

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS**

**“SEGUIMIENTO DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> EN MAIZ Y  
JARABE FRUCTOSADO DERIVADO DE SUS  
ALMIDONES”**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
Q.A. PAVEL CASTILLO URUETA**

**TUTOR: DRA.- ING. MA. DEL CARMEN DURAN DOMINGUEZ**



**2005**

**M: 350504**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

### Jurado Asignado:

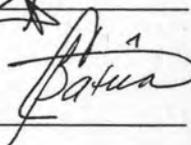
**Dra. Magda Carvajal Moreno**  
**Dra. María Guadalupe Albarran Sánchez**  
**Dr. Eduardo San Martín Martínez**  
**Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez**  
**M. en C. Francisco Rojo Callejas**

**Presidente**  
**Vocal**  
**Secretario**  
**Primer suplente**  
**Segundo suplente**

### Lugar de trabajo:

Laboratorios E-301 y E-302, Edificio "E" del PIQyQA de la Facultad de Química-UNAM.

**Sustentante: Q.A. Pável Castillo Urueta**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

**Tutor: Dra.-Ing. María del Carmen Duran Domínguez**

## Resumen

La aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, presentes en alimentos, piensos y cereales como el maíz. Las cuatro principales aflatoxinas (AF), son B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Dichas toxinas pueden causar enfermedades tanto en humanos como en animales. La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es la más abundante y tóxica del grupo y resulta ser el más potente hepato-cancerígeno conocido. El objetivo de esta investigación es dar seguimiento al destino de la AFB<sub>1</sub> a través de las operaciones unitarias del proceso que simula la producción de jarabe de fructosa a escala de laboratorio a partir de almidones de maíz. Este estudio se realizó con el fin de estimar el riesgo potencial a la salud que se pudiera tener por la ingesta de AF por el consumo de jarabe de fructosa obtenido a partir de maíz contaminado. La determinación de AFB<sub>1</sub> se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en muestras fortificadas y sin fortificar de maíz, almidón, fibra, hidrolizados de almidón y jarabe de glucosa-fructosa. Se evaluó el destino de AFB<sub>1</sub> empleando lotes de maíz fortificado con 2, 20 y 199.97 µg de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de maíz. Se observó que solamente el lote con casi 200 µg de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de maíz tuvo datos medibles. El 6.11% de la toxina se pierde en el agua de remojo y el 93.89% logra pasar con el maíz al proceso de molienda húmeda. De ese 93.89%, en la fibra quedó 12.14%, en el almidón 18.6% y se lixivió el 63.15% en el agua de lavado y en los sólidos que no son recuperados. El almidón contaminado que se obtuvo en esta etapa se empleó para la producción de jarabe de fructosa y se observó que conforme aumenta la hidrólisis se separa una cantidad mayor de la toxina: Cuando la solución de almidón se hidrolizó con α-amilasa se determinó una concentración de 5.50 µg de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de hidrolizado y una vez que se adicionó la siguiente enzima, glucoamilasa, la concentración de la toxina se incrementó a 7.25 µg de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de hidrolizado. Estos resultados sugieren que la hidrólisis enzimática no reduce la concentración de AFB<sub>1</sub> sino que se mantiene en el producto. En el siguiente paso, de purificación del jarabe de glucosa usando carbón activado, se encontró que el producto ya no contuvo AFB<sub>1</sub>, indicando que la toxina permaneció en el adsorbente usado. El compuesto en estudio ya no fue detectado en ninguna de las operaciones unitarias posteriores. Los resultados derivados del estudio de los lotes contaminados en niveles de 2 y 20 µg kg<sup>-1</sup> sugieren que si el maíz empleado en la producción de jarabe fructosado cumple con la normatividad vigente de 20 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> no se encontrarán residuos del compuesto en ninguna de las operaciones unitarias requeridas para obtener jarabe fructosado. Si se tuvieran concentraciones mayores, sería importante verificar con especial cuidado el producto final del paso de purificación con carbón activado para que sea realizado adecuadamente y garantice la inocuidad del producto final.

Palabras clave: Aflatoxina B<sub>1</sub>, maíz, fructosa, miel fructosada

## Abstract

The aflatoxins compounds (AF), are toxic metabolites produced by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*, that grow in foods, animal feeds, foodstuffs, and cereals, such as maize. The most important aflatoxins (AF) are B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>. These toxins can produce damages in humans and animals. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), is the most abundant and potent hepatotoxin member of the group and the most potent hepatocarcinogen known. The objective of this research was to monitor the fate of AFB<sub>1</sub> throughout the unit operations involved in the process to prepare fructose syrup at laboratory level from maize starches. This research was realized to estimate the potential risk to public health by the probable ingest of AF by fructose syrup produced from contaminated maize. The determination of AFB<sub>1</sub> was carried out by high pressure liquid chromatography (HPLC), in fortified and not fortified samples of corn, corn fiber, corn starch, hydrolyzed starch, and glucose-fructose syrup. AFB<sub>1</sub> fate was followed using a maize grains lot fortified with 199.97 µg of AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> of corn. It was observed that 6.11 per cent of the toxin was lost in the soaking water, and 93.89 per cent passed with the corn to the moist milling process. It was detected 12.14% of AFB<sub>1</sub> in the corn fiber, and 18.6% in the corn starch, and 63.15% in the waste water (from the 93.89 that entered). The contaminated corn starch obtained in this step was used to prepare fructose syrup. It was found that when the solution of starch was hydrolyzed with α-amylase, aflatoxin detected was 5.50 µg of AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> of sample, and when glucoamylase was added, the toxin concentration increased up to 7.25 µg of AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> of sample. These results suggested that the enzymatic hydrolysis did not reduce the AFB<sub>1</sub> concentration in the product. In the purification step using activated carbon, for clarification of glucose syrup, AFB<sub>1</sub>, was not detected, indicating that the toxin remained in the adsorbent material used. The compound in study was not further detected in any of the following unit operations. Results derived from the maize lots contaminated with 2 and 20 µg kg<sup>-1</sup>, suggest that if maize used for the fructose syrup production complies with the present norm of 20 µg kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> no residues of this compound will be found in any of the unit operations required. If these concentrations were higher it would be important to verify with special care the product from the purification step using activated carbon to warrant the innocuousness or harmlessness of the final product.

Key Words: Aflatoxin B<sub>1</sub>, maize, fructose, fructose syrup

Simbología y glosario

<b>Anglicismos</b>	
<b>“Protein A-Sepharose CL-4B”</b>	Proteína A de la pared celular de <i>Staphylococcus</i> unido a “sepharosa”.
<b>“Quenching”</b>	Reducción de la señal de fluorescencia por la presencia de sustancias interferentes como oxígeno, baquelita, plástico, etc.
<b>“Sepharosa”</b>	Derivado de gel de sílice que se emplea en la producción de adsorbentes y soportes cromatográficos.
<b>Glosario</b>	
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AF</b>	Aflatoxinas, conjunto de compuestos secundarios producidos por algunas especies del hongo <i>Aspergillus</i> .
<b>AFB<sub>1</sub></b> <b>Aflatoxina B<sub>1</sub></b>	Ciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo [2,3h][1]benzopiren-1,11-diona,2,3,6a,9a-tetrahidro-4-metoxi-, (6aR,9aS).
<b>AFB<sub>2</sub></b> <b>Aflatoxina B<sub>1</sub></b>	Ciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3h][1]benzopiren-1,11-diona, 2,3,6a,8,9,9a hexahidro-4-metoxi-,(6aR,9aS).
<b>AFG<sub>1</sub></b> <b>Aflatoxina G<sub>1</sub></b>	1H,12H-Furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pireno[3,4-c][1]benzopiren-1,12-diona,3,4,7a,10a-tetrahidro-5-metoxi-,(7aR,10aS).
<b>AFG<sub>2</sub></b> <b>Aflatoxina G<sub>1</sub></b>	1H,12H-Furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pireno[3,4-c][1]benzopiren-1,12-diona,3,4,7a,9,10,10a-hexahidro-5-metoxi-,(7aR-cis).
<b>Aflatoxicol</b> <b>Aflatoxin Ro</b>	Metabolito producido por la acción del citocromo P-450 sobre AFB <sub>1</sub> Ciclopenta(c)furo(3',2':4,5)furo(2,3-h)(1)benzopyren-1(1H)-one, 2,3,6a,9a-tetrahidro-1-hidroxi-4-metoxi.
<b>AFM<sub>1</sub></b> <b>Aflatoxina M<sub>1</sub></b>	Ciclopenta(c)furo(3',2':4,5)furo(2,3-h)(1)benzopiren-1,11-diona, 2,3,6a,9a-tetrahidro-9a-hidroxi-4-metoxi-, (6aR-cis).
<b>AIIC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (“IARC” International Agency for Research of Cancer).
<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Químicos Analíticos (“Association of Official Analytical Chemists”).
<b>ATF</b>	Ácido trifluoroacético.
<b>Baquelita</b>	Resina sintética que se obtiene calentando formaldehído y fenol en presencia de un catalizador. Tiene mucho uso en la industria, especialmente en la preparación de barnices y lacas y en la fabricación de objetos moldeados.
<b>BPC</b>	Bifenilos policlorados.
<b>Cancerígeno</b>	Que puede provocar cáncer
<b>Carcinógeno</b>	Dicho de una sustancia o agente: Que produce cáncer.
<b>C<sub>18</sub></b>	Nomenclatura empleada para definir el tipo de cadena de una fase estacionaria en cromatografía.
<b>CIA</b>	Cromatografía de inmunoafinidad.
<b>CLAR</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
<b>Citocromo P-</b>	Complejo enzimático encargado de degradar compuestos antropogénicos.

<b>450 (CYP-450)</b>	
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media de una sustancia.
<b>DOF</b>	Diario Oficial de la Federación.
<b>DON</b>	Desoxinivalenol o vomitoxina, micotoxina producida por <i>Fusarium</i> .
<b>EDTA</b>	Sal disódica del ácido tetraaminacético.
<b>Edulcorante</b>	Sustancia natural o sintética empleada para impartir sabor dulce.
<b>EEUU</b>	Estados Unidos de América (Abreviatura aceptada por la Real Academia Española).
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ("United Nations Food and Agriculture Organization").
<b>Fluorescencia</b>	Luminiscencia que desaparece al cesar la causa que la produce.
<b>Fosforescencia</b>	Luminiscencia que permanece algún tiempo al cesar la causa que la produce.
<b>Gluten</b>	Fracción proteica de los cereales.
<b>HAP</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
<b>IgG</b>	Inmunoglobulinas (proteínas del sistema inmune).
<b>LSD</b>	Ácido dietilamino lisérgico (por sus siglas in inglés, lysergic diethylamine acid).
<b>Micelio</b>	Talo de los hongos, formado comúnmente de filamentos muy ramificados y que constituye el aparato de nutrición de estas plantas.
<b>Monoclonal</b>	Sustancia producida en el organismo animal por la presencia de un antígeno, contra cuya acción reacciona específicamente frente a un único antígeno.
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana.
<b>OMS</b>	Organización Mundial para la Salud.
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno.
<b>Policlonal</b>	Sustancia producida en el organismo animal por la presencia de un antígeno, contra cuya acción reacciona frente a varios antígenos.
<b>SAF</b>	Solución amortiguadora de pH a base de sales de fosfatos.
<b>UE</b>	Unión Europea.
<b>UV-vis</b>	Radiación ultravioleta-visible.
<b>W</b>	Watt de potencia.
<b>Símbolos griegos</b>	
<b>λ<sub>em</sub></b>	Longitud de onda de emisión, 450 nm.
<b>λ<sub>ex</sub></b>	Longitud de onda de excitación, 365 nm.
<b>ε</b>	Coefficiente de extinción molar.

*"Voy a lanzar ciertas acusaciones contra los enseñantes de ciencias y la enseñanza de la ciencia. En primer lugar, los acuso a ustedes, enseñantes de ciencias, de dedicar sus energías a la mera transmisión de conocimientos y principios científicos; de ser, en otras palabras, libros de texto animados... hasta el punto de que sus alumnos creen que la ciencia no es nada más que eso..."*

*En segundo lugar, los acuso de dar a sus alumnos una idea falsa de la esencia de la ciencia... los acuso de no transmitir la gran verdad de que la esencia de la ciencia es un método, una empresa desordenada, imaginativa, con frecuencia poco sistemática donde la suerte y la perseverancia desempeñan un papel importante..."*

*Los acuso, pues, de transmitir a sus alumnos la idea falsa de que los modelos y analogías que utilizan para explicar ideas científicas son representaciones exactas de la realidad, en vez de ser, como son en realidad, construcciones imaginativas de la mente humana.*

*Mi tercera acusación es que no han hecho mucho para ayudar a sus alumnos normales y por debajo de lo normal para que sepan distinguir entre lo que es ciencia y lo que no lo es..."*

*W. J. Fletcher, 1979*

---



---

**ÍNDICE GENERAL**

	<i>Páginas</i>
Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Simbología y glosario.....	v

**CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

1.0. Antecedentes.....	1
1.1. Las micotoxinas.....	2
1.2. Las aflatoxinas.....	3
1.2.1. Estructura química de las aflatoxinas.....	5
1.2.2. Efectos tóxicos de las aflatoxinas.....	6
1.3. Legislación sobre aflatoxinas.....	8
1.3.1. Normatividad mexicana.....	9
1.3.2. Legislación de EUA sobre aflatoxinas.....	10
1.3.3. Legislación sobre aflatoxinas vigente en la Unión Europea.....	11
1.4. Mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo.....	13
1.5. Posible problemática del uso de maíz y otros cereales y granos contaminados con aflatoxinas.....	13
1.6. Problemas asociados al consumo de la fructosa.....	15
1.7. Proceso para la obtención de almidón de maíz.....	16
1.8. Obtención de jarabes de glucosa a partir de dispersiones de almidón.....	17
1.8.1. Hidrólisis del almidón.....	19
1.8.2. Hidrólisis de productos intermediarios, sacarificación.....	20
1.8.3. Purificación del jarabe de glucosa.....	20
1.8.4. Isomerización de glucosa a fructosa.....	20
1.9. Justificación.....	21
1.10. Objetivos.....	22

**CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS**

2.0. La Cromatografía como una herramienta analítica.....	23
2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	23
2.1.1. Instrumentación en cromatografía líquida.....	23
2.1.2. Detector de fluorescencia.....	24
2.2. Fundamentos de la espectroscopía de fluorescencia.....	25
2.2.1. Efecto de "apagado".....	26
2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución en la identificación de aflatoxinas.....	27
2.4. Cromatografía de bioafinidad.....	28
2.4.1. Cromatografía de inmunoafinidad.....	29
2.4.2. Obtención de anticuerpos para la cromatografía de inmunoafinidad.....	31
2.4.2.1. Producción de anticuerpos policlonales.....	31
2.4.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales.....	31
2.4.3. Inmunoadsorbentes.....	33

---

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.0 Metodología .....	34
3.1. Reactivos y materiales.....	35
3.2. Métodos.....	36
3.2.1. Metodología del análisis químico.....	36
3.2.2. Obtención de almidón de maíz.....	36
3.2.3. Obtención de jarabe de fructosa a partir de dispersiones de almidón.....	37
3.2.3.1. Hidrólisis del almidón.....	37
3.2.3.2. Sacarificación.....	38
3.2.3.3. Isomerización.....	38
3.3. Criterios de pureza del estándar de AFB <sub>1</sub> .....	39
3.3.1. Obtención del espectro de absorción y determinación de la longitud máxima de absorción para AFB <sub>1</sub> .....	39
3.3.2. Cálculo del factor de corrección del equipo (FC).....	39
3.4. Soluciones patrón de AFB <sub>1</sub> .....	40
3.5. Métodos de análisis de AFB <sub>1</sub> .....	40
3.5.1. Extracción de AFB <sub>1</sub> de muestras de maíz, almidón y adsorbente.....	40
3.5.2. Purificación de las muestras.....	41
3.5.3. Derivación de AFB <sub>1</sub> .....	41
3.5.4. Cuantificación por CLAR-fluorescencia.....	42
3.5.5. Cálculo del porcentaje de recuperación de AFB <sub>1</sub> en los diferentes productos del maíz.....	42

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.0 Establecimiento de las condiciones para la producción de jarabe fructosado.....	43
4.1. Análisis químico de las muestras de maíz.....	43
4.2 Obtención del almidón de maíz.....	43
4.3. Obtención de jarabe de fructosa a partir de dispersiones de almidón.....	44
4.3.1. Hidrólisis de almidón .....	44
4.3.2. Sacarificación.....	45
4.3.3. Isomerización.....	46
4.4. Establecimiento del método para identificación y cuantificación de AFB <sub>1</sub> .....	47
4.4.1. Criterio de pureza del estándar de AFB <sub>1</sub> .....	47
4.4.2. Curvas de calibración para cuantificar AFB <sub>1</sub> .....	48
4.4.3. Cálculo del porcentaje de recuperación de AFB <sub>1</sub> en los diferentes productos del maíz.....	48
4.5. Resultados obtenidos en las muestras de maíz fortificadas con estándar de AFB <sub>1</sub> ...	50

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.....	61
Recomendaciones.....	62

## ANEXO 1

A1.0. Áreas cromatográficas obtenidos en el análisis por cromatografía de líquidos de las muestras analizadas.....	64
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

**ANEXO 2. MANEJO DE RESIDUOS**

<b>A2.1. Datos generales de la AFB<sub>1</sub></b> .....	<b>65</b>
<b>A2.1.2. Datos físicos</b> .....	<b>65</b>
<b>A2.1.3. Estabilidad</b> .....	<b>65</b>
<b>A2.1.4. Datos toxicológicos</b> .....	<b>65</b>
<b>A2.2. Tratamiento de residuos, visión general</b> .....	<b>66</b>
<b>A2.3. Descontaminación del material de laboratorio</b> .....	<b>67</b>
<b>A2.4. Descontaminación del área de trabajo</b> .....	<b>67</b>
<b>A2.5. Descontaminación de material desechable</b> .....	<b>67</b>
<b>A2.6. Tratamiento de derrames</b> .....	<b>67</b>
<b>A2.7. Tratamiento de remanentes de extracto de muestras</b> .....	<b>67</b>
<b>A2.8. Tratamiento de equipos analíticos</b> .....	<b>68</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>70</b>

---

## LISTA DE TABLAS

	<i>Páginas</i>
Tabla 1.1. Principales contaminantes que se encuentran en la biosfera tanto de origen natural como de origen antropogénico (Manahan, 2000).....	2
Tabla 1.2. Niveles máximos permitidos para aflatoxinas en México.....	10
Tabla 1.3. Niveles máximos permitidos para aflatoxinas en EEUU (FDA, 2000).....	10
Tabla 1.4. Límites máximos de aflatoxinas establecidas por el MERCOSUR (MERCOSUR, 1994).....	11
Tabla 1.5. Niveles máximos permitidos de aflatoxinas por la legislación de la Unión Europea (Directiva CE 2174/2003) .....	12
Tabla 1.6. Toxicidad de algunas aflatoxinas para patos (Peña y Durán, 1990).....	22
Tabla 4.1. Resultado del análisis químico del maíz.....	43
Tabla 4.2. Isomerización de glucosa a fructosa por glucosa isomerasa.....	47
Tabla 4.3. Resultados del cálculo del factor de corrección del equipo.....	48
Tabla 4.4. Porcentaje de recuperación de AFB <sub>1</sub> en diferentes matrices.....	50
Tabla 4.5. Resultados obtenidos en la muestra fortificada a un nivel de 2 µg kg <sup>-1</sup> .....	56
Tabla 4.6. Resultados obtenidos en las muestras fortificadas a un nivel de 20 µg kg <sup>-1</sup> .	56
Tabla 4.7. Resultados obtenidos en la muestra fortificada a un nivel de 200 µg kg <sup>-1</sup> .....	56
Tabla A1.1. Áreas cromatográficas de la muestra contaminada con 199.76 µg kg <sup>-1</sup> de AFB <sub>1</sub> .....	64
Tabla A1.2. Áreas cromatográficas de la muestra contaminada con 19.82 µg kg <sup>-1</sup> de AFB <sub>1</sub> .....	64
Tabla A1.3. Áreas cromatográficas de las muestra contaminada con 20.23 µg kg <sup>-1</sup> de AFB <sub>1</sub> .....	64
Tabla A2.1. Valores de DL <sub>50</sub> para AFB <sub>1</sub> en roedores.....	66

## LISTA DE FIGURAS

	<i>Páginas</i>
Figura 1.1. Estructura química de las aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> (Jaimez <i>et al.</i> , 2000)....	4
Figura 1.2. Metabolitos obtenidos en el tratamiento ácido de las aflatoxinas B <sub>1</sub> y G <sub>1</sub> Holcomb <i>et al.</i> , 1992).....	14
Figura 1.3. Derivados que se pueden obtener a partir de aflatoxina B <sub>1</sub> por la acción metabólica de animales. A: aflatoxina B <sub>1</sub> , B: aflatoxina B-2,3-dihidro-2,3-diol, C: aflatoxina B-2,3-óxido, D: aflatoxina B <sub>2</sub> , E: aflatoxina Q <sub>1</sub> , F: aflatoxicol H <sub>1</sub> , G: aflatoxicol (AFL), H: aflatoxicol M <sub>1</sub> , I: aflatoxina M <sub>1</sub> , J: aflatoxina P <sub>1</sub> , K: aflatoxina B <sub>2a</sub> (Pohland y Wood, 1987).....	16
Figura 1.4. Obtención de almidón a partir de granos de maíz amarillo (Anónimo, 2003).....	17
Figura 1.5a. Estructura de la amilosa.....	18
Figura 1.5b. Estructura de la amilopectina.....	18
Figura 1.6. Pasos para la producción enzimática de jarabe fructosado a partir de almidón de maíz.....	19
Figura 2.1. Instrumentación básica en cromatografía líquida de alta resolución.....	24
Figura 2.2. Esquematización del proceso de fluorescencia.....	25
Figura 2.3. Pasos básicos de la cromatografía de inmunoafinidad.....	30
Figura 3.1. Esquema sobre la obtención de jarabes de fructosa a partir de dispersiones de almidón.....	34
Figura 3.2. Obtención de almidón a partir de granos de maíz blanco comercial (Los puntos en los cuales se tomaron muestras para determinar aflatoxinas fueron los marcados con un asterisco).....	37
Figura 4.1. Hidrólisis del almidón comercial empleando alfa-amilasa.....	45
Figura 4.2. Hidrólisis de oligosacáridos empleando glucoamilasa.....	46
Figura 4.3. Curva de calibración para AFB <sub>1</sub> de 2 a 20 µg kg <sup>-1</sup> .....	49
Figura 4.4. Curva de calibración para AFB <sub>1</sub> de 20 a 200 µg kg <sup>-1</sup> .....	49
Figura 4.5. Cromatograma del blanco de reactivos.....	51
Figura 4.6. Cromatograma de la curva de calibración de AFB <sub>1</sub> de 20 a 200 µg kg <sup>-1</sup> ....	51
Figura 4.7. Cromatograma obtenido en el almidón de la muestra sin contaminar.....	52
Figura 4.8. Cromatograma obtenido en una muestra de maíz contaminada con 2.02 µg kg <sup>-1</sup> de AFB <sub>1</sub> .....	52
Figura 4.9. Cromatograma obtenido después de realizar la isomerización del jarbe de glucosa en la muestra fortificada con 20.23 µg kg <sup>-1</sup> .....	53
Figura 4.10. Cromatograma obtenido en la muestra de fibra del lote contaminado con 199.76 µg kg <sup>-1</sup> de AFB <sub>1</sub> .....	54
Figura 4.11. Cromatograma obtenido para la muestra de hidrolizado con α-amilasa del lote contaminado con 199.76 µg kg <sup>-1</sup> .....	55
Figura 4.12. Cromatograma obtenidos para la muestra de hidrolizado con glucoamilasa de la muestra contaminado con 199.76 µg kg <sup>-1</sup> .....	55
Figura 4.13. Distribución de AFB <sub>1</sub> durante la obtención de almidón de maíz.....	57
Figura 4.14. Obtención de jarabe de fructosa a partir de almidón.....	58
Figura A2.1. Diagrama de generación de residuos en la producción de almidón.....	68
Figura A2.2. Generación de residuos en la producción de jarabe de fructosa.....	69

## *Agradecimientos*

*Agradecimientos al CONACYT por la beca-crédito No. 181805 otorgada para la realización de los estudios de maestría.*

*A ENZIQUM y NOVOSYMES por la donación de las enzimas empleadas en este proyecto.*

*Agradecimiento especial a la Dra. Carmen Durán de Bazúa por su apoyo y dirección del proyecto.*

*A la Dra. Magda Carvajal Moreno por sus magníficas sugerencias.*

*A la M. en C. Irma Tejada por sus valiosos comentarios y correcciones.*

*A los miembros del jurado por sus valiosas sugerencias y observaciones.*

*A todo el personal de los laboratorios 301 – 303 del PYZA y QA por su apoyo durante la realización de esta investigación.*

*A Mis padres y a mi hermano (Juanita, Sigfrido, Sigfrido Jr.) por apoyarme totalmente durante esta nueva etapa de mi vida.*

*A todos mis amigos, que le dan un toque especial a mi vida: Osvaldo, Jaime, Jorge, Rol, Mary, Julia, Lore, Sandra, Rony, Inés, Ileana.*

*"A ti pequeña, que puedo decirte. Tu que has caminado a mi lado durante este tiempo, riendo y abatiendo mi cansancio, dándome fuerzas para seguir luchando. Norita gracias por todo".*

*Dedicada a mis padres*

*"Todo el sufrimiento, el empeño y el gozo que hicieron posible la culminación de este trabajo lo dedico a dos seres que bajo el ideal de la lucha, el amor, la tolerancia y el respeto me han guiado y apoyado en todo. Ellos que en ocasiones con mano dura y firme y, otras con mano suave y dulce, me corrigieron durante los años más críticos para mi formación y que pese a los años siempre están en vela, cuidando de mi. Esos maravillosos seres a los cuales les debo el que hoy me encuentre pisando esta Tierra. Gracias por todo amados padres"*

*Pável Castillo 2005*

## **Capítulo 1**

# **Introducción**

### **1.0. Antecedentes**

En los últimos años, la protección del ambiente se ha convertido en uno de los temas más importantes en nuestra sociedad, debido a que desde hace algún tiempo hay conciencia del deterioro que está sufriendo como consecuencia de las actividades humanas y del riesgo que esto implica, tanto para la supervivencia del hombre como para mantener la vida en el planeta como hoy se conoce. Como una necesidad de mantener el equilibrio ambiental, la ciencia y la tecnología deben actuar coordinadamente para encontrar soluciones viables para los problemas ambientales, generando tecnologías sostenibles que promuevan la eficiencia de los procesos humanos, así como concientizando y reeducando a la población mediante el estudio de las ciencias ambientales.

A pesar que la naturaleza tiende a equilibrar por sí misma, los mecanismos de generación y eliminación de contaminantes, debido al aumento demográfico acelerado y a las prácticas humanas, este equilibrio se ha visto descompensado generándose un exceso de contaminantes que tardan un mayor tiempo en degradarse y tienden a acumularse, lo cual afecta consecuentemente los principales cuerpos receptores de la biosfera (Manahan, 2000).

Se considera como contaminante a aquella sustancia o elemento cuya concentración se encuentra por arriba de las permitidas en un entorno y que le causa efectos nocivos. Los contaminantes pueden ser naturales (producidos sin la intervención del hombre) y antropogénicos (generados por esta especie), siendo ambas fuentes perjudiciales para los ecosistemas y para el equilibrio global de la Tierra.

Entre los contaminantes naturales, citados en la Tabla 1.1, se encuentran las micotoxinas y, entre ellas, las aflatoxinas que, debido a su rápida difusión y peligrosidad en el ambiente, son considerados como una fuente de estudio de gran importancia dentro de la toxicología ambiental y de la propia química ambiental (Manahan, 2000).

## 1.1. Las micotoxinas

De acuerdo con algunas estimaciones, se han identificado cerca de 100,000 hongos filamentosos, de los cuales 400 pueden ser considerados potencialmente tóxicos *per se* o por los metabolitos que generan. De ellos, se sabe que el 5% produce compuestos tóxicos que causan problemas en todo el mundo (Bata y Lásztity, 1999).

**Tabla 1.1. Principales contaminantes que se encuentran en la biosfera tanto de origen natural como de origen antropogénico (Manahan, 2000)**

Contaminantes naturales		
Agua	Atmósfera	Geosfera
1) Algas (eutrofización)	1) Combustión de materia orgánica	1) Corrosión causada por microorganismos
2) Microorganismos patógenos	2) Exceso de CO <sub>2</sub> el cual causa un calentamiento global	2) Micotoxinas, generadas por microhongos
3) Exceso de alcalinidad debido al tipo del suelo		3) Aflatoxinas, generadas por <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>
Contaminantes antropogénicos		
1) Insecticidas y herbicidas	1) Combustión de hidrocarburos	1) Deposición de HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> lo cual disminuye pH del suelo
	2) Partículas suspendidas (CO, SO <sub>2</sub> , NO, NO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O, NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S, Cl <sub>2</sub> , HCl, HF)	
2) Asbestos	3) Lluvia ácida (HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2) Deposición de sulfatos originados en la combustión del SO <sub>2</sub> por vehículos automotores
3) Plaguicidas	4) HAP, nitro-HAP	3) Exceso de fertilizantes y plaguicidas
4) Detergentes	5) Dioxinas y furanos	3) Exceso de NO y NO <sub>2</sub> , desequilibrio en el ciclo de N <sub>2</sub>
5) Elementos traza contribuyentes a la acidez, alcalinidad y salinidad (As, Mg, Mn, Cr, Fe, Pb, Zn)		4) Elementos traza contribuyentes a la acidez, alcalinidad y salinidad (As, Mg, Mn, Cr, Fe, Pb, Zn)
6) Radionucleótidos		5) BPC (bifenilos policlorados)
7) Aguas residuales con alto contenido de materia orgánica que requiere grandes cantidades de oxígeno para ser oxidadas		6) Derrames de petróleo y de compuestos derivados del petróleo
8) BPC		

La distribución y contaminación por microhongos de cereales, semillas oleaginosas y otros cultivos se encuentra ampliamente documentada en la literatura. Los metabolitos tóxicos de

los hongos han sido encontrados en alimentos, cereales y cereales procesados (maíz, arroz, sorgo, trigo, etc.), leguminosas, frijol de soya, cacahuates, nueces, pistaches, etc. (Bata y Lásztity, 1999; Chiavaro *et al.*, 2001; Kok, 1994; Stroka y Anklam, 2002; Stroka *et al.*, 2000). Los alimentos y alimentos procesados contaminados por micotoxinas son un gran riesgo para la salud del hombre y animales y, a consecuencia de ello, se presentan pérdidas económicas muy importantes (Bata y Lásztity, 1999; Blesa *et al.*, 2004; Kok, 1994).

De forma directa o indirecta, los alimentos contaminados por hongos son un riesgo potencial para la salud humana, ya que se pueden presentar diversos tipos de micotoxicosis. Las micotoxicosis son intoxicaciones causada por la ingesta de alimentos que han sido infestados por hongos filamentosos y que producen micotoxinas (Bata y Lásztity, 1999; Bonifaz, 2002). En la intoxicación se puede o no consumir el hongo (esporas, filamentos) y la mayoría de las veces únicamente se ingiere la toxina, que es liberada en el medio. Aunque la concentración de estas toxinas puede ser muy baja, la serie de trastornos que ocasiona pueden ser muy variados y, en ocasiones, fatales (Blesa *et al.*, 2004; Jaimez *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004). En la actualidad, el terreno de la micotoxicología es muy vasto. Sin embargo, todavía hay muchas toxinas que no se han investigado a fondo, no sólo en sus efectos, sino también en sus estructuras químicas y propiedades. Existen muchos tipos de micotoxinas y, entre las más conocidas y frecuentes, se encuentran: Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), vomitoxina o desoxinivalenol (DON), tricotecenos, citrinina y patulina (Araguás *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2004; D'Mello y Macdonald, 1997; Holcomb *et al.*, 1992; Knasmüller *et al.*, 1997; Lerda *et al.*, 2005; Molinié *et al.*, 2005; Papp *et al.*, 2002; Pestka *et al.*, 2004; Urraca *et al.*, 2004).

## 1.2. Las aflatoxinas

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos que cobraron importancia a partir de la muerte repentina en 1960 en Escocia, de cien mil pavos alimentados con harina de cacahuate proveniente del Brasil infectada con una especie fúngica: *Aspergillus flavus* (Bata y Lásztity, 1999; Blesa *et al.*, 2004; Chiavaro *et al.*, 2001; Holcomb *et al.*, 1992; Jaimez *et al.*, 2000; Kok, 1994; Kussak *et al.*, 1995; Otta *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Rastogi *et al.*, 2001; Sharma y Márquez, 2001; Shenashi *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 1998; Stroka *et al.*, 2000). Los micelios de ésta y otras especies afines productoras de aflatoxinas, son capaces

de colonizar semillas y pastas de oleaginosas de cacahuete, girasol, algodón, soja o soya, sésamo o ajonjolí, avellanas, almendras y cereales y sus derivados dispuestos en sacos o silos (Jaimez *et al.*, 2000; Kok, 1994; Kussak *et al.*, 1995; Papp *et al.*, 2002; Sיעיow, 2003; Stroka *et al.*, 2000; Williams y Wilson, 1999).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos que presentan diversas estructuras químicas (Figura 1.1). Como ya se mencionó, estos compuestos son producidos por hongos microscópicos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*) y pueden contaminar granos básicos y alimentos procesados que se han formulado con ellos. Dichas sustancias, al ser ingeridas y metabolizadas, son capaces de producir reacciones tóxicas que pueden causar efectos adversos en la salud humana; hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, gastroentéricos, cancerígenos e inmunosupresivos y aún la muerte en animales superiores; representando un riesgo potencial para los animales (ratas, ratones, cerdos, truchas, etc.), incluido el hombre (Blesa *et al.*, 2004; Niedwetzki *et al.*, 1994; Leeson *et al.*, 1995; Sharma y Márquez, 2001; Shenasi *et al.*, 2002).

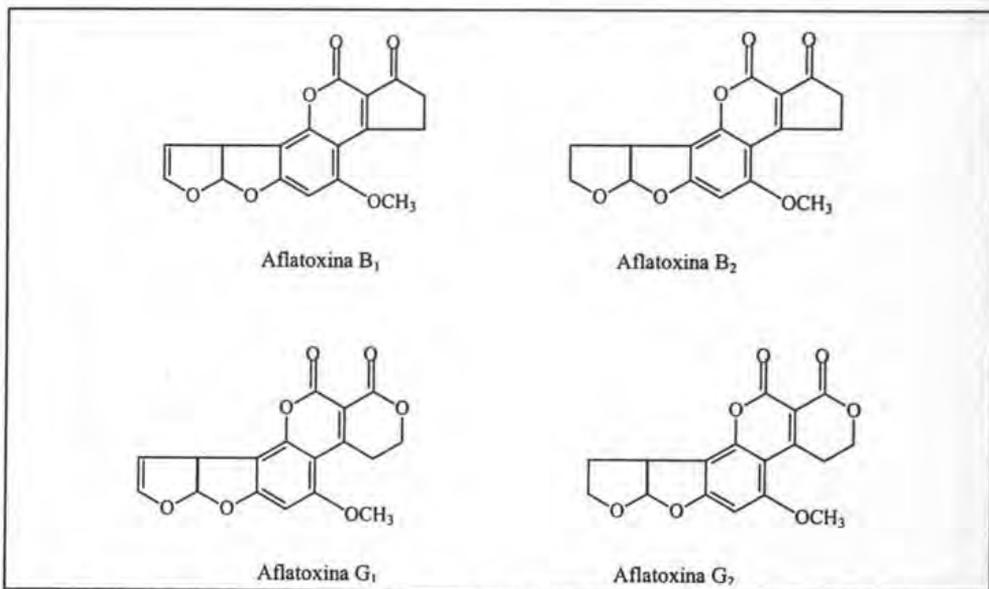


Figura 1.1. Estructura química de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (Jaimez *et al.*, 2000)

El desarrollo de *Aspergillus sp.*, se ve afectado por la termohigrotropía, es decir, que responde al estímulo de la temperatura y la humedad relativa de la atmósfera y del sustrato. También depende de diversos factores entre los que destacan los físicos, biológicos, bioquímicos y ambientales (Pohland y Wood, 1987). Así, la formación de aflatoxinas en el sustrato tiene lugar si éste se almacena entre 20 y 40°C con un 10-20% de humedad y con un 70-90% de humedad relativa en el aire (Sendra y Carbonell, 1999). Las aflatoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Gimeno y Martins, 2004). El desarrollo del hongo se ve favorecido si los granos están dañados por insectos o roedores. Pero, aún en ausencia de estas condiciones, si ya han germinado algunas esporas en el sustrato, se pueden formar "nichos ecológicos" que favorecen el desarrollo de sectores con micelios generadores de aflatoxinas porque al proliferar produce agua por respiración aumentando así la humedad de algunas semillas o granos (Steciow, 2003).

Cuando los cereales y frutos secos están almacenados en condiciones poco adecuadas de humedad y temperatura y que resultan ser las óptimas para que *Aspergillus sp.*, desarrolle sus toxinas (humedad relativa de 80-85%, sustrato con humedad 17% y temperaturas de 24-35°C), éstas se forman (Leeson *et al.*, 1995). La composición química de las aflatoxinas varía con las cepas, el sustrato o materia orgánica sobre el cual crece y las condiciones ambientales del desarrollo del hongo (Lippmann, 2000).

### 1.2.1. Estructura química de las aflatoxinas

Las aflatoxinas constituyen un grupo de metabolitos heterocíclicos (Leeson *et al.*, 1995; Rastogi *et al.*, 2001). Recientemente, se han identificado por lo menos 18 aflatoxinas, sin embargo, solamente las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son sintetizadas naturalmente. Las otras aflatoxinas (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, G<sub>2a</sub>, B<sub>2a</sub> y aflatoxicol, etc.), son productos del metabolismo microbiano o de animales (Lindner, 1995; Palmgren y Hayes, 1987). El nombre de cada

aflatoxina fue acuñado por los investigadores que las identificaron dando las letras B y G por sus fluorescencias (azul y verde en inglés), si eran derivadas de la leche (M) o de otros productos.

Químicamente, las aflatoxinas son difurocumarolactonas. Su estructura consiste en un dihidrodifurano o tetrahidrodifurano unido a una cumarina substituida. Las aflatoxinas B y M presentan un anillo de pentenona y las G un anillo de seis miembros o lactona (Figura 1.1), (Jaimez *et al.*, 2000; Leeson *et al.*, 1995; Palmgren y Hayes, 1987). Existen diversas aflatoxinas, sin embargo, se ha reportado que la más peligrosa es la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), debido, a que es un potente teratógeno, mutágeno y hepatocancerígeno (Akiyama *et al.*, 2001; Otta *et al.*, 2000; Jaimez *et al.*, 2000; Rastogi *et al.*, 2001; Williams y Wilson, 1999).

Los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* sintetizan de manera predominante la AFB<sub>1</sub>, la cual es el compuesto más tóxico del grupo. *A. flavus* produce solamente AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, mientras *A. parasiticus* llega a producir las cuatro aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>). Sin embargo, no todas las especies de *Aspergillus sp.*, son capaces de producir aflatoxinas. El genotipo de cada especie determina la aflatoxicidad. Algunos factores biológicos, químicos y ambientales determinan la cantidad de aflatoxinas producidas por las cepas aflatoxígenas de *Aspergillus sp.*, sobre un sustrato (Leeson *et al.*, 1995).

### 1.2.2. Efectos tóxicos de las aflatoxinas

La acción cancerígena de las aflatoxinas ha sido demostrada en ratas, truchas y hurones. Usando alimento, contaminado con aflatoxinas, se demostró que 0.5 mg kg<sup>-1</sup> en la dieta inducen daño y produce carcinoma en animales de laboratorio (D'Mello *et al.*, 1997). Como se mencionó, durante 1960 fallecieron 100,000 pavos a causa de una severa intoxicación por metabolitos que provenían de hongos filamentosos. Estos compuestos se encontraron en harina infestada por *Aspergillus flavus*, ya que este hongo se desarrolla comúnmente durante el periodo de almacenamiento (Holcomb *et al.*, 1992; Jaimez *et al.*, 2000; Kussak *et al.*, 1995;). Diversos estudios permitieron determinar una serie de compuestos fluorescentes a los cuales se les denominó en su conjunto como aflatoxinas (AF), destacando cuatro de ellas por su alta actividad cancerígena y teratógena, aún en muy bajas concentraciones. Al mismo tiempo, en Estados Unidos de América, EEUU, se

observaron hematomas que fueron relacionados con la contaminación por aflatoxinas en las dietas de peces (Otta *et al.*, 2000).

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las aflatoxinas en los humanos son: La biodisponibilidad, la toxicidad, la cantidad de toxina ingerida diariamente en función de la concentración de aflatoxina y de la cantidad de alimento ingerido, la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado; el peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste; la edad del individuo (Gimeno y Martins, 2004).

La susceptibilidad de los humanos hacia las aflatoxinas no está bien documentada; sin embargo, estudios epidemiológicos realizados en África y Asia han mostrado que una de las principales causales de muerte es el cáncer de hígado (hepatocarcinoma). Esta enfermedad causa por lo menos 300,000 muertes por año. Los estudios epidemiológicos han encontrado un aumento en la incidencia de cáncer y hematomas en las regiones donde ha aumentado la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas (Guzmán, 2001; Williams y Wilson, 1999). Investigaciones realizadas en 185,000 muestras de cacahuete provenientes de Brasil, Guatemala, Irlanda, México, Suiza, Reino Unido, EEUU, y la URSS indican que, el 1% del total de muestras en estudio presentan niveles de aflatoxinas menores a  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  (FAO, 1991; García *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2001). Estos estudios han demostrado la presencia de diversas micotoxinas como las aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, etc. En la India, por ejemplo, se han encontrado valores de aflatoxinas totales que oscilaban entre 6.25-15.6 mg de AF  $\text{kg}^{-1}$  de maíz; cantidades que provocan daño hepático agudo. También en 1974 fueron documentados 108 casos de pacientes que habían consumido maíz contaminado con aflatoxinas en niveles que oscilaban entre 0.25 y 15 mg de AF por kg de dieta. En todos estos casos se detectó cirrosis hepática en niños. Por otra parte, el síndrome de Reye con encefalitis y degeneración grasa de vísceras en niños se ha asociado con la ingesta de aflatoxinas (Jaimez *et al.*, 2000; Lindner, 1995; Nelson *et al.*, 1980).

En países asiáticos como Tailandia, la presencia de aflatoxinas son un mal endémico y las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> han sido aisladas de hígado humano determinándose la presencia de

sus metabolitos (P<sub>1</sub> y Q<sub>1</sub>), en dicho tejido. Estos derivados de las aflatoxinas se han relacionado de forma directa con cáncer (Jaimez *et al.*, 2000).

Otros estudios realizados en el sur de Guangxi, China durante 1990, sugieren un riesgo potencial a desarrollar cáncer hepático por la exposición a dosis diarias de aflatoxinas en niveles que van de 16.9 a 20 mg de aflatoxina por kg de peso corporal, lo cual resulta ser significativamente menor a lo observado en estudios con ratas macho. Adicionalmente, se correlacionó esta susceptibilidad con la presencia de infecciones por hepatitis B (Lippmann, 2000).

### 1.3. Legislación sobre aflatoxinas

Por otra parte, el reconocimiento de la actividad cancerígena de las aflatoxinas ha llevado a interrogantes concernientes al peligro que representa para la salud pública la contaminación de los alimentos con hongos. Un estudio realizado por la comisión del Codex Alimentarius en 1997, concluyó que una disminución en los límites permisibles de aflatoxinas de 20 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en la dieta europea, no tenía un efecto medible en la incidencia de cáncer hepático. No obstante, el riesgo de cáncer por la influencia de dichos compuestos aumenta en las regiones en donde la población ingiere con mayor frecuencia alimentos contaminados con aflatoxinas y donde la nutrición proteica es deficiente, combinado con la hepatitis B, como en regiones de Asia y África (Steciow, 2003; Williams y Wilson, 1999). En África, la cerveza se elabora con sorgo y se ha identificado la presencia de AFB<sub>1</sub>, tanto en este cereal como en la propia cerveza. Consecuentemente, la exposición de los individuos a las micotoxinas por ingestión de frutos secos, cereales y alimentos o bebidas elaborados con ellos, continúa siendo muy preocupante (Sendra y Carbonell, 2004).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha determinado que existe suficiente evidencia para clasificar a las AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> como probables agentes carcinógenos para humanos (Holcomb *et al.*, 1992). No obstante, debido a que estos compuestos se producen naturalmente, no existe forma de evitarlos. Hasta el momento no se cuenta con valores para niveles sin efectos que sirvan como referencia para las regulaciones al respecto. Debido a ello, los organismos de salud de los distintos países han

establecido regulaciones para la presencia de las aflatoxinas en los alimentos. Algunos estipulan una tolerancia cero, mientras que en otros se tienen límites que van desde 2 a 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales. Por ejemplo, Brasil en productos para exportación permite 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales, mientras la India permite 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> (D'Mello *et al.*, 1997).

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció el límite máximo permisible de 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la AFB<sub>1</sub> y de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para las aflatoxinas totales (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>), en varios géneros de alimentos (Papp *et al.*, 2002). Por su parte, la Unión Europea (UE), toma esta regulación solamente para algunos alimentos como son las especias. Para otros alimentos, como las nueces, frutas secas, cereales y sus derivados para consumo humano directo o como ingrediente, establece límites más rigurosos aceptando solamente 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la presencia de AFB<sub>1</sub> y 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la presencia de AF totales (Blesa *et al.*, 2004; Chiavaro *et al.*, 2001; Gimeno y Martins, 2004; Stroka y Anklam, 2002).

Por otra parte; los EEUU, México y los países que integran el MERCOSUR (Tabla 1.4), cuentan con el nivel de tolerancia más alto para el total de las cuatro aflatoxinas, 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en todos los géneros alimenticios para consumo humano (Gimeno y Martins, 2004).

La Comisión de Codex Alimentarius de la FAO/OMS concluyó en 1997 que las aflatoxinas deben ser consideradas como contaminantes carcinogénicos y, por lo tanto, su consumo debe ser lo más bajo posible (Kok, 1994, Williams y Wilson, 1999).

A continuación se presenta los límites máximos establecidos para la presencia de aflatoxinas tomadas por diferentes países o regiones económicas.

### 1.3.1. Normatividad mexicana

La norma oficial mexicana (NOM-188-SSA1-2002), establece que: a) Todos los alimentos para consumo humano no excederán de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas, b) Los cereales con una concentración mayor de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo

para animales o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la Tabla 1.2. Cabe resaltar que en esta legislación no se contempla la regulación de AFB<sub>1</sub> sino del total de las cuatro toxinas.

**Tabla 1.2. Niveles máximos permitidos para aflatoxinas en México**

Especie / etapa de producción	Límite máximo $\mu\text{g kg}^{-1}$
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

### 1.3.2. Legislación de los EEUU sobre aflatoxinas

La legislación de los EEUU es una de las más laxas del mundo y es casi 10 veces más alta que la adoptada por la UE. Sin embargo, México y los países integrantes del MERCOSUR han basado sus legislaciones en ésta. A continuación en la Tabla 1.3, se presentan los límites permitidos en los EEUU.

**Tabla 1.3. Niveles máximos permitidos para aflatoxinas en los EEUU (FDA, 2000)**

Producto	Nivel ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Todos los productos, excepto leche, para consumo humano	20
Leche	0.5
Maíz para animales jóvenes y ganado vacuno	20
Maíz para ganado en reproducción, cerdos y aves maduras	100
Maíz para alimentación de cerdos en etapa de finalización	200
Maíz para animales de engorda en etapa de finalización	300
Semilla de algodón como ingrediente de alimentos	300
Todos los suministros diferentes al maíz	20

**Tabla 1.4. Límites máximos de aflatoxinas establecidas por el MERCOSUR (MERCOSUR, 1994)**

Alimento	Aflatoxina	Límite
Leche		
Leche fluida	M <sub>1</sub>	0.5 µg L <sup>-1</sup>
Leche en polvo	M <sub>1</sub>	5.0 µg kg <sup>-1</sup>
Maíz		
Maíz en grano (entero, partido, aplastado)	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	20 µg kg <sup>-1</sup>
Harinas o sémolas de maíz	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	20 µg kg <sup>-1</sup>
Cacahuete		
Cacahuete (sin descascarar, descascarado, crudo o tostado)	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	20 µg kg <sup>-1</sup>
Cacahuete en pasta (pasta de maní o manteca de maní)	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	20 µg kg <sup>-1</sup>

### 1.3.3. Legislación sobre aflatoxinas vigente en la Unión Europea

La legislación de la UE (Tabla 1.5.), sobre contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios, fue publicada en la directiva CE 2174/2003 del 12 de diciembre de 2003 (DOCE 13-12-2003). Ésta es una de las legislaciones más estrictas del mundo, algunos otros países han adoptado esta misma legislación: Austria, Bélgica, España, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Luxemburgo, Polonia, Reino Unido.

Dicha legislación estipula que los límites máximos se aplican a la parte comestible de los cacahuates, frutos de cáscara y frutos secos. Los cacahuates, frutos de cáscara, frutos secos y el maíz que no cumpla con los contenidos máximos de aflatoxinas establecidos podrán ser puestos en circulación a condición de que:

- a. No se destinen al consumo humano directo, ni se usen como ingrediente de productos alimenticios.
- b. Cumplan con los contenidos máximos establecidos para los cacahuates, para los frutos de cáscara, frutos secos y para el maíz.
- c. Sean sometidos a un tratamiento posterior de selección u otros métodos físicos, de forma que después de dicho tratamiento no superen los límites máximos establecidos y que el tratamiento mismo no provoque otros residuos nocivos
- d. Estén etiquetados de forma que se demuestre claramente su destino, incluida la indicación "Producto destinado a ser sometido obligatoriamente a un tratamiento de selección u otros métodos físicos con objeto de reducir el nivel de contaminación de

aflatoxinas antes de su consumo o su utilización como ingrediente de productos alimenticios".

**Tabla 1.5. Niveles máximos permitidos de aflatoxinas por la legislación de la Unión Europea (Directiva CE 2174/2003)**

PRODUCTO	CONTENIDO MAXIMO ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ o ppb)		
	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
<b>Cacahuates, frutos de cáscara y frutos secos</b>			
Cacahuates, frutos de cáscara, frutos secos y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o usados como ingredientes en los productos alimenticios	2 (a)	4 (a)	
Cacahuates destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	8 (a)	15 (a)	
Frutos de cáscara y frutos secos destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5 (a)	10 (a)	
<b>Cereales ( incluido el alforfón, Fagopyrum sp.)</b>			
Cereales (incluido el alforfón, o trigo negro, Fagopyrum sp.) y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingrediente en los productos alimenticios	2	4	
Cereales (incluido el alforfón, o trigo negro, Fagopyrum sp.), salvo el maíz destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente en los productos alimenticios	2	4	
Maíz destinado a ser sometido a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente en los productos alimenticios	5	10	
Leche (leche cruda, leche para la fabricación de productos lácteos y leche tratada térmicamente tal como se establece en la Directiva 92/46/CEE del Consejo, cuya última modificación la constituye el Reglamento CE N° 806/2003			0,05
Los siguientes tipos de especias:			
- <i>Capsicum spp.</i> ( frutos desecados, enteros o triturados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón)			
- <i>Piper spp.</i> ( frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra)	5	10	
- <i>Myristica fragans</i> ( nuez moscada)			
- <i>Zingiber officinale</i> (jengibre)			
- <i>Curcuma longa</i> ( cúrcuma)			

#### 1.4. Mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo

Las aflatoxinas se transforman en diversos metabolitos por la acción de las enzimas hepáticas del citocromo P450 dependientes de la familia enzimática polisustrato monooxigenasa (CYP-450). La aflatoxina B<sub>1</sub> se convierte a B<sub>1</sub>-epóxido y aflatoxinas hidroxiladas M<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub> y aflatoxicol. Estudios realizados en animales de laboratorio demuestran que el proceso de transformación de AFB<sub>1</sub> a AFB<sub>1</sub> 8-9 epóxido involucra a varias enzimas del CYP-450. AFB<sub>1</sub> 8-9 epóxido representa al último carcinógeno, el cual es altamente reactivo con las moléculas de ADN. Está demostrado que, independientemente del tejido, la activación de AFB<sub>1</sub> es la última forma y es un requerimiento absoluto para que AFB<sub>1</sub> se manifieste como mutagénico, carcinogénico y tenga acción sobre el ADN (Awney *et al.*, 2002; Kussak *et al.*, 1995;).

El efecto de AFB<sub>1</sub> sobre el ADN es el resultado de la interacción de la toxina con los sitios reactivos de la macromolécula. Se conocen dos tipos de interacción entre las aflatoxinas y los ácidos nucleicos. Uno de ellos es la formación reversible de enlaces pues se forman enlaces no covalentes; el segundo involucra la unión irreversible, es decir, se forman enlaces covalentes que dan lugar a la formación de aductos de ADN. La formación de AFB<sub>1</sub>-ADN aductos requiere de la activación de AFB<sub>1</sub> por el citocromo P-450, con lo que se produce el 8-9 epóxido, que presenta una alta reactividad para sitios nucleofílicos en los componentes macromoleculares. Los derivados hidroxilados son menos reactivos y menos tóxicos que AFB<sub>1</sub> (Leeson *et al.*, 1995).

#### 1.5. Posible problemática del uso de maíz y otros cereales y granos contaminados con aflatoxinas

La presencia de aflatoxinas es inevitable en algunos lotes de maíz, dadas las condiciones en que las micotoxinas se producen, tanto en la planta en pie, en el campo, como durante estadios posteriores como cosecha, transporte, almacenamiento y utilización (García *et al.*, 2001). Diversos países producen excedentes de maíz amarillo (principalmente los EEUU), los cuales tienden a ser industrializados obteniendo numerosos productos, entre los que destacan los almidones, los azúcares, las dextranas, etc. (Paliwal, 2004). En los últimos

años, el principal producto ha sido el jarabe de fructosa. Esta miel se encuentra compuesta de 42 a 90% de fructosa (Gagné *et al.*, 2002; Medellín, 2002).

Si el maíz empleado en la elaboración de jarabes fructosados pudiera encontrarse contaminado con *Aspergillus sp.*, habría la posibilidad de que estas toxinas pudieran quedar en forma residual en el producto final. Lo anterior ha sido constatado en la elaboración de cerveza con granos de malta contaminados por hongos, en donde se ha determinado la presencia de diversas micotoxinas en la cerveza (Scott, 1996). Otro alimento en el que se ha detectado la presencia de aflatoxinas es el aceite comestible obtenido de cacahuates contaminados y, en el cual, se han encontrado concentraciones de aflatoxina B<sub>1</sub> que oscilan entre 10-68 µg kg<sup>-1</sup> (Lindner, 1995).

Estudios encaminados a determinar el efecto del proceso de nixtamalización sobre las aflatoxinas en el maíz, demostraron que el tratamiento alcalino modifica la estructura química de las aflatoxinas ya que se provoca la apertura del anillo y, debido a ello, las aflatoxinas ya no exhiben fluorescencia por lo que ya no son detectadas. Estos estudios condujeron a evaluar el efecto reversible de un valor de pH ácido (como el del tracto digestivo) y se observó que los compuestos obtenidos por tratamiento alcalino volvían a exhibir fluorescencia, lo cual sugiere que el anillo se vuelve a cerrar (Guzmán, 2001). Se sabe que un medio fuertemente ácido produce una conversión de la AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> en AFB<sub>2a</sub> y AFG<sub>2a</sub> (Figura 1.2), las cuales exhiben menor toxicidad y acción cancerígena (Kok, 1994).

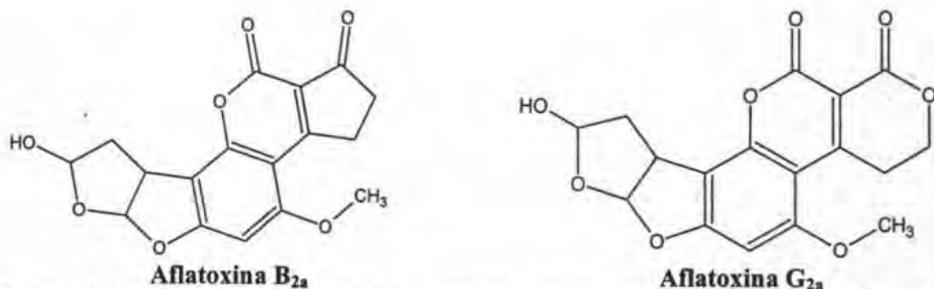


Figura 1.2. Metabolitos obtenidos en el tratamiento ácido de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> (Holcomb *et al.*, 1992)

Por otra parte, diversos estudios han mostrado que el metabolismo de animales superiores, por presentar el citocromo P-450, puede transformar a las aflatoxinas en otras moléculas similares como en el caso de la AFB<sub>1</sub> que es transformada en AFM<sub>1</sub> por las vacas y secretada en la leche; incluso, puede ser transformada en las aflatoxinas M<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, aflatoxicol (ver Figura 1.3) (Carvajal *et al.*, 2003a; Pohland y Wood, 1987; Kussak *et al.*, 1995).

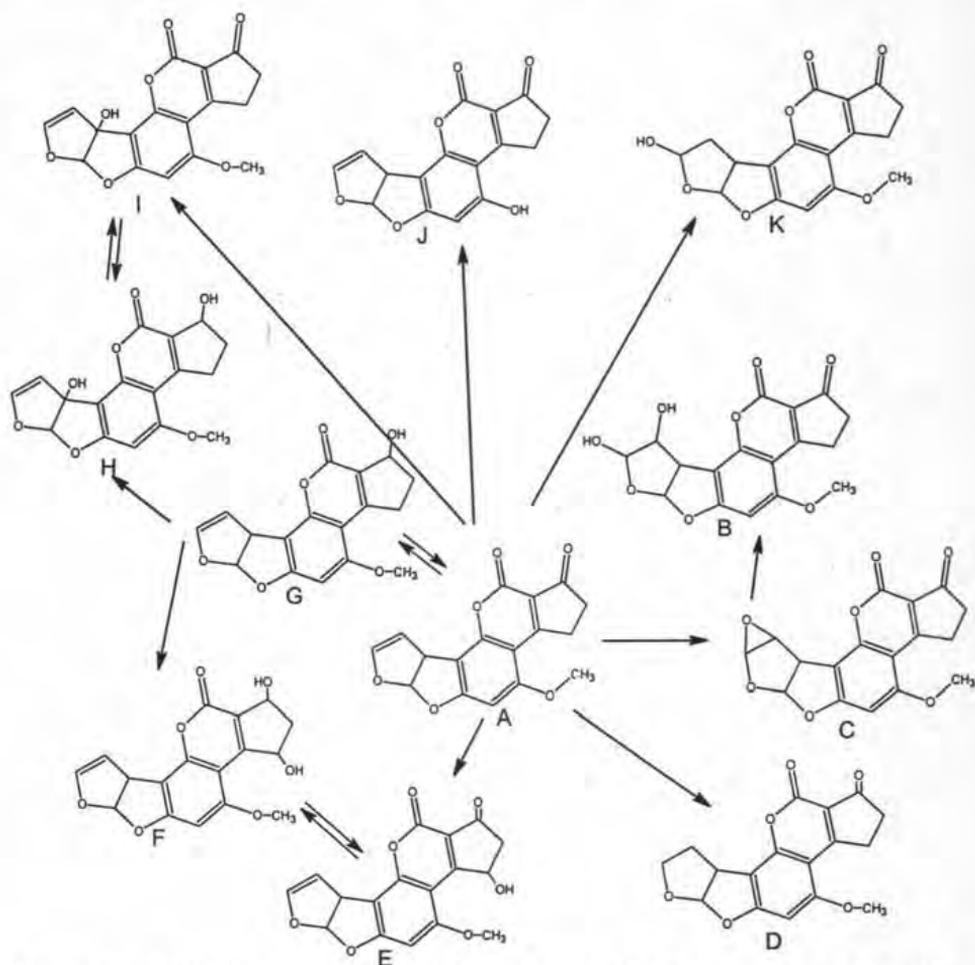
### 1.6. Problemas asociados al consumo de la fructosa

La fructosa es un monosacárido que se encuentra en las frutas y la miel de abeja pero que, en las últimas 5 décadas se ha obtenido a partir de los almidones de cereales, principalmente de maíz, mediante su hidrólisis ácida o el uso de diversas enzimas y su posterior isomerización y concentración por evaporación. Estas mieles o jarabes fructosados han sido ampliamente usados en las industrias refresqueras, de bebidas y alimentarias (Bray *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2002).

Cabe mencionar que existen dos posibles riesgos a la salud para los consumidores de productos adicionados con jarabes fructosados. Uno de ellos es la obesidad por su rápido metabolismo si se ingiere en cantidades importantes de este carbohidrato (Bray *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2004).

El otro es el asociado a la posible presencia de aflatoxinas en los granos de maíz de donde proviene el almidón con el que se produce el jarabe de fructosa y, dado que actualmente no se sabe el efecto que los tratamientos de hidrólisis enzimática y la isomerización puedan tener sobre las aflatoxinas, podrían tener efectos negativos en los consumidores de estos edulcorantes, ya sea directamente o en los alimentos a los que se adicionen.

En la actualidad no se cuenta con ningún estudio enfocado a determinar la presencia de aflatoxinas en jarabe de fructosa, sin embargo, se han realizado estudios en otros alimentos y se ha encontrado que si las materias primas con las que son elaborados se encuentran contaminadas con aflatoxinas, el proceso disminuye su concentración pero aún se logran identificar en el producto final.



**Figura 1.3. Derivados que se pueden obtener a partir de aflatoxina B<sub>1</sub> por la acción metabólica de animales. A: aflatoxina B<sub>1</sub>, B: aflatoxina B-2,3-dihidro-2,3-diol, C: aflatoxina B-2,3-óxido, D: aflatoxina B<sub>2</sub>, E: aflatoxina Q<sub>1</sub>, F: aflatoxicol H<sub>1</sub>, G: aflatoxicol (AFL), H: aflatoxicol M<sub>1</sub>, I: aflatoxina M<sub>1</sub>, J: aflatoxina P<sub>1</sub>, K: aflatoxina B<sub>2a</sub> (Pohland y Wood, 1987)**

**1.7. Proceso para la obtención de almidón de maíz**

A continuación, en la Figura 1.4, se muestra el proceso industrial para la obtención de almidón de maíz a partir de granos enteros.

El maíz perfectamente limpio se introduce en tanques de maceración con agua a una temperatura de 49-54°C durante 30 a 50 horas, con el agregado de alguna sustancia que

facilite la separación del pericarpio o fibra (bisulfito, ácido láctico) y la proteína insoluble. Después de la maceración, el grano de maíz hinchado, conteniendo cerca del 45% de agua, se muele grueso para permitir que el germen a través de un proceso de flotación se separe. Esta fracción se seca, para ingresar luego en un proceso de extracción de aceite.

En la siguiente etapa, el tamizado, se logra la separación de la fracción fibrosa, que pasará a transformarse en el "gluten". Por diferencia de densidad, mediante centrifugado, permite separar el gluten de la fécula. El gluten se concentra, se filtra y se seca para producir gluten de maíz. Una parte de la fécula se seca o se modifica para ser vendida a industrias de alimentos, papeleras, textiles u otras. Los edulcorantes de maíz o el alcohol etílico se producen de la fécula restante.

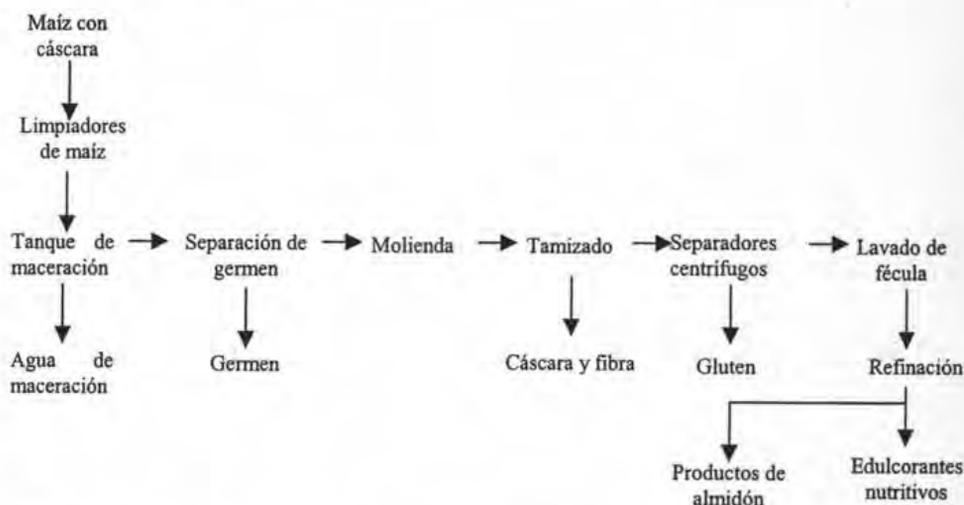


Figura 1.4. Obtención de almidón a partir de granos de maíz amarillo (Anónimo, 2003)

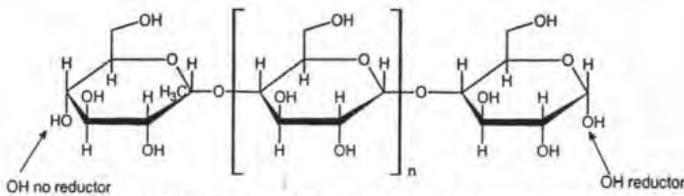
### 1.8. Obtención de jarabes de glucosa a partir de dispersiones de almidón

Hasta el momento se ha hablado sobre la producción de jarabes de fructosa a partir del almidón de maíz por lo que es necesario explicar lo que es el almidón.

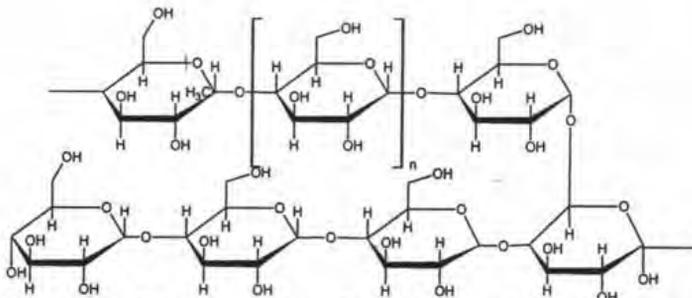
El almidón es un polisacárido, formado por monómeros de glucosa. Mediante este polímero las plantas almacenan la energía. Dicha estructura consta de dos componentes: la amilosa y

la amilopectina. La fracción de la amilosa puede representar el 20% y la amilopectina el restante 80% del almidón, pero esta proporción depende de las variedades de maíz (Tester *et al.*, 2004; van der Maarel *et al.*, 2002).

La amilosa (Figura 1.5a) es un polisacárido soluble en agua, que consiste en la unión de monómeros de D-glucosa que se encuentran unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4. La otra fracción, amilopectina, se encuentra constituida por monómeros de D-glucosa unidos a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 formando la cadena lineal; sin embargo, se une a otras cadenas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,6 (Figura 1.5b). Debido a estas uniones, esta fracción tiene un alto peso molecular, lo que la hace insoluble en agua (van der Maarel *et al.*, 2002).



**Figura 1.5a. Estructura de la amilosa.** En la figura se muestran los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos que conforman la estructura de la amilosa



**Figura 1.5b. Estructura de la amilopectina.** En la figura se muestran los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\beta$ -1,6 que conforman la estructura de la amilopectina

La producción de edulcorantes a partir de almidón consiste en la hidrólisis del almidón, enzimática o química (medio ácido), a fin de liberar los monómeros de glucosa. Es decir, el producto de esta conversión es una solución de glucosa, la cual debe ser tratada

enzimáticamente para transformar la glucosa en fructosa mediante el empleo de glucosa isomerasa a un valor de pH de 7-8.5 a 60°C (Crabb y Shetty, 1999).

La producción enzimática de jarabes de fructosa a partir de este polímero se realiza en las siguientes etapas (Figura 1.6):

1. Hidrólisis del almidón
2. Formación de jarabe glucosado
3. Purificación del jarabe glucosado
4. Isomerización del jarabe glucosado a fructosado

### 1.8.1. Hidrólisis del almidón

La hidrólisis del almidón mediante el empleo de  $\alpha$ -amilasa produce diversos fragmentos, ya que dicha enzima realiza cortes sobre las cadenas de glucosa; sin embargo, no puede actuar sobre las glucosas terminales. Los principales productos de la hidrólisis del almidón con  $\alpha$ -amilasa son dextrinas, maltosa, maltotriosa, pentosas, etc. (Crabb y Mitchhinson, 1997; Crabb Shetty, 1999). A continuación se describen cada una de las etapas que se requieren en la obtención enzimática de fructosa a partir de almidón de maíz.

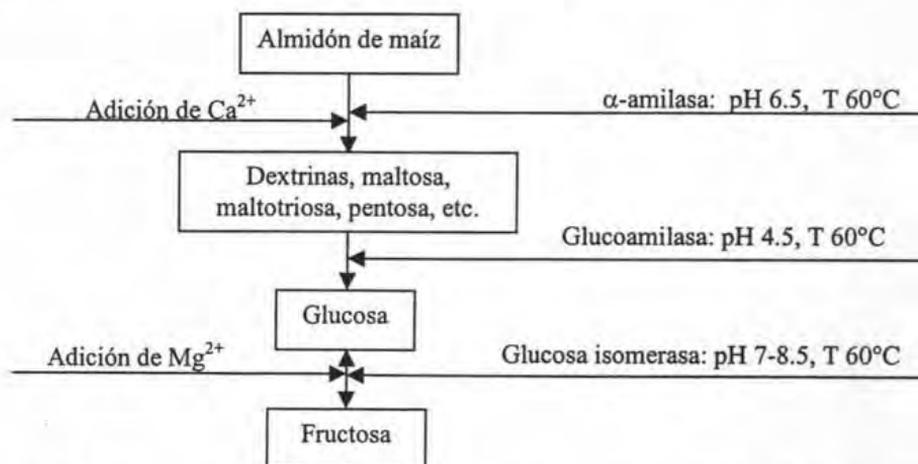


Figura 1.6. Pasos para la producción enzimática de jarabe fructosado a partir de almidón de maíz

### 1.8.2. Hidrólisis de productos intermediarios, sacarificación

Para llevar a cabo la hidrólisis total hasta glucosa es necesario la adición de otra enzima (glucoamilasa). Esta enzima es capaz de realizar cortes aún en la glucosas terminales. El producto de esta reacción es un jarabe de glucosa (Crabb y Shetty, 1999).

### 1.8.3. Purificación del jarabe de glucosa

El siguiente paso es la purificación de la solución de glucosa obtenida. Para ello es necesario eliminar el color y otros contaminantes o residuos de las reacciones de hidrólisis. Comúnmente, la eliminación de color y otros contaminantes se realiza mediante la adición de carbón activado, tierra de diatomeas, etc. Una vez que se adicionan los adsorbentes a la solución ésta se calienta y se mantiene en agitación para facilitar la adsorción. Una vez que se alcanza el equilibrio, es necesario filtrar la solución para eliminar los adsorbentes y recuperar la solución de glucosa clarificada y decolorada.

El último paso necesario en la purificación de la glucosa, consiste en eliminar los iones metálicos presentes que se adicionaron en los pasos de la hidrólisis, ya que el ión metálico  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe la actividad de la enzima glucosa isomerasa. La eliminación de los iones metálicos se realiza mediante el empleo de columnas empacadas con resinas intercambiadoras de iones (Crabb y Shetty, 1999).

### 1.8.4. Isomerización de glucosa a fructosa

La última etapa en el proceso de producción de jarabe glucosado es la isomerización de glucosa a fructosa. Este paso se lleva a cabo mediante el empleo de la enzima glucosa isomerasa. En la literatura se encuentra reportado que dicha proteína es capaz de trabajar a un intervalo de pH entre 6.5-8 y una temperatura entre 45-90°C. Se sabe que todas las isomerasas requieren de la presencia de iones divalentes como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Cr}^{2+}$  para una buena actividad catalítica. Sin embargo, algunos iones como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son capaces de inhibir a estas enzimas. Uno de los inhibidores importantes de la glucosa isomerasa resulta ser el ión  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual compite con el  $\text{Mg}^{2+}$  por la actividad catalítica. Por otra parte, este efecto inhibitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  se puede contrarrestar removiendo dicho ión mediante intercambio iónico y manteniendo en exceso el ión  $\text{Mg}^{2+}$ . En sistemas en que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es inferior a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , después de someter la

solución a intercambio iónico, 45 mg  $Mg^{2+}$  por litro son suficientes para evitar la inactividad de la isomerasa. La reacción se mantiene por el tiempo necesario para obtener una solución en la cual se establece un equilibrio entre la concentración de glucosa y la de fructosa. Posteriormente, se realiza la concentración de la solución a presión reducida a fin de evitar que los azúcares se caramelicen y obtener mieles con una concentración de fructosa de 42-55% (Bravo *et al.*, 1998, Crabb y Shetty, 1999).

Con base en esta introducción, a continuación se plantea la justificación de esta investigación, así como los objetivos planteados.

### 1.9. Justificación

Como se ha reiterado, la aflatoxinas son metabolitos secundarios de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estos tóxicos han sido estudiados en numerosas materias primas y alimentos, en los cuales se puede desarrollar el hongo. En los últimos años se ha promovido la industrialización de miles de toneladas de maíz para producir jarabes fructosados o miel de maíz a partir de la hidrólisis de los almidones de este cereal con su posterior isomerización y concentración, dando como resultado un edulcorante.

Si este maíz estuviera contaminado con aflatoxinas, habría la posibilidad de que estos compuestos tóxicos pasaran a las mieles fructosadas, como se ha reportado en la elaboración de alimentos producidos con granos contaminados. Hasta el momento no se encuentra documentado el destino de las aflatoxinas en el proceso de elaboración de jarabe fructosado.

Como la legislación mexicana permite emplear materias primas con una contaminación de hasta 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales en alimentos para consumo humano surge la necesidad de realizar un estudio encaminado a determinar la posible presencia de aflatoxinas en cada una de las etapas del proceso de elaboración de jarabes de maíz y de diversos jarabes comerciales, recordando que los efectos tóxicos se pueden presentar aún en concentraciones del orden de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ver Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Toxicidad de algunas aflatoxinas para patos (Peña y Durán, 1990)

Aflatoxina	Peso molecular	DL <sub>50</sub> * (µg)
B <sub>1</sub>	312	12-50
B <sub>2</sub>	314	85
G <sub>1</sub>	328	39
G <sub>2</sub>	330	172
M <sub>1</sub>	328	17
B <sub>2A</sub>	330	>1200
G <sub>2A</sub>	346	>1600

\*Patos de 1 día de nacidos

### 1.10. Objetivos

Con base en esta justificación, los objetivos de esta investigación son:

- Montar una metodología analítica que permita identificar y cuantificar la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub> en cada una de las operaciones unitarias que involucra la producción de jarabe fructosado a partir de almidón de maíz.
- Establecer las condiciones para la producción de jarabe fructosado a escala de laboratorio a partir de maíz.

## Capítulo 2

# Fundamentos analíticos

### 2.0. La cromatografía como una herramienta analítica

En la actualidad, los métodos cromatográficos se usan ampliamente para el análisis y separación de muestras, dado que presentan gran selectividad por los solutos. Debido a ello, se pueden separar muestras complejas y multicomponentes.

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que permiten la separación de muestras con componentes estrechamente relacionados en mezclas muy complejas. En todas las formas de cromatografía la muestra se desplaza con una fase móvil y el analito es retenido por la fase estacionaria. En este sistema se verifican equilibrios de reparto del soluto entre las dos fases, por lo que los solutos más afines a la fase estacionaria serán más retenidos que aquellos que resultan ser menos afines y de esta forma se realiza la separación de la muestra (Skoog *et al.*, 2000).

### 2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución

En la cromatografía de líquidos de alta resolución se emplea una fase móvil (líquida) y una estacionaria (sólida). La fase móvil se impulsa mediante una bomba recíproca para obtener un flujo continuo a alta presión. La muestra se introduce al equipo mediante un inyector el cual tiene un rizo de volumen conocido. La separación se realiza en una columna cromatográfica empacada con un adsorbente. Existen diversos tipos de columnas, las más usadas son tubos de acero inoxidable de 4.6 mm de diámetro interno y una longitud de 25 cm; sin embargo, las puede haber de 15, 10, 5 cm. El relleno básicamente consiste en microesferas de sílice porosa con la superficie modificada. Las columnas más comunes presentan una capa de grupos octadecil ( $C_{18}H_{27}$ ) que recubre la superficie de las microesferas (Bender, 1992).

#### 2.1.1. Instrumentación en cromatografía líquida

La instrumentación en cromatografía de líquidos de alta resolución es básicamente la misma que se emplea en cromatografía de gases, sin embargo, existen algunas variantes.

Debido a que la fase móvil es un líquido, se requiere de un reservorio especial para ésta y una bomba que mantenga un flujo constante en el sistema. La instrumentación completa se muestra en la Figura 2.1, la cual consta de un reservorio para la fase móvil, una bomba, un indicador de presión, un sistema de introducción de la muestra, una columna analítica, un detector, un registrador y un reservorio para desechos (Bender, 1992).

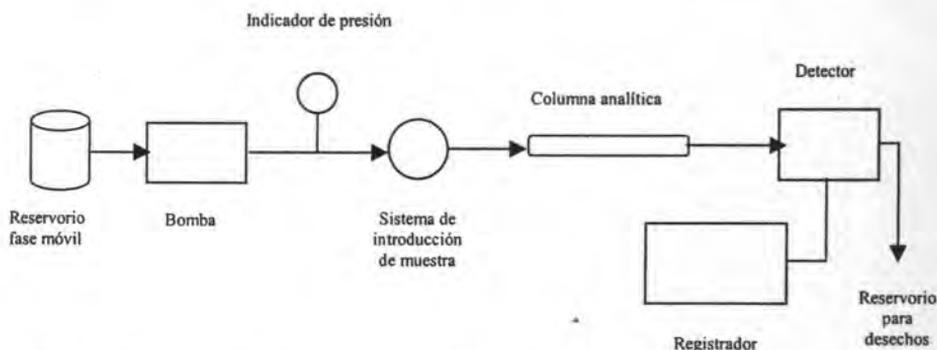


Figura 2.1. Instrumentación básica en cromatografía líquida de alta resolución

### 2.1.2. Detector de fluorescencia

Estos detectores presentan una gran variedad de diseños. Existen fluorómetros de filtros, con monocromador en el sistema de excitación y filtro en el de emisión, también los hay con dos monocromadores. Estos instrumentos emplean diferentes fuentes de radiación para trabajar en la región del ultravioleta. Para ello, son comúnmente empleadas lámparas de xenón, deuterio y lámparas de mercurio con o sin fósforo.

Estos detectores son muy eficientes y altamente sensibles para sustancias que exhiben fluorescencia; sin embargo, pueden presentarse inconvenientes en la espectroscopía de fluorescencia, asociados a la cromatografía, como puede ser el oxígeno disuelto en la fase móvil, lo cual reduce la señal de fluorescencia (efecto de apagado, "quenching"). El detector de fluorescencia se fundamenta en la teoría de la espectroscopía de fluorescencia. Debido a ello, el detector presenta una alta sensibilidad sobre sustancias capaces de fluorescer al ser excitadas por la radiación UV (Bender, 1992; Skoog *et al.*, 2000).

## 2.2. Fundamentos de la espectroscopía de fluorescencia

En la Figura 2.2, se muestran las etapas en las que sucede el proceso de fluorescencia en el cual se observa que, como primer paso, las moléculas se excitan (I), por la fuente de iluminación, pasando de su estado basal a un estado singulete excitado ( $S_1$ ) o ( $S_2$ ) del cual, en un tiempo determinado, retornan a su estado basal ( $S_0$ ), mediante la emisión de un fotón (IV).

Diagrama de Jablonsk (Lakowicz, 1999)

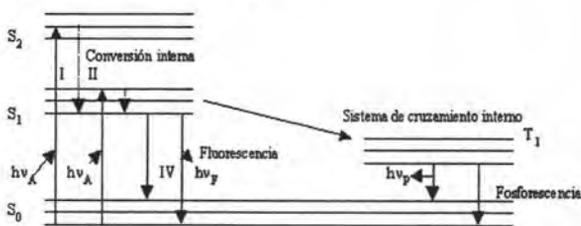


Figura 2.2. Esquematización del proceso de fluorescencia

donde:

$S_0$  Estado basal de la molécula

$S_1, S_2$  Estados excitados de la molécula

I Proceso de excitación (absorbe energía electrónica)

II Proceso de pérdida de energía (pasa de un nivel energético inferior)

IV Proceso de emisión de un fotón (llega al estado basal por liberación de un fotón)

$h\nu_A$  Energía de excitación

$h\nu_F$  Energía liberada en un fotón (fluorescencia)

$h\nu_P$  Energía liberada en un fotón (fosforescencia)

$T_1$  Sistema de cruce interno (proceso de fosforescencia)

Durante la excitación (Proceso I), las moléculas adquieren energía vibracional en forma de energía electrónica, llegando a algún subnivel vibracional del estado electrónico excitado. Las moléculas tienen una fuerte tendencia a llegar a un nivel vibracional inferior, perdiendo energía a través de colisiones (Proceso II). Esta pérdida de energía se detiene en un estado electrónico excitado singulete ( $S_1$ ), desde donde retornan al estado basal mediante la emisión de un fotón (proceso IV) (Galen, 1985). A esta serie de procesos se le conoce como fluorescencia, durante los cuales la transición energética no provoca cambios en el espín del electrón. La espectroscopía de fluorescencia es un método espectroscópico que presenta

alta sensibilidad (partes por trillón) y especificidad (Willard, 1988). Esta técnica se encuentra encaminada al estudio de compuestos que presentan la propiedad de fluorescer.

Dentro de las aplicaciones de dicha técnica se encuentra el estudio de moléculas de origen biológico como son las lectinas, ácidos nucleicos, proteínas, toxinas, etc. También se pueden determinar contaminantes trazas como quinonas, drogas y tóxicos de origen natural o sintético (ácido dietilamin-lisérgico, LSD), entre otros (Willard, 1988). La alta sensibilidad es el resultado de la diferencia entre la longitud de onda de excitación y la de emisión de fluorescencia. Con el empleo de la espectroscopía de fluorescencia en la determinación de sustancias fluorescentes como las aflatoxinas, el límite de detección aumenta en dos órdenes de magnitud con respecto a métodos convencionales (Wehry, 1981). Dos compuestos que son excitados a la misma longitud de onda, emiten a diferente longitud por lo que se logra diferenciar fácilmente a cada compuesto (Willard, 1988).

### 2.2.1. Efecto de “apagado”

Se le denomina efecto de apagado (“quenching” por su nombre en inglés), a la reducción en la intensidad de la fluorescencia esperada para una solución. Este efecto puede ocurrir como resultado de una absorción excesiva o por la emisión de la radiación por la misma solución. A la concentración en la cual ocurre dicho fenómeno, se le ha denominado *concentración de apagado* (“quenching”). El efecto de apagado puede ser causado por pérdidas de energía no radiante de moléculas excitadas. Un agente de apagado facilita la conversión de las moléculas de un estado excitado singulete a un nivel de triplete en donde la emisión no ocurre. Este efecto se presenta en muchos compuestos aromáticos debido a la presencia de oxígeno disuelto. También se puede presentar dicho fenómeno debido a factores químicos y físicos. La intensidad de fluorescencia de muchos compuestos depende de la temperatura, por lo que este factor físico representa un problema en el análisis, ya que provoca variaciones en las mediciones. Otro aspecto importante que puede causar un descenso en la intensidad de la fluorescencia es la gran facilidad con que se pueden contaminar las muestras con sustancias en cantidades indetectables. Entre los contaminantes más comunes se encuentran la baquelita, los plásticos o polímeros comerciales, el cromo, etc. (Wehry, 1981).

### 2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en la identificación de aflatoxinas

La técnicas más usuales en la determinación de aflatoxinas empleaban detectores UV; sin embargo, diversos estudios mostraron que la detección de estas toxinas no era tan sensible y selectiva como la detección por fluorescencia y que los picos de interferencias eran muy comunes. Por ello, surgió la necesidad de introducir el empleo de la detección por fluorescencia.

El uso de CLAR con detección de fluorescencia es uno de los métodos actualmente más aceptados para la determinación de aflatoxinas. La elección de este método permite un análisis cualitativo y cuantitativo de las aflatoxinas, ya que ellas presentan fluorescencia. La longitud de onda de excitación  $\lambda_{ex}$  = 360 nm puede usarse para las cuatro aflatoxinas y la longitud de onda de emisión, para B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> es  $\lambda_{em}$  = 440 nm. La de 470 nm puede usarse para G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

Este método instrumental presenta diversas ventajas sobre otras técnicas, siendo la más importante la capacidad de automatización. Con este método se puede trabajar en fase normal o en fase reversa. La fase reversa es más empleada que la fase normal. En esta variante se emplean columnas con fases unidas químicamente como son las de octadecil y fenilpolisilano que son fases no polares. La fase móvil tendrá que ser más polar, a fin de poder realizar la separación de los analitos (Holcomb *et al.*, 1992).

Sharman y Gilbert (1991), determinaron aflatoxinas en muestras de nueces, frutas secas y alimentos para animales. El método propuesto por ellos, se basa en extraer las aflatoxinas mediante una mezcla de disolventes: acetonitrilo:agua (6:4 v/v), cloroformo:agua (150:5), realizando la limpieza de los extractos en un sistema automatizado para posteriormente proceder al análisis efectuado por CLAR-fluorescencia. Por otra parte, Akiyama *et al.*, 2001 determinó algunas aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) en especias, realizándose la extracción mediante una mezcla de acetonitrilo:agua (9:1), la limpieza de los extractos se efectuó

mediante cartuchos multifuncionales (Multisep # 228), y los analitos fueron determinados por CLAR-fluorescencia.

Recientemente Blesa *et al.*, 2004, determinó aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) en alimentos provenientes de los mercados y supermercados de Valencia, España. En este estudio la extracción se realizó mediante el método de matriz dispersa en fase sólida, se realizó una derivación precolumna para que posteriormente los analitos se separaran y cuantificaran mediante CLAR-fluorescencia.

#### 2.4. Cromatografía de bioafinidad

La cromatografía de bioafinidad incluye numerosos métodos en los que se emplean moléculas biológicas como ligandos de afinidad. Un ejemplo es la cromatografía de inmunoafinidad (CIA), en la cual, el ligando es un anticuerpo. El empleo de anticuerpos y antígenos genera gran especificidad; por ello, resulta ser una técnica ideal para la purificación muestras complejas (Kussak *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 1996a,b; Meyers, 2001; Muronetz y Korpela, 2003; Phillips y Krum, 1998).

Muronetz y Korpela (2003), emplean proteínas de la pared celular de bacterias (*Staphylococcus aureus*, proteínas A, G o L), como anticuerpos de purificación en la cromatografía de bioafinidad. Debido a que tienen la cualidad de presentar una alta especificidad por antígenos (IgGs), pudiéndose emplear en el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Cabe mencionarse que la proteína A, une de forma específica los antígenos IgM y IgE, la proteína L es capaz de unir las cadenas  $\kappa$  ligeras; la proteína G une los antígenos IgG y IgM. Por otra parte, otros autores como Enomoto *et al.* (1994), estudiaron que las proteínas empleadas comúnmente en la cromatografía de bioafinidad son las lectinas inmovilizadas provenientes de la concanavalina A y las aglutininas provenientes del germen de trigo, que son empleadas para fijar moléculas biológicas con ciertos residuos de azúcares. En otros casos se pueden emplear ligandos como son enzimas, cofactores de proteínas, ácidos nucleicos, hormonas o receptores celulares.

### 2.4.1. Cromatografía de inmunoafinidad

La cromatografía de inmunoafinidad (CIA) es uno de los subtipos de la cromatografía de bioafinidad más empleados. Es un tipo de cromatografía de adsorción en la que la molécula a ser purificada es adsorbida de forma reversible y específica, a una sustancia complementaria (ligando) inmovilizada en un soporte insoluble (matriz). Tiene un efecto concentrador, lo que permite procesar grandes volúmenes de muestra (se emplea como método de preconcentración y de limpieza). La alta selectividad de las separaciones depende de la especificidad natural de las moléculas interactuantes (Kussak *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 1996a,b; Phillips y Krum, 1998; Walters, 1985).

Por otra parte, Lawrence *et al.* (1996a), evaluaron las ventajas de emplear la CIA en la eliminación de disolventes orgánicos para la preparación, extracción y limpieza de muestras contaminadas con triazinas. Con este método se tuvieron límites de detección de 2 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dependiendo de la triazina en cuestión y del tejido vegetal analizado. Lawrence *et al.*, (1996b), emplearon la CIA como un método de preconcentración y limpieza de herbicidas a base de fenilurea en muestras de alimentos. Esta cromatografía, también fue utilizada por Phillips y Krum (1998), para realizar análisis de muestras biológicas determinándose los analitos en muestras de sangre, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo.

La gran afinidad que presentan los anticuerpos específicos hacia las aflatoxinas ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas. Mediante el empleo de la cromatografía de inmunoafinidad, se han podido concentrar y purificar las aflatoxinas provenientes de muestras complejas eliminando gran parte de las interferencias asociadas a la matriz (Holcomb *et al.*, 1992).

El método antes citado puede emplearse para:

- Purificar sustancias de mezclas biológicas y ambientales complejas (HAP, herbicidas, plaguicidas, enzimas, toxinas, etc.).
- Separar la forma nativa de la desnaturalizada de una misma sustancia.

- Eliminar pequeñas cantidades de material biológico de grandes cantidades de sustancias contaminantes.
- Concentrar muestras en las que el analito de interés se encuentre en muy bajas concentraciones con respecto a la matriz (Akiyama *et al.*, 2001; Ferrer y Barceló, 1999; Kussak *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 1996a, b; Lawrence y Menard, 2001; Phillips y Krum, 1998; Romero *et al.*, 2000; Stöcklein *et al.*, 1998).

Este tipo de cromatografía se desarrolla en tres etapas fundamentales (Figura 2.3):

1. Inmovilización del ligando.
2. Adsorción de la sustancia a purificar.
3. Desadsorción de la sustancia ligada.

Chang *et al.* (2004), realizaron la limpieza y separación de aflatoxinas y ocratoxina A mediante columnas de inmunoafinidad, para su análisis posterior por CLAR con detección de fluorescencia. En este estudio se encontró que los porcentajes de recobro variaron del 72 al 101% para ocratoxina y para aflatoxinas en muestras de cereales para desayuno a base de maíz y en pasta de cacahuate respectivamente.

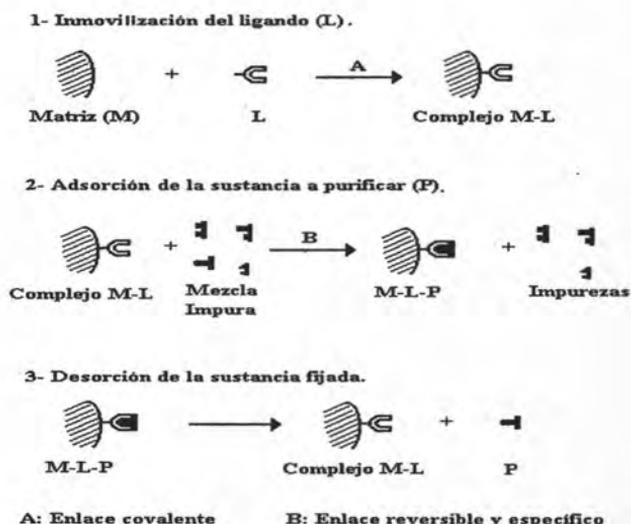


Figura 2.3. Pasos básicos de la cromatografía de inmunoafinidad

### 2.4.2. Obtención de anticuerpos para la cromatografía de inmunoafinidad

En el sistema inmune de vertebrados las células productoras de anticuerpos presentan entre sus características la capacidad de producirlos de manera específica, sintetizando tipos de anticuerpos particulares. Esta propiedad ha sido explotada por diversos autores como Meyers (2001); Muronetz y Korpela (2003); Walters (1985); para producir los anticuerpos específicos que requieren para preparar sus inmunoabsorbentes. Enomoto *et al.* (1994), prepararon los anticuerpos a partir de la inmunización de ratones (BALB/c), los cuales fueron inyectados durante dos semanas con una solución amortiguadora de fosfatos que contenía el antígeno  $\beta$ -lactóglobulina.

#### 2.4.2.1. Producción de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son obtenidos por la inmunización de conejos o ratones con el antígeno de interés. Se produce una respuesta con la producción y proliferación de múltiples clones de linfocitos en el animal, obteniéndose de su sangre un suero policlonal, con una amplia variedad de anticuerpos de diferente especificidad y afinidad. El empleo de estos anticuerpos en la cromatografía de inmunoafinidad presenta las siguientes desventajas:

- Es heterogénea con respecto a su especificidad y propiedades de unión.
- La preparación del anticuerpo no es reproducible de un animal inmunizado a otro.
- Hay dificultad para la obtención de grandes cantidades de anticuerpo (Burgess y Thompson, 2002).

#### 2.4.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son más difíciles y caros de producir. Un clon derivado de un linfocito único producirá anticuerpos monoclonales, con especificidad única. Como existe imposibilidad de obtener cultivos de clones celulares de linfocitos-B normales que produzcan los anticuerpos de especificidad deseada, se han desarrollado las siguientes técnicas:

- Transformación *in vitro* de los linfocitos-B (p.e., mutagénesis mediada por medio de virus oncogénicos).
- Fusión de las células productoras de anticuerpos con células de mieloma, las cuales confieren inmortalidad a las células B.

La obtención de anticuerpos monoclonales consiste básicamente en inmunizar animales contra el antígeno para el que se desea producir anticuerpos. Tras obtener una respuesta adecuada se aíslan del animal los linfocitos B esplénicos (capaces de producir anticuerpos) y se fusionan por medio de polietilenglicol con células de líneas establecidas de mieloma, tumor del sistema inmune.

Algunos de los híbridos (heterocariontes formados por recombinación genética) combinan la capacidad de los linfocitos de producir los anticuerpos deseados con la capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro* de las células de mieloma (Burgess y Thompson, 2002).

Una vez obtenidos los híbridos que establecen ya una línea celular (hibridoma), se seleccionan aquellos que sean productores de las inmunoglobulinas específicas deseadas y, tras diversas fases de clonación para asegurar que las células obtenidas proceden de un único clon, los clones seleccionados se conservan por criopreservación en nitrógeno líquido y/o se expanden bien *in vitro*, en cultivo, bien *in vivo*, por inoculación en cavidad peritoneal de ratón. Así, se pueden obtener grandes cantidades de soluciones de medio de cultivo o de líquido ascítico desde donde las inmunoglobulinas específicas pueden purificarse por procedimientos convencionales (Estivil, 2004). La capacidad en un hibridoma establecido de producir los anticuerpos permanece indefinidamente y siempre es posible reconstituir la línea a partir de los clones congelados, con lo que la disponibilidad del anticuerpo producido así como la reproducibilidad del ensayo realizado con el mismo es permanente (Burgess y Thompson, 2002; Estivil, 2004).

Thompson *et al.* (2004), empleó cromatografía de inmunoafinidad para la separación de proteínas específicas involucradas en el proceso de transcripción del ARN eucariótico. Para

ello, prepararon los anticuerpos monoclonales a partir de la inyección de proteínas de unión TATA de humanos en ratones (Balb/c ByJ). Los anticuerpos fueron identificados por el método de ELISA, para su posterior purificación por precipitación con sulfato de amonio. Posteriormente, estos anticuerpos monoclonales (1TBP22), se unen químicamente a la "sepharosa" para tener el inmunoabsorbente 1TBP22-sepharosa.

### 2.4.3. Inmunoabsorbentes

Los inmunoabsorbentes se producen cuando un anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte por formación de enlace covalente. El soporte debe ser un sólido insoluble como la sílice, "sepharosa" u otra resina insoluble.

El anticuerpo se inmoviliza por la formación de un enlace covalente, entre los diferentes grupos como amino terminales o grupos amino en la posición épsilon, grupos carboxilo y los grupos activados del soporte o resina, epóxidos, OH, etc.) (Ferrer y Barceló, 1999; Meyers, 2001; Muronetz y Korpela, 2003). Este proceso se lleva a cabo en dos pasos: a) Paso de Activación, b) Paso de Acoplamiento.

Un inmunoabsorbente se emplea como ligando de afinidad para la separación selectiva del analito de interés. Los compuestos que no son reconocidos por el anticuerpo, no se retienen. Con ello se genera una alta selectividad sobre el analito problema. Los cromatogramas presentan una línea base limpia y con niveles de cuantificación de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los inmunoabsorbentes se usan ampliamente para el aislamiento de anticuerpos y antígenos puros. Por ejemplo, para "protein A-Sepharose CL-4B", la proteína A se enlaza específicamente con anticuerpos de tipo IgG y en la forma inmovilizada es un adsorbente extremadamente útil, fácil de usar y con alta capacidad para muchos procesos de rutina como:

- Aislamiento y fraccionamiento de anticuerpos tipo IgG.
- Purificación de subclases de IgG.
- Aislamiento de antígenos.
- Eliminación selectiva de IgG como contaminante (Ferrer y Barceló, 1999).

## Capítulo 3

### Materiales y métodos

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación, de establecer las condiciones para la producción a escala de laboratorio de jarabe fructosado a partir de maíz y de montar una metodología analítica que permita identificar y cuantificar la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub> en cada una de las operaciones unitarias que involucra la producción de jarabe fructosado a partir de almidón de maíz, en este capítulo se presentan los pasos seguidos.

#### 3.0. Metodología

En las Figuras 3.1 y 3.2 se muestra el esquema general seguido. En la Figura 3.1 se ven los puntos en que se realizó el muestreo para el análisis de AFB<sub>1</sub>.

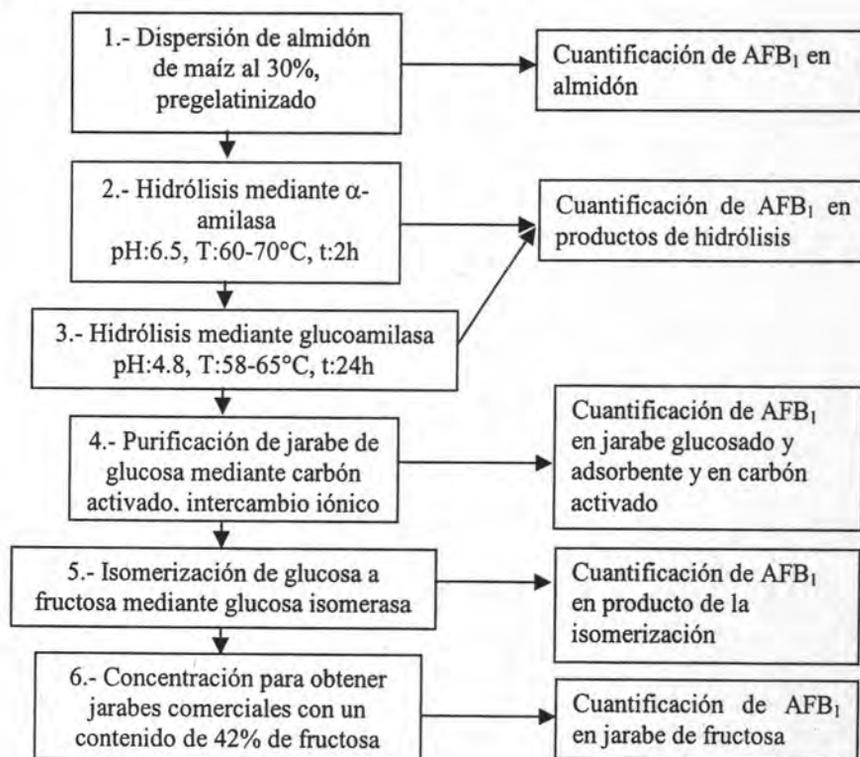


Figura 3.1. Esquema sobre la obtención de jarabes de fructosa a partir de dispersiones de almidón

### 3.1. Reactivos y materiales

En el desarrollo de la presente investigación se emplearon los siguientes reactivos y disolventes: Metanol (Cat. 9093-03), acetonitrilo (Cat. 9017-03), benceno (Cat. 9154-63) todos grado cromatográfico de J.T. Baker, Xalostoc, México. Cloroformo (Cat. 9080-03), sulfato de sodio anhidro (Cat. 3898-01), bisulfito de sodio (Cat. 3556-01), fosfato monobásico de potasio (Cat. 3246-01), cloruro de calcio (Cat. 1332-01), sulfato de magnesio (Cat. 2500-01), sulfato de sodio anhidro (, 3998-01), ácido sulfúrico (Cat. 9681-05), HCl (Cat. 9535-62), ácido trifluoroacético (Cat. W729-05), acético glacial (Cat. 9507-61) todos grado reactivo de J.T. Baker, Xalostoc, México. Ácido láctico (Cat. A162-1 de Fisher Scientific, EEUU), ácido bórico (Cat. 0084 de Química Dinámica, México), fosfato dibásico de potasio (Cat. 3584 de Productos Químicos Monterrey, México), sulfato de cobre (Cat. 7758-99-8) y dicromato de potasio (Cat. 6770 ) de Mallinckrodt-Baker, EEUU Aflatoxina B<sub>1</sub> (Cat. No. A6636 de Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EEUU),  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa grado industrial (Enziquim, México), glucosa isomerasa (Cat. IAN20755, Novosymes, Dinamarca), columnas de inmunioafinidad (Cat. G1004, VICAM, Watertown, EEUU).

El maíz provenía de muestras comerciales de las variedades Chalco y Toluca adquiridas en una forrajería. El maíz se limpió manualmente para eliminar materia extraña. Se mezclaron las muestras adquiridas (lotes de 5 kg) para tener lotes homogéneos de los que se tomaban sublotes de 500 g para la producción de almidones. Los lotes se conservaron a 4°C en un cuarto de temperatura controlada en frascos de vidrio cerrados.

Para evaluar la permanencia y destino de la aflatoxina, cada sub lote de maíz que se fortificó con AFB<sub>1</sub> fue adicionado con 2, 20 y 200  $\mu\text{g AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$  de muestra. Las soluciones estándar fueron asperjadas sobre el grano y cada sub lote se dejó en frascos abiertos durante 24 horas en un laboratorio aislado y con condiciones controladas para evitar la contaminación del resto de los laboratorios (Anexo 2), para que el disolvente que contenía los estándares de AFB<sub>1</sub> se evaporara y las muestras quedaran fortificadas.

Para la puesta a punto de las metodologías de hidrólisis enzimática e isomerización se emplearon almidones de maíz comerciales (“Maizena”).

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Metodología del análisis químico

El análisis químico de las muestras de maíz se realizó de acuerdo con lo descrito en los métodos 14.063, 14.064, 14.067 (AOAC, 1980), correspondientes a los contenidos de humedad, cenizas y grasa cruda. El contenido de proteína cruda se determinó modificando el método 14.068 (AOAC, 1980). Las modificaciones al método consistieron en acoplar dicho método para la micro-destilación Kjeldahl. Para ello, se redujeron las cantidades de muestra y reactivos. Se emplearon 40 mg de la muestra de maíz, se le adicionaron 40 mg de sulfato de cobre y 500 mg de sulfato de sodio. La digestión se realizó con 3 mL de ácido sulfúrico concentrado en un digestor (Labconco 23540, Missouri, EEUU). La destilación de la muestra digerida se realizó en un equipo para microdestilación (Kjeldahl 65000, LABCONCO, Missouri, EEUU), mediante la adición de 20 mL de hidróxido de sodio concentrado (60%). El destilado se recibió en 50 mL de ácido bórico (0.5%) y fue titulado con NaOH (0.001N). El porcentaje de proteína se calculó mediante la siguiente ecuación:  $P=N \times F$  empleando el factor de conversión reportado para maíz  $F=6.25$  (AOAC, 1980). Cabe mencionar que los análisis se realizaron por triplicado.

#### 3.2.2. Obtención de almidón de maíz

El almidón de maíz se obtuvo a partir de lotes de 500g de maíz entero, el cual se remojó con 1 L de solución que contenía 1.48g de bisulfito de sodio y 4.7 mL de ácido láctico en agua destilada. La solución con el maíz se mantuvo a una temperatura de 50°C por 30 h. Posteriormente, los granos se molieron mediante una licuadora doméstica (Osterizer mod. 869-18S), a alta velocidad por 5 minutos. La fibra y el germen se retuvieron mediante dos tamices (20 cm de diámetro y malla con apertura de poro de  $1\text{mm}^2$ ; 25 cm de diámetro y malla con apertura de  $149\ \mu\text{m}^2$ ). De acuerdo con Berkhout (1976), la separación del almidón de la proteína se realiza por medio de separadores centrífugos. Como no se contaba con un equipo idóneo en el laboratorio (las centrifugas no separaban las dos fases),

en la presente investigación, la separación de proteína-almidón se realizó mediante un canal de separación de 3 x 0.1 m, con un ángulo de inclinación de 7°. La separación se realizó por el corrimiento de las dos fracciones a lo largo del canal por gravedad. El almidón, debido a su mayor peso, se deposita en el tubo, mientras las proteínas (más ligeras), permanecen en suspensión y son arrastradas hasta el final del tubo. El almidón se secó a 50°C por 24h y la fracción de fibra-germen-cascarilla a 60°C por 24 horas. El proceso completo se muestra en la Figura 3.2.



**Figura 3.2. Obtención de almidón a partir de granos de maíz blanco comercial (Los puntos en los cuales se tomaron muestras para determinar aflatoxinas fueron los marcados con un asterisco)**

### 3.2.3. Obtención de jarabe de fructosa a partir de dispersiones de almidón

#### 3.2.3.1. Hidrólisis del almidón

La obtención del jarabe de fructosa se realizó mediante la hidrólisis de almidón, sacarificación e isomerización (Richardson *et al.*, 2002; Slomiska *et al.*, 2003) (Figura 3.1). Para poner a punto las metodologías, se preparó una suspensión al 30% p/v de almidón comercial ("Maizena") en una solución amortiguadora de fosfatos (SAF), con un valor de pH de 7.4. A la solución se le adicionaron 40 mg kg<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> (Long-Liu *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2002). Una vez ajustados estos parámetros se procedió a pregelatinizar la suspensión mediante tratamiento térmico a 95°C por 5 minutos

manteniendo agitación manual constante. Posteriormente, la suspensión se enfrió a 60°C y se adicionó la  $\alpha$ -amilasa (Enziquim, México), en una relación del 1% (p/p), con respecto a la masa del almidón. La reacción se mantuvo a 60°C por 2 horas en una incubadora con agitación orbital a la velocidad rotacional establecida por el fabricante (SEV, México). La enzima se inactivó mediante la adición de HCl al 5%, hasta alcanzar un pH de 4.7. Este procedimiento se repitió para las muestras de almidón de maíz sin fortificar con AFB<sub>1</sub> y para las fortificadas.

### 3.2.3.2. Sacarificación

A la solución obtenida en el paso anterior se le adicionó el 1% de glucoamilasa. La reacción se llevó a 65°C por 24h. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo por calentamiento a 95°C por 5 min. La solución se purificó mediante la adición de 3g de carbón activado (3g/333 mL de suspensión) y posterior filtración sobre papel filtro. La mezcla con el adsorbente se calentó a 60°C y se mantuvo en agitación por 90 minutos en una plancha de agitación magnética a velocidad media. La suspensión se filtró a través de papel filtro de poro cerrado (Whatman 1005 110, Springfield, Inglaterra). Posteriormente, se procedió a remover los iones Ca<sup>2+</sup> mediante columnas empacadas con 10 g de intercambiador iónico (amberlite IR-120<sup>®</sup>). La resina se hidrató previamente con metanol al 20% y el empaque de la columna se realizó en húmedo. La columna empacada fue lavada con 500 mL de agua desionizada (obtenida mediante un equipo de desionización Modulab Analytical, Texas, EUA). La columna fue equilibrada con 1 litro de solución de HCl al 5% y nuevamente lavada con agua desionizada hasta obtener en el efluente un valor de pH de 7. Una vez equilibrada la columna, se procedió a realizar la carga del jarabe de glucosa y se colectó la fracción. Posteriormente, se pasaron 200 mL de agua desionizada a través de la columna y también se recolectaron.

### 3.2.3.3. Isomerización

Una vez purificada la solución (glucosa), se procedió a realizar su isomerización a fructosa. Para ello se ajustaron los valores de pH (7.5), temperatura (60°C) y se adicionó MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para tener una concentración final de 1.5 mM y 2mM respectivamente. La enzima se adicionó al 1% con respecto al peso inicial de almidón, la reacción se mantuvo por 30h.

La solución resultante se filtró para retirar la enzima en suspensión. Posteriormente, se trató con 3g de carbón activado (3 g/450 mL) manteniéndola en agitación por 1 hora a 60°C. El carbón activado se retiró por filtración con papel poroso. Finalmente, se evaporó bajo presión reducida para concentrar los azúcares.

### 3.3. Criterios de pureza del estándar de AFB<sub>1</sub>

#### 3.3.1. Obtención del espectro de absorción y determinación de la longitud máxima de absorción para AFB<sub>1</sub>

La longitud de onda máxima de absorción para AFB<sub>1</sub> se determinó empleando un espectrofotómetro UV-visible (GBC-Cintra 5, Victoria, Australia) el cual se ajustó a 0 de absorbancia mediante un blanco de solución benceno-acetonitrilo (98:2). Posteriormente, se realizó un barrido de 330 a 370 nm de la solución de AFB<sub>1</sub>.

#### 3.3.2. Cálculo del factor de corrección del equipo (FC)

Se preparó una solución con 1L de ácido sulfúrico 0.018N y 78 mg de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (método 970.43 (B) AOAC). De la solución resultante (0.25 mM K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) se tomaron alícuotas para preparar dos soluciones con concentraciones de 0.125 mM y 0.0625 mM respectivamente. (AOAC, 1990; DOF, 2002). Posteriormente, se calibró el espectrofotómetro UV-Vis a cero de absorbancia con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.018N como blanco de acuerdo con el método 970.44 (AOAC, 1990). A continuación se procedió a leer la absorbancia de las tres soluciones de dicromato de potasio de menor a mayor concentración, a la longitud de onda de máxima absorción para la AFB<sub>1</sub>. Con los valores obtenidos se procedió a calcular el coeficiente de extinción molar mediante la siguiente ecuación:  $\epsilon = (Ax100)/[mM]$ . El valor del coeficiente de extinción molar sirvió para calcular el factor de corrección del equipo mediante la siguiente ecuación:

$FC = 3160/\epsilon_{\text{promedio}}$ , donde: 3160 es el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) para soluciones de dicromato de potasio y  $\epsilon_{\text{promedio}}$  es el coeficiente de extinción experimental para soluciones de dicromato de potasio. Una vez verificando que el valor de FC se encontraba en el intervalo de aceptación, 0.95 a 1.05, se procedió a calcular la concentración real de la solución de AFB<sub>1</sub> (método 971.22 (B) AOAC) mediante la ecuación que a continuación se detalla:

$$\mu\text{g de AFB}_1 \text{ mL}^{-1} = (\text{AxPMx1000xFC})/\epsilon$$

donde:

**A:** absorbancia

**PM:** Peso molecular ( $\text{AFB}_1=312$ )

**FC:** Factor de corrección del equipo

**$\epsilon$ :** Coeficiente de extinción molar para soluciones de  $\text{AFB}_1$  (19,800)

### 3.4. Soluciones patrón de $\text{AFB}_1$

La preparación de la solución estándar de  $\text{AFB}_1$  se realizó según se describe en el método 970.44 (A) AOAC (AOAC, 1990; DOF, 2002). Para ello, se disolvió el estándar con una mezcla benceno-acetonitrilo (98:2), para obtener una solución con concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . De esta solución estándar se partió para preparar las curvas de calibración con concentraciones de 2 a  $20 \mu\text{g de AFB}_1 \text{ L}^{-1}$  y de 20 a  $200 \mu\text{g de AFB}_1 \text{ L}^{-1}$ . Estas concentraciones se transforman a ng (concentración absoluta) de  $\text{AFB}_1$  inyectados en  $20 \mu\text{L}$  (volumen de análisis), de cada uno de los puntos de la curva estándar. Esto se realizó con el fin de evitar el cambio de unidades de concentración en las soluciones ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y las muestras ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Al cuantificar las muestras se consideró el factor de dilución y se obtuvo la concentración de la toxina en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Se prepararon dos curvas de calibración para el análisis de las muestras fortificadas con  $\text{AFB}_1$ . Las curvas de calibración contemplan concentraciones de 2 a  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ . En ambos casos, cada punto de la curva de calibración se inyectó por triplicado.

### 3.5. Métodos de análisis de aflatoxina $\text{B}_1$

#### 3.5.1. Extracción de aflatoxina $\text{B}_1$ de muestras de maíz, almidón y adsorbente

La extracción de las aflatoxinas en maíz, almidón y adsorbente se realizó como a continuación se detalla. Se colocaron 50 g de muestra, 100 mL de una mezcla de metanol:agua (80:20) y 5 g de NaCl en un vaso de vidrio para licuadora. A continuación, se procedió a licuar a alta velocidad por 3 minutos. La mezcla se filtró (Filtrado 1), a través de papel filtro de poro cerrado. Se tomó un volumen de 10 mL del filtrado se diluyó con 40

mL de agua destilada filtrándolo nuevamente sobre papel fibra de vidrio (Wathman 1823010, Springfield, Inglaterra), Filtrado 2 (DOF, 2002).

La extracción del jarabe glucosado y fructosado se realizó colocando 50 mL de jarabe, 10 mL de agua destilada y 100 mL de cloroformo en un matraz. La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se realizó la separación de la fase orgánica de la acuosa en un embudo de separación (Jaimez *et al.*, 2000; Papp *et al.*, 2002; Sharma y Márquez, 2001). La fracción orgánica se evaporó a sequedad bajo presión reducida (evaporador rotatorio Büchi 461, Alemania). El residuo fue resuspendido en 100 mL de metanol al 80% y se filtró a través de papel filtro (Filtrado 1). Se tomaron 10 mL del filtrado y se diluyeron con 40 mL de agua destilada, filtrando nuevamente (Filtrado 2) sobre papel fibra de vidrio.

### 3.5.2. Purificación de las muestras

La limpieza de las muestras se realizó mediante columnas de inmunoafinidad (Afla B de Vicam, GA, EUA). Las columnas se acondicionaron con 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos, con un valor de pH de 7.4. Una vez acondicionada la columna, se realizó la carga de 10 mL del filtrado 2 de la muestra. Enseguida, se procedió a lavar con 10 mL de agua desionizada, el proceso de lavado se repitió dos veces más. La columna fue secada mediante un flujo de aire, la aflatoxina fue eluida con 1.5 mL de acetonitrilo (Carvajal *et al.*, 2003b; DOF, 2002).

### 3.5.3. Derivación de AFB<sub>1</sub>

La derivación del estándar y del extracto de las muestras adicionadas se realizó tomando 200  $\mu$ L de las soluciones estándar de AFB<sub>1</sub> o del extracto de las muestras en un vial de 1.8 mL, a este volumen se les agregó 700  $\mu$ L de solución de ácido trifluoroacético, ATF (10 mL ATF, 5 mL ácido acético glacial y 35 mL de agua desionizada), se agitaron vigorosamente por 30 segundos. Los viales se mantuvieron en un baño de agua a temperatura de 65°C por 10 minutos (Akiyama *et al.*, 2001; DOF, 2002; Kok, 1994). Una vez transcurrido el tiempo especificado se enfriaron a temperatura ambiente (DOF, 2002).

#### 3.5.4. Cuantificación por CLAR-fluorescencia

La cuantificación de AFB<sub>1</sub> se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos consistente en una bomba ternaria (Varian 9012, CA, EEUU), equipado con un inyector Rheodyne 9725i con un rizo (*loop*) de 20  $\mu$ L (Cotati, CA, EEUU), y un detector de fluorescencia (Varian 9075, CA, EEUU). La separación se llevó a cabo mediante una columna C<sub>18</sub> en fase reversa Prodigy ODS (3) 4.6 mm D.I., x 250 mm x 5  $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, EEUU).

Todos los disolventes fueron desgasificados por 30 minutos usando un baño de ultrasonido Branson 1210 (Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT, EEUU). El agua grado cromatográfico fue obtenida por filtración de agua destilada y desionizada, mediante un sistema de microfiltración Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU), a través membranas de nailon de 0.45  $\mu$ m x 47mm (Cat. AFO-0504, Phenomenex Torrance, EEUU).

La fase móvil presentó la siguiente composición: agua:acetonitrilo:metanol (70:10:20). La columna se mantuvo a temperatura ambiente con un flujo de la fase móvil de 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Las longitudes de onda de excitación y emisión del detector de fluorescencia se ajustaron a 365 y 450 nm respectivamente. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L. La identificación y cuantificación de la AFB<sub>1</sub>, en el extracto final, se realizó por comparación del tiempo de retención del estándar y de las áreas bajo la curva con la obtenida de la solución estándar.

#### 3.5.5. Cálculo del porcentaje de recuperación de AFB<sub>1</sub> en los diferentes productos del maíz

Para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas en maíz, fibra de maíz, almidón de maíz y jarabe de fructosa, se adicionaron muestras de 50 g con la cantidad suficiente de estándar de AFB<sub>1</sub> para tener una concentración de 20  $\mu$ g de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de material. Las muestras se extrajeron y cuantificaron con base en lo descrito arriba.

## Capítulo 4

## Resultados y discusión

## 4.0. Establecimiento de las condiciones para la producción de jarabe fructosado

## 4.1. Análisis químico de las muestras de maíz

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados del análisis químico practicado al maíz blanco adquirido. Los valores del análisis químico de las muestras de maíz son muy cercanos a los reportados en las tablas de valor nutritivo de los alimentos del INNSZ (1996). Con estos análisis no se encontraron diferencias significativas entre los lotes de grano.

Tabla 4.1. Resultado del análisis químico del maíz

Parámetro	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	MUESTRA 4	‡Valor reportado
Humedad (%)	9.89±0.28	9.73±0.09	9.85±0.23	9.80±0.15	10.60
Cenizas BS (%)	1.47±0.07	1.11±0.033	1.50±0.08	1.35±0.10	NR
Cenizas BH (%)	1.22±0.11	1.24±0.05	1.30±0.15	1.28±0.17	1.3
Grasa BS (%)	4.33±0.56	4.19±0.05	4.50±0.70	4.27±0.53	NR
Grasa BH (%)	3.90±0.51	3.78±0.05	4.1±0.42	3.85±0.12	4.70
Proteína BS (%)	9.55±0.16	10.77±2.57	9.70±0.09	10.05 ±0.12	NR
Proteína BH (%)	8.67±0.18	9.72±2.32	8.95±0.15	8.88±0.22	7.90

BS = Base seca

BH = Base húmeda

NR = No reportado

‡ Tablas del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México (INNSZ, 1996)

## 4.2. Obtención del almidón de maíz

En la literatura se reporta un rendimiento industrial del 67% de almidón de maíz a partir de grano entero (Berkhout, 1976). Lógicamente, la tecnología y los equipos empleados a nivel industrial buscan la minimización de las pérdidas del almidón y permiten la separación del gluten del almidón con lo cual se incrementa el rendimiento y la pureza de este constituyente del maíz (SAGPYA, 2005). En esta investigación, la obtención y separación del almidón se realizó empleando materiales y equipos de laboratorio. Debido a ello, los rendimientos obtenidos fueron de 48%. Dado que el rendimiento no tiene un efecto en la

investigación realizada, estos valores se consideran adecuados para los propósitos de esta investigación. El porcentaje del rendimiento del almidón se calculó como sigue:

Peso del almidón de primera (BS)= 219.5g

Peso del grano (BS)= 450.55g

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{219.5\text{g (BS)}}{450.5\text{g (BS)}} \times 100 = 48.7$$

Rendimiento = 48.7%

BS= Base seca

### 4.3. Obtención de jarabe de fructosa a partir de dispersiones de almidón

#### 4.3.1. Hidrólisis del almidón

Se determinó el tiempo de hidrólisis de una suspensión de almidón comercial al 30% p/v. La hidrólisis se llevó a cabo mediante  $\alpha$ -amilasa bajo las condiciones de referencia del proveedor. Las condiciones probadas fueron: pH de 7.4, temperatura de 65°C y 40 mg L<sup>-1</sup> de Ca<sup>2+</sup> (Crabb y Mitchinson, 1997). El tiempo de hidrólisis del almidón bajo las condiciones probadas fue de 60 minutos. Como se definió en el capítulo de Materiales y métodos, la reacción se llevó a cabo por un periodo de 2 horas; sin embargo, en el intervalo de tiempo de 60 a 120 minutos ya no se observó un incremento substancial en la concentración de carbohidratos (Figura 4.1).

El tiempo de hidrólisis determinado en este experimento es semejante a los valores reportados en otros trabajos. Las condiciones de operación en ellos son pH 7-7.5, temperatura 95-105°C y tiempo de reacción de 60-90°C. La diferencia en la naturaleza de la  $\alpha$ -amilasa, hace posible realizar la hidrólisis del almidón a altas temperaturas con lo que se ahorra el proceso de pregelatinización (Crabb y Mitchinson, 1997; Crabb y Shetty, 1999; Richardson *et al.*, 2002; Slominska *et al.*, 2003).

En este estudio se trabajó con una amilasa proveniente de *Bacillus subtilis* que requiere de valores de pH ligeramente alcalinos (7.4) y una temperatura de 60°C. Debido a ello, los procesos de pregelatinización e hidrólisis se realizaron por separado. Las enzimas

termoestables permiten realizar la gelatinización y la hidrólisis en una misma etapa. Esto representa una ventaja a nivel industrial ya que se evita la pérdida de sólidos y se reduce el tiempo de proceso y los costos.

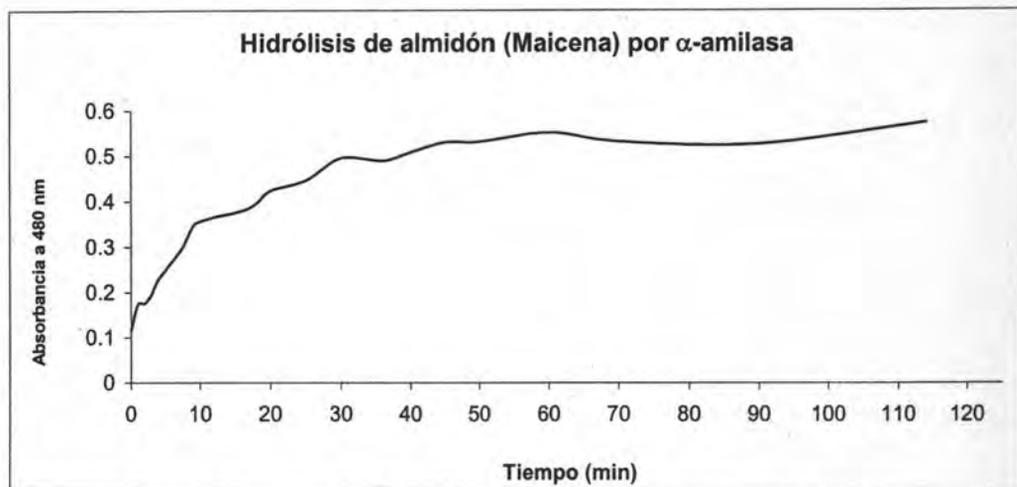
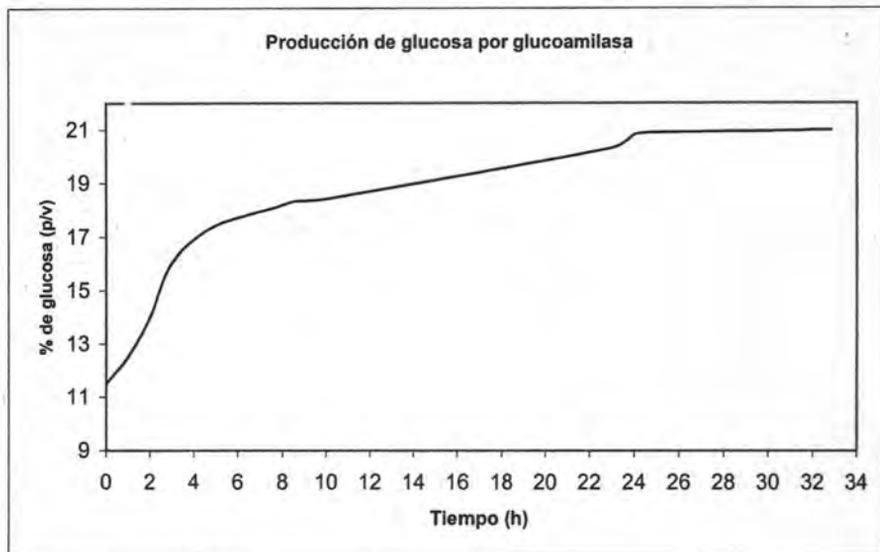


Figura 4.1. Hidrólisis del almidón comercial empleando alfa-amilasa

#### 4.3.2. Sacarificación

La sacarificación se realizó empleando glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sobre la solución de almidón hidrolizado obtenida según la Sección 3.2.3.1. Una vez ajustados los parámetros de temperatura y pH, la reacción se dejó correr por 32 horas. Los resultados obtenidos en este experimento (Figura 4.2), indican que, a partir de las 23 horas de reacción, ya no hay un incremento substancial en el porcentaje de glucosa.

El valor máximo de glucosa alcanzado a las 23 horas fue de 20.3% (p/v), teniendo un incremento de 0.7% transcurridas 32 horas de reacción. Autores como Crabb y Shetty (1999), han reportado que el proceso de sacarificación se realiza de 24 a 96 horas dependiendo de la capacidad de operación de las plantas industriales.



**Figura 4.3. Hidrólisis de oligosacáridos empleando glucoamilasa**

De acuerdo con lo reportado por Crabb y Mitchinson (1997), los procesos de sacarificación, purificación y concentración, dan como resultado un jarabe que contiene 30-32% de sólidos disueltos, de los cuales, el 95% es dextrosa. En esta investigación, el análisis de glucosa se realizó directamente sobre la solución obtenida después de la purificación, es decir, no se concentró el producto y, por eso, sólo se obtuvo el 20.3% de glucosa en la solución.

Por otra parte, concentrar la solución que se someterá a sacarificación por medio de glucoamilasa conlleva dos problemas. El primero es la gran afinidad de la glucoamilasa por los enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-4, con lo que se tiene una hidrólisis lenta sobre los enlaces  $\alpha$  1-6 presentes en las maltodextrinas y, por lo tanto, una baja liberación de glucosa. El segundo se refiere a la reversión a productos con enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-6 como maltosa e isomaltosa a expensas de la cantidad de dextrosa presente en el jarabe (van der Maarel *et al.*, 2002).

#### 4.3.3. Isomerización

En la Tabla 4.2, se muestran los valores de fructosa y glucosa determinados en el jarabe a 20, 25 y 30 horas de reacción. La isomerización de la solución de glucosa dio como

resultado una solución con un equilibrio de 33.28 y 42.27% (p/v) de fructosa y glucosa, respectivamente, a las 30 horas de conversión. Como puede observarse, los porcentajes obtenidos para las dos azúcares son bajos con respecto a los reportados (Crabb y Mitchinson, 1997). Esto puede deberse, principalmente, a que parte de las maltodextrinas no son degradadas totalmente a glucosa. También, como se mencionó anteriormente, el análisis de glucosa se realizó directamente sobre la solución sin preconcentrar, es decir, la solución de glucosa se encuentra más diluida que en un jarabe con 40% de sólidos disueltos.

Por otra parte, se puede favorecer la conversión de glucosa a fructosa mediante temperaturas altas (Crabb y Shetty, 1999); sin embargo, la glucosa isomerasa de Novosymes se inactiva fácilmente a temperaturas superiores a los 60°C, lo que resulta ser una limitante en el proceso que se empleó.

**Tabla 4.2. Isomerización de glucosa a fructosa por glucosa isomerasa**

Tiempo de isomerización (h)	Porcentaje de fructosa	Porcentaje de glucosa
20	25.11	49.13
25	28.83	47.11
30	33.28	42.27

#### 4.4. Establecimiento del método para identificación y cuantificación de AFB<sub>1</sub>

##### 4.4.1. Criterio de pureza del estándar de AFB<sub>1</sub>

La pureza del estándar de AFB<sub>1</sub> se verificó de acuerdo con lo descrito en los métodos 970.44 y 971.22 (AOAC, 1990). A continuación, en la Tabla 4.3, se muestran los datos experimentales con los cuales se procedió a calcular el factor de corrección del equipo (FC) y la concentración real de AFB<sub>1</sub> en la solución madre.

El factor de corrección para la señal del equipo (FC=0.96), se encuentra dentro del intervalo (0.95<FC<1.05) establecido en los criterios del método AOAC (1990). Con este valor experimental se procedió a calcular la concentración real de AFB<sub>1</sub> en la solución de referencia. La concentración determinada fue de 9.99 µg mL<sup>-1</sup> lo cual equivale al 99.9% de pureza del estándar.

Tabla 4.3. Resultados del cálculo del factor de corrección del equipo

Solución de dicromato de potasio (mM)	Absorbancia promedio a $\lambda_{\text{máx}}$ (348nm)	$\epsilon=(Ax100)/[mM]$
0.25	0.8180 $^{\pm 0.001}$	3272.00
0.125	0.4090 $^{\pm 0.001}$	3272.00
0.0625	0.2080 $^{\pm 0.002}$	3328.00
		$\epsilon$ promedio= 3290.67 $^{\pm 32.33}$

**Nota:** Las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones de dicromato de potasio

El factor de corrección del equipo se calculó como sigue,  $FC = [3160/3290.67]=0.960$

#### 4.4.2. Curvas de calibración para cuantificar AFB<sub>1</sub>

Como se mencionó en el capítulo anterior, las curvas de calibración contemplan concentraciones de 2 a 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . En las Figuras 4.3 y 4.4 se muestran las curvas de calibración para AFB<sub>1</sub> con sus intervalos de confianza, la ordenada y pendiente de la recta y el coeficiente de regresión lineal.

#### 4.4.3. Cálculo del porcentaje de recuperación de AFB<sub>1</sub> en los diferentes productos del maíz

Como se describió en el Capítulo III, para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxina en maíz, fibra de maíz, almidón de maíz y jarabe de fructosa, se adicionaron muestras de 50 g con la cantidad suficiente de estándar de AFB<sub>1</sub> para tener una concentración de 20  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>  $\text{kg}^{-1}$  de material. Las muestras se extrajeron y cuantificaron con base en lo descrito en la sección de metodología de ese capítulo. Los porcentajes de recuperación para cada una de las matrices se muestran en la Tabla 4.4.

El mejor porcentaje de recobro de AFB<sub>1</sub> fue en el maíz con un valor de 97.6%. En la literatura se reportan porcentajes de 78, 83 y 98.6% de recuperación para AFB<sub>1</sub> en esta matriz (Blesa *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2004; Otta *et al.*, 2000). Estos porcentajes son considerados adecuados para el estudio de aflatoxinas en alimentos de acuerdo con cada uno de los métodos de extracción empleados.

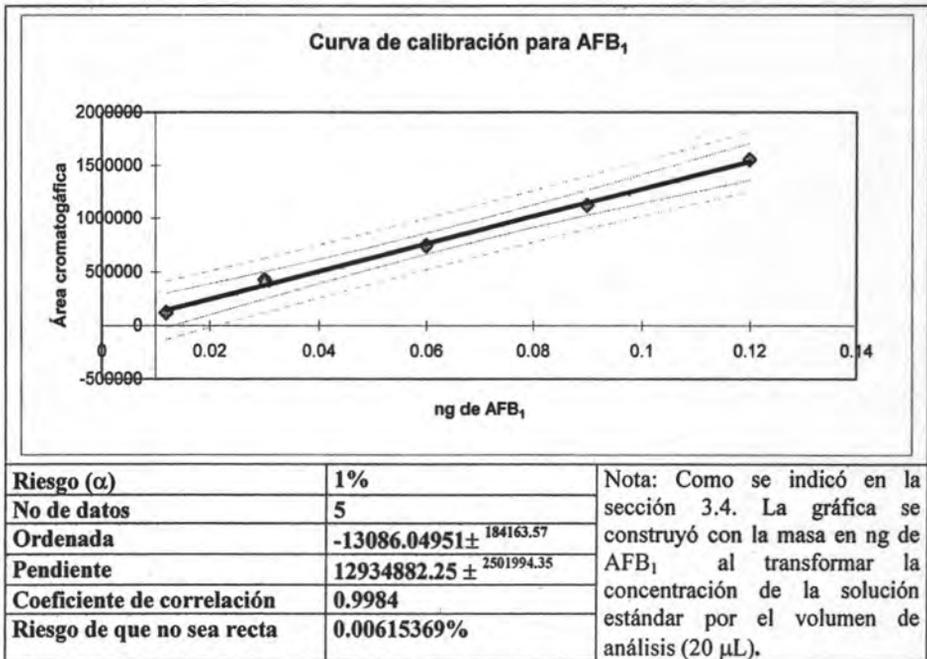


Figura 4.3. Curva de calibración para AFB<sub>1</sub> de 2 a 20  $\mu$ g  $kg^{-1}$

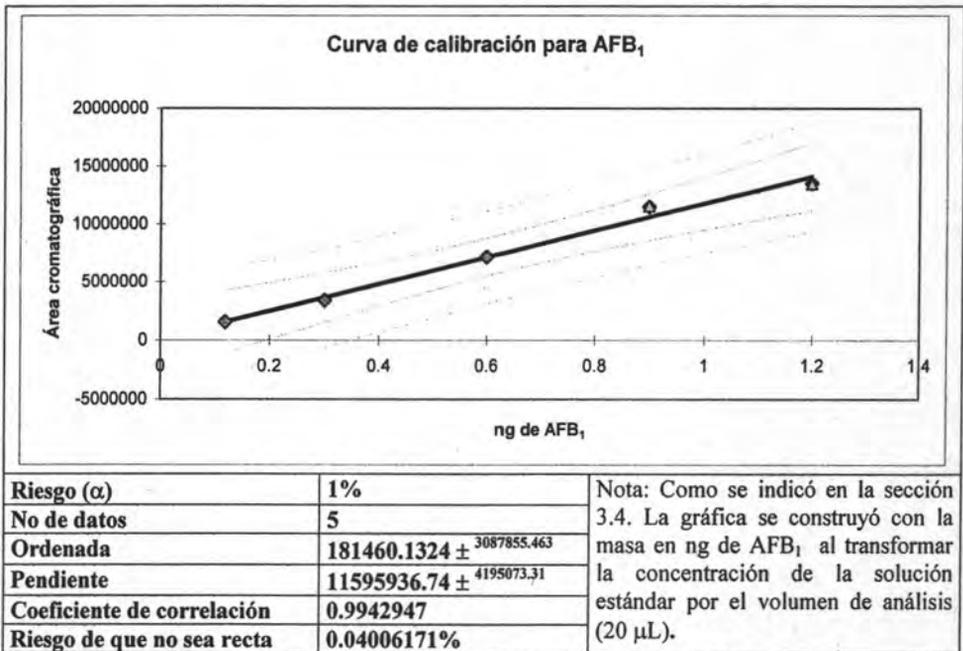


Figura 4.4. Curva de calibración para AFB<sub>1</sub> de 20 a 200  $\mu$ g  $kg^{-1}$

Tabla 4.4. Porcentaje de recuperación de AFB<sub>1</sub> en diferentes matrices

Matriz	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	% de recuperación
Maíz	19.94	19.46	$97.6 \pm 4.31$
Fibra	21.27	19.06	$89.6 \pm 2.89$
Almidón	19.94	15.47	$77.59 \pm 6.52$
Jarabe	19.83	16.13	$81.34 \pm 3.27$

El porcentaje de recobro obtenido en este trabajo se encuentra dentro de estos valores y muy cercano al reportado por Otta (2000). En las otras matrices estudiadas se tienen porcentajes de recobro que varían del 77 al 89%. Como sobre estas matrices no se encontraron datos en la literatura, no hay manera de corroborar si el recobro es bueno pero, considerando otras matrices biológicas, puede decirse que es adecuado.

#### 4.5. Resultados obtenidos en las muestras de maíz fortificadas con estándar de AFB<sub>1</sub>

Para dar seguimiento al destino de la AFB<sub>1</sub> se procedió a contaminar muestras de maíz con el estándar de aflatoxina. Con este maíz se realizó todo el proceso de obtención de almidón y, posteriormente, se realizó su transformación a jarabe de glucosa-fructosa.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el análisis de AFB<sub>1</sub> por cromatografía de líquidos. En las Figuras 4.5. y 4.6 se muestran los cromatogramas correspondiente al blanco de reactivos y a la curva de calibración de AFB<sub>1</sub>. En el cromatograma del blanco de reactivos (solución derivatizante + acetonitrilo), se observan las tres señales producidas por la solución derivatizante. En la Figura 4.6, se muestran las curvas obtenidas para las diferentes concentraciones (20, 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), del estándar de AFB<sub>1</sub>.

Las muestras de maíz fueron fortificadas en tres niveles 2, 20 y 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Paralelamente, se analizaron una muestra sin contaminar y las fortificadas. En la primera, obviamente, no se detectó la presencia de la toxina ni en el maíz ni en ninguno de los productos obtenidos en el laboratorio (fibra, almidón, hidrolizados y jarabe). En la Figura 4.7, se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra de almidón obtenido con el maíz no fortificado. Por otra parte, en la muestra fortificada con 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> se pudo identificar la presencia de AFB<sub>1</sub> en el maíz pero no fue posible cuantificarla debido a la gran variación

que se obtiene en las áreas bajo las curvas del cromatograma (Figura 4.8). Es necesario señalar que la toxina de la muestra con  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> ya no fue identificada en los productos de las operaciones subsecuentes (fibra, almidón, hidrolizados y jarabes).

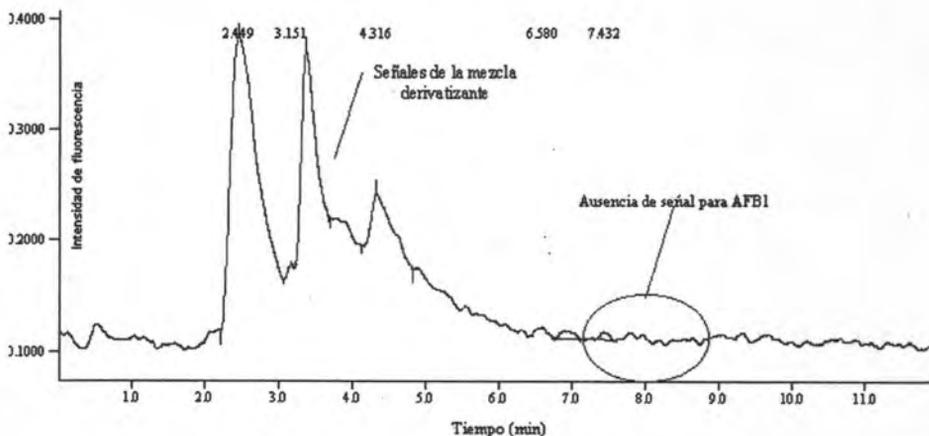


Figura 4.5. Cromatograma del blanco de reactivos

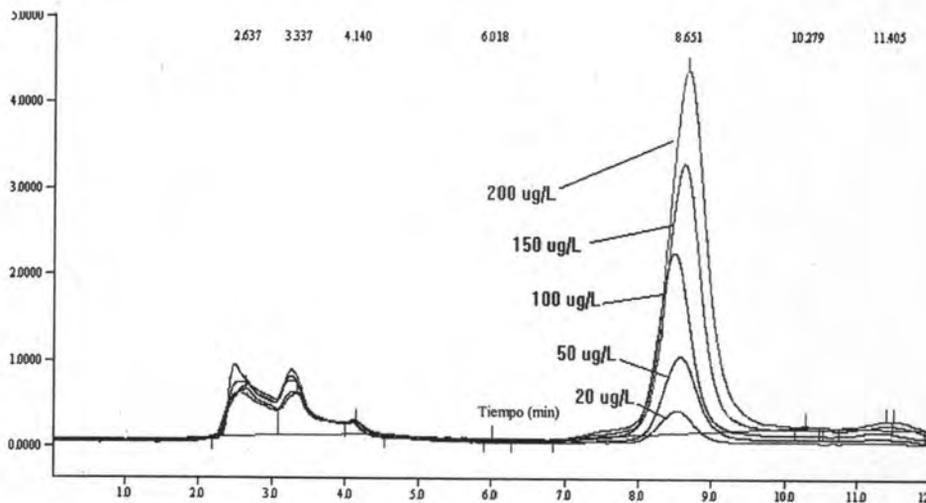


Figura 4.6. Cromatograma de la curva de calibración de AFB<sub>1</sub> de 20 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$

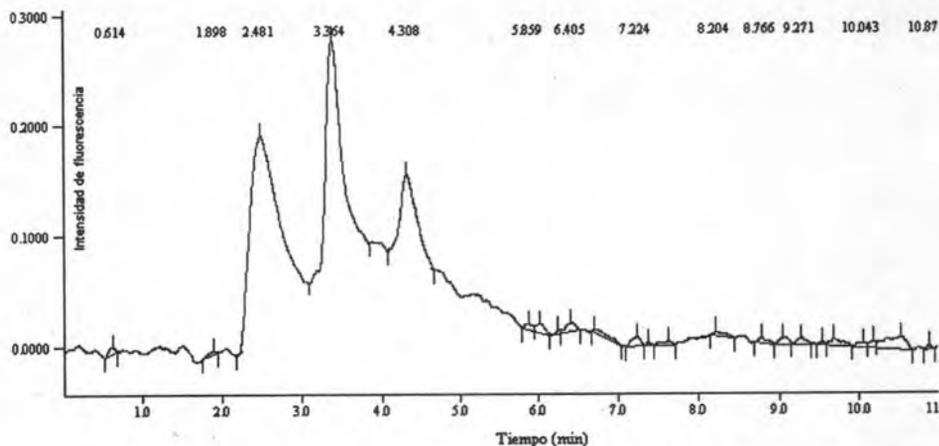


Figura 4.7. Cromatograma obtenido en el almidón de la muestra sin contaminar

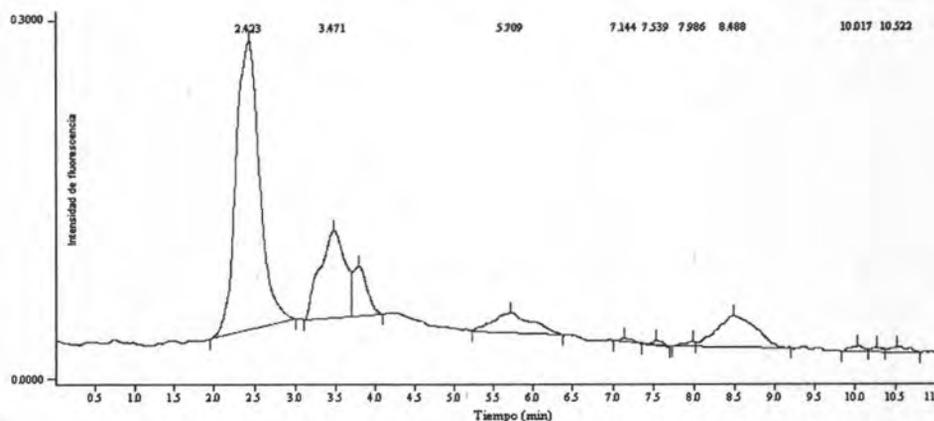


Figura 4.8. Cromatograma obtenido en una muestra de maíz contaminada con  $2.02 \mu\text{g kg}^{-1}$  de  $\text{AFB}_1$

En las muestras adicionadas con  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , que es el nivel máximo permisible por la legislación nacional vigente, se observó una disminución paulatina en el contenido de la  $\text{AFB}_1$  de los productos de las operaciones unitarias subsecuentes. La  $\text{AFB}_1$  se encontró en la fibra y en el almidón. En los productos de las operaciones restantes ya no fue posible cuantificarla e incluso después de que se realiza la purificación de la solución de glucosa mediante la adición de carbón activado, la toxina ya no es detectada (Figura 4.9). Debido a

que en el almidón permanece una cantidad muy pequeña de AFB<sub>1</sub>, no pudo ser cuantificada durante las etapas de hidrólisis y sacarificación.

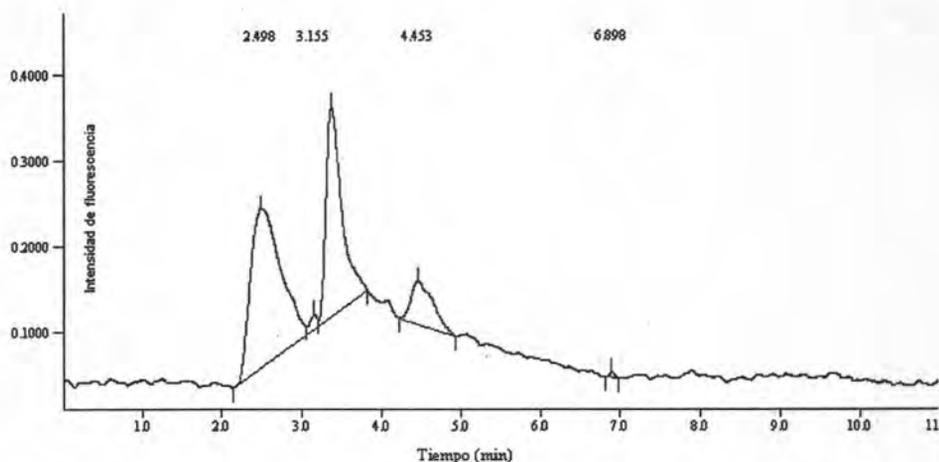


Figura 4.9. Cromatograma obtenido después de realizar la isomerización del jarabe de glucosa en la muestra fortificada con 20.23  $\mu\text{g kg}^{-1}$

En las muestras fortificadas con el nivel más alto de la toxina, 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  se observó con mayor facilidad que la AFB<sub>1</sub> se distribuye del maíz a la fibra (Figura 4.10) y al almidón. Esta muestra permitió identificar y cuantificar el analito después de realizar la hidrólisis, (Figura 4.11), y la sacarificación (Figura 4.12). Sin embargo, como en el caso de las muestras fortificadas con 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , después de la adición de carbón activado el analito ya no fue identificado en ninguno de los productos de las operaciones posteriores.

Los resultados obtenidos indican que, a concentraciones muy bajas de AFB<sub>1</sub>, del orden de 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , la toxina debido a su baja concentración no puede ser detectada desde las primeras etapas del proceso, es decir, desde el remojo (Tabla 4.5). En el Anexo 1 se muestran las áreas cromatográficas con las cuales se procedió a calcular la concentración de la AFB<sub>1</sub> en cada muestra.

En el caso de las muestras que fueron contaminadas con 20 y 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  se observó la presencia de la aflatoxina en los diferentes productos derivados del maíz (Tablas 4.6 y 4.7).

Sin embargo, la concentración de la aflatoxina en cada uno de estos productos se va reduciendo con respecto a la adicionada inicialmente en el maíz. Con el almidón contaminado se procedió a la producción del jarabe de fructosa y se observó que durante la hidrólisis enzimática se logra identificar a la toxina y que mientras mayor sea la hidrólisis del almidón es posible “recuperar” una mayor cantidad de toxina. Esto puede deberse a que la aflatoxina se adsorbe primero en los gránulos de almidón quedando retenida en ellos. El almidón al gelatinizarse forma una estructura de red que pudiera estar reteniendo a la AFB<sub>1</sub>. Cuando se hidroliza esta red con alfa amilasa (hidrólisis parcial), se recupera una cantidad menor que con la hidrólisis total mediante glucoamilasa. Esta suposición parece ser corroborada ya que al incrementarse el grado de hidrólisis, se observa un incremento en la cantidad de AFB<sub>1</sub> (Tabla 4.7). Por otra parte, en la muestra que fue adicionada con 199.97 µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> de maíz (Tabla 4.7), al medir las concentraciones residuales en el agua de separación de almidón, pudo detectarse una pequeña cantidad de AFB<sub>1</sub>. Se piensa que los sólidos suspendidos en el agua ayudan a que la aflatoxina se pierda con este efluente, ya que la aflatoxina es insoluble en agua. Para las muestras adicionadas con 2 y 20 µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> no se pudo identificar dicho compuesto debido a sus bajas concentraciones.

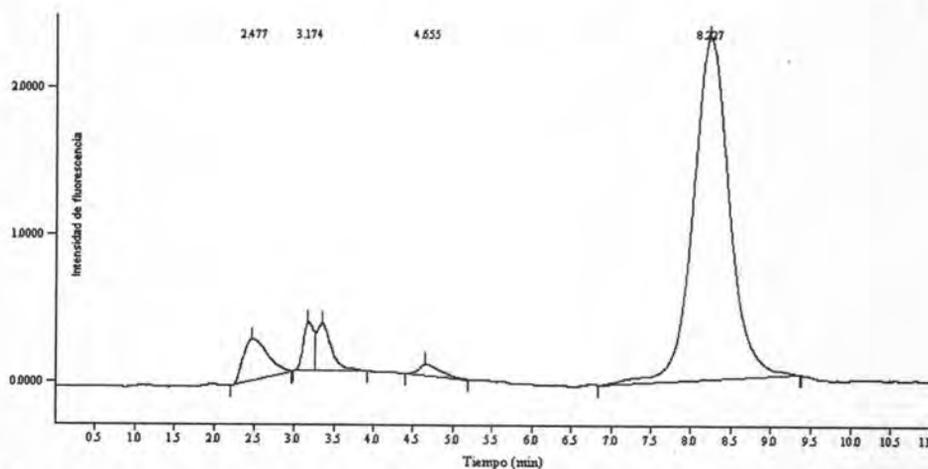


Figura 4.10. Cromatograma obtenido en la muestra de fibra del lote contaminado con 199.76 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>

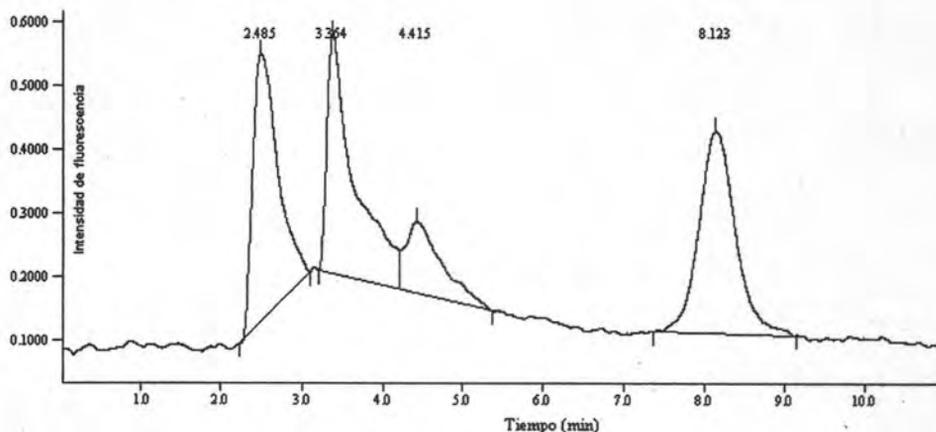


Figura 4.11. Cromatograma obtenido para la muestra de hidrolizado con  $\alpha$ -amilasa del lote contaminado con  $199.76 \mu\text{g kg}^{-1}$

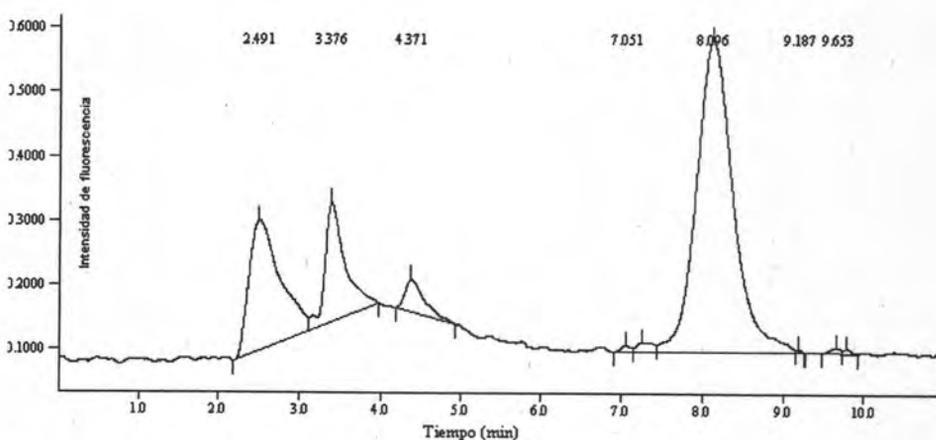


Figura 4.12. Cromatograma obtenidos para la muestra de hidrolizado con glucoamilasa de la muestra contaminado con  $199.76 \mu\text{g kg}^{-1}$

Después de realizar la molienda húmeda se lograron recuperar 0.242 kg de almidón con una concentración de  $\text{AFB}_1$  de  $77.06 \mu\text{g kg}^{-1}$ , la cual equivale al 18.65% de la concentración inicial que tenía el maíz. En cuanto a la fibra (cascarilla, germen y fibra), se recuperaron 0.1114 kg con  $108.90 \mu\text{g AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$ , equivalente al 12.14% de la concentración inicial de  $\text{AFB}_1$ .

**Tabla 4.5. Resultados obtenidos en la muestra fortificada a un nivel de 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$**

Muestra	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Contenido inicial de AFB <sub>1</sub> en el maíz	2.02 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Maíz	Detectado, NC
Fibra	Nd
Almidón	Nd
Agua de separación de almidón	Nd
Hidrólisis con $\alpha$ -amilasa	Nd
Hidrólisis con glucoamilasa	Nd
Isomerización con glucosa isomerasa	Nd
Jarabe	Nd

Nd: No detectada

NA: No aplica

NC: No cuantificable

**Tabla 4.6. Resultados obtenidos en las muestras fortificadas a un nivel de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$**

Muestra	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Contenido inicial de AFB <sub>1</sub> en el maíz	20.23
Maíz	18.76
Fibra	10.25
Almidón	4.50
Agua de separación de almidón	Nd
Hidrólisis con $\alpha$ -amilasa	NC
Hidrólisis con glucoamilasa	NC
Isomerización con glucosa isomerasa	Nd
Jarabe	Nd

Nd: No detectada

NA: No aplica

NC: No cuantificable

**Tabla 4.7. Resultados obtenidos en la muestra fortificada a un nivel de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$**

Muestra	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Contenido inicial de AFB <sub>1</sub> en el maíz	199.76 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Maíz	192.52
Fibra	108.90
Almidón	77.06
Agua de separación de almidón	10.23
Hidrólisis con $\alpha$ -amilasa	5.50
Hidrólisis con glucoamilasa	7.25
Isomerización con glucosa isomerasa	Nd
Jarabe	Nd

Nd: No detectada

NA: No aplica

NC: No cuantificable

La diferencia del 6.11% representa la pérdida de la aflatoxina en los sólidos que no se recuperan y que se eliminan con el agua de remojo del maíz y un 63.09% que se pierde con el agua de lavado usada en la purificación del almidón (Figura 4.13). Cabe mencionar que es en este proceso cuando se verifica la mayor pérdida de sólidos disueltos y en suspensión en agua, básicamente formados por proteína y la fracción de almidón-proteína que no se logran separar.

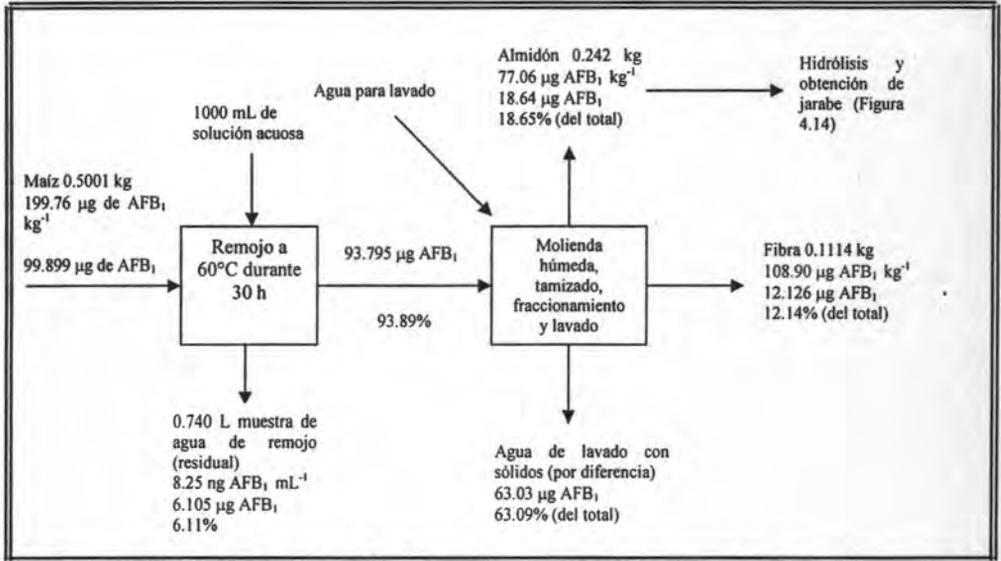


Figura 4.13. Distribución de AFB<sub>1</sub> durante la obtención de almidón de maíz

Por otra parte, en el proceso de producción del jarabe a partir de la hidrólisis del almidón las diferentes operaciones unitarias involucradas, con excepción del paso de purificación con carbón activado, no parecen influir en la reducción del tóxico. En la Figura 4.14, se muestra la distribución de la AFB<sub>1</sub> presente en el almidón a través del proceso de elaboración del jarabe de fructosa a nivel de laboratorio. En este experimento se empleó una muestra con 77.06 µg de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> almidón. Durante la hidrólisis, se lograron cuantificar 5.50 µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> y en la sacarificación 7.25 µg AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>.

La purificación del hidrolizado con carbón activado, a fin de eliminar los sólidos residuales y los compuestos que imparten coloración, retiene la aflatoxina y la elimina del producto en

los niveles de adición de 20 y 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Debido a ello, el empleo del carbón activado resulta ser un paso crítico en la eliminación de AFB<sub>1</sub> en el jarabe de glucosa y fructosa. Este paso también se emplea a nivel industrial por lo que puede representar la operación unitaria más importante para eliminar aflatoxinas de productos de maíz contaminado.

En las etapas posteriores a la purificación del producto sacarificado ya no se pudo detectar la toxina. Del balance de materia puede desprenderse que hay una cantidad de aflatoxina que se encuentra probablemente absorbida y/o adsorbida en el carbón activado pero los métodos seguidos para su desorción y cuantificación no permitieron determinarla. Solamente se cuantificaron 0.525  $\mu\text{g}$  (7.1% de lo que venía con el almidón). Esta cantidad que no pudo ser desorbida del carbón activado no es despreciable 2.74  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>), ya que representa 36.8% de las aflatoxinas que venían con el almidón (versus 31.4% que acompañan al producto de sacarificación sin filtrar ni purificar y 24.7% que estaban con el producto hidrolizado, ya que estas muestras fueron retiradas del proceso para la realización de los análisis.

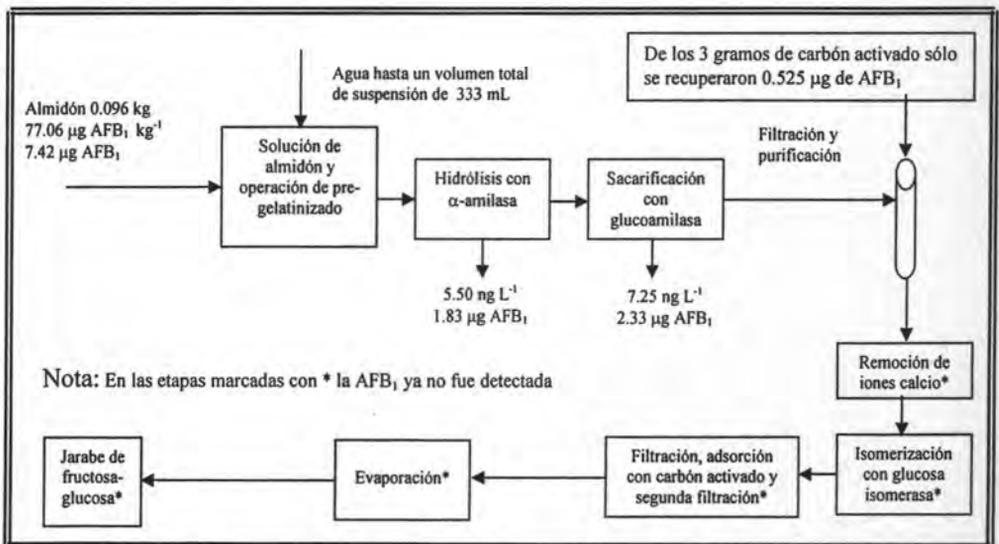


Figura 4.14. Obtención de jarabe de fructosa a partir de almidón

BIBLIOTECA CENTRAL  
DEPARTAMENTO DE TESIS

DATOS DE LA TESIS

FECHA DE PRESTAMO: 24-ENE-06

CLASIFICACION: 001-00550-61-2005

AUTOR: Gómez Almaraz Liztli

TITULO: Desarrollo de un método analítico para la extracción

AÑO: 2005 UNIV. UNAM FAC. F. QUÍMICA CARRERA M. en C.

DATOS DEL USUARIO

NOMBRE: Leonardo Cabrera Guzmán TEL. \_\_\_\_\_

INSTITUCION: UNAM FAC. O ESC. F. QUÍMICA

CARRERA QFB No. DE CUENTA: 93292409

PROFESOR  INVESTIGADOR  BACHILLERATO

PASANTE  ESTUDIANTE LIC.  ESTUDIANTE POSG.

(LLENAR UNA BOLETA POR CADA TESIS)

CB HISTORIA DE LA CIVILIZACIÓN (GENERAL)  
CC ANTIGÜEDADES (GENERAL) ARQUEOLOGÍA  
CD ARCHIVOS. DIPLOMÁTICAS  
CE CRONOLOGÍA  
CJ NUMISMÁTICA. MONEDAS  
CN EPIGRAFÍA. INSCRIPCIONES  
CR HERÁLDICA  
CS GENEALOGÍA  
CT BIOGRAFIA

#### HISTORIA GENERAL, EUROPA

D HISTORIA GENERAL  
DA GRAN BRETAÑA  
DBAUSTRIA, HUNGRÍA  
DC FRANCIA  
DD ALEMANIA

Si bien algunos trabajos describen que las aflatoxinas llegan a pasar al producto final, como el ejemplo de la cerveza de sorgo descrito en el primer capítulo (Scott, 1996), otros trabajos reportan que micotoxinas como las fumonisinas se pierden por las operaciones unitarias como el remojo y la eliminación de la fibra de los granos (JOINT FAO/WHO, 2001). Esto depende de la estructura química de la toxina y de su solubilidad en agua así como de las matrices en las que se encuentren. Para el caso de las aflatoxinas, que son insolubles en agua, la pérdida durante el remojo previo a la molienda húmeda es despreciable. Debido a ello, es que logran pasar a los productos derivados del maíz. La FAO reporta, para las fumonisinas, que la molienda seca del maíz produce una distribución a los diferentes constituyentes del maíz. De forma contraria, la molienda húmeda provoca extracción de la fumonisina hacia el agua con la consecuente reducción en el maíz (JOINT FAO/WHO, 2001). En este trabajo se observó que la AFB<sub>1</sub> permanece en el maíz durante el remojo y la pérdida del contaminante en el agua de remojo es insignificante 6% (para una muestra con 199.76 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> inicial). Después de la molienda húmeda se requiere lavar y purificar a la fibra, germen y almidón; empleando un volumen muy grande de agua con la consecuente pérdida de sólidos (fibra, gluten y almidón no recuperables). En este caso la pérdida de la aflatoxina en el efluente de lavado final del almidón fue del orden del 63%, lo que implica que los sólidos pudieran arrastrar toxina adsorbida sobre las partículas.

Por otra parte, la mayoría de las micotoxinas son termo resistentes, por lo que se requieren temperaturas elevadas para su destrucción. En el caso de AFB<sub>1</sub> son necesarias temperaturas superiores a 150°C (Gimeno y Martins, 2004). A estas temperaturas las propiedades organolépticas de los alimentos se modifican, por lo que la eliminación de aflatoxinas mediante la aplicación de temperaturas elevadas no es factible. Debido a que en el proceso de obtención de almidón y jarabe fructosado la temperatura más elevada a la cual es sometido el producto es de 95°C no se logra eliminar a la toxina.

Si, como parecen indicar los experimentos realizados en esta investigación, las aflatoxinas se retienen en el carbón activado usado para purificar el producto sacarificado, al ser éste “regenerado” a altas temperaturas (485°C) (Hernández y Harriott, 1976), estos compuestos tóxicos sí podrían ser eliminados o transformados en compuestos menos tóxicos. En este

proceso de regeneración o disposición final del carbón que ya no pueda activarse deberían quemarse los otros subproductos que contienen aflatoxinas como las aguas residuales y la “fibra” (germen, cascarilla y fibra).

## Capítulo 5

### Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados en esta investigación de:

- Montar una metodología analítica que permita identificar y cuantificar la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub> en cada una de las operaciones unitarias que involucra la producción de jarabe fructosado a partir de almidón de maíz.

y

- Establecer las condiciones para la producción de jarabe fructosado a escala de laboratorio a partir de maíz.

Las conclusiones derivadas del análisis y discusión de los resultados obtenidos en esta investigación son las siguientes:

- Se pudo montar una metodología analítica que permitió identificar y cuantificar a la AFB<sub>1</sub> a lo largo del proceso de obtención de jarabe fructosado a partir de maíz en grano fortificado con una solución estándar de AFB<sub>1</sub> a tres diferentes concentraciones (2, 20 y 200 microgramos de AFB<sub>1</sub> por kg de grano) en las operaciones unitarias seguidas para producir almidón y de éste jarabe de fructosa.
- Los resultados obtenidos en este trabajo son solamente válidos para las condiciones bajo las cuales se obtuvieron, por lo que no se pueden ni deben extrapolar a nivel industrial.
- Se establecieron las condiciones para la producción de jarabe de fructosa a partir de almidón de maíz empleando enzimas grado industrial.
- Se observó la reducción paulatina de la AFB<sub>1</sub> a lo largo del proceso de obtención de almidón y del proceso de producción de jarabe de fructosa.
- En el proceso de obtención de almidón, se pierde casi 81% de la AFB<sub>1</sub> con los subproductos de las operaciones unitarias involucradas, permaneciendo poco menos

de un 20% en el almidón. Estos subproductos deberán ser tratados para evitar que contaminen cuerpos receptores y, evidentemente, no podrían ser usados como alimentos.

- Para las operaciones unitarias de hidrólisis se identificó como un paso crítico el empleo de carbón activado para purificar el producto hidrolizado final, ya que en éste se tiene la eliminación de prácticamente toda la AFB<sub>1</sub> de la solución de glucosa.
- El carbón activado deberá ser regenerado a condiciones tales que garanticen la eliminación de la AFB<sub>1</sub> y la formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O como productos finales

## Recomendaciones

Con la finalidad de que en un futuro se afine esta primer aproximación, es necesario realizar las siguientes observaciones o recomendaciones:

- Durante este proceso de regeneración parte del carbón va perdiendo efectividad y, eventualmente, ya no es útil. En este punto podría contemplarse su calcinación con los subproductos contaminados para eliminar la AFB<sub>1</sub>.
- Realizar un estudio de la cinética de absorción y/o adsorción - desorción de la AFB<sub>1</sub> en carbón activado a fin de evitar que la AFB<sub>1</sub> retenida pase al producto final
- En este estudio se tomó como analito modelo la AFB<sub>1</sub>; sin embargo, resulta pertinente realizar el análisis de las cuatro aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), legislada en México e, incluso, metabolitos como aflatoxicol y aflatoxinas P<sub>1</sub> y Q<sub>1</sub>, debido a su toxicidad
- Es pertinente realizar un estudio en el cual se realice un muestreo directo en un proceso industrial a fin de corroborar los datos obtenidos a nivel de laboratorio

- Con base en la literatura, que muestra fehacientemente el efecto negativo de la ingestión de aflatoxinas, proponer a la autoridades correspondientes la reducción de los niveles tolerables en alimentos para consumo humano. En la normatividad actual (NOM-188-SSA1-2002), se permiten  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , que resultan ser los niveles que permiten los Estados Unidos de América. La normatividad de la Comunidad Europea permite  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Sin embargo, estudios recientes (Carvajal *et al.*, 2004), demostraron que niveles de  $10 \mu\text{g}$  de  $\text{AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$  son capaces de tener efectos mutágenos en *Salmonella typhimurium* Ta-98, por lo que debe considerarse seriamente la reducción de los niveles permisibles
- Se sugiere realizar una investigación enfocada a determinar y cuantificar las cuatro aflatoxinas, legisladas en México, en cada uno de los subproductos de maíz como fibra, germen y gluten, así como en productos elaborados con estas materias primas.

## Anexo 1

### A1.0. Áreas cromatográficas obtenidos en el análisis por cromatografía de líquidos de las muestras analizadas

En las siguientes tablas se muestran las áreas cromatográficas empleadas para determinar la concentración de AFB<sub>1</sub> en cada una de las muestras analizadas.

**Tabla A1.1. Áreas cromatográficas de la muestra contaminada con 199.76 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>**

Inyección	Áreas cromatográficas				
	Maíz	Fibra	Almidón	α-amilasa	Glucoamilasa
1	723271	5330454	1291097	277492	357603
2	723160	5341689	1283529	276036	358450
3	727229	5326370	1299108	274399	356088
Promedio	724553.33	5332837.67	1291244.67	275975.67	357380.33
Desviación estándar	2317.86	7932.80	7790.55	1547.38	1196.64
%CV	0.32	0.15	0.60	0.27	0.16

**Tabla A1.2. Áreas cromatográficas de la muestra contaminada con 19.82 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>**

Inyección	Áreas cromatográficas				
	Maíz	Fibra	Almidón	α-amilasa	Glucoamilasa
1	953271	383583	186763	97647	98090
2	953166	389156	187542	89547	69445
3	957229	384267	185394	89466	70483
Promedio	954555.33	385668.67	186566.33	92220.00	79339.33
Desviación estándar	2316.06	3039.42	1087.42	4700.10	16246.85
%CV	0.24	0.79	0.58	5.10	20.48

**Tabla A1.3. Áreas cromatográficas de la muestra contaminada con 20.23 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>**

Inyección	Áreas cromatográficas				
	Maíz	Fibra	Almidón	α-amilasa	Glucoamilasa
1	975231	621982	305451	67854	68254
2	971150	615193	302522	78532	74963
3	974823	629198	306800	69718	79867
Promedio	973734.67	622124.33	304924.33	72034.67	74361.33
Desviación estándar	2247.66	7003.58	2187.09	5703.52	5829.83
%CV	0.23	1.13	0.72	7.92	7.84

---

---

## Anexo 2

# Manejo de residuos

### A2.1 Datos generales de la AFB<sub>1</sub>

Material extremadamente peligroso, sus efectos son fatales aun en concentraciones muy bajas. La AFB<sub>1</sub> puede ser absorbida por la piel, inhalada o por ingesta. Las aflatoxinas son potentes carcinógenos. Su uso debe ser controlado y exclusivo para investigación. Sinónimos: (metabolito tóxico de *Aspergillus flavus*.) aflatoxina B<sub>1</sub> de *Aspergillus flavus*; aflatoxina B(1) de *Aspergillus flavus*; 2,3,6a-alfa,9a-alfa-tetrahidro-4-metoxiciclopenta[c]furo[2',3':4,5]furo[2,3-h]cromona-1,11-diona

Usos: estudios de carcinogénesis

Formula molecular: C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

CAS No: 1162-65-8

#### A2.1.2. Datos físicos

Apariencia: sólido

Punto de fusión: 268 - 269 C

#### A2.1.3. Estabilidad

Estable, incompatible con agentes oxidantes fuertes. Puede presentar sensibilidad a la luz y al aire.

#### A2.1.4. Datos toxicológicos

El compuesto es extremadamente toxico por:

- Inhalación.
- Contacto con la piel.
- Por ingestión.
  
- Puede causar cáncer.
- Puede causar daño genético hereditable.

En la Tabla A2.1, se muestra la dosis letal media para AFB<sub>1</sub> en algunos animales de laboratorio. Se puede observar que dosis muy bajas de 0.4 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal provocan la muerte en conejos.

**Tabla A2.1. Valores de DL<sub>50</sub> para AFB<sub>1</sub> en roedores**

Vía de administración	Especie	DL <sub>50</sub>
Oral	Raton	9 mg kg <sup>-1</sup>
Oral	Conejo	0.4 mg kg <sup>-1</sup>
Oral	Rata	0.48 mg kg <sup>-1</sup>

## A2.2. Tratamiento de residuos, visión general

En esta investigación se generan diversos residuos sólidos y líquidos. Dichos residuos se clasifican con base en su grado de toxicidad y se les somete a tratamiento para su estabilización y disposición final.

El objetivo de este anexo fue el de establecer los lineamientos par realizar la estabilización de los residuos que se generaron durante el desarrollo experimental de la investigación, así como realizar la descontaminación diaria de todos los materiales de vidrio, consumibles, equipo y área de trabajo utilizados, así como los procedimientos a seguir en caso de derrames y remanentes de extractos de las muestras que contengan AFB<sub>1</sub>.

Para realizar el trabajo de investigación, la descontaminación y la limpieza siguen las normas de seguridad establecidas por el Reglamento de Higiene y Seguridad para los Laboratorios de la Facultad de Química de la UNAM. Para ello, se debe cumplir con el uso de equipo de protección como son bata, guantes impermeables, máscara anti-polvos o gases y lentes de seguridad.

También el área de laboratorio seleccionada fue aquella en la que solamente el autor tenía acceso y contaba con luz UV para la descomposición de los residuos que hubieran podido quedar en el aire.

**A2.3. Descontaminación del material de laboratorio**

Todo el material de vidrio utilizado durante el desarrollo experimental y analítico, debe sumergirse en una solución de hipoclorito de sodio, la cual se prepara diluyendo una parte de solución comercial de hipoclorito (con una concentración entre 5 y 6%), con diez partes de agua. Después del tratamiento, el material debe enjuagarse abundantemente con agua corriente, seguido de agua destilada, y dejándolo secar por escurrimiento o en estufa de 90-100°C.

**A2.4. Descontaminación del área de trabajo**

Después del análisis, las superficies de las áreas de trabajo deben limpiarse con una toalla desechable impregnada en solución de hipoclorito de sodio.

**A2.5. Descontaminación de material desechable**

Todo el material desechable, debe sumergirse durante un mínimo de 5 minutos en la solución de hipoclorito de sodio. La solución usada debe eliminarse por el drenaje y los materiales desechables tratados, deben empacarse en una bolsa de plástico sellada para colocarse en el depósito de desechos. Los desechos son considerados residuos peligrosos por la posible presencia de la toxina a niveles traza que no se hubiera degradado con la solución de hipoclorito de sodio.

**A2.6. Tratamiento de derrames**

Los derrames de soluciones de AF deben tratarse inmediatamente con hipoclorito de sodio, vertiéndolo directamente del envase, recoger los líquidos con un papel absorbente, el cual también se colocará en una bolsa de plástico.

**A2.7. Tratamiento de remanentes de extracto de muestras**

Una vez que se ha separado una alícuota del extracto de la muestra es frecuente que permanezca un remanente del mismo. Estos restos de extractos deben tratarse con una cantidad de hipoclorito de sodio equivalente a la unidad de volumen del residuo a tratar.

Los líquidos resultantes se deben acumular en un recipiente para desechos líquidos y eliminarse en un lugar destinado especialmente para éstos (Marambio y Salinas, 1998; NOM-188-SSA1-2002).

### A2.8. Tratamiento de equipos analíticos

Una vez que se han terminado de emplear los equipos analíticos es necesario hacer pasar un flujo de metanol o acetonitrilo por un periodo de 30 minutos, a fin de eliminar cualquier remanente de la aflatoxina. Los efluentes obtenidos se deben disponer en frascos de vidrio perfectamente identificados para su disposición.

En las Figuras A2.1 y A2.2 se muestran los puntos de generación de residuos en el proceso de obtención de jarabe fructosado a partir de maíz entero. Durante la producción de almidón los residuos son básicamente los subproductos del maíz como fibra, "gluten", germen, agua de remojo. En el caso de que las muestras sean adicionadas con AFB<sub>1</sub>, estos subproductos deben ser considerados como residuos peligrosos y tratados con hipoclorito de sodio.

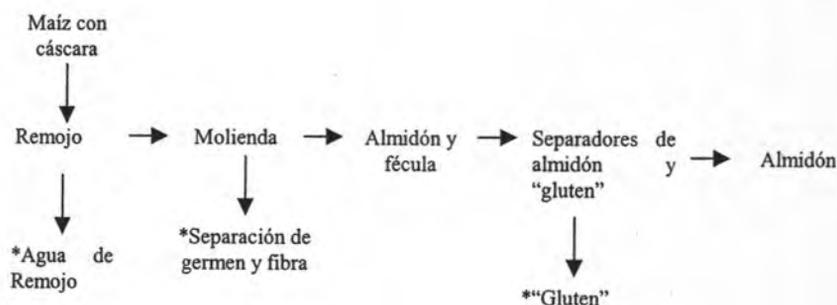
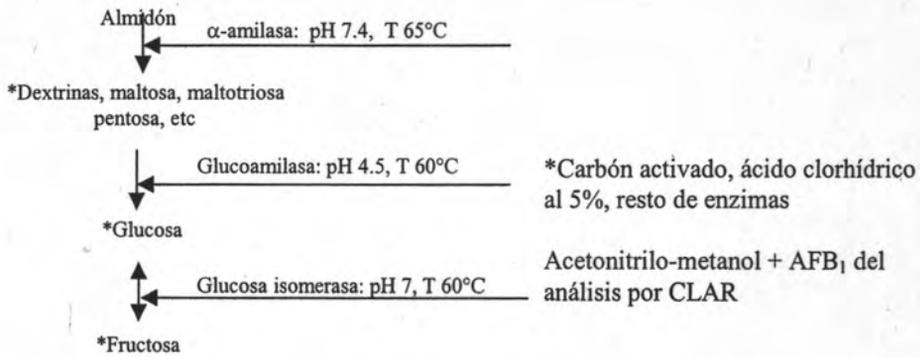


Figura A2.1. Diagrama de generación de residuos en la producción de almidón de maíz



**Figura A2.2. Generación de residuos en la producción de jarabe de fructosa**

La mayor parte de la generación de residuos ocurre durante la extracción de la muestra y en el análisis cromatográfico, ya que se generan efluentes orgánicos que pueden contener trazas de AFB<sub>1</sub>.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

---

---

## Referencias

1. Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., and Toyoda, M. (2001). Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932:153-157.
2. Anónimo (2003). Tomado de las redes internacionales. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/agricu/publicaciones/aceite/proindes.html>
3. Araguás, C., González-Peñas, E., and López-de-Ceraín, A. (2005). Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chemistry*, 92:459-464.
4. AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. 13th Ed. Washington, D.C. EEUU. 211-221p.
5. AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed. Washington, D.C. EEUU. 1184-1199p.
6. Awney, H. A., Attih, A. M., Habib, S. L., and Mostafa, M. H. (2002). Effect of melatonin on the production of microsomal hydrogen peroxide and cytochrome P-450 content in rat treated with aflatoxin B<sub>1</sub>. *Toxicology*, 172:143-148.
7. Bata, A., and Lásztity, R. (1999). Detoxification of mycotoxins-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10:223-228.
8. Bender, G.T. (1992). *Métodos instrumentales de análisis en química clínica*. 2ª ed. Acribia, Zaragoza, España. 187-209p.
9. Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., and Mañes, J. (2004). Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local market and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Additives and Contaminants*, 21(2): 165-171.
10. Bonifaz, A. (2002). *Micología médica básica*. 2ª ed., Méndez Editores, México, D.F., México. 471-475p.
11. Bravo, V., Jurado, E., Luzón, G., and Cruz, N. (1998). Kinetics of Fructose-Glucose Isomerization with Sweetzyme Type A. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 76:778-783.
12. Bray, G.A., Nielsen, S.J., and Popkin, B.M. (2004). Consumption of high – fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:537-543.
13. Burgess, R.R., and Thompson, E.N. (2002). Advances in gentle immunoaffinity chromatography. *Biotechnology*, 13:304-308.

14. Carvajal, M., Rojo, F., Méndez, I., and Bolaños, A. (2003a). Aflatoxin B<sub>1</sub> and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: The situation in Mexico. *Food Additives and Contaminants*, 20 (11):1077-1086.
15. Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo, F., and Méndez, I. (2003b). Aflatoxin M<sub>1</sub> in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *Journal of Food Protection*, 66 (10):1885-1892.
16. Carvajal, M., Espinosa-Aguirre, J.J., Moctezuma, M.G., Gonsebatt, M.E., Rojo, F., and Pérez-López, I. (2004). Minimal amount of aflatoxin b<sub>1</sub> to produce a mutation in the Ames test with *Salmonella thyphimurium* Ta-98. *Revista Mexicana de Micología*, 19:71-79.
17. Castillo-Urueta, P., García-Gómez, R.S., y Durán-de-Bazúa C. (2004). Aflatoxinas en maíz amarillo usado para elaborar jarabes de fructosa: ¿Existen riesgos para la salud? *Industria Alimentaria*, 26(4):28-35.
18. Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V., and Bereton, P. (2004). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxins A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1059:13-16.
19. Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., and Dossena, A. (2001). New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography A*, 937:31-40.
20. Crabb, W.D., and Mitchinson, C. (1997). Enzyme involved in the processing of starch to sugars. *Trends in biotechnology*, 15:349-352.
21. Crabb, W.D., and Shetty, J.K. (1999). Commodity scale production of sugars from starches. *Microbiology*, 2:252-256.
22. DOF. (2002). Diario Oficial de la Federación. NOM-188-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. México, D.F., México. Martes 15 de octubre. 22-41p.
23. D'Mello, J.P.F., and Macdonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69:155-166.
24. Egal, S., Hounsa, A., Gong, Y.Y., Turner, P.C., Wild, C.P., Hall, A.J., Hell, K., and Cardwell, K.F. (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, Artículo en prensa disponible en [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

25. Enomoto, A., Kamata, N., and Nakamura, K. (1994). Antibodies elicited by the primary response are useful as ligands for immunoaffinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(2):1008-1013.
26. Estivil, T.G. (2004). Anticuerpos monoclonales, tecnologías en desarrollo. En internet:<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS34/m monoclon34.html>
27. FAO: (1991). Food for the Future. Food, nutrition and agriculture No. 1. En internet: <http://www.fao.org/docrep/U3550T/U3550T00.htm>
28. FDA. (2000). Food Drug Administration. Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. U. S. Food and Drug Administration, Industry Activities Staff Booklet. En internet:<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html>
29. Ferrer, I., and Barceló, D. (1999). Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 8(3):180-192.
30. Gagné, I., Matsuura, T., and Duvnjak, Z. (2002). Enhanced high fructose syrup production by a hybrid fermentation/pervaporation system using a silicone rubber hollow fiber membrane module. *Separation science and technology*, 37(9):2055-2075.
31. Galen, W.E. (1985). *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. Mc. Graw-Hill International Edition, Nueva York, EEUU.
32. García, G. A., Martínez, F. R., y Melgarejo, H. J. (2001). Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el estado de Sonora, 1998: Informe técnico. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 72(2):187-193.
33. Gimeno, A. y Martins, M. L. (2004). Riesgos de micotoxicosis que algunas micotoxinas (como contaminantes de los alimentos) pueden provocar en humanos. Artículo técnico publicado en Ergomix. En Internet: <http://www.ergomix.com/nuevo/prueba/micotoxinas1.asp?valor=366>.
34. Guzmán, D. P. (2001). Mitos y realidades de las aflatoxinas. *Avance y perspectiva*, 20:415-420.
35. Hernández, L.A., and Harriott, P. (1976). Regeneration of powdered active carbon in fluidized bed. *Environmental Science and Technology*, 10(5):454-457.

36. Holcomb, M., Wilson, D.M., Trucksess, M.W., and Thompson, H.C. (1992). Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *Journal of Chromatography*, 659:127-137.
37. IARC (2002). International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations. 82:171. En internet: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol82/82-04.html>
38. INNSZ (1996). Tablas de uso práctico del valor nutricional de los alimentos de mayor consumo en México. Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Ed. Pax México. México, D.F., México. 12p.
39. Jaimez, J., Fuente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., and Mahuizer, G. (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 882:1-10.
40. JOINT-FAO/WHO (2001). JOINT FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Fifty-sixth meeting. Summary and conclusions. 2-33p.
41. Knasmüller, S., Bresgen, N., Kassier, F., Mersch-Sundermann, V., Gelderblom, W., Zöhrer, E., and Eckl, P.M. (1997). Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B<sub>1</sub>, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutation Research*, 391:39-48.
42. Kok, W. Th. (1994). Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659:127-137.
43. Kussak, A., Andersson, B., and Andersson, K. (1995). Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatography determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> and Q<sub>1</sub> in urine. *Journal of Chromatography B*, 672:253-259.
44. Kussak, A., Andersson, B., Andersson, K., and Nilsson, C.A. (1998). Determination of aflatoxicol in human urine by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography. *Chemosphere*, 36(8):1841-1848.
45. Lakowicz, J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy. 2<sup>a</sup> Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York, EEUU. 298-310p.
46. Lawrence, F.J., Ménard, C., Hennion, M-C., Pichon, V., LeGoffic, F., and Durand, N. (1996a). Evaluation of immunoaffinity chromatography as a replacement for organic solvent clean-up of plant extracts for the determination of triazine herbicides by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 752:147-154.

47. Lawrance, F.J., Ménard, C., Hennion, M-C., Pichon, V., LeGoffic, F., and Durand, N. (1996b). Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant material. *Journal of Chromatography A*, 732:277-281.
48. Lawrence, J.F., and Menard, C. (2001). Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922:111-117.
49. Leeson, S., Diaz, G., and Summers, J. (1995). *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. University Books, Ontario, Canadá. 249-297p.
50. Lerda, D., Biaggi-Bistoni, M., Peralta, N., Ychari, S., Vazquez, M., and Bosio, G. (2005). Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 43:691-698.
51. Lindner, E. (1995). *Toxicología de alimentos*. 2ª Edición. Acribia S.A. Zaragoza, España. 117-123p.
52. Lippmann, M. (2000). *Environmental Toxicants*. Wiley-Intersciences. Nueva York, EEUU. 401-402p.
53. Long-Lui, L., Charng-Cherng, C., and Wen-Hwei, H. (1998). Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnology Applied to Biochemistry*, 28:61-68.
54. Manahan, S. (2000). *Environmental Chemistry*. Lewis Publishers. Florida, EEUU. Caps. 1-18. 1-582pp.
55. Marambio, E.D., y Salinas, V.M. (1998). *Manual de seguridad para los Laboratorios de la Facultad de Química*. Coordinación de Seguridad, Prevención de riesgos y protección Civil. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., México. 1-4p.
56. Medellín, M.P. (2002). La fructosa es dañina para su salud. *Pulso*, Diario de San Luis. Sección Ideas, marzo 4. San Luis Potosí, SLP., México. 4p.
57. Meyers, R.A. (2001). *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Vol. 13. Wiley. Nueva York. EEUU. 15-23p.
58. MERCOSUR (1994). Reglamento Técnico sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz SGT N° 3/Rec N° 38/9A. Anexo GMC - RES N° 056/94. Incorporada por Resolución MSyAS N° 110 del 4.04.95. En internet: <http://www.mrecic.gov.ar/comercio/mercosur/normativa/resolucion/1994/res5694.htm>

59. Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., and Pfohl-Leszkowics, A. (2005). Analysis of some breakfast cereal on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*, 92: 391-400.
60. Muronetz, V.I., and Korpela, T. (2003). Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790:53-66.
61. Nelson, D.B., Kimbrough, R., Landrigan, P.S., Hayes, A.W., Yang, G.C., and Benanides, J. (1980). Aflatoxins and reye's syndrome: A case control study. *Pediatrics*, 66(6): 865-869.
62. Niedwetzki, G., Lach, G., and Geschwill, K. (1994). Determination of aflatoxins in food by use of an automatic work station. *Journal of Chromatography A*, 661:175-180.
63. Novozymes (2000). Starch isomerization. En internet: <http://www.novozymes.com>. Consultada por última vez, 23 junio de 2004.
64. Otta, K.H., Papp, E.; and Bagócsi, B. (2000). Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 882:11-16.
65. Palmgren, M.S., and Hayes, A.W. (1987). Aflatoxins in Food; Micotoxins in foods. *Food Science and technology A series of monographs* Ed. Academic Press. San Diego, EEUU. 65-95p.
66. Paliwal, R.L. (2004). El maíz en los trópicos: Usos del Maíz. Deposito de documentos de la FAO. En internet: [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/DOCREP/003/X7650S/x7650s08.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/003/X7650S/x7650s08.htm) Consultada por última vez, Agosto de 2004.
67. Papp, E., H-Otta, K., Záray, G., and Mincsovic, E. (2002). Liquid chromatography determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73:39-46.
68. Park, J.W., Kim, E.K., and Kim, Y.B. (2004). Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B<sub>1</sub> through food consumption. *Food Additives and Contaminants*, 21(1): 70-75.
69. Peña, S.D. y Durán, M.C. (1990). Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo*, XVI(94):61-70.
70. Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y., and Chung, Y.J. (2004). Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters*, 153:61-73.

71. Phillips, T.M., and Krum, J.M. (1998). Recycling immunoaffinity chromatography for multiple analyte analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 715:55-63.
72. Pohland, A.E., and Wood, G.E. (1987). Occurrence of Mycotoxins in Food; Mycotoxins in foods. Food Science and technology A series of monographs. Ed. Academic Press. San Diego, EEUU. 35-45p.
73. Berkhout, F. (1976). The Manufacture of maize starch in Starch production technology. (Radley, J.A editor) Applied Science publishers, LTD. Londres, Inglaterra. 109-123p.p
74. Rastogi, S., Das, M., and Khanna, S.K. (2001). Quantitative determination of aflatoxins B1-oxime by column liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 933:91-97.
75. Richardson, H.T., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J.M., Robertson, D.E., and Miller, C. (2002). A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. *The journal of biological Chemistry*, 277(29):26501-26507.
76. Robledo, M.L., Marín, S., and Ramos, A. J. (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*, 18:141-144.
77. Romero, F., Quinehua, E., and Quinehua, C. (2000). Actividad contráctil del músculo papilar cardiaco y conducto deferente de rata inducida por veneno de la araña *Latrodectus mactans* de Chile. *Gayana (Concepc.)* 64(2):161-170.
78. SAGPYA., Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (2005). Molienda húmeda. República de Argentina. En internet: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/prensa/publicaciones/maiz/pag22.php>. Revisada por última vez, el 17 de febrero de 2005.
79. Scott, P.M. (1996). Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of AOAC International*, 79(4):875-882.
80. Sendra, J. Ma. y Carbonell, J. V. (2005) Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA/CSIC) En la web: <http://www.alfa-editores.com/bebidas/Abril%20-%20Mayo%2005/TECNOLOGIA%20Evaluacion%20de.htm>
81. Sharma, M., and Márquez, C. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology*, 93:109-114.

82. Shenasi, M., Aidoo, K.E., and Candlish, A.A.G. (2002). Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 79:113-119.
83. Simon, P., Delsaut, P., Lafontaine, M., Morele, Y., and Nicot, T. (1998). Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of aflatoxin M1. *Journal of Chromatography B*, 712:95-104.
84. Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A. (2000). *Principios de análisis instrumental*. 5ª ed., McGraw-Hill. Madrid, España. 730-755. 785-828p.
85. Slominska, L., Wisniewska, D., and Grzeskowiak, A. (2003). Liquefaction of starch by thermostable alpha-amylase. *Technologia Alimentaria*, 2 (2): 17-26.
86. Steciow, M. (2003). Aflatoxinas. Tomado de las redes internacionales En internet:<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Aflatox.htm>.
87. Stöcklein, W., Warsinke, A., Micheel, B., Kempter, G., Höhne, W., and Scheller, F.W. (1998). Diphenylurea hapten sensing with monoclonal antibody and its Fab fragments: Kinetic and thermodynamic investigations. *Analytica Chimica Acta*, 362:101-111.
88. Stroka, J., and Anklam, E. (2002). New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(2): 90-95.
89. Stroka, J., Otterdijk, R., and Anklam, E. (2000). Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A*, 904:251-256.
90. Tester, R.F., Karkalas, J., and Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal science*, 39:151-165.
91. Thompson, N.E., Foley, K.M., and Burges, R.R. (2004). Antigen-binding properties of monoclonal antibodies reactive with human TATA-binding protein and use in immunaffinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 36:186-197.
92. Urraca, J.L., Marazuela, M.D., and Moreno-Bondi, M.C. (2004). Analysis for zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 524: 175-183.
93. van der Maarel, M.J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94:137-155.

94. Walters, R.R. (1985). Affinity Chromatography. Analytical Chemistry, 57(11):1099A-1113A.
95. Wehry, E.L. (1981). Modern fluorescence spectroscopy. Plenum Press. Nueva York, EEUU. 325-357p.
96. Willard, H. H. (1988). Instrumental Methods of Analysis. 7<sup>a</sup> Ed. Wodsworth Publishing Company, San Diego. EEUU. 197-222, 465-512p.
97. Williams, J., y Wilson, D. (1999). Informe sobre el problema de aflatoxinas de la castaña (*Bertholletia excelsa*) en Bolivia: Documento Técnico 71/1999. Universidad de Georgia, USAID/Bolivia. 4-7p.