muestra =87							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	11,06	9,9	3,5	1	13,5	12,32	4,24
2	14,27	12,76	4,39	2	8,48	7,7	2,55
3	13,92	12,73	4,74	3	5,08	4,78	1,86
4	24,54	22,48	8,11	4	2,28	1,96	0,4
5	26,77	25,4	9,67	5	7,98	7,33	2,51
6	19,07	17,15	5,63	6	8,55	7,66	5,53
7	25,45	24,06	9,19	7	6,42	5,88	2,09
8	12,88	11,57	3,85	8	13,53	12,33	4,33
9	13,25	12,05	4,18	9	9,26	8,57	2,87
10	25,49	23,67	8,31	10	12,13	11,07	3,75
media	18,67	17,18	6,16		8,72	7,96	3,01
mediana	16,67	14,96	5,19		8,52	7,68	2,71

Muestra =88							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	32,79	34,07	20,49	1	31,92	32,95	19,67
2	31,46	32,72	22,49	2	27,43	28,68	17,88
3	31,67	33,28	22,22	3	29,57	29,6	18,23
4	25,17	26,09	15,3	4	26,99	28,01	17,57
5	25,56	26,77	16,57	5	26,16	27,28	16,34
6	22,01	22,76	12,71	6	28,09	29,43	20,09
7	27,14	28,31	17,99	7	26,53	27,66	16,15
8	23,76	24,58	13,41	8	32,02	33,03	20
9	24,63	25,5	14,76	9	28,37	29,67	19,37
10	20,51	21,28	12,17	10	27,34	28,5	17,17
media	26,47	27,54	16,81		28,44	29,48	18,25
mediana	25,37	26,43	15,94		27,76	29,06	18,06

Muestra =90							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	25,04	24,5	11,74	1	27,66	26,48	10,77
2	29,74	29,58	14,74	2	23,23	22,3	9,72
3	26,59	26,24	12,91	3	22,2	20,55	8,23
4	17,56	16,43	7,13	4	24,22	22,88	9,84
5	25,26	24,45	11,31	5	29,01	28,39	13,26
6	18,61	17,28	7	6	25,21	23,97	10,09
7	28,9	29,09	16	7	22,55	21,36	8,65
8	18,85	17,97	8,2	8	21,83	20,67	8,62
9	21,91	20,7	8,79	9	18,87	17,44	6,96
10	19,25	17,93	7,65	10	19,39	18,01	7,13
media	23,17	22,42	10,55		23,42	22,21	9,33
mediana	23,48	22,58	10,05		22,89	21,83	9,19

Muestra =91							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	24,41	23,25	9,61	1	24,05	23,16	9,34
2	22,98	21,7	9,47	2	24,04	22,74	9,29
3	18,89	17,92	7,99	3	21,98	20,47	7,43
4	16,09	14,74	5,33	4	23,43	22,35	10,16
5	20,47	19,6	9,12	5	29,12	27,41	11,94
6	24,07	22,67	9,23	6	30,93	30,75	15,64
7	23,03	22,57	10,8	7	19,27	17,54	7,11
8	19,57	12,45	6,5	8	24,78	24,13	10,64
9	23,31	22,11	9,37	9	18,25	17,7	8,03
10	25,77	24,96	11,25	10	22,33	21,27	8,67
media	21,86	20,20	8,87		23,82	22,75	9,83
mediana	23,01	21,91	9,30		23,74	22,55	9,32

Muestra =92

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	11,33	10,33	3,94	1	22,46	20,76	7,41
2	26,74	24,45	8,29	2	19,77	20,64	15,17
3	19,92	18,65	7,43	3	15,61	14,11	4,55
4	16,5	15,27	6,07	4	20,87	19,76	7,14
5	20,41	19,23	7,62	5	26,37	24,45	9,69
6	13,13	11,97	4,65	6	20,15	13,51	6,3
7	24,31	23,13	9,23	7	22,01	22,94	15,87
8	20,2	18,8	7,03	8	24,89	23,32	9,02
9	22,04	20,61	7,82	9	19,67	20,48	13,54
10	27,32	25,68	9,64	10	24,67	23	8,48
media	20,19	18,81	7,17		21,65	20,30	9,72
mediana	20,31	19,02	7,53		21,44	20,70	8,75

Muestra =93

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	17,63	15,86	5,54	1	23,43	21,59	7,52
2	21,6	19,91	6,83	2	25,25	25,76	15,89
3	12,8	11,69	4,98	3	38,09	38,53	20,26
4	21,57	20,01	7,43	4	24,84	22,81	7,59
5	25,76	23,9	8,35	5	24,05	22,79	8,91
6	25,95	23,99	8,78	6	25,88	23,9	8,17
7	26,46	24,88	9,45	7	26,36	22,75	11,46
8	21,74	18,73	6,39	8	26,26	24,9	9,74
9	20,5	18,14	6,17	9	28,46	26,55	9,7
10	16,85	14,24	4,1	10	27,59	27,25	12,85
media	21,09	19,14	6,80		27,02	25,68	11,21
mediana	21,59	19,32	6,61		26,07	24,40	9,72

Muestra =94

lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	22,66	20,16	6,52	1	19,14	19,79	11,49
2	13,77	11,99	4,22	2	13,43	13,59	7,89
3	13,74	12,88	4,67	3	13,69	12,26	4,31
4	22,72	20,42	6,51	4	18,07	16,37	5,39
5	19,63	17,72	6,31	5	12,07	10,65	3,28
6	14,87	13,33	5,02	6	19,23	17,21	5,41
7	13,97	12,57	4,02	7	14,78	13,42	4,98
8	17,21	15,35	5,29	8	15,35	13,79	4,92
9	20,49	18,07	5,79	9	31,92	33,2	20,87
10	12,49	17,01	3,44	10	19,97	18,1	6,06
media	17,16	15,95	5,18		17,77	16,84	7,46
mediana	16,04	16,18	5,16		16,71	15,08	5,40

Muestra =95							
lado 1				lado 2			
	x	y	z		x	y	z
1	15,16	13,63	4,48	1	19,3	16,99	5,35
2	18,97	17,66	5,93	2	16,3	14,11	4,48
3	9,84	8,79	3,52	3	16,86	14,78	4,97
4	11,9	10,57	3,5	4	18,27	16,01	4,94
5	13,46	11,83	4,3	5	26,76	24,89	9,05
6	12,51	11,23	4,32	6	21,36	19,47	6,73
7	11,67	10,31	4,24	7	16,53	14,25	5,13
8	13,38	12,95	5,89	8	14,36	12,85	4,64
9	8,57	7,81	3,41	9	19,98	17,75	5,75
10	16,41	14,71	4,67	10	18,86	16,59	5,16
media	13,19	11,95	4,43		18,86	16,77	5,62
mediana	12,95	11,53	4,31		18,57	16,30	5,15

Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology

M. M. Samar^{†‡}, M. S. Neira^{‡§}, S. L. Resnik^{†‡*} and A. Pacin[§]

[†]Departamento de Química Orgánica; [‡]Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina; [§]Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina; ^{*}Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina

(Received 13 December 2000; revised 16 March 2001; accepted 20 March 2001)

The stability of naturally occurring DON was evaluated during the fermentation stage of the bread-making process on a pilot scale. Two different products, French bread and Vienna bread, were prepared with naturally contaminated wheat flour (150 mg kg⁻¹) under controlled experimental conditions. Dough was fermented at 30, 40 and 50 °C according to standard procedures employed in Argentinean low-technology bakeries. When the dough was fermented at 50 °C, the maximum reduction was 56% for the Vienna bread, with French bread being reduced by 41%. DON reduction during bread-making occurs not only in the bakery due to thermal decomposition, but also during the fermentation step. The Argentinean traditional bread-making process might reduce DON levels during the fermentation stages if the dough is leavened at temperatures > 30 °C.

Keywords: deoxynivalenol, detoxification, mycotoxin, processing

Introduction

Wheat products are the main food consumed by the population in Argentina and in other South American

countries. According to the Food and Agriculture Organization (FAO 1991), the Argentineans ingest 343.8 g/person/day of wheat products. Likewise, Gallo *et al.* (1992) and Pacin *et al.* (1998) reported that wheat products consumption represented 32–48% of total calories in Argentina.

Deoxynivalenol (DON) is a widespread contaminant of wheat that has been implicated in animal and human toxicosis (Bhat *et al.* 1989, Beasley and Lambert 1990, Pacin 1992, Prelusky *et al.* 1994, Nijs *et al.* 1997) and most recently in the aetiology of Ig-A nephropathy (Greene *et al.* 1994). Natural occurrence of DON in wheat and in wheat products has been reported world-wide (Quiroga *et al.* 1995, Resnik *et al.* 1995, Trucksess *et al.* 1995, 1996, Pacin *et al.* 1997, Scott 1997, Yoshizawa and Jin 1998, Pascale *et al.* 2000).

At present, there is no way to prevent its occurrence in grains and in some cases there may be increases in mycotoxin levels in some processed foods (Scott 1998), so considerable work has been undertaken on reduction processes, either intentional treatments or normal food processing.

Bakery processing has been reported to reduce DON contamination by some (Abbas *et al.* 1985, Seitz *et al.* 1986, Boyacioglu *et al.* 1993), while others suggested that DON is highly stable in this process (El-Banna *et al.* 1983, Scott *et al.* 1983, 1984) (table 1). Moreover, DON appeared to be very stable at 100 °C at the pH of the bread (Wolf and Bullerman 1998).

Neira *et al.* (1997) observed DON reduction after the fermentation step and also after the baking step in different products manufactured in one low-technology bakery in Argentina. The aim of the present study was to evaluate the fermentation process employed by small bakeries in Argentina on a pilot scale in order possibly to increase toxin degradation by manipulation of fermentation conditions.

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Industrias, FCEyN, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina. e-mail: sresnik@cvtci.com.ar

Table 1. References on the effect of bakery processing on DON contamination.

Reference	DON level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Baking formula	Fermentation conditions, temperatures time	% DON remaining after baking (flour = 100%)
El-Banna <i>et al.</i> (1983)	2000 (spiked) 3300 (natural)	50 g flour 0.7% yeast 0.5% salt	room temperature, 75 min	115
Scott <i>et al.</i> (1983)	4100			102
Scott <i>et al.</i> (1984)	1000–6800	100 g flour 3% yeast 4% sugar 2% salt additives (20 ppm potassium bromate	room temperature, 80 min	107
Abbas <i>et al.</i> (1985)	300 500 9100	AACC approved method 1983		36–84
Seitz <i>et al.</i> (1986)	220–3200	100 g flour 3.5–5.3% yeast 6% sugar 1.5% salt 3% shortening 0.25 barley malt 50 ppm ascorbic acid	30 °C 90–120 min	53–64 (220 ppb) 70–95 (350 ppb) 66–80 (880 ppb) 74–90 (880 ppb) 98–113 (2030 ppb) 125 (3200 ppb)
Boyacioglu <i>et al.</i> (1993)	2900	25.0 g flour 3% yeast 5% sugar 2% salt without additives = potassium bromate	30 °C, 3 h	93 55–110 110.5
Neira <i>et al.</i> (1997)	1370	traditional bakery recipes	25 °C, 5–11 h	78.4 (fermented dough) 55.7 (baked product)

Materials and methods

Three different temperatures (30, 40, 50 °C), two time intervals and two different products (French bread and Vienna bread) were used, and the entire experiment was repeated three times. The initial time (no fermentation) was used as a positive control and was repeated twice for each product.

Standards of deoxynivalenol (DON) and T-2 toxin, heptafluorobutyric anhydride (HFBA) and 4-(*N,N*-dimethylamino)-pyridine (DMAP) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). LC-grade solvents (acetonitrile, toluene and ethyl acetate) and sodium bicarbonate were purchased from Merck.

Compressed yeast cake was purchased from Calsa (70% moisture and 2×10^{10} cells g⁻¹) and stored at 4 °C.

Forty samples of five different brands of 1 kg wheat flour units of suitable baking strength were purchased at various supermarkets of Luján City during May 1997. Natural DON contamination was found in

35% (14/40) of the wheat flour samples analysed with a mean for the positive samples of $94 \mu\text{g kg}^{-1}$ (range of positives 50–175 $\mu\text{g kg}^{-1}$). No T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON, T-2-triol, T-2-tetraol or zearalenone were found in any of the flour samples. Wheat flour contaminated with $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ of DON was used to prepare the dough.

Dough preparation

Dough was made with the following ingredients. French bread: flour (14% moisture basis, 100 parts), water (40 °C, 54 parts), malt flour (0.20 parts), salt (2.00 parts) and yeast (0.16 parts). Vienna bread: flour (14% moisture basis, 100 parts), water (40 °C, 30 parts), fat (5 parts), salt (1.00 parts), sugar (10 parts) and yeast (2 parts).

Dry ingredients were mixed first, then moistened with pre-warmed water (40 °C) and finally yeast (dissolved in pre-warmed water) was incorporated. Dough was mixed manually until held together with a smooth

appearance and was then placed in a dough mixer for 2 h at 10 rpm in the case of French bread and for 12 min at 42 rpm in the case of Vienna bread. After mechanically mixing, dough had a non-sticky, smooth and satiny appearance and optimum handling properties. The dough was then punched down and the ends and sides of the dough were folded five times in the case of French bread and 15 times for Vienna bread. Final dough temperature was $\sim 24-26^\circ\text{C}$.

The fermentation step was carried out in a forced convection oven. After an initial fermentation (10 min at room temperature covered with a wet sheet), the dough bulk was divided and sealed. Each loaf (mean 40 g) represented 25 g flour. Loaves were fermented at 30, 40 or 50 $^\circ\text{C}$ and 80% relative humidity. Samples were stored at -18°C until DON quantification.

The temperature in the geometrical centre of the loaf during fermentation was monitored with a calibrated thermocouple (Termoquar, Argentina) and recorded at various times.

The doubling time of the loaf of both types of breads was determined in triplicate for each temperature. Loaves were placed in a volumetric flask, which was set in the fermentation oven previously adjusted at the work temperature. Volumes were recorded at different intervals of time until three successive volume measurements showed no variation.

Moisture content (mc) of all samples was determined in triplicate, as described (Pacín *et al.* 1997). Of each loaf, 2 g were heated in a vacuum oven at 60 $^\circ\text{C}$ until two successive weight loss measurements, performed every 2 h, showed $<0.05\%$ mc difference.

Extraction and clean up of the samples was performed as described by Neira *et al.* (1997) with slight modifications. Samples, defatted with *n*-hexane, were extracted with acetonitrile:water (84:16) (mixture adjusted taking into account the water content of each sample) and blended for 3 min at high speed with an Osterizer blender. About 8 ml of the extract, previously filtered through Whatman No. 4 paper, was placed in an 8 $\times$ 15 mm culture tube and three portions of 0.5 ml were successively passed through a Mycosep 225 column (Romer Labs., Inc., MO, USA), each transferred to a different tube, evaporated to dryness in a 60 $^\circ\text{C}$ water bath under vacuum and stored at -18°C . Each tube contained nearly 130 mg flour-equivalent.

The dried extract residues were derivatized with HFBA as described by Croteau *et al.* (1994) in the

presence of T-2 toxin as internal standard. Briefly, the catalyst solution of DMAP was added to the dried extract, vortexed and 50 μl HFBA was added. The tube was placed in a heating block at 60–65 $^\circ\text{C}$ for 20 min. Excess of derivatizing agent was destroyed with 1 ml aqueous sodium bicarbonate solution (5% in distilled water) and 400 μl toluene was added. After centrifuging, the upper organic layer (480 μl) was transferred to a vial and stored at -18°C .

Gas chromatography with electron-capture detection (GC-ECD) was performed within 3 days of derivatization on a Hewlett-Packard Model 5890 Series II equipped with a split/splitless injector operating in the splitless mode, and a HP Model 3396 integrator. GC separation was achieved with a HP-5 capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μm thickness of film). The temperature program consisted of 1 min at 80 $^\circ\text{C}$, then an increase of 80–160 $^\circ\text{C}$ at 30 $^\circ\text{C min}^{-1}$, followed by 160–183 $^\circ\text{C}$ at 1 $^\circ\text{C min}^{-1}$ and then 183–280 $^\circ\text{C}$ at 12 $^\circ\text{C min}^{-1}$ (with a 5-min hold). Nitrogen flow was 1 ml min $^{-1}$. The temperatures of the injector and the detector were 250 and 300 $^\circ\text{C}$, respectively. The injection volume was 1 μl . The detection limit was 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ on the basis of three times the average signal-to-noise ratio of the baseline. Each sample replicate was analysed three times. Average recoveries of DON from flour and non-fermented dough samples spiked with 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were 92% (SD 2.5, $n = 3$) and 88% (SD 5.0, $n = 3$), respectively.

Concentration of DON in each loaf was converted to an equivalent flour weight basis and the values were not corrected for recoveries.

Microcal Origin statistical software (Microcal Software, Northampton, MA, USA) was used to verify significant differences between treatments by one-way analysis of variance (ANOVA) and to perform non-linear fitting.

Results and discussion

In traditional Argentinean bakeries, fermentation is performed at temperatures in the range 30–50 $^\circ\text{C}$ for variable times. The doubling of the loaf volume indicates the end of the fermentation step. The time required to fit this objective at the different temperatures was obtained by fermenting the loaves at 30, 40 or 50 $^\circ\text{C}$ and by plotting volume increase versus time (figure 1). As it can be seen from the sigmoidal curves

obtained, there is a short lag period followed by a rapid increase in volume before reaching a plateau that is almost the same at the three temperatures and represents a triple increase in volume approximately. The Boltzman equation (1)

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (1)$$

where x is time and A_1 , A_2 , x_0 and dx are four constants, fits adequately the points obtained for volume increase with the French bread dough ($\chi^2 = 0.009$, 0.006 and 0.005 in the 30, 40 and 50°C curve respectively).

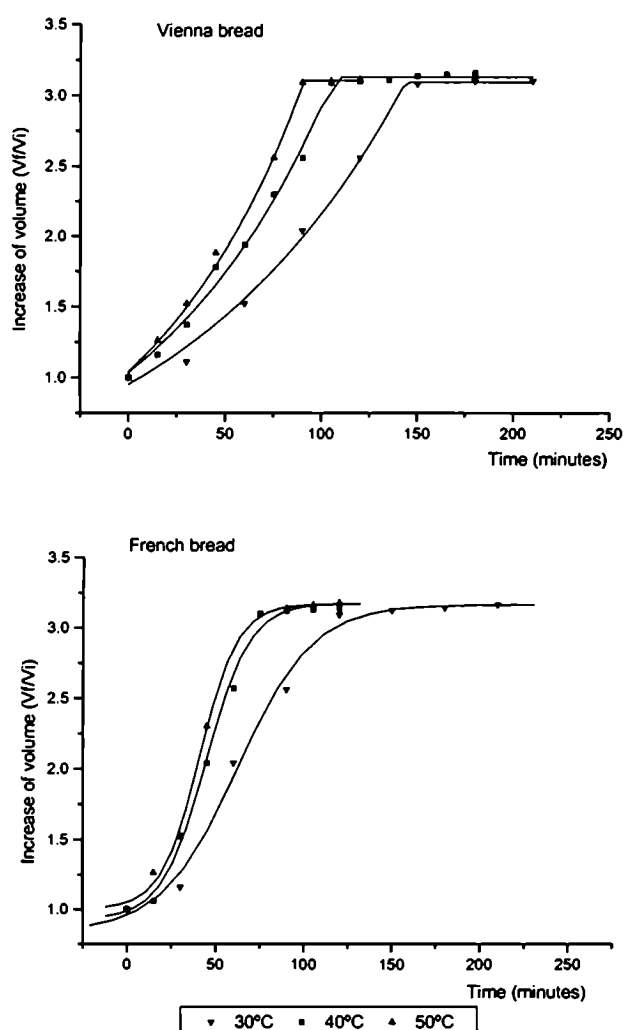


Figure 1. Increase of volume during fermentation. Each point is the mean of triplicate analysis ($SD < 0.02$).

Another experimental equation, the SRichards2 Model (2)

$$y = a \left[(1 + (d - 1)e^{-k(x-x_c)})^{1/(1-d)} \right] \quad (2)$$

$d \neq 1$

where x is the time and a , d , k and x_c are constants, was used in the case of the Vienna bread dough ($\chi^2 = 0.004$ in the three cases). The times selected to stop fermentation (approximate doubling of the loaf volume) were 60 min at 30°C, 45 min at 40°C and 40 min at 50°C in the case of French bread dough, and 90, 70 and 60 min, respectively, for Vienna bread. Concentration of DON was analysed at initial time (no fermentation), at final time (approximately doubling volume of the dough) and at half time of the last one. The real volume increase calculated using the equations cited and the times selected for DON analysis are given in table 2.

The temperature inside the dough in the fermentation oven at 50°C increased smoothly from the initial 26°C to nearly 40°C in 60 min (figure 2). When the oven temperature was 40°C, the temperature increased from 26 to 34°C inside the dough, while in the oven at 30°C dough temperature varied slightly between 25 and 27°C in 90 min.

DON levels at different fermentation times, DON reduction (per cent of change from initial time, mean of triplicate analysis) and the corresponding standard deviations (SD) are shown in table 2. DON concentration in French bread fermented at 30°C for 60 min was not significantly different than the initial level ($p = 0.84$) while when it was fermented at 50°C for 40 min (41% reduction) the difference was significant ($p = 0.05$). In Vienna bread, a 25% reduction was observed at 30°C ($p = 0.08$). The maximum reduction related to the initial contamination level (56%) was obtained in Vienna bread fermented 60 min at 50°C ($p = 0.01$). Although there is a higher level of yeast in Vienna dough compared with French bread, more work is needed to analyse if there is a relationship between initial yeast content and reduction.

Other authors studied the effect of the baking process with contradictory results. Details on fermentation conditions and changes observed by some of them at the end of the baking process are summarized in table 1. Abbas *et al.* (1985), Neira *et al.* (1997) and Seitz *et al.* (1986) detected a lower DON concentration in bread samples than in the wheat flours used to prepare them. The present results are in agreement

Table 2. Calculated increase of volume in the selected fermentation time and DON contamination and reduction (%). Volume increase calculations were made using the Boltzman equation for French bread and the equation of the SRichards2 Model for the Vienna bread. Control bread (no fermentation) had $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ (SD = 28).

Type of bread	Temperature (°C)	Fermentation time (min)	Increase of volume ^a (V_f/V_i)	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD	DON reduction (%)
French bread	30	30	1.06	146	17	0
		60	1.74	154	5	0
	40	23	1.1	127	28	15
		45	1.92	89	15	40
	50	20	1.07	106	19	29
		40	1.88	89	5	41
Vienna bread	30	45	1.36	153	14	0
		90	1.99	112	3	25
	40	35	1.49	120	2	20
		70	2.14	96	6	36
	50	30	1.49	76	12	49
		60	2.14	66	27	56

^a V_f , final volume; V_i , initial volume.

with their findings and differ from other studies that reported a high retention of DON in bread, probably due to differences in the technology of the bakery process. It is important to point out that several factors could affect the fate of a mycotoxin during food processing including the food matrix, pH, moisture content, process temperature, natural or spike contamination, and concentration of the toxin (Scott 1998). Bread baking quality decreased noticeably in heavily contaminated flours and greater reduction was obtained when DON levels in flour were

lower (Seitz *et al.* 1986). Scott *et al.* (1984) incorporated additives, particularly potassium bromate, and reported a slight increase in DON levels in bread. This result is in agreement with the observation of Boyacioglu *et al.* (1993) on the effect of additives. These authors obtained a 7% reduction in control bread made from whole wheat flour and fermented at room temperature for 3 h (a result not in disagreement with the present data at 30 °C) and observed changes from reduction of 45% with sodium bisulphite to a 10% increase with potassium bromate. Others (Young 1986, Young *et al.* 1986) showed that DON complexes reversibly with bisulphite. In only one case was the fermentation step evaluated (El-Banna *et al.* 1983). They studied the process of making Egyptian bread and observed no reduction in the fermented dough or in the bread. This is also similar with the present results when the fermentation oven was set at 30 °C. Young *et al.* (1984) observed an increase in DON levels in yeast doughnuts. They suggested that perhaps the wheat used was also contaminated with a DON precursor, which was converted to DON by the active yeast. This fact is another point to be considered and might explain somewhat the diversity of results found in the literature.

In agreement with previous observations on DON reduction in Argentinean bakery products (Neira *et al.* 1997), the results presented here indicate that DON reduction during bread-making might be due not only to thermal decomposition of the toxin, but also to

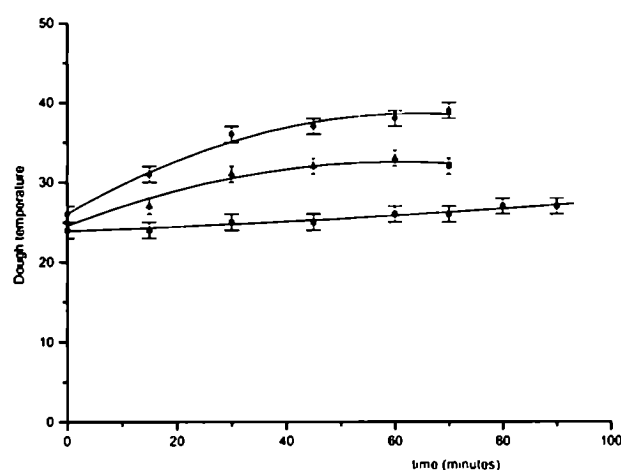


Figure 2. Temperature profiles in the centre of French bread dough placed in a fermentation oven at 30 °C (■), 40 °C (▲) and 50 °C (●).

some process during yeast fermentation. It has been reported that the fermentation process contributes to the reduction of contamination by other mycotoxins (Westby *et al.* 1997).

In conclusion, the Argentinean traditional bread-making process might reduce DON levels during the fermentation stages if the dough is leavened at temperatures $> 30^{\circ}\text{C}$ under controlled conditions.

Acknowledgements

The authors thank Mrs Gabriela Cano and Mrs Daniela Taglieri for technical assistance and the Universidad Nacional de Luján, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica for financial support.

References

- ABBAS, H. K., MIROCHIA, C. J., PAWLOSKY, R. J., and PUSCH, D. J., 1985. Effect of cleaning, milling and baking on deoxynivalenol in wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**, 482–486.
- BEASLEY, V. R., and LAMBERT, R. J., 1990. The apparently minimal hazard posed to human consumers of products from animals fed trichothecenes-contaminated grains-1990. *Veterinary and Human Toxicology*, **32**, 27–39.
- BHAT, R. V., BEDU, S. R., RAMAKRISHNA, Y., and MUNSHI, K. L., 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicoses associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. *Lancet*, **7**, 35–37.
- BOYACIOGLU, D., HETTIARACHCHY, N. S., and D'APPOLONIA, B. L., 1993. Additives affect deoxynivalenol (vomitoxin) flour during breadbaking. *Journal of Food Science*, **58**, 416–418.
- CROTEAU, S. M., PRELUSKY, D. B., and TRENHOLM, H. L., 1994. Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 928–934.
- EL-BANNA, A. A., LAU, P.-Y., and SCOTT, P. M., 1983. Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs II — deoxynivalenol (vomitoxin) during making of Egyptian bread. *Journal of Food Protection*, **46**, 484–486.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION, 1991. *Food Balance Sheets 1984–86 Average* (Rome: FAO).
- GALLO, A., BOURDIGNON, F., PACIN, A., BARBIERI, T., and RESNIK, S., 1992. Evaluation of food intake by means of 24 hour dietary recall in a town of the province of Buenos Aires, Argentina. *Ecology of Food and Nutrition*, **28**, 299–317.
- GREENE, D. M., AZCONA-OLIVERA, J. L., and PESTKA, J. J., 1994. Vomitoxin (deoxynivalenol) induced Ig-A nephropathy in B6C3F1 mouse: dose response and male predilection. *Toxicology*, **92**, 245–260.
- NEIRA, M. S., PACIN, A. M., MARTINEZ, E. J., MOLTÓ, G., and RESNIK, S. L., 1997. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *International Journal of Food Microbiology*, **37**, 21–25.
- NIJS, M. DE, VAN EGMOND, H. P., ROMBOUTS, F. M., and NOTERMANS, S. H. W., 1997. Identification of hazardous *Fusarium* secondary metabolites occurring in food raw materials. *Journal of Food Safety*, **17**, 161–191.
- PACIN, A., 1992. Las micotoxinas como factor de riesgo en la salud humana. *Seminario Internacional sobre Micotoxinas* (Colombia: IDEMA. Asociación Colombiana de Postcosecha de Granos), pp. 87–108.
- PACIN, A., RESNIK, S. L., NEIRA, M. S., MOLTÓ, G., and MARTINEZ, E. J., 1997. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 327–331.
- PACIN, A., MARTINEZ, E., PORTELA, M., and NEIRA, S., 1998. Consumo de alimentos en la población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. *La Alimentación Latinoamericana*, **221**, 28–36.
- PASCALÉ, M., DE GIROLAMO, A., VISCONTI, A., and PANCALDI, D., 2000. Indagine sulla presenza di deossinivalenolo in cereali prodotti in alcune aree del nord Italia nel 1998. *Informatore Fitopatologico*, **10**, 68–73.
- PRELUSKY, D. B., ROTTER, B. A., and ROTTER, R. G., 1994. Toxicology of mycotoxins. *Mycotoxin in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*, edited by J. D. Miller and H. L. Trenholm (St Paul, MN: Eagan), pp. 359–403.
- QUIROGA, N., RESNIK, S. L., PACIN, A., MARTINEZ, E., PAGANO, A., RICCOBENE, I., and NEIRA, S., 1995. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentinean wheat. *Food Control*, **6**, 201–204.
- RESNIK, S. L., COSTARRICA, L. M., and PACIN, A., 1995. Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control*, **6**, 19–28.
- SCOTT, P. M., 1997. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 333–339.
- SCOTT, P. M., 1998. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **149**, 543–548.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., DEXTER, J. E., BRENNAN, P. W., and TRENHOLM, H. L., 1984. Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. *Food Additives and Contaminants*, **1**, 313–323.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., LAU, P. Y., DEXTER, J. E., and GREENHALGH, R., 1983. Effects of experimental flour milling and breadbaking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard Red Spring wheat. *Cereal Chemistry*, **60**, 421–424.
- SEITZ, L. M., EUSTACE, W. D., MOHR, H. E., SHOGREN, M. D., and YAMAZAKI, W. L., 1986. Cleaning, milling and baking tests with hard red winter wheat containing deoxynivalenol. *Cereal Chemistry*, **63**, 146–150.
- TRUCKSESS, M. W., READY, D. W., PENDER, M. K., LIGMOND, C. A., WOOD, G. E., and PAGE, S. W., 1996. Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran. *Journal of AOAC International*, **79**, 883–887.
- TRUCKSESS, M. W., THOMAS, F., YOUNG, K., STACK, M. E., FULGUERAS, W. J., and PAGE, S. W., 1995. Survey of deoxynivalenol in U.S. 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of AOAC International*, **78**, 631–636.
- WESTBY, A., REILLY, A., and BAINBRIDGE, Z., 1997. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. *Food Control*, **8**, 329–339.

- WOLF, C. E., and BULLERMAN, L. B., 1998. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment. *Journal of Food Protection*, **61**, 365-367.
- YOUNG, J. C., 1986. Formation of sodium bisulfite addition products with trichothecenones and alkaline hydrolysis of deoxynivalenol and its sulfonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 919-923.
- YOUNG, J. C., FULCHER, G. R., HAYOE, J. H., SCOTT, P. M., and DEXTER, J. F., 1984. Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32**, 659-664.
- YOUNG, J. C., SUBRYAN, L. M., POTTS, D., MCLAREN, M. E., and GOBRAN, F. H., 1986. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 461-465.
- YOSHIZAWA, T., and JIN, YIN-ZHE, 1998. Trichothecene occurrence in Japanese wheat and barley --- its characteristics. *Mycotoxins*, **47**, 15-18.



Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment

G. Molto^{†*}, M. M. Samar^{†‡}, S. Resnik^{†‡§},
E. J. Martínez[¶] and A. Pacin^{§||}

[†]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina; [‡]Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina; [§]Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina; [¶]Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina; ^{||}Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina

(Received 20 October 1999; revised 1 February 2000; accepted 13 March 2000)

The presence of trichothecenes (deoxynivalenol, 3-acetyl deoxynivalenol, 15-acetyl deoxynivalenol, nivalenol, neosolaniol and diacetoxyscirpenol) was studied in 50 samples of Argentinean beer (nine different brands). Gas chromatography with electron capture detector was used for identification and quantification of these mycotoxins. The only mycotoxin detected was deoxynivalenol (DON). It was present in 44% of the samples, 18% were contaminated with more than 20 ng/ml. Toxin levels ranged from 4 to 221 ng/ml in positive samples. This is the first report on DON contamination of Argentinean beer. The estimate of probable daily intake (PDI) of DON from beer consumption in Argentina does not indicate a health hazard, but it has to be taken into account in calculations of total DON exposure in the population.

Keywords: deoxynivalenol, mycotoxins, beer, trichothecenes, occurrence.

Introduction

Trichothecenes were found in Argentinean cereals, especially in wheat (Quiroga *et al.* 1995, González *et al.* 1997, Pacin *et al.* 1997). There is no published

information on the occurrence of trichothecenes in Argentinean barley or malt in the last few years even though the occurrence of DON and NIV in barley was reported in 1983 (Tanaka *et al.* 1988). The most important trichothecene in Argentinean grains, in terms of incidence, is deoxynivalenol (DON) which has also been found in finished foods (Neira *et al.* 1997, Pacin *et al.* 1997).

The natural occurrence of DON in barley has been reported in several countries (Tanaka *et al.* 1988, Scott 1990, Perkowski *et al.* 1997). Certain mycotoxins, including DON, were found in beers of different parts of the world (Niessen *et al.* 1993, Scott *et al.* 1993, Scott 1996, Scott and Lawrence 1997, Shim *et al.* 1997, Torres *et al.* 1998). Beer contamination could originate from barley and/or other brewing adjuncts such as corn or wheat; moreover it can increase if *Fusarium* species grow during the germination of the barley in the malting process (Beattie *et al.* 1998). DON constitutes a problem for the brewing industry, not only due to its toxicity (Ueno 1983, Pacin 1992, Kuiper-Goodman 1994) but also because it interferes in the productive process (Scott 1996, Beattie *et al.* 1998).

Beer consumption in Argentina has been increasing since 1990 (S.A.G.y P. 1999). As there are no data on the occurrence of mycotoxins in beers produced in our country, studies were conducted to determine the extent of the consumers' exposure to DON by beer consumption.

Materials and methods

Samples

Canned or bottled beer samples (50) of nine different brands were bought at random in different supermarkets from Buenos Aires City during 1997 and

* To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Industrias, FCEyN, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina; e-mail sresnik@cvtci.com.ar

1998. Sub-samples of 5 ml of degassed beer were used for the analysis.

Standards and reagents

Mycotoxin standards were purchased from Sigma and all other reagents were purchased from Merck Química Argentina.

Extraction and clean up

The method of analysis of Scott *et al.* (1993) was followed with slight modifications. Briefly, the degassed sample went through a silica gel column (3 ml $\times$ 500 mg, JT Baker). It was eluted with 4 $\times$ 20 ml ethyl acetate: methanol (95:5). The extract was taken to dryness in a rotary evaporator (temperature below 50 C). The residue was transferred to a 4 ml vial by rinsing with 3 $\times$ 1 ml of methylene chloride: methanol (3:1). Once again it was taken to dryness and the residue was dissolved in 50 μ l of methanol + 500 μ l of water and cleaned up on an RP-18 column (3 ml $\times$ 500 mg, JT Baker). The column was washed twice with 50 μ l of methanol + 500 μ l of water and the toxins were eluted with methanol: water (80:20) (1 $\times$ 6 ml). The eluate was evaporated to dryness in a rotary evaporator (temperature below 50 C) (5 ml beer equivalent).

Derivatization

The fourth part of the dry remainder was dissolved in 100 μ l of a solution of 2 mg of 4-*N*, *N*-dimethylaminopyridine ml toluene-acetonitrile 95:5. Then, 15 μ l of heptafluorobutyric anhydride were added. The mixture, after vortex-mix for 1 min, was kept in a sand bath at 60 C for 30 minutes, mixed well (vortex-mixed for 1 min) with 1 ml of aqueous sodium bicarbonate solution (3%) and centrifuged at 350 *g* for 1 min to separate the layers. An aliquot of the upper organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 500 μ l of hexane containing 2-amino-5-chlorobenzophenone (ACBP, 2.5 μ g ml) (internal standard).

Gas Chromatography

Gas chromatography (GC) was performed on a Hewlett-Packard Model 5890 Series II instrument equipped with a split splitless injector operating in the splitless mode, a ^{63}Ni electron capture detector and a HP Model 3396 integrator. GC separation was achieved with a HP-5 capillary column (25 m, 0.2 mm internal diameter and 0.5 μ m film thickness). The temperature programme consisted of 1 min at 60 C, then an increase of 60 to 200 C at 50 C min (with 2 min hold), followed by 200 to 280 C at 5 C min (with 5 min hold). Nitrogen was used as carrier gas, with a flow of 1 ml min and as auxiliary gas, 60 ml/min. The temperature of the injector and the detector were 250 C and 300 C respectively. The injection volume was 2 μ l, the quantification limit 2 ng/ml.

TLC analysis

Two-dimensional TLC in the higher level samples confirmed DON. The residue (35 ml beer equivalent) was obtained by repeating the above extraction and clean-up procedure seven times. It was then spotted on a silica gel 60 TLC plate (Merck cat. No. 5553) along with 30 μ l of standard solution (Deoxynivalenol Sigma, 100 μ g/ml). The first developing solvent was toluene: acetonitrile 1.00:1.00 and the second one, toluene: acetonitrile 1.05:1.00. The plate was dried, sprayed with 20% aluminium chloride in ethanol-water (1:1), heated at 120 C for 6 min and viewed under long-wavelength UV light. The limit of DON determination was 40 ng/ml.

Statistical methodology

Contamination frequencies were compared using the Fisher exact test, and mean contamination values in two independent groups were compared by means of the Mann-Whitney non-parametric test. Comparison of mean contamination values in more than two groups was performed using a one-way analysis of variance. Under normality, the test usually used is the *F*-test, based on the residuals sum of squares but when the assumption of normality cannot be sustained, the non-parametric Kruskal-Wallis test should be used (Conover 1980). Calculations were made using the Statistix package.

Results and discussion

All beers analysed throughout this work were bottom-fermented beers: 38% were derived from all-barley malt and 62% derived from barley malt plus adjuncts (most of them unmalted cereals). There were no significant differences between mean contamination values of these two sub-groups ($p = 0.66$). According to Argentine Regulations ('Código Alimentario Argentino' CAA) all beers brewed in Argentina must contain a minimum of 60% of barley malt. (CAA 1998). Different types of beer were analysed in this first survey: light, bock, lager, premium, African and different alcoholic grades. Data concerning the malt used by the different breweries were not available.

The only trichothecene detected was DON, being positive in 44% of the analysed samples. Neosolaniol, 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyl-4-deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol and nivalenol were not found.

Contamination values of DON greater than 20 ng/ml were present in 18% of all samples (Table 1), with an average contamination of 14.3 ng/ml based on all samples.

As we did not have the date of manufacture of the samples analysed, we considered the 'best if consumed before date'. Beer shelf-life is usually 6 months after the manufacture for both canned and bottled beers.

Table 1. Distribution of DON levels in beer samples.

DON (ng/ml)	Frequency	% of samples
ND	28	56
2–20	13	26
20–50	7	14
50–150	1	2
150–250	1	2

ND: not detectable.

Three groups of samples were compared (1997, 1998 and 1999). Highest levels and incidence were found in samples with 'best if consumed before' date 1997 (Table 2). Significant differences were found in DON contamination frequencies between years 1997 and 1998 ($p = 0.02$). A one-way non-parametric analysis of variance was applied to log transformed data to compare mean contamination values in the three years. Significant differences between years were detected ($p = 0.025$). The logarithmic transformation was needed in order to attain homoscedasticity. This is the first report of DON contamination in Argentinean beer and the results encourage us to continue this survey with an appropriate experimental design to find out if there is any relationship between contamination and type of beer, brand or barley contamination in different harvests.

In Canada, Scott *et al.* (1993) observed 29 samples contaminated out of a total of 50, the total average being 5.4 ng/ml (range = 0.3–50.3 ng/ml). The highest value of DON in commercial beers was reported in Germany (569 ng/ml) in a wheat beer; the average for this type of beer was 245 ng/ml and for barley malt beer was 148 ng/ml (Niessen *et al.* 1993). Our results, with respect to average levels and incidence, are analogous with the data reported by Scott *et al.* (1993). The average contamination value in our survey was considerably lower than that found for barley malt beer by Niessen *et al.* (1993). The finding that in these beers the DON concentration was significantly greater was probably because in that work 22.4% of the beers analysed were suspected for gushing-spontaneous decarbonization of beer upon opening of a bottle.

Risk Exposure

The mean daily intake of DON (table 3) from beer consumption was estimated based on National Luján University (Pacin *et al.* 1998) and FAO (FAO 1991)

Table 2. Deoxynivalenol contamination distributed according to 'best if consumed before date'.

Date	Contaminated samples/total	Average (ng/ml)	Median (ng/ml)	Over positive samples (ng/ml)		
				Minimum	Maximum	Mean
1997	8/9	51	16	5	221	58
1998	8/26	7	0	4	43	22
1999	6/14	5	0	5	20	12

Table 3. Mean daily intake of deoxynivalenol from beer consumption considering the average contamination (14.3 ng ml). The first four columns were calculated with data from National Luján University and the last, with FAO figures (all FAO data were expressed for an adult of 70 kg body weight).

	Age groups (years)				FAO adult
	Male		Female		
	18-24	25-50	18-24	25-50	
Estimated mean daily intake (ng/kg body weight)	16.4	0.9	7.3	1.3	15.6
Contribution of beer consumption to the TDI (3 µg/kg)	0.55%	0.03%	0.24%	0.05%	0.52%

food consumption data. Taking into account the first set of data, the greater value corresponds to the 'young men' group for which the daily intake was 16.4 ng kg.

The Tolerable Daily Intake (TDI) for DON was estimated to be 3 µg kg for adults and 1.5 µg kg for infants (Kuiper-Goodman 1994). Compared with the TDI, beer consumption in our country could contribute up to 0.55% to the TDI (table 3).

Although DON ingestion through beer consumption does not represent a serious risk for the consumer's health, it is important to take into account that beer consumption is increasing, and beer is just one among all foods and beverages that could be contaminated. So, it could contribute to achieving the TDI.

Our study shows for the first time the presence of low concentrations of DON in Argentinean beer. Continued surveys of commercial beer for DON will be appropriate, in order to develop prevention strategies to maintain or even diminish DON levels in beer.

References

- BEATTIE, S., SCHWARZ, P., HORSLEY, R., BARR, J., and CASPER H., 1998, The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. *Journal of Food Protection*, **61**, 103-106.
- CAA, 1998, Código Alimentario Argentino Actualizado, art. 1080, p. 357.
- CONOVER, W. J., 1980, *Practical Nonparametric Statistics* (New York: John Wiley & Sons).
- FAO, 1991, Food Balance sheets 1984-86 average, (Basic Data Unit, Statistics Division, Rome, Italy: FAO).
- GONZÁLEZ, H. H. L., PACIN, A., RESNIK, S. L., and MARTÍNEZ, E., 1997, Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia*, **135**, 129-134.
- KUIPER-GOODMAN, T., 1994, Prevention of human mycotoxicosis through risk assessment and risk management. *Mycotoxins in Grain*, edited by J. D. Miller and H. L. Trenholm (St Paul MN: Eagan Press), pp. 439-469.
- NEIRA, M. S., PACIN, A., MARTÍNEZ, E., MOLTO, G. A., and RESNIK, S. L., 1997, The effect of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *International Journal of Food Microbiology*, **37**, 21-25.
- ESSE, L., BÖHM-SCHRAML, M., VOGEL, H., and DONHAUSER, S., 1993, Deoxynivalenol in commercial beer - screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research*, **9**, 99-109.
- PACIN, A., 1992, Las micotoxinas como factor de riesgo en la salud humana. *Seminario Internacional sobre Micotoxinas*, editado por Asociación Colombiana de Postcosecha de Granos (Colombia: IDEMA), pp. 87-108.
- PACIN, A., RESNIK, S. L., NEIRA, M. S., and MOLTO, G. A., 1997, Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and breadmaking products in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 327-331.
- PACIN, A., MARTÍNEZ, E., PORTELA, M., and NEIRA, S., 1998, Consumo de alimentos en la población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. *La Alimentación Latinoamericana*, **221**, 28-36.
- PERKOWSKI, J., JELEN, H., KIECANA, I., and GOLINSKI, P., 1997, Natural contamination of spring barley with group A trichothecene mycotoxins in south-eastern Poland. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 321-325.
- QUIROGA, N., RESNIK, S. L., PACIN, A., MARTÍNEZ, E., PAGANO, A., RICCOBENE, I., and NEIRA, S., 1995, Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentinean wheat. *Food Control*, **6**, 201-204.
- S.A.G.Y.P. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 1999, <http://siap.sagip.mecon.ar/aliment/bebidas/Cerveza>
- SCOTT, P., 1990, Trichothecenes in grains. *Cereals Foods World*, **35**, 661-666.
- SCOTT, P. M., 1996, Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, **79**, 875-882.
- SCOTT, P., and LAWRENCE, G. A., 1997, Determination of aflatoxins in beer. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, **80**, 1229-1234.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., and WEBER, D., 1993, Analysis of Canadian and Imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, **10**, 381-389.
- SHIM, W. B., KIM, J. C., SEO, J. A., and LEE, Y. W., 1997, Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 1-5.

- TANAKA, T., HASEGAWA, A., YAMAMOTO, S., LEE, U., SUGIURA, Y., and UENO, Y., 1988, Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 979–983.
- Torres, M. R., Sanchis, V., and RAMOS, A. J., 1998, Occurrence of fumonisins in Spanish beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *International Journal of Food Microbiology*, **39**, 139–143.
- UENO, Y. (EDITOR), 1983, *Trichothecenes—Chemical Biological and Toxicological Aspects* (Amsterdam: Elsevier).

A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina

M. M. S. Solovey^{†‡}, C. Somoza[‡], G. Cano[§]
A. Pacin^{*||} and S. Resnik^{*†‡||}

[†]Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina; [‡]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina; [§]Fundación Cargill; ^{*}Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina; ^{||}Centro de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

(Received 4 January 1999; accepted 28 March 1999)

The presence of mycotoxins in corn-based foods available in Argentina was determined in order to make a preliminary exposure assessment. Thirty-eight samples [corn meal ('polenta') and corn flakes] of different local brands were analysed for zearalenone, deoxynivalenol and aflatoxins by TLC and fumonisins (FB₁, FB₂ and FB₃) by HPLC. None of the 38 samples contained any detectable amount of aflatoxins (<2 µg/kg), zearalenone (<50 µg/kg) and deoxynivalenol (<50 µg/kg). By contrast fumonisin contamination was found in 95% of the samples. The highest fumonisin levels were found in corn meal: FB₁ (range positives: 60–2860 µg/kg; mean positive value: 556 µg/kg), FB₂ (61–1090 µg/kg; 232 µg/kg) and FB₃ (18–1015 µg/kg; 150 µg/kg). Low levels of fumonisin B₁ were detected in 16/17 corn flakes samples (2–38 µg/kg). Total fumonisin levels in corn meal were more than 1000 µg/kg in 24% (5/21) of the samples. Although it is not the staple food in Argentina, maize consumption is very important, especially among children. A daily fumonisin intake of 11.3 µg/kg of body weight was estimated for child consumers (1–5 years old) based on an average consumption of 200 g of corn meal/day. Calculated at an average rate for all children (consumers or not) the intake estimate was 0.9 µg/kg of body weight.

Keywords: fumonisins, mycotoxins, corn, zearalenone

Introduction

Mycotoxins such as aflatoxins, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins, are unavoidable contaminants of corn and have been implicated as aetiological agents in animal and human diseases. Most information available concerns data on natural occurrence of these mycotoxins in grains and feeds, although corn processed for human consumption has received much attention because it is the staple food in many countries and the raw product has often been found to be contaminated.

Aflatoxins, well known as hepatotoxic and carcinogenic metabolites (Eaton and Groopman 1994, Guengerich *et al.* 1996), produced primarily by *Aspergillus flavus*, have been found frequently to contaminate corn crops (Jelinek *et al.* 1989, Resnik *et al.* 1995, 1996). Besides aflatoxins, fusarium toxins are the most often reported mycotoxins contaminating maize. The natural occurrence in corn of zearalenone, an oestrogenic toxin, and deoxynivalenol, which produces digestive disorders, has been observed worldwide (Scott 1990, Prelusky *et al.* 1994, Resnik *et al.* 1995, 1996). Moreover, foods made from corn have been found to be contaminated with deoxynivalenol (Trucksess *et al.* 1986). The occurrence of fumonisins in corn and in corn-based foods has been widely noted (Bullerman 1996, Shephard *et al.* 1996, Patel *et al.* 1997, Pineiro *et al.* 1997, Tseng and Liu 1997). Fumonisins, produced primarily by *F. moniliforme*, cause leukoencephalomalacia in horses, pulmonary oedema in pigs (Prelusky *et al.* 1994) and hepatic cancer in rats (Gelderblom *et al.* 1996). High levels of fumonisins in grains in certain areas of the world, have been associated with oesophageal cancer in humans (Gelderblom *et al.* 1996). Immune suppres-

* To whom correspondence should be addressed.

sion is another important toxic effect induced by all these mycotoxins (Pestka and Bondy 1994).

Although it is not the staple food in Argentina, maize consumption is very important, especially among children (Pacin *et al.* 1998). The occurrence of fumonisins (Sydenham *et al.* 1993, Chulze *et al.* 1996, Ramirez *et al.* 1996), aflatoxins, zearalenone and deoxynivalenol (Chulze *et al.* 1989, Resnik *et al.* 1996) has been reported in Argentina field maize. The natural co-occurrence of fumonisins, aflatoxins and zearalenone in Argentinian corn has also been established (Gonzalez *et al.* 1998). However in Argentina there is little information about the contamination levels of corn-based foods.

Tolerance limits for some of these mycotoxins have been established in many countries. For total aflatoxins the maximum limit varies from not detectable up to 50 µg/kg (FAO 1997). Mercosur regulations (RES. No 56/94) establish for total aflatoxins in corn meal a limit of 20 µg/kg. In France the tolerance level of zearalenone in corn for human consumption is 200 µg/kg, and in Canada for trichothecenes in food, 100 µg/kg.

To assess the extent of the consumer's exposure to these mycotoxins, commercial corn-based human foodstuffs (purchased during 1997) were analysed for the presence of aflatoxins, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins (FB₁, FB₂ and FB₃). This paper reports preliminary data on this subject.

Materials and methods

Samples

Thirty-eight samples of corn-based food products were randomly purchased from commercial outlets and natural food stores in Buenos Aires, Argentina during 1997. All samples were ground in a laboratory mill until the sample passed through a 20-mesh-sieve. Samples were frozen (-20 °C) prior to analysis.

Analysis for aflatoxins (AF), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN)

The samples were analysed for the presence of these mycotoxins according to the method of Romer No. MY8402s. Briefly, sub-samples (25 g) were extracted

with 50 ml of acetonitrile water (84:16) by blending for 3 min at high speed with an Osterizer blender. The extract was filtered through Whatman No. 4 paper. Approximately 8 ml of the filtrate were placed in a 15 × 85 mm culture tube and 4 ml of the filtrate was passed through a Mycosep 225 column (Romer Labs Inc., MO, USA). The purified extract was then transferred to another tube and evaporated to dryness in a 60 °C water bath under vacuum (Wilson and Romer 1991). The residue was redissolved in toluene:acetonitrile (95:5) and a 50 µl aliquot was applied on Merck silica gel TLC (No. 5553) and developed in toluene:acetone (1:2). Sample spots of AF and ZEN were visualized by fluorescence (AF: 366 nm; ZEN: 254 nm). Plates were then air-dried, sprayed with 20% AlCl₃ ethanol:water (1:1) solution and heated at 150 °C for 10 min. The levels of DON were estimated visually (*R_f* ≈ 0.5) by comparison with standard spots under long-wave UV light. The detection limit was 2 µg/kg for AF and 50 µg/kg for ZEN and DON.

Analysis for fumonisins (FB)

HPLC analysis was performed according to the AOAC method 995.15 (AOAC 1995). Sub-samples (50 g) were extracted with 100 ml of methanol:water (3:1) by blending for 5 min at high speed with an Osterizer blender. The blended extracts were centrifuged (10 min, 500 g) and the supernatant filtered through Whatman No. 4 filter paper and adjusted to pH 5.8–6.5 (NaOH 1M) (Resnik *et al.* 1994, AOAC 1995). An aliquot (10 ml) was applied to a strong-anion exchange column (SAX, Merck) previously conditioned with methanol:water (3:1) followed by methanol. The fumonisins were eluted with an acetic acid: methanol solution (1:99). The eluate was evaporated to dryness in a 40 °C water bath under vacuum and the residue redissolved in methanol (100 µl). An aliquot (50 µl) was derivatized with 225 µl of derivatizing solution (40 mg *o*-phthalaldehyde (OPA) in 1 ml methanol, dilute with 5 ml of 0.1 M disodium tetraborate solution, and 50 µl of 2-mercaptoethanol). Within 1 min of adding OPA reagent, 20 µl of the derivatized solution were injected into the LC system.

Standards and reagents

DON, ZEN and aflatoxins standards and OPA were purchased from Sigma, fumonisins standards were

purchased from MRE (South Africa), and all other reagents were purchased from Merck Química Argentina.

Apparatus

Liquid chromatograph. Bomb L6200A (Merck-Hitachi); Column = Lichrosorb C-18 (Merck), 10 cm × 4.6 mm i.d., 5 µm; 23°C; mobile phase, methanol: 0.1 M sodium dihydrogen phosphate (77:23, v/v), adjusted to pH 3.3 with orthophosphoric acid; flow rate = 1 ml/min; the fluorescence detector (Merck-Hitachi Z-1100) was set at an excitation wavelength of 335 nm and an emission wavelength of 440 nm. Fumonisin quantification was done by measurement of the peak area and comparison with fumonisin standards.

Standards. 50 µg/µl of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in acetonitrile: H₂O, 1:1.

The detection limit was 1.5 µg/kg.

Results and discussion

The results summarized in table 1 showed the high incidence of fumonisin contamination in corn meal (90.5% FB₁) as well as in corn flakes (94.1% FB₁) while, on the other hand, aflatoxins, deoxinivalenol and zearalenone were not detectable.

The range, average and median of fumonisin levels and the number of positive samples for each fumonisin are given in table 2. Corn meal was not only

frequently contaminated with fumonisins, but it was also contaminated at the highest levels. Fumonisin in corn flakes were at low levels or were not detected probably because products that undergo thermal processes reaching temperatures above 150°C, may have some losses of this mycotoxin (Jackson *et al.* 1996). fumonisin B₁ was found at higher levels than fumonisin B₂ and B₃ in all samples. The ratio FB₁/FB₂ varied from 3/1 to 16/1. As can be seen in table 2 the samples had higher FB₂ values than FB₃. Of total fumonisins, FB₂ represented 15–29% and FB₃, 5–20%.

These results are comparable with the data reported by other authors (Bullerman 1996, Pohland 1996). In USA products, a similar incidence of fumonisins in corn meal with slightly lower levels of contamination was noted (Pohland 1996). Sydenham *et al.* (1991) reported mean positive values of FB₁ of 1048 µg/kg in USA corn meal, and 138 µg/kg in South African corn meal. Commercial corn products in Switzerland (Pittet 1992) were found to contain lower levels of fumonisins. In UK breakfast cereals, contamination with 11–194 µg/kg of fumonisins and polenta with concentrations ranging from 16 to 2124 µg/kg (Patel *et al.* 1997) were detected.

Table 1. Percentage of samples contaminated with each mycotoxin.

	% of positive samples					
	AF	ZEN	DON	FB ₁	FB ₂	FB ₃
Corn meal	ND	ND	ND	90.5	57.1	52.4
Corn flakes	ND	ND	ND	94.1	ND	ND

ND: not detectable.

Table 2. Fumonisin contamination of corn meal and corn flakes.

Products		Contaminated samples/total	Average (µg/kg)	Median (µg/kg)	Over positive samples (µg/kg)		
					Minimum	Maximum	Mean
Corn meal	FB ₁	19/21	503	281	60	2860	556
	FB ₂	12/21	133	117	61	1090	232
	FB ₃	11/21	78	59	18	1015	150
	Total	19/21	714	368	60	4964	790
Corn flakes	FB ₁	16/17	11	7	2	38	11
	FB ₂	0/17	0				
	FB ₃	0/17	0				
	Total	16/17	11	7	2	38	11

In the published data, usually the ratio FB_1/FB_2 is 3/1, although levels of FB_2 as high as 40% of the total fumonisins have been reported, and FB_2 is commonly higher than FB_3 (Bullerman 1996, Pohland 1996).

It is of concern that 24% of the corn meal samples had total fumonisin levels greater than 1000 µg/kg (table 3). However, these data must be interpreted with caution as they were calculated from a limited number of samples.

The estimated mean daily intake of fumonisins for corn meal consumption was calculated (table 4). For example for child consumers (1–5 years old) a daily fumonisin intake of 11.3 µg/kg of body weight was estimated based on an average consumption of 200 g of corn meal/day (Pacin *et al.* 1998). Calculated at an average rate for all children (consumers or not) the intake estimate was 0.9 µg/kg of body weight.

Table 3. Distribution of total fumonisin levels in corn meal samples.

Fumonisin (µg/kg)	Frequency	% of samples
0–500	14	67
501–1000	2	10
1001–1500	3	14
> 1500	2	10

The available information on the toxicity of fumonisins is not complete and a tolerable daily intake has not been established (Kuiper-Goodman 1994, Kuiper-Goodman *et al.* 1996). The estimate of the probable daily intake (PDI) in an exposure assessment in Canada (Kuiper-Goodman *et al.* 1996) was 0.19 µg/kg bw/day for child consumers and 0.089 µg/kg bw/day for all children. These values are 10 times lower than in Argentina, where as corn-based foods are very popular and consumption by children is very significant, the presence of fumonisins in food is a serious problem. These preliminary data showed that consumers' exposure to fumonisins could be important and more work is needed in this area. The toxicological significance of the exposure at the levels reported here is not known.

References

- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*, Supp. March 1996. Chapter 49, pp. 49.
- BULLERMAN, L., 1996. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. *Fumonisin in Food*, edited by Lauren Jackson, Jonathan DeVries and L. B. Bullerman. Advances in Experimental Medicine and Biology, (New York and London: Plenum Press). Vol. 392, pp. 27–38.
- CHULZE, S., BERTINETTI, C., DALCERO, A., ETCHIVERRY, M., FARNOCHI, C., TORRES, A., RIZZO, I., and VARSIVSKY, E.,

Table 4. Mean daily intake of fumonisins for corn meal consumption.

Age groups (years)	Average weight (kg)	Corn meal (g). mean daily intake		Estimated mean daily intake (µg kg body weight)			
				Total fumonisins		Fumonisin B ₁	
		Consumers	All samples	Consumers	All samples	Consumers	All Samples
Male							
1-5	14	200	15.4	11.3	0.9	7.9	0.6
6-10	25	0	0	0.0	0	0	0
11-14	40	0	0	0.0	0	0	0
15-25	61	228.5	7.5	3.0	0.1	2.1	0.1
26-55	78	250	20	2.5	0.2	1.8	0.1
Over 55	80	0	0	0.0	0	0	0
Female							
1-5	14	200	13.3	11.3	0.8	7.9	0.5
6-10	24	0	0	0.0	0	0	0
11-14	40	0	0	0.0	0	0	0
15-25	56	216.7	10.6	3.1	0.1	2.2	0.1
26-55	58	215.3	11.5	2.9	0.2	2.1	0.1
Over 55	60	0	0	0	0	0	0

Average corn meal contamination level: Total fumonisins 790 µg kg; fumonisin B₁ 556 µg kg.

1989. Incidence of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol on corn in Argentina. *Mycotoxin Research*, **5**, 9–12.
- CHULZE, S., RAMIREZ, M., FARNOCHI, M., PASCALE, M., VISCONTI, A., and MARCH, G., 1996. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2797–2801.
- EATON, D. L., and GROOPMAN, J. D., 1994. *The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance* (San Diego, CA: Academic Press).
- FAO, 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. *Food and Nutrition Paper*, No. **64**, pp. 1–43.
- GELDERBLOM, W. C. A., SNYMAN, S. D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C. M., VAN DER WESTHUIZEN, L., MARASAS, W. F. O., VICTOR, T. C., KNASMÜLLER, S., and HUBER, W., 1996. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. *Fumonisin in Food*, edited by Lauren Jackson, Jonathan DeVries and L. B. Bullerman, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (New York and London: Plenum Press), vol. **392**, pp. 279–296.
- GONZALEZ, H. H. L., MARTINEZ, E. J., PACIN, A., RESNIK, S., and SYDENHAM, W. E., 1998. Contaminación del maíz en la cosecha por especies del género *Fusarium* y sus toxinas. Comunicación 62° Congreso Argentino de Bioquímica. *Biogímica y Patología Clínica*, **62**, 255.
- GUENGERICH, F. P., JOHNSON, W. W., VENG, Y. F., and SHIMADE, T., 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B₁ and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives*, **104**, 557–562.
- JACKSON, L., HLYWKA, J., SENTHIL, K., and BULLERMAN, L., 1996. Effect of thermal stability of fumonisins. *Fumonisin in Food*, Edited by Lauren Jackson, Jonathan DeVries and L. B. Bullerman, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. **392**, pp. 345–353.
- JELINEK, C. F., POHLAND, A. E., and WOOD, G., 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an update. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **72**, 223–229.
- KUIPER-GOODMAN, T., 1994. Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment and risk management. *Mycotoxins in grain*, edited by J. D. Miller and H. L. Trenholm (St Paul, MN: Eagan Press), pp. 439–469.
- KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P. M., MCEWEN, N. P., LOMBAERT, G. A., and NG, W., 1996. Approaches to the risk assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. *Fumonisin in Food*, Edited by Lauren Jackson, Jonathan DeVries and L. B. Bullerman, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. **392**, pp. 369–393.
- PACIN, A., MARTINEZ, M. E., PORTELA, M. L., and NEIRA, M. S., 1998. Consumo de alimentos en la población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. *La Alimentación Latinoamericana*, **221**, 28–36.
- PATEL, S., HAZEL, C. M., WINTERTON, A. G., and GEADLE, A. E., 1997. Surveillance of fumonisins in UK maize foods and other cereals. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 187–191.
- PESTKA, J. J., and BONDY, G. S., 1994. Immunotoxic effects of mycotoxins. *Mycotoxins in Grain*, Edited by J. D. Miller and H. L. Trenholm (St Paul, MN: Eagan Press), pp. 339–358.
- PINEIRO, M. S., SILVA, G. E., SCOTT, P. M., LAWRENCE, G. A., and STACK, M. E., 1997. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. *Journal of AOAC International*, **80**, 825–828.
- PITTET, A., PARISOD, V., and SCHELLENBERG, M., 1992. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1352–1354.
- POHLAND, A., 1996. Occurrence of fumonisins in the U.S. food supply. *Fumonisin in Food*, Edited by Lauren Jackson, Jonathan DeVries and L. B. Bullerman, (New York and London: Plenum Press), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **392**, pp. 19–26.
- PRELUSKY, D. B., ROTTER, B. A., and ROTTER, R. G., 1994. Toxicology of mycotoxins. *Mycotoxins in Grain* edited by J. D. Miller and H. L. Trenholm (St Paul, MN: Eagan Press) pp. 359–403.
- RAMIREZ, M., PASCALE, M., CHULZE, S., REYNOSO, M., MARCH, G., and VISCONTI, A., 1996. Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids growth in Argentina. *Mycopathologia*, **135**, 29–34.
- RESNIK, S., NEIRA, A., ANCAROLA, V., GONZALEZ, H. H. L., and PACIN, A., 1994. Utilización de columnas Sax para limpieza de extractos contaminados por fumonisinas: pH óptimo. Libro de Actas. VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1° Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur, pp. 81–83.
- RESNIK, S., COSTARRICA, M. L., and PACIN, A., 1995. Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control*, **6**, 19–28.
- RESNIK, S., NEIRA, A., PACIN, A., MARTINEZ, E., APRO, N., and LATREITE, S., 1996. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1984–1994. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 115–120.
- SCOTT, P., 1990. Trichothecenes in grains. *Cereals Food World*, **35**, 661–666.
- SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., STOCKENSTRÖM, S., and SYDENHAM, E. W., 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International*, **79**, 671–687.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., and STOCKENSTRÖM, S., 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 2014–2018.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., RHEEDER, J. P., PERALTA SANHUEZA, C. E., GONZALEZ, H. H., and RESNIK, S. L., 1993. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 891–895.
- TRUCKSESS, M. W., WOOD, G. E., EPPLEY, R. M., YOUNG, K., COHEN, C. K., PAGE, S. W., and POHLAND, A. E., 1986. Occurrence of deoxynivalenol in grain and grain products. *Biodeterioration*, Edited by S. Barry, G. Llewellyn and C. O'Rear (Aberystwyth: The Cambrian News Ltd.), pp. 243–247.
- TSENG, T. C., and LIU, C. Y., 1997. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based foodstuffs in Taiwan market. *Mycopathologia*, **137**, 57–61.
- WILSON, T. J., and ROMER, T. R., 1991. Use of the Mycosep multi-functional column for liquid chromatographic determination of aflatoxins in agricultural products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **74**, 951–956.

De este artículo solo se cuenta con el abstract ya que no se han recibido los reprints.

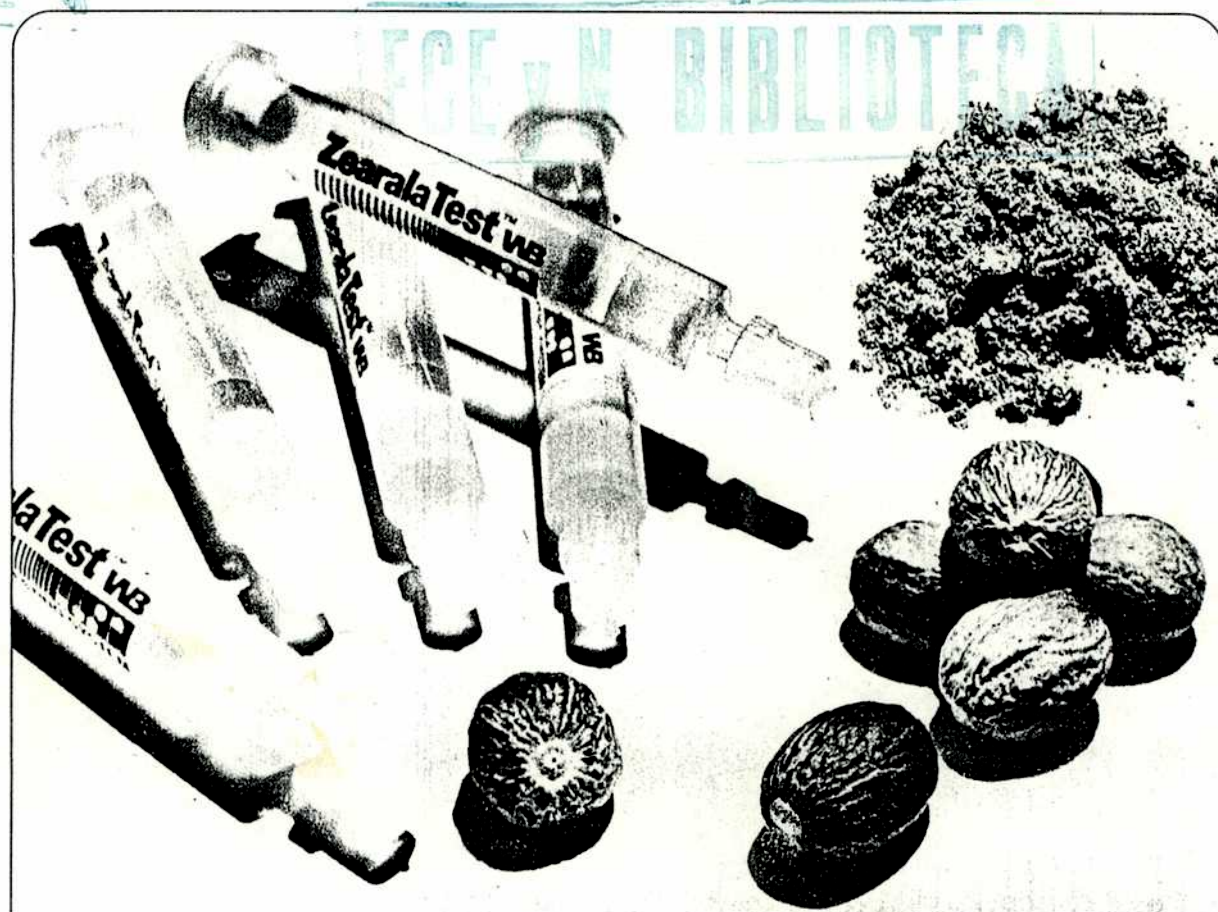
Analytical Methods for Trichothecenes Surveillance - An Overview Over the Period 1990-2000

Volume 8 Nº5 - Publication Date: 1 October 2002 pág. 257-268.

M.M. Samar *Departamento de Química Orgánica y Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina* and **S.L. Resnik** *Departamento de Química Orgánica y Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina; Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina*

This article reviews some aspects of analytical methods used to determine the occurrence of type A and B trichothecenes in grains and foodstuffs and their trends during the decade 1999-2000. A pronounced tendency to use extraction solvents less toxic than chloroform became evident. There was not a prevalent clean up process that pointed there were problems to obtain good recoveries of those mycotoxins. Taking into account the mean values of contamination found in the literature and the provisional maximum tolerable daily intake, a methodology suitable for a surveillance work should have a limit of quantification not greater than 50µg/kg for deoxynivalenol and less than 10µg/kg for T-2 and HT-2 toxins. Therefore, gas chromatography or thin layer chromatography could be used for type B trichothecenes while for type A trichothecenes, gas chromatography with electron capture or mass spectrometric detectors is the mandatory quantification method.

Mycotoxin Research



Die neuen "Wide Bore" Teströhrchen. Schneller, einfacher, genauer.

VICAM kann erneut eine echte Innovation vorweisen: Die neuen "Wide Bore" Teströhrchen. Ihr größeres Format ermöglicht eine höhere Fließgeschwindigkeit, ohne bestehende Prüfmethoden verändern zu müssen. Und das bei Wiederfindungsraten von 99% bis 101%. Auch der Nachweis von Mykotoxinspuren in problematischen Matrices wie z.B. bestimmte Gewürze können schnell und einfach mit "Wide Bore" Teströhrchen nachgewiesen werden. Gute Gründe, um sich jetzt schnellstens zu informieren.

KLAUS RUTTMANN GmbH

Sales and Marketing

Tel: +49-(0)40-82 58 31, Fax: -82 07 13,

VICAM

Trichothecenes and Zearalenone production by Fusarium species isolated from Argentinean black beans.

Castillo M^{1,2}, Samar MM^{1,2}, Moltó G¹, Resnik S^{1,2,3*} and Pacin A^{3,4}

¹ Departamento de Química Orgánica. ² Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina.

³ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina.

⁴ Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina.

* Author for Correspondence. Departamento de Industrias, FCEyN, Ciudad Universitaria. (1428) Buenos Aires, Argentina. Fax (54 11) 4576-3366. E-mail: sresnik@cvtci.com.ar

Abstract

Isolates of Fusarium species obtained from freshly harvested bean grains for human consumption collected from different Argentinean regions, were investigated for their ability to biosynthesise trichothecenes and zearalenone either on rice grains or beans. Low incidence of toxigenic fungi was observed. These mycotoxigenic species produced several toxins when grown on rice but none or little amount when cultured on beans. The results of this report suggest that contamination of Argentinean beans with Fusarium mycotoxins will not be common and therefore people would be at low mycotoxicosis risk through consumption of beans.

Introduction

Trichothecenes and zearalenone (ZEN), some of the Fusarium mycotoxins, have been implicated in human and animal diseases and for that reason, are considered economically and toxicologically important worldwide (1,2).

The trichothecenes, a group of highly cytotoxic sesquiterpenes, have different biochemical and biological effects. They have local effects such as vomiting and skin necrosis, and on

the other hand, systemic effects as they are potent inhibitors of protein synthesis. The principal systemic effects are related with the haematological system. One of the trichothecene toxins, deoxynivalenol (DON), could produce nephropathic effects due to Ig A increase, although it has less toxicity than the others (PMTDI (deoxynivalenol) = $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight, PMTDI (T-2 and HT-2 toxins) = 60 ng kg^{-1} of bw per day) (1,3,4). ZEN has estrogenic and anabolic activity that disturbs the reproductive organ structure and function (TDI = $100 \text{ ng/kg bw per day}$) (5).

Monitoring these mycotoxins in food products is the first step to assess the extent of the consumers exposure to them. In many countries of America, beans are part of traditional foods and hence it is important to determine if they could contain toxins that represent a health hazard. As cereals are the main source of mycotoxins in food, trichothecenes and ZEN associated with them have been extensively studied, but mycotoxin presence in beans was seldom reported. Considerable quantities of DON, diacetoxyscirpenol (DAS) and T-2 toxin, and fumonisin B₁ (FB₁) were found in naturally infected mouldy navy beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in China (6). In a comparative investigation of mycoflora and mycotoxins in dry beans produced in Taiwan and Ontario, aflatoxins but no Fusarium toxins were found in infected beans from Taiwan, while those from Ontario contained DAS, DON, T-2 toxin and FB₁ and no aflatoxins (7). Fumonisin and no trichothecenes were found in Fusarium-infected adzuki beans (*Phaseolus angularis*) and mung beans (*Phaseolus aureus*) produced in Canada (8). In another survey in Brazil (9), *Phaseolus vulgaris* L. showed ochratoxin A contamination and ZEN was not found. In Ecuador (10), bean samples revealed ochratoxin A, DON and T-2 toxin contamination and fumonisins were not detected.

No studies were found on mycotoxins in Argentinean beans. Black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) intended for human consumption, are mainly produced in Salta province. The toxigenic fungi found on a mycological survey carried out in 1999, included *Alternaria alternata* and several species of the genera Fusarium: *F. semitectum*, *F. graminearum* and *F. equiseti* (11). These Fusarium species have been frequently isolated from Argentinean cereals (12). It has been reported that *F. semitectum* produces ZEN, T-2 toxin, nivalenol (NIV), and neosolaniol (NEO). *F. graminearum* can produce DON, 3-acetyl-deoxynivalenol (3-A-DON), 15-acetyl-deoxynivalenol (15-A-DON), NIV, ZEN, and NEO. Mycotoxins produced by *F. equiseti* include NIV, fusarenon-X, T-2 toxin, DAS, and ZEN (13).

The presence of a toxigenic fungi indicates the probability of mycotoxin production. The fungi not only need a favourable environment to produce the toxins but also a suitable substrate. Which mycotoxin is synthesised depends on the Fusarium species and on the strain, as some strains might be non toxigenic while others might produce several toxins. *F. graminearum* isolates have been separated into two chemotypes based on the ability to produce the trichothecenes DON or NIV. In Argentina the occurrence of isolates of DON chemotype has been reported so far.

Thus, the aim of this paper was to evaluate the Fusarium isolates obtained from black beans of the 1999 harvest in Salta province (11) for their ability to produce trichothecenes and zearalenone on two different substrates, rice kernels and beans, where rice is a suitable substrate for Fusarium toxins production.

Materials and Methods

All the isolates of *Fusarium semitectum* (29), *F. graminearum* (16) and *F. equiseti* (9) obtained from 120 samples of freshly harvested bean grains collected from different Salta regions of Argentina (1999 harvest) by Castillo *et al* (11), were tested for their ability to biosynthesise trichothecenes and zearalenone either on rice grains or beans.

Isolates were transferred to potato dextrose agar slants and incubated at 25°C to stimulate conidial formation (14). Conidial suspensions were prepared by adding 7 mL of sterile distilled water to each slant and gently scraping the agar surface with a wire loop to give a turbid suspension.

The isolates were grown on 30 g of healthy beans or rice grains free of *Fusarium* mycotoxins, in 500 mL Erlenmeyer flasks. Moisture was adjusted to 40% by adding distilled water before autoclaving at 121°C for 15 minutes. Autoclaved flasks were shaken by hand to loosen the grains, and each flask was inoculated with 7 mL of the conidial suspension (105 conidia/mL). Flasks were incubated at 25°C for 25 days with daily shaking for the first 4 days to distribute the inoculum.

The samples were extracted with acetonitrile-water (84:16) and blended for 3 min at high speed with an Osterizer blender. About 8 mL of the extract was placed in a 8x15 mm culture tube and three aliquots of 0.5 mL were successively passed through a Mycosep 227 column (Romer Labs. Inc., MO, USA), each aliquot was transferred to a different tube, dried in a 60°C water bath under vacuum and stored at -18°C prior to analysis.

The dried extract residues were derivatized with heptafluorobutyric anhydride (HFBA) as described by Croteau *et al* (15). Briefly, the catalyst solution of 4-(N,N-dimethylamino)-pyridine (DMAP) was added to the dried extract, vortexed and 50 µL of HFBA was added. The tube was placed in a heating block at 60±2°C for 20 min. Excess of derivatizing agent was destroyed with 1 mL of aqueous sodium bicarbonate solution (5% in distilled water) and 400 µL of toluene was added. After centrifuging, the upper organic layer (480 µL) was transferred to a vial.

Gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD) was performed on a Hewlett-Packard Model 5890 Series II equipped with an automatic injector and controlled from an HP3398A GC-ChemStation. GC separation was achieved with a HP-5 capillary column (30 m x 0,25 mm of i.d. x 0,25 µm thickness of film). The temperature program consisted of 1 minute at 80°C, then an increase of 80-160°C at 30°C min⁻¹ followed by 160-183°C at 1°C min⁻¹ and then 183-280°C at 12°C min⁻¹ (with 5-min hold). Nitrogen flow was 1 mL min⁻¹. The temperature of the injector and the detector were 250 and 300°C respectively. The injection volume was 1 µL (splitless mode).

The detection and quantification limits calculated on the basis of three and five times the average signal-to-noise ratio of the baseline respectively, are listed in table 1. Recoveries of Don and T-2 from beans were 80 and 87% respectively. Recoveries of Niv, the more polar trichothecene, and Zen from beans were significantly lower (30-40%). However this low recovery was not relevant as cultures of *Fusarium* species are known to produce mycotoxins in the order of mg/kg. Each sample was analysed three times.

Table 1: Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) en µg/kg calculated on the basis of three and five times the average signal to noise ratio of the baseline.

	LOD	LOQ
DON	11	18
ZEA	15	25
NIV	21	35
T-2 toxin	40	66
Neo	99	165
T-2 tetraol	8	14
HT-2 toxin	36	59
3-ADON	60	100
DAS	56	93

The identity of the mycotoxins in the positive samples was confirmed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60 plates, 20 x 20 cm (Merck 1.05553) using external standards. Standards of DON, NIV, 3-ADON, NEO, DAS, T-2 toxin, T-2 tetraol, HT-2 toxin, and ZEN were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, United States of America). When presence of ZEN or DON were suspected, plates were developed with toluene:acetone (1:1); Niv, with toluene:acetone (1:2), and type A trichothecenes, with chloroform:acetone:2-propanol (8:1:1). Zen has greenish-blue fluorescence under short wave UV light (256 nm) at $R_f = 0.83$, and blue fluorescence under long wave UV light (356 nm) after spraying with $AlCl_3$ solution (20% in ethanol) and heating 3 min at 150°C. DON and NIV has blue fluorescence after spraying with $AlCl_3$ solution and heating 3 min at 150°C at $R_f = 0.38$ and 0.36 respectively. T-2 toxin and Neo develop a brown colour after spraying with methanol:sulphuric acid:acetic acid (8:1:1) solution followed by heating at 150°C for 5 min at $R_f = 0.90$ and 0.54 respectively.

Results and Discussion

Mycotoxins produced by *Fusarium* species isolated from black beans are shown in table 2. Five of the 54 isolates were toxigenic. Isolates of *F. equiseti* were all non producers. When cultured on rice, one isolate of *F. semitectum* showed abilities to produce ZEN and another one T-2 toxin, while three isolates of *F. graminearum* were able to synthesise trichothecenes, two of them produced DON and one, NEO. When grown on beans, only one of the *F. graminearum* isolates was toxigenic and produced Neo. The occurrence of this trichothecene is not so frequent as the others, and also it is uncommon to find a strain of *F. graminearum* that produces only this mycotoxin. It has also been reported NEO production by isolates of *F. graminearum* from Argentinean maize (12). Not any of the 54 isolates produced Niv, 3-A-DON, HT-2 toxin, T-2 tetraol, nor DAS. The presence of Niv was suspected to be produced by four isolates of *F. semitectum* as the GC analysis showed a peak with the retention time of Niv standard, but it was not confirmed by TLC.

Table 2: Incidence of toxigenic isolates of *Fusarium* species isolated from black beans and grown either on rice or on bean grains.

Species	Nº of species examined	Mycotoxin detected	Nº and % of toxigenic Isolates	
			rice	bean
<i>F. semitectum</i>	29	ZEN	1 (3.4%)	0
		T-2 toxin	1 (3.4%)	0
<i>F. graminearum</i>	16	DON	2 (12.5%)	0
		NEO	1 (6.3%)	1 (6.3%)
<i>F. equiseti</i>	9	ND	0	0

ND = no mycotoxin detected.

In table 3, the mycotoxin production in both substrates is shown. *F semitectum* isolate produced 28.5 mg/kg of Zen and the other one produced 29.2 mg/kg of T-2 toxin on rice kernels. In the same substrate, two of the *F graminearum* isolates produced DON, 432 and 712 mg/kg each one. The isolate 373 of *F graminearum* produced 9.7 mg/kg of Neo on rice, but when cultured on beans produced a low level, 0.28 mg/kg, of this mycotoxin.

Table 3: Mycotoxin production by isolates of *F semitectum* and *F graminearum* grown either on rice grains or on beans.

Species	Isolate N°	Mycotoxin detected	Concentration of toxin (mg/kg)	
			rice	bean
<i>Fusarium semitectum</i>	374	ZEN	28.5	ND
	138	T-2 toxin	29.2	ND
<i>Fusarium graminearum</i>	584	DON	432	ND
	586	DON	712	ND
	373	NEO	9.7	0.28

ND = no mycotoxin detected.

Incubation temperature and time, the same for both substrates, are considered good incubation conditions for mold growth and also for mycotoxin production. So it is remarkable that the same isolates that prove to be capable to synthesize the toxins on rice, did not produce any detectable metabolite on beans with the exception of the isolate 373 which produced a very low level of NEO on the last substrate. This fact could indicate that beans were not a good substrate for *Fusarium* mycotoxin production.

Conclusion

Low incidence of toxigenic fungi was observed. These mycotoxigenic species produced several toxins when grown on rice but none or little amount when grown on beans. Black beans seems to be a poorer substrate than rice for trichothecenes and zearalenone production. Thus, the results of this report suggest that contamination of beans from Argentina with *Fusarium* mycotoxins will not be common and therefore people would be at low mycotoxicosis risk through consumption of beans.

Acknowledgement

The authors thank Gabriela Cano, María Elena Chaparro, José Mallarini, and Daniela Taglieri for technical assistance and the Universidad de Buenos Aires, Universidad Nacional de Luján, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica for financial support.

References

- 1 Summary and Conclusions of the Fifty-six meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 6-15 February 2001. Mycotoxins. <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/jecfa/fecfa56.pdf>
- 2 Chelkowski J (1998) Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains. In: Sinha K and Bhatnagar D (Eds) Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, Marcel Dekker, Inc, New York, NY: 45 - 64
- 3 Ueno Y (1983) Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- 4 Greene DM, Azcona-Olivera JI and Pestka JJ (1994) Vomitoxin (deoxynivalenol) induced IG-A nephropathy in B6C3F1 mouse: dose response and male predilection. Toxicology, 92: 245 - 260
- 5 Kuiper-Goodman T (1994) Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment and risk management. In: Miller JD, Trenholm HL (Eds) Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin, Eagan Press, St. Paul, MN: 439 - 468
- 6 Tseng TC, Tu JC, Soo LC (1995) Natural occurrence of mycotoxins in *Fusarium* infected beans. Microbios 84: 21 - 28
- 7 Tseng TC, Tu JC, and Tzcan SS (1995) Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario. Canada Bot Bull Acad Sin 36: 229 - 234
- 8 Tseng TC and Tu JC (1997) Mycoflora and mycotoxins in adzuki and mung beans produced in Ontario, Canada. Microbios 90: 87 - 95
- 9 Soares LM and Rodrigues Amaya DB (1989) Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin-layer chromatographic method. J Assoc Off Anal Chem 72: 22 - 26
- 10 Mühlemann M, Lüthy J and Hübner P (1997) Mycotoxin contamination of food in Ecuador. B: Ochratoxin A, Deoxynivalenol, T-2 toxin and fumonisin. Mitteilungen Gebiete Lebensm Hyg 88: 593 - 612
- 11 Castillo MD, González HHL, Pacin A, Resnik SL (2001) Fungi associated with *Phaseolus vulgaris* L. harvested at the main production area in Argentina. Sent for publication Mycopathologia.
- 12 Moltó GA, González HHL, Resnik SL and Pereyra González A (1997) Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium* spp. from argentinian corn. Food Add and Contamin 14: 263 - 268
- 13 Marasas WFO, Nelson PE and Toussoun TA (1984) In: Toxigenic *Fusarium* Species-Identity and Mycotoxicology (University Park: Pennsylvania State University Press).
- 14 Megalla SE, Benett GA, Ellis JJ and Shotwell OL (1987) Production of deoxynivalenol and zearalenone by isolates of *Fusarium graminearum*. Schw J Food Protection 50: 826 - 828
- 15 Croteau SM, Prelusky DB and Trenholm HL (1994) Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with Electron Capture Detection. J Agric Food Chem 42: 928 - 934

Manuscript received June 4, 2002; accepted Oct 15, 2002.