



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto de algunos factores de proceso sobre la degradación de la metilamina, uno de los subproductos del ditiocarbamato de sodio utilizado como agente biocida contra *Leuconostoc mesenteroides* en los ingenios azucareros, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
FÁTIMA BONILLA VIDAL



MÉXICO, D. F.,

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	QFB. Silvia de Jesús Mendoza Arellano
VOCAL	QFB. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
SECRETARIO	Dra. Marisela Bernal González
PRIMER SUPLENTE	Dr. Martín Daniel Trejo Valdez
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorios 301, 302, 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marisela Bernal González

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUSTENTANTE:

Fátima Bonilla Vidal

Índice

	Pág.
Glosario	i
Resumen	iii
1. Problemática	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos particulares	3
1.4. Hipótesis	3
2. Antecedentes	4
2.1. Panorama nacional de la producción de azúcar	4
2.2. Microorganismos presentes en la caña y su origen	7
2.3. Formación de dextranas	7
2.4. Proceso de elaboración del azúcar	9
2.4.1. Labores de quema, cosecha y corte	9
2.4.2. Quema	9
2.4.3. Corte	10
2.4.4. Molienda	11
2.4.5. Clarificación	12
2.4.6. Evaporación	12
2.4.7. Cristalización	12
2.4.8. Centrifugación	13
2.4.9. Secado, enfriado y envasado	13
2.5. Biocidas utilizados en la industria azucarera	14
2.5.1. Metil ditiocarbamato de sodio (metam-sodio) y sus productos de degradación	14
2.6. Aminas alifáticas	16
2.6.1. Efectos toxicológicos de las aminas alifáticas	17
2.6.2. Formación de nitrosaminas	18

2.7. Metilamina (MA)	18
2.7.1. Propiedades fisicoquímicas	19
2.7.2. Interacción en el medio ambiente	20
2.7.3. Toxicidad	20
2.7.4. Límites máximos permitidos en alimentos y ambiente laboral	22
2.7.5. Absorción de la metilamina	23
2.7.6. Reactividad de la metilamina	25
2.8. Cinética de reacción	27
3. Fundamentos analíticos	29
3.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	29
3.1.1. Cromatografía de fases químicamente unidas	29
3.2. Instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución	30
3.2.1. Detector de fluorescencia	32
3.3. Reacción de derivatización	32
3.4. Extracción en fase sólida (EFS)	34
3.5. Metodologías reportadas para el análisis de aminas alifáticas	35
3.5.1. Preconcentración y derivatización en cartuchos C ₁₈	35
4. Metodología	38
4.1. Equipo y materiales	38
4.2. Reactivos	38
4.2.1. Preparación de soluciones	39
4.3. Análisis de metilamina	40
4.3.1. Derivatización y EFS de la metilamina	41
4.3.1.1. Derivatización y EFS de la metilamina en agua	41
4.3.1.2. Derivatización y EFS de la metilamina en jugo	42
4.3.2. Condiciones cromatográficas	42
4.4. Determinación del tiempo de retención (t_R) y de los límites de detección (L_d)	43
4.5. Elaboración de curvas patrón	44
4.6. Tratamiento de la muestra	44

4.7.	Diseño experimental	44
4.7.1.	Evaluación de la degradación de la metilamina	45
4.7.2.	Cinética de degradación	46
4.8.	Porcentaje de recobro (%R)	46
4.9.	Análisis estadístico	47
5.	Resultados	48
5.1.	Identificación y cuantificación de la MA	48
5.1.1.	Tiempo de retención t_R de la metilamina	49
5.1.2.	Límites de detección (L_d)	50
5.1.3.	Curvas de calibración	50
5.2.	Precisión	53
5.3.	Degradación de la MA	53
5.3.1.	Degradación en agua	54
5.3.2.	Degradación en jugo	55
5.4.	Análisis estadístico de la influencia de los factores en la degradación	57
5.5.	Porcentaje de recobro	59
6.	Conclusiones	61
7.	Recomendaciones	64
	Anexos	65
A.1.	Lavado de material de vidrio	65
A.2.	Lavado de cartuchos C_{18}	66
A.3.	Disposición de los residuos generados durante la investigación	67
A.4.	Datos de área bajo la curva para la curva de calibración de la metilamina en agua	68
A.5.	Datos de área bajo la curva para la curva de calibración de la metilamina en agua	69
A.6.	Tabla para análisis de varianza	70
	Bibliografía	71

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Producción nacional de azúcar de la Zafra 2011/2012 (CONADESUCA/ SAGARPA, 2013)	5
Tabla 2. Parámetros de eficiencia de la producción de azúcar: Zafra 2011/2012 (CONADESUCA/ SAGARPA, 2013)	6
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la metilamina (Praxair, 2008)	19
Tabla 4. Rango de toxicidad aguda (Valle y Lucas, 2000)	21
Tabla 5. Valores de LC ₅₀ y LD ₅₀ de la metilamina	21
Tabla 6. Límites máximos de exposición a la MA en una jornada laboral	23
Tabla 7. Compuestos de fluorescencia natural (MN CN, 2012)	32
Tabla 8. Técnicas reportadas para el análisis de aminas alifáticas	36
Tabla 9. Equipo y materiales con especificaciones técnicas	38
Tabla 10. Reactivos y disolventes utilizados	39
Tabla 11. Condiciones cromatográficas para el análisis de la MA	43
Tabla 12. Diseño experimental	45
Tabla 13. Comparación de metodología para la preconcentración de la metilamina	48
Tabla 14. Tiempo de retención y límite de detección de la metilamina en diferentes matrices	50
Tabla 15. Regresión lineal de las curvas patrón de la MA	52
Tabla 16. Análisis estadístico del punto medio de las curvas patrón	53
Tabla 17. Cinética de degradación de la metilamina en agua	54
Tabla 18. Cinética de degradación para cada experimento con la metilamina en jugo de caña	57
Tabla 19. Análisis de varianza para la degradación de metilamina	57
Tabla 20. Contribución porcentual de cada factor sobre la degradación	59
Tabla 21. Porcentaje de recobro de la metilamina en jugo de caña	59

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Degradación del metil ditiocarbamato en solución neutra, ácida y básica (Wales, 2002)	1
Figura 2. Estados productores de azúcar, con porcentaje de participación (SAGARPA, 2012)	4
Figura 3. Síntesis general de la dextrana a partir de la sacarosa	8
Figura 4. Proceso de elaboración del azúcar	10
Figura 5. Estructura del ditiocarbamato de sodio (Wales, 2002)	15
Figura 6. Degradación del metam-sodio en una solución neutra (LAINCO, 2010)	16
Figura 7. Degradación del metam-sodio en una solución básica (LAINCO, 2010)	16
Figura 8. Degradación del metam-sodio en una solución ácida (LAINCO, 2010)	16
Figura 9. Estructura química de la metilamina (Parmeggiani, 1999)	19
Figura 10. Clasificación de amino-oxidasas (Hernández-Guillamón, 2005)	24
Figura 11. Formación de melanoidinas durante la producción del azúcar (Larrahondo, 1995)	26
Figura 12. Comportamiento de la velocidad según el orden de reacción (Anónimo, 2012a)	28
Figura 13. Esquema de un equipo de CLAR	30
Figura 14. Tratamiento de la muestra mediante EFS (Anónimo, 2012b)	34
Figura 15. Reacción de derivatización de la MA en un medio básico	37
Figura 16. Principales etapas de la metodología	41
Figura 17. Metodología para la determinación del % de recobro	47
Figura 18. Cromatograma de la MA en agua	49
Figura 19. Cromatograma de la MA en jugo de caña	49
Figura 20. Curva de calibración de la MA en agua	51
Figura 21. Curva de calibración de la MA en jugo de caña	51
Figura 22. Curva linealizada de la MA en jugo de caña	52
Figura 23. Curvas de degradación de la MA en agua	54
Figura 24. Curvas de degradación de la MA en jugo de caña	56
Figura 25. Degradación de segundo orden para la MA en jugo	56
Figura 26. Diagrama de Pareto	58

Glosario

ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AO	Aminooxidasa
AOSS	Aminooxidasa sensible a semicarbazida
$C_2H_4NNaS_2$	Metil ditiocarbamato de sodio
$CH_3NH_3^+Cl^-$	Cloruro de metilamonio
CL ₅₀ (LC ₅₀)	Concentración letal media (<i>lethal concentration</i>)
CONADESUCA	Comisión Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar
CS ₂	Disulfuro de carbono
d	Día
d.i.	Diámetro interno
DAO	Diaminooxidasa
DL ₅₀ (LD ₅₀)	Dosis letal media (<i>lethal dose</i>)
FBA	Factor de bioacumulación
FMOC	9-fluorenilmetilcloroformato
g	Gramo
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
ha	Hectárea
HAc-NaAc	Mezcla de ácido bórico y borato de sodio en acetonitrilo
<i>HSL</i>	<i>Hazardus Substance List</i>
k	Rapidez de degradación (orden cero)
k	Rapidez de degradación (segundo orden) (jugo de caña a 25°C expuesto a luz solar)
k _d	Constante de disociación
kg	Kilogramo
k _{oc}	Coefficiente de adsorción
kPa	Kilopascal
L	Litro
LMPE-PPT	Límite máximo permisible de exposición, promedio ponderado en el tiempo. Es la concentración promedio ponderada en tiempo de un contaminante en el ambiente laboral para una jornada de ocho horas diarias y una semana laboral de cuarenta horas a la cual se pueden exponer la mayoría de los trabajadores sin sufrir daños a su salud
log P _{ow}	Coefficiente de reparto
M	Molar
m ³	Metro cúbico
MA	Metilamina
MAO	Mono-amino oxidasa
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minutos
MIT	Metil isotiocianato

MM	Masa molecular
mm	Milímetro
MNCN	Museo Nacional de Ciencias Naturales (España)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramo
NH ₂ R	Amina primaria
NH ₃	Amoníaco
NHR ₂	Amina secundaria
NHR ₃	Amina terciaria
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> (EEUU)
nM	Nanomolar
-N-N=O	Grupo nitroso
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
OSHA	<i>Occupational Safety & Health Administration</i>
PAO	Poliaminaoxidasa
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
Pol	Contenido aparente de sacarosa, expresado como un porcentaje en masa y determinado mediante un método polarimétrico
ppm	Partes por millón
SHHS	<i>Special Health Hazard Substance List</i>
STEL	<i>Short Time Exposure Limit</i>
STPS	Secretaría del Trabajo y Previsión Social (México)
t _{1/2}	Tiempo de vida media
THF	Siglas en inglés para tetrahidrofurano (<i>Tetrahydrofuran</i>)
TMBB-Su	Siglas en inglés para 1,3,5,7 tetrametil-8-(N-hidroxisuccinimidil éster butírico de difluoroboradoza-s-indaceno (<i>1,3,5,7 tetramethyl-8-(N-hydroxysuccinimidyl butyric ester) difluoroboradoza-s-indacene</i>)
ton	Tonelada
t _R	Tiempo de retención
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Letras griegas y otros símbolos

λ	Longitud de onda de máxima absorción
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
°Bx	Contenido de sólidos solubles en agua expresado en porcentaje
°C	Grados Centígrados

Nota: Esta tesis usa el punto decimal

Resumen

En la actualidad el uso del ditiocarbamato de sodio en la industria azucarera es de vital importancia para evitar el desarrollo de microorganismos acompañantes de la caña siendo el más importante: *Leuconostoc mesenteroides*, bacteria causante de la formación de dextranas a partir del azúcar. Estas gomas afectan el proceso bloqueando el paso del jugo de caña a través de los equipos y generando pérdidas significativas de sacarosa. Se ha usado el ditiocarbamato de sodio como desinfectante para eliminar a éste y otros microorganismos. Sin embargo, sus productos de degradación han sido designados como contaminantes tóxicos que, además, se forman fácilmente. Entre ellos se encuentra la metilamina. Este compuesto tiene acción irritante en piel, ojos, mucosa y tracto respiratorio; además de ser considerada un precursor de nitrosaminas, las cuales son cancerígenas. Es por ello que, en esta investigación, se estudió la degradación de la metilamina bajo algunos factores ambientales que ocurren durante la producción del azúcar para poder determinar qué factor o factores tienen mayor contribución en la degradación de la amina durante el procesamiento del azúcar garantizando la inocuidad del producto final. La metilamina fue estudiada mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) previa extracción en fase sólida (EFS) y derivatización del compuesto. Se evaluó el efecto de la matriz (agua, jugo de caña), temperatura (4, 25°C) y la fotólisis (luz y oscuridad) sobre la degradación de la metilamina. Los límites de detección del compuesto fueron de 0.1 µg L⁻¹ en agua y 0.001 µg L⁻¹ en jugo de caña. La metodología utilizada arrojó un porcentaje de recobro del 86.2%. La degradación presentada por el compuesto de interés cuando fue expuesto a la luz solar y a una temperatura ambiente de 25°C presenta, para la matriz de agua, una constante de velocidad de degradación (k) de 0.3110 µg L⁻¹ d⁻¹ y un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 2.57 días y una constante de velocidad de reacción de segundo orden k de 0.7325 L µg⁻¹ min⁻¹ (1055 L µg⁻¹ d⁻¹, más de 3000 veces mayor a la del agua a las mismas condiciones) con un $t_{1/2}$ 125.5 minutos (0.087 d, 30 veces menor que para agua) en la matriz de jugo de caña. El factor matriz (jugo de caña) tuvo un porcentaje de contribución del 66.7% en la degradación del compuesto. Esto pudiera deberse al efecto de la presencia de carbohidratos reductores que reaccionarían con la metilamina formando melanoidinas, hipótesis derivada de esta investigación que se plantea como la continuación de la misma.

Palabras clave: *Leuconostoc mesenteroides*, jugo de caña de azúcar, ditiocarbamato de sodio, metilamina



1. Problemática

1.1. Introducción

En México la industria azucarera es históricamente una de las más importantes, debido a su relevancia económica y social en el campo; genera más de dos millones de empleos, tanto en forma directa como indirecta; se desarrolla en entidades federativas y municipios, generando un valor de producción primaria de alrededor de 30 mil millones de pesos (SAGARPA, 2012). En la producción de azúcar, las dextranas son compuestos indeseables a partir de la sacarosa, sintetizados por microorganismos contaminantes, que provocan pérdidas significativas al incrementar la viscosidad en los fluidos y reducir el recobrado industrial (Rodríguez, 2005). El control de dichos microorganismos contaminantes, principalmente la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, se ejecuta mediante el uso del metil-ditiocarbamato de sodio (metam-sodio), agente biocida que tiene un intervalo de aplicación de 40 a 80 mg L⁻¹ y es agregado de forma continua durante la extracción del jugo, ya que es donde se homogeneiza fácilmente (Villa, 2008). Los productos de degradación del metil-ditiocarbamato de sodio se presentan en la Figura 1. Estos han sido designados como contaminantes tóxicos, por lo que el fungicida de origen está clasificado como de "uso restringido" (Cox, 2006). Asimismo, el autor menciona que puede descomponerse de manera relativamente simple (Cox, 2006).

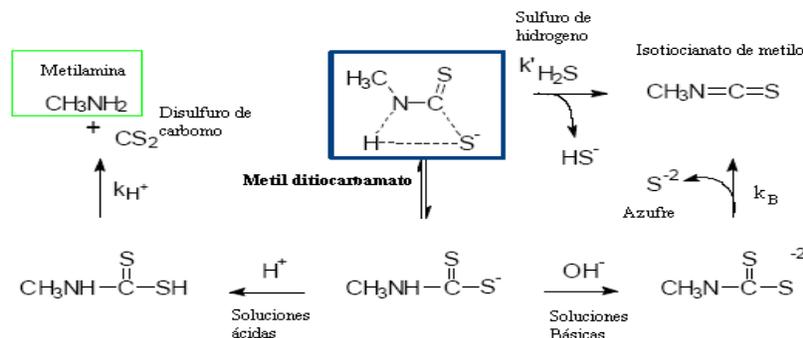


Fig. 1. Degradación del metil ditiocarbamato en solución neutra, ácida y básica (Wales, 2002)



Como se observa en la Figura 1, la metilamina es un compuesto de degradación en condiciones ácidas. Es un compuesto altamente tóxico, sensibilizador e irritante para piel, mucosa, tracto respiratorio y por todas las vías de exposición: inhalación, ingestión y contacto (Sahasrabuddhey *et al.*, 1999; Meseguer Lloret *et al.*, 2004). El análisis del compuesto de interés se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y sobre todo por su eficacia, ya que proporciona datos de tiempo de retención (t_R) que, al compararse con estándares, permiten realizar su identificación (Harris, 2007).

1.2. Justificación

El jugo obtenido durante la molienda tiene un pH ligeramente ácido de 5.2 (Villa, 2008) y como el biocida es agregado de forma continua durante la extracción, en un medio ácido, el metam-sodio, nombre comercial del ditiocarbamato de sodio (Rubin, 2004), se hidroliza, dando como resultado metilamina (CH_3NH_2) y disulfuro de carbono (CS_2) (Wales, 2002). Este compuesto es de gran relevancia ya que figura en la lista de sustancias peligrosas (*Hazardous Substance List*) debido a que está reglamentado por la OSHA (*Occupational Safety & Health Administration*) y también está considerado en la lista de sustancias extremadamente peligrosas para la salud (*Special Health Hazard Substance List*) ya que es inflamable (New Jersey Department of Health, 2004). A nivel nacional es considerado como psicotrópico y precursor químico por la Ley General de Salud y la Ley Federal para el Control de Precursores Químicos (Jiménez, 2012). Por lo anterior resulta de considerable interés su estudio, tanto para evaluar su vida media durante las diferentes condiciones ambientales que ocurren en las primeras operaciones unitarias en un ingenio azucarero: Fotólisis, matriz y temperatura, como para establecer una metodología de detección precisa, exacta y confiable que brinde la seguridad de que el azúcar y principalmente los productos intermediarios del proceso (cachaza, mieles y melaza) son inocuos al no contener metilamina.



1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar la degradación de la metilamina bajo diferentes condiciones ambientales, considerando que ocurren durante la producción del azúcar, determinando su comportamiento bajo dichas condiciones

1.3.2. Objetivos particulares

- Revisar las metodologías analíticas que utilicen la cromatografía de líquidos de alta resolución, para la determinación y cuantificación de la metilamina en matrices acuosas
- Evaluar la degradación de la metilamina bajo los siguientes factores: temperatura, tiempo, fotólisis y matriz
- Identificar qué factor o factores contribuyen en mayor proporción con la degradación de la metilamina
- Investigar el comportamiento de la metilamina en las diferentes matrices
- Determinar los tiempos de vida media de la metilamina así como sus límites de detección en las matrices estudiadas.

1.4. Hipótesis

- La concentración de la metilamina disminuirá al ser expuesta a las condiciones de temperatura, fotólisis, tiempo y matriz presentes en un proceso azucarero.



2. Antecedentes

2.1. Panorama nacional de la producción de azúcar

La industria azucarera en México es muy importante, requiriendo en los últimos diez años una superficie cultivada del orden de 700,000 hectáreas por año, cuya producción alcanza en promedio los 46 millones de toneladas de caña de azúcar y 5 millones de toneladas de azúcar. El estado de Veracruz ocupa el primer lugar a nivel nacional en el cultivo de caña de azúcar (Fig. 2), aportando el 37% de la producción total nacional y de la superficie total cosechada (SAGARPA, 2012).

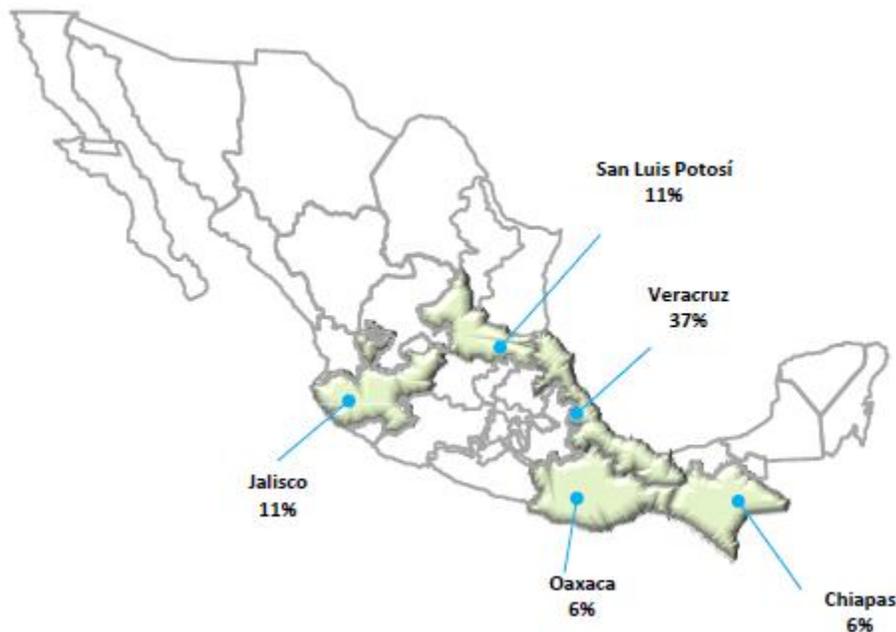


Fig. 2. Estados productores de azúcar, con porcentaje de participación (SAGARPA, 2012)

Los datos de la producción nacional de azúcar para la Zafra 2011/2012 se muestran en la Tabla 1. En ésta se puede observar que, efectivamente, el estado con mayor participación en la producción de azúcar, es Veracruz. Esto se debe a que es el estado con mayor número de ingenios (veintidós ingenios de un total nacional de cincuenta y siete). Sin embargo, el estado con mayor rendimiento de fábrica es Morelos con un 13.46%, es decir, que tiene 2.93% por encima del rendimiento de Veracruz (Tabla 2). Esta diferencia puede deberse además de la



presencia de *Leuconostoc mesenteroides*, a factores físicos tales como largas demoras entre cosecha, el corte y la molienda de la caña de azúcar, ya que permiten la formación de dextrana (Villa, 2008).

**Tabla 1. Producción nacional de azúcar de la Zafra 2011/2012
(CONADESUCA/SAGARPA, 2013)**

Estado	Hectáreas cosechadas (ha)	Caña molida (ton)	Azúcar producida (ton)	Miel producida (ton)	Alcohol producido (miles de L)
Campeche	9,048	426,780	45,891	16,139	np
Colima	15,811	1,303,185	140,442	60,459	np
Chiapas	30,791	2,879,721	336,179	105,645	8,725
Jalisco	68,955	5,904,551	672,219	225,175	2,577
Michoacán	14,599	1,231,929	144,002	48,015	np
Morelos	15,564	1,782,256	239,885	61,800	np
Nayarit	27,983	1,968,302	240,659	79,777	np
Oaxaca	47,350	2,434,609	252,707	130,497	np
Puebla	16,038	1,893,967	241,536	73,344	np
Quintana Roo	28,421	1,587,276	148,238	72,805	np
San Luis Potosí	71,423	2,778,373	310,365	97,560	np
Sinaloa	20,178	1,613,186	143,383	60,692	np
Tabasco	32,374	1,776,030	180,216	67,398	np
Tamaulipas	31,650	1,882,274	186,961	65,265	2,584
Veracruz	273,575	16,768,788	1,765,786	568,804	1,424
Total Nacional	703,7061	46,231,229	5,048,469	1,733,369	15,310

ha: hectárea; ton: Toneladas; L: Litros; np: no producen alcohol



Por lo anterior se observa que las prácticas de manejo que incluyen los tiempos de producción, así como la aplicación de biocidas, en este caso el ditiocarbamato de sodio, determinan la calidad y rendimiento del azúcar producido. La calidad se reconoce en el momento de la molienda por la cantidad de azúcar recuperable o rendimiento que se obtiene por tonelada de caña molida, lo cual depende de características como: alto contenido de sacarosa, bajo contenido de materiales extraños, bajo contenido de sólidos solubles diferentes de la sacarosa y bajos niveles de fibra (Larrahondo, 1995). La calidad de la caña y, por ende, el rendimiento de fábrica es de gran importancia, ya que con ello se está originando que la producción nacional azucarera tenga una mayor participación en el mercado mundial.

Tabla 2. Parámetros de eficiencia de la producción de azúcar; Zafra 2011/2012 (CONADESUCA/SAGARPA, 2013)

Estado	Rendimiento de fábrica (%)	Eficiencia en fábrica (%)	Sacarosa en caña (%)	Fibra en caña (%)
Campeche	10.75	81.31	13.16	13.26
Colima	10.78	82.43	13.03	12.32
Chiapas	11.67	85.02	13.65	12.95
Jalisco	11.38	83.73	13.56	12.91
Michoacán	11.69	84.66	13.76	13.65
Morelos	13.46	85.25	15.70	14.20
Nayarit	12.23	83.78	14.57	13.36
Oaxaca	10.38	83.45	12.42	13.13
Puebla	12.75	84.61	15.10	12.76
Quintana Roo	9.34	77.25	12.05	13.38
San Luis Potosí	11.17	81.27	13.70	14.56
Sinaloa	8.89	80.50	11.00	13.06
Tabasco	10.15	79.34	12.83	13.51
Tamaulipas	9.93	76.34	12.83	13.51
Veracruz	10.53	82.23	12.76	13.50
Total Nacional	10.92	82.36	13.21	13.35



2.2. Microorganismos presentes en la caña y su origen

Los microorganismos presentes en la caña de azúcar proceden del suelo y de las estructuras vegetales en putrefacción. La rizosfera (suelo en interacción con la raíz) contiene una amplia gama de microorganismos, aunque no se sabe si las rizosferas de la caña de azúcar, están asociadas de manera constante con microorganismos específicos. En un estudio (Mayeux y Colmer, 1960) se encontró un elevado número de *Enterobacter* (10^5 UFC/g) en el suelo próximo a la caña y, en menor cuantía, a medida que aumenta la distancia desde el tallo. Aunque no de forma constante, la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* también puede encontrarse en la rizosfera en un número superior a 5×10^3 UFC/ g.

Con el clima húmedo y caluroso, el jugo que exuda de la caña contiene un elevado número de microorganismos, aproximadamente 10^9 UFC de bacterias y 10^6 UFC de levaduras y mohos por gramo, los cuales pueden contaminar la caña al ser cortada (Mayeux y Colmer, 1960; Silliker *et al.*, 1980). La infección de la caña por el insecto *Diatraea saccharalis*, conocido como “borer” y el ataque de roedores favorecen la contaminación microbiana de la gramínea en el campo.

2.3. Formación de dextranas

Las dextranas no son compuestos propios de la caña, el contenido de estos polisacáridos en la caña es muy bajo o casi cero. Su formación ocurre por la acción de la enzima dextranasacarasa de microorganismos contaminantes que se alojan en la savia de la planta o la atacan posteriormente al ser dañada su corteza (Rodríguez, 2005). La bacteria *Leuconostoc mesenteroides* es el principal microorganismo productor de dextranas. Esta bacteria da origen a las dextranas utilizando la sacarosa como materia prima (Fig. 3) y contribuye así, a la pérdida de esta última. Las dextranas son polisacáridos constituidos por unidades de glucosa unidas en forma de cadena recta mediante enlaces α 1-6. Al menos entre 50% y 60% de las uniones deben ser α 1-6 para que el polímero se defina como dextrana, existiendo un amplio rango de masas moleculares entre ellos, ya que oscilan desde unos miles hasta varios millones de unidades de masa molecular.



Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextranasacarasa hidroliza la sacarosa y forma dextranas (Larrahondo, 1995; Rodríguez, 2005; Villa, 2008).

Además de las pérdidas de sacarosa a consecuencia de la formación de dextranas, estos polímeros incrementan la viscosidad de los jugos, creando problemas en los evaporadores y tachos. Junto con el jugo, estas dextranas se extraen en los molinos y contaminan los flujos de la planta procesadora, conocida en unos países como central y en otros como ingenio azucarero, y su nivel en el jugo llega a exceder las 10,000 ppm (1%) en los casos extremos (Rodríguez, 2005). Las dextranas tienen, además, la particularidad de elevar los valores del “pol” (contenido aparente de sacarosa, expresado como un porcentaje en masa y determinado mediante un método polarimétrico), debido a su poder altamente dextro-rotatorio (Larrahondo, 1995).

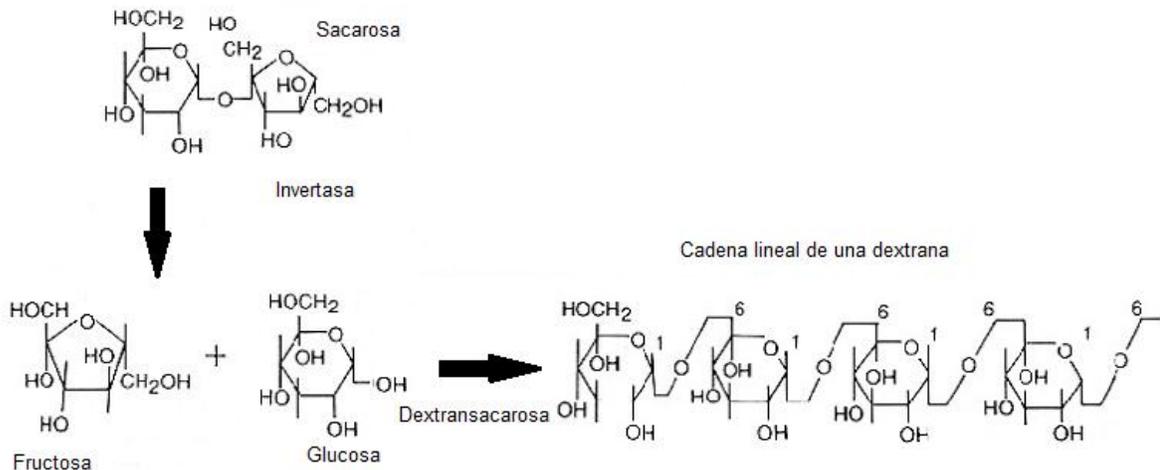


Fig. 3. Síntesis general de la dextrana a partir de sacarosa (Larrahondo, 1995)

En cada molécula de azúcar que se consume se utiliza solamente la fracción de glucosa en la síntesis de dextrana, permaneciendo como subproducto la fructosa, la cual se descompone en ácidos orgánicos y otros productos coloreados que inducen un descenso del pH; lo anterior ocasiona un aumento en la tasa de inversión de la sacarosa por catálisis ácida y contribuye, en consecuencia, al incremento de las pérdidas adicionales de azúcar comercial (Larrahondo, 1995).



Algunos estudios recientes muestran que una cepa de *L. mesenteroides*, aislada en un central de Argentina, durante las primeras 6 horas de crecimiento a 30°C consumió la sacarosa a razón de 8.46 g L⁻¹/ h. El consumo de la sacarosa se redujo con el incremento de la temperatura. Una vez que las dextranas están en el proceso de producción de azúcar, la viscosidad de la solución se incrementa en dependencia de la concentración y de la masa molecular de los polímeros formados, el cual puede oscilar entre 10⁵ y 10⁷ o más (Larrahondo, 1995).

El control de las dextranas en la agroindustria azucarera se ejecuta mediante el riguroso ajuste entre la quema, si ésta se realiza, el corte mecanizado o manual y la entrega de la caña fresca al central. También se emplean las técnicas de saneamiento con vapor del equipamiento productivo cada 8 horas durante el funcionamiento del central azucarero y el uso de biocidas sobre la caña (Rodríguez, 2005).

2.4. Proceso de elaboración de azúcar (Fig. 4)

2.4.1. Labores de campo, cosecha y corte

El proceso productivo se inicia con la adecuación del campo (etapa previa de siembra de la caña). La cosecha empieza cuando los tallos dejan de desarrollarse, las hojas se marchitan y se caen y la corteza se vuelve quebradiza. Esto ocurre aproximadamente 11 ó 16 meses después de la siembra. Posteriormente, se lleva a cabo la quema.

2.4.2. Quema

La operación de la quema tiene como objetivo eliminar las hojas y aumentar la temperatura del tallo de 55 hasta 85°C. Estas temperaturas no destruyen aparentemente las bacterias tolerantes al calor (microorganismos termófilos), ya que éstos se pueden encontrar tras la operación de quemado. *Leuconostoc mesenteroides* ha sido detectado en las cañas aproximadamente con la misma frecuencia antes y después del quemado. Además, se ha observado el rápido aumento del nivel de dextranas en casi diez veces desde las 12 a las 48 horas, de



la quema, hasta alcanzar las 3200 ppm. Cuando *Leuconostoc* y otras bacterias formadoras de ácido se desarrollan en la caña de azúcar recolectada, ésta se vuelve ácida. Se produce azúcar invertida, ácido láctico, acético y principalmente dextranas (Silliker *et al.*, 1980).



Fig. 4. Proceso de elaboración del azúcar. a) siembra; b) quema; c) cosecha manual; d) cosecha mecánica; e) transporte; f) troceado; g) molinos; h) clarificación; i) evaporación; j) centrifugación; k) secado l) envasado (Elaboración propia)

2.4.3. Corte

El corte se puede realizar manual o mecánicamente. Durante este paso *Leuconostoc mesenteroides* es la bacteria láctica que fundamentalmente agrede a la caña. El nivel de exposición del tejido interno de la caña se incrementa con el corte mecanizado, el trozado o por la quema, lo cual provoca la inactivación de las enzimas fenol oxidasas de acción protectora o bactericida en la planta. En la caña



cortada sin trozar, el contenido de las dextranas no excedió de 250 ppm en el jugo, mientras que la caña trozada exhibió mayor velocidad de formación de dextranas, debido a la mayor área de tallos expuestos y, por lo tanto, mayor grado de infección bacteriana. Por otro lado se reportó que en la caña trozada, después de dos horas de acopiada, se observó la infección masiva con *Leuconostoc* y otras bacterias, hasta a seis pulgadas de distancia de los extremos (Larrahondo, 1995).

Posteriormente, las cañas son transportadas al ingenio azucarero y lo ideal es que este tiempo no sea mayor de 36 horas para evitar pérdidas de sacarosa (Chang *et al.*, 2012).

2.4.4. Molienda

Al llegar la caña al ingenio azucarero, pasa a los desfibradores, aparato que se emplea para completar la preparación y la desintegración de la caña y facilitar así la extracción del jugo de la caña (Hugot, 1963). El jugo mixto es un medio ideal para el crecimiento de muchos microorganismos, además tiene °Brix de 10 a 18, un pH de 5.0 a 5.6, abundantes sales orgánicas e inorgánicas, aminoácidos y otros nutrientes y una temperatura media entre 25 a 30°C. El recuento de bacterias del jugo procedente del primer rodillo es de 10^5 a 10^7 UFC/ mL para la caña normal y aproximadamente de 10^8 UFC/ mL para la caña ácida (Silliker *et al.*, 1980). Las condiciones de operación de los molinos y la calidad de la caña contribuyen a las pérdidas de sacarosa que pueden ocurrir por inversión ácida, inversión enzimática e infección microbiana. La inversión ácida comprende la inversión química de la sacarosa en glucosa y fructosa; ocurre en condiciones ácidas; la tasa de inversión se incrementa con pH bajos y altos niveles de temperatura, mientras que la descomposición enzimática resulta por la acción de proteínas, principalmente la invertasa, que actúa como un catalizador para promover la inversión de la sacarosa. La invertasa puede estar presente en la caña de azúcar naturalmente o ser producida por las levaduras *Saccharomyces sp.* y se desactiva a temperaturas superiores a 65°C (Calero *et al.*, 2009). Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextranasacarasa hidroliza



la sacarosa y forma dextranas. La elevada viscosidad de los jugos y la presencia en ellos de dextranas de elevada masa molecular junto con otros sólidos insolubles, obstruyen las mallas filtrantes y provocan pérdidas de los jugos por derrames de los molinos a los drenajes.

2.4.5. Clarificación

El jugo obtenido es ácido (pH aproximado 5.2), opaco y turbio. Mediante tratamiento químico con cal y calentamiento cercano a su punto de ebullición (105°C), se neutraliza. La viscosidad de la solución debida a dextranas, reduce la velocidad de la precipitación de las impurezas, forma incrustaciones, disminuye la eficiencia calorífica del flujo y empobrece, de manera general el proceso. El jugo que proviene de las cañas deterioradas con valores de pH más ácidos, consume mayor cantidad de cal para su neutralización, lo cual le aporta mayor turbiedad y genera mayor volumen de cachaza con características pegajosas que colmatan los filtros prensa (GEPLACEA, 1988).

2.4.6. Evaporación

Durante esta etapa, el jugo clarificado es sometido al proceso de evaporación en tachos al vacío para eliminar la mayor cantidad de agua contenida y obtener la meladura (jarabe). En este paso, la presencia de las dextranas provoca el aumento de incrustaciones en las superficies de calentamiento y, con ello, un mayor gasto energético. El tiempo de cocción de las masas también se incrementa y el agotamiento de éstas se reduce.

2.4.7. Cristalización

Este proceso se lleva a cabo por evaporación, donde se cristaliza la sacarosa y se forma la “masa cocida” (mezcla de cristales y meladura). Si existe la presencia de dextranas provocará un incremento del tiempo de cristalización del azúcar, la masa cocida en los cristalizadores se enfría más de lo apropiado y aumenta aún más la anormal viscosidad del fluido, se incrementan los tiempos de lavado en las centrifugas para alcanzar la calidad requerida del azúcar, así como los tiempos



totales de la centrifugación y de la purga. El azúcar crudo, derivado de tales masas cocidas, es pegajoso, difícil de manipular, secar y envasar. Algunos estudios confirmaron que la calidad de la masa cocida afectó significativamente el rendimiento de los cristales de azúcar, pues se redujo al 86% en el caso de 755 ppm de dextranas en las masas cocidas con 84.3% de pureza. La reducción de la velocidad de cristalización del azúcar se manifiesta específicamente en la disminución de la velocidad de crecimiento del cristal en los ejes *a* y *b*. Es decir, los cristales de azúcar se deforman en el eje *c*, y adquieren una forma alargada con las dextranas ocluidas en ellos. Este cristal, llamado “de aguja”, reduce la eficiencia de la purga de las masas cocidas durante la centrifugación, lo cual provoca la pobre separación del cristal de las mieles y decae la calidad de refinación del azúcar (Cuddihy *et al.*, 1998).

2.4.8. Centrifugación

El proceso de centrifugado, separa el grano (azúcar) del líquido (miel). Después de un giro inicial corto, el azúcar se lava con agua caliente para eliminar residuos de miel. La masa del primer tacho, masa A, al pasar por la centrífuga produce el azúcar A y la miel A. La miel A pasa al segundo tacho donde vuelve a cristalizarse formando la masa B que a su vez se vuelve a separar en las centrífugas. La miel B pasa al tercer tacho donde se repite el proceso. La meladura final, después de separar los granos de la masa C, se llama miel final (melaza) y se comercializa como alimento animal y como base para la destilación de alcohol (Asocaña, 2012).

2.4.9. Secado, enfriado y envasado

El azúcar húmeda se somete a calentamiento, aproximadamente a una temperatura de 60°C, para secarla y reducir su humedad hasta 0.05% aproximadamente para evitar la formación de terrones; posteriormente, es llevada a enfriadores rotatorios para disminuir su temperatura unos 40-45°C, para llevarla finalmente al proceso de envasado (CRC, 2010).



De manera general, las pérdidas generadas por las dextranas oscilan desde 0.35 hasta 8 kg de azúcar por tonelada de caña molida por la presencia de cada 1000 ppm de dextranas en el jugo mezclado. Cualquiera que sea el resultado, es evidente la necesidad de eliminar las dextranas del proceso de producción de azúcar y el método más utilizado es el uso de biocidas.

2.5. Biocidas utilizados en la industria azucarera

El método de control empleado habitualmente en la industria contra los microorganismos y en especial de las bacterias ácido-lácticas como *Leuconostoc sp* es el uso de reactivos químicos; sin embargo, la industria alimentaria o aquella industria que elabora productos de consumo humano se ve en dificultad para el control de microorganismos por reactivos químicos, dado que estos generalmente pueden ser tóxicos al humano o acarrear graves consecuencias al ambiente (Cuervo-Mulet *et al.*, 2010).

Existen productos que se han utilizados o que se recomiendan para su uso en desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar (Villa, 2008). Los más comunes son:

- ✓ Ditiocarbamatos y otros carbamatos
- ✓ Cloruro de benzalconio y otras sales cuaternarias de amonio como bifluoruro de amonio
- ✓ Formaldehído
- ✓ Formalina

2.5.1. Metil-ditiocarbamato de sodio (metam-sodio) y sus productos de degradación

El ditiocarbamato de sodio es ampliamente utilizado en la industria azucarera durante la extracción del jugo de caña debido a su acción inhibitoria de *Leuconostoc mesenteroides*, principal responsable de la formación de dextranas.



Los plaguicidas ditiocarbamatos son compuestos derivados del ácido carbámico que poseen una ligera actividad anticolinesterásica y presentan una gran capacidad para la captación de metales e interacción con radicales sulfhidrilo. Entre estos plaguicidas se encuentra el metam-sodio, cuyo mecanismo de acción se fundamenta en su carácter quelante de ciertos metales que son vitales para el microorganismo. En el caso del dimetilditiocarbamato de sodio se tiene una inhibición competitiva en el desarrollo celular, removiendo el ión férrico del citocromo, deteniendo así la cadena transportadora de energía y causando la muerte del microorganismo (Cremllyn, 1991).

El ditiocarbamato de sodio (Fig. 5) se conoce por una variedad de sinónimos incluyendo: metam, metam-sodio y carbatión. Su fórmula molecular es: $C_2H_4NNaS_2$, con una masa molecular de $129.18 \text{ g mol}^{-1}$. A temperatura ambiente se forma un gas incoloro, con un desagradable olor similar al del disulfuro de carbono. Es corrosivo para el aluminio, cobre, zinc y latón. Es estable en su estado seco y cristalino, y en solución acuosa concentrada (Wales, 2002).

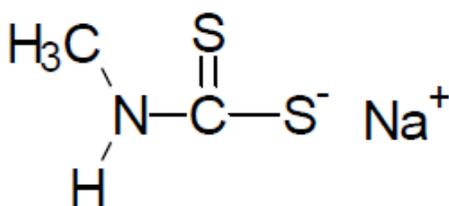


Fig. 5. Estructura del ditiocarbamato de sodio (Wales, 2002)

En dilución acuosa se descompone en el compuesto activo y volátil llamado metil isotiocianato (MIT). El pH de la matriz afecta de manera considerable la descomposición de metam-sodio. Los productos de descomposición varían al variar el pH de la matriz. En pH neutro o ligeramente alcalino se obtiene MIT como producto principal.



En soluciones neutras, el metam-sodio se descompone en metil isotiocianato (MIT) e hidrogenosulfuro de sodio (NaSH):

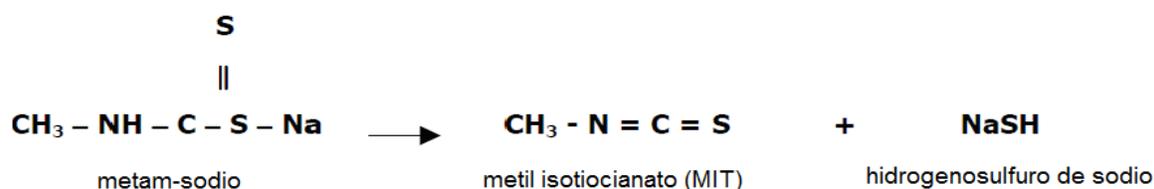


Fig. 6. Degradación de metam-sodio en una solución neutra (LAINCO, 2010)

En soluciones alcalinas diluidas se produce una reacción de oxidación, caracterizada por la formación de azufre elemental (S) y MIT:

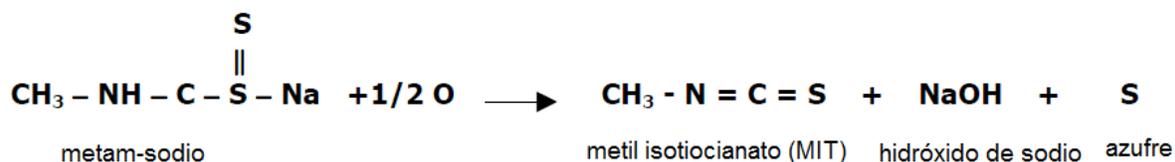


Fig. 7. Degradación de metam-sodio en una solución alcalina diluida (LAINCO, 2010)

En soluciones ácidas se produce una descomposición no oxidativa que inicialmente produce la mitad de MIT del que se forma en la descomposición oxidativa:

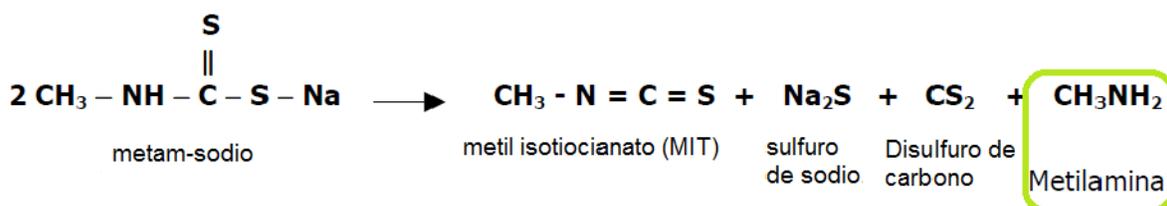


Fig. 8. Degradación de metam-sodio en solución ácida (LAINCO, 2010)

2.6. Aminas alifáticas

Las aminas alifáticas se forman cuando uno o más átomos de hidrógeno del amoníaco (NH₃) son sustituidos por uno, dos o tres radicales alquil o alcohol. Las aminas alifáticas inferiores son gases como el amoníaco y perfectamente solubles en agua, pero los homólogos superiores son insolubles en agua. Todas las aminas



alifáticas son básicas. En función del número de hidrógenos sustituidos, las aminas pueden ser primarias (NH_2R), secundarias (NHR_2) o terciarias (NR_3) (Parmeggiani, 1999).

Las aminas alifáticas de cadena corta son emitidas a la atmosfera o atmósfera a partir de fuentes antropogénicas, tales como las operaciones de ganado en engorda, incineración de residuos, tratamiento de aguas residuales y diversos procesos industriales.

Además de su origen por procesos industriales, las aminas alifáticas pueden generarse como productos de degradación de productos orgánicos, como las proteínas y los aminoácidos u otros compuestos que contienen nitrógeno (Sahasrabuddhey *et al.*, 1999, Meseguer-Lloret *et al.*, 2002, Kumar *et al.*, 2011).

2.6.1. Efectos toxicológicos de las aminas alifáticas

Una preocupación actual es la posibilidad de que algunas aminas alifáticas puedan reaccionar con nitratos o nitritos *in vivo* para formar compuestos nitrosos, muchos de los cuales son cancerígenos potentes en animales (Parmeggiani, 1999).

Las aminas alifáticas y poliaminas son bien conocidas como sustancias con olor parecido al amoníaco y precursoras de N-nitrosaminas, las cuales son cancerígenas. El seguimiento de las alquilaminas es de considerable interés ya que la mayoría son tóxicas, sensibilizadores e irritantes para piel, mucosa, tracto respiratorio y por todas las vías de exposición: inhalación, ingestión y contacto (Sahasrabuddhey *et al.*, 1999, Meseguer-Lloret *et al.*, 2004).



2.6.2. Formación de nitrosaminas

Las nitrosaminas son aminas que contienen un grupo funcional nitroso ($-N-N=O$). Estos compuestos se forman cuando un nitrógeno (N) y un oxígeno (O) de un compuesto “nitrosante” se unen al nitrógeno del grupo amino (N) de un compuesto amínico (Parmeggiani, 1999).

Las nitrosaminas son potentes cancerígenos animales. Las investigaciones bioquímicas, patológicas y experimentales de las nitrosaminas aportan pocos indicios de que la especie humana sea resistente al potencial cancerígeno de las nitrosaminas. Se ha demostrado que los tejidos humanos metabolizan las nitrosaminas para formar compuestos que se unen al ADN, un proceso considerado como el primer paso en el desarrollo de cáncer. El *National Toxicology Program (NTP)* de Estados Unidos ha clasificado a cinco nitrosaminas como sustancias que pueden considerarse razonablemente cancerígenas para humanos (Parmeggiani, 1999).

2.7. Metilamina

La metilamina es una amina alifática primaria, conocida también como: aminometano; metanoamina; monometilamina (Fig. 9), es una base más fuerte que el amoníaco, y sus vapores irritan los ojos y el tracto respiratorio. Se han descrito casos de sensibilización bronquial. Las propiedades olfatorias como advertencia de este compuesto no son buenas, ya que provoca fatiga olfatoria (Parmeggiani, 1999).

La metilamina surge de modo natural como resultado de la putrefacción y es un substrato para la metanogénesis. El uso de metilamina como un intermediario en la síntesis de productos farmacéuticos, pesticidas, disolventes, explosivos, agentes tensoactivos, y reveladores fotográficos pueden dar lugar a su liberación al medio ambiente a través de varios flujos de residuos (Thauer, 1998).

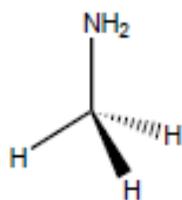


Fig. 9. Estructura química de la metilamina (Parmeggiani, 1999)

2.7.1. Propiedades fisicoquímicas

La metilamina es un compuesto orgánico de fórmula CH_3NH_2 . Es un gas incoloro derivado del amoníaco, donde un átomo de hidrógeno se reemplaza por un grupo metilo. Es la amina primaria más sencilla, de fuerte olor amoniacal. Se reparte comúnmente en solución acuosa al 33-40%. Como se presenta en la Tabla 3, la metilamina es un gas más pesado que el aire y puede desplazarse a ras del suelo, con posibilidad de ignición a distancia.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la metilamina (Praxair, 2008)

Característica o propiedad	Descripción / Valor
Estado físico	Gas licuado comprimido incoloro, de olor característico
Punto de ebullición	-6.3°C
Punto de fusión	-94°C
Densidad relativa (agua = 1)	0.6628
Solubilidad en agua, g /100 mL a 20°C	108 g
Presión de vapor, a 20°C	290 kPa
Densidad relativa de vapor (aire = 1)	1.07
Punto de inflamación	-10°C
Temperatura de autoignición	430°C
Límites de explosividad, % en volumen en el aire	4.9-20.7%
Coefficiente de reparto octanol/agua como log P_{ow}	-0.71
Masa molecular	31.1 g mol ⁻¹

Es una base de fuerza intermedia. Reacciona violentamente con mercurio con peligro de incendio y explosión; también reacciona violentamente con oxidantes fuertes, como el cloro (Parmeggiani, 1999).



2.7.2. Interacción en el medio ambiente

La metilamina en estado gaseoso se degrada en la atmósfera por dos vías: a) por reacción con radicales hidroxilo producidos fotoquímicamente; y la vida media para esta reacción en el aire se estima en 18 horas y b) por reacción con el ozono; la vida media para esta reacción en el aire se estima en 540 días (PubChem, 2004).

La metilamina no contiene algún componente cromóforo que absorba a longitudes de onda (λ) > 290 nm, por lo que no se espera que sea susceptible a la fotólisis directa por la luz solar. Si se libera en el suelo, la metilamina tendrá una movilidad moderada con base en los valores de su coeficiente de adsorción (K_{oc}) de 389 y 449. Un pKa de 10.62 indica que la metilamina existirá casi en su totalidad en la forma de catión a valores de pH de 5 a 9 y por lo tanto la volatilización desde la superficie del agua no se espera que sea un proceso importante de destino final. Un factor de bioacumulación (FBA) estimado de 3 sugiere la acumulación en organismos acuáticos es baja. La hidrólisis no se espera que sea un importante proceso de destino ambiental ya que este compuesto carece de grupos funcionales que se hidrolizan en condiciones ambientales (PubChem, 2004).

2.7.3. Toxicidad

La metilamina afecta a la salud gravemente por todas las vías de exposición. Al tener contacto a través de la piel puede producir graves irritaciones y quemaduras. Respirar aire contaminado con metilamina puede irritar la nariz, la garganta y los pulmones. Su exposición repetida puede causar bronquitis con tos, flema y falta de aire y, además, puede afectar gravemente el hígado.

En la Tabla 4 se muestran la clasificación del grado de toxicidad aguda de un agente xenobiótico según el valor de su dosis letal media (DL_{50}) y concentración letal media (CL_{50}). Al comparar los valores de DL_{50} y CL_{50} de la metilamina (Tabla 5) se puede decir que se encuentra en la denominación de toxicidad moderada.



Tabla 4. Rango de toxicidad aguda (Valle y Lucas, 2000)

Denominación	Administración			
	DL ₅₀ Dosis oral única rata	DL ₅₀ Dosis cutánea única conejo	CL ₅₀ Inhalación 4h rata	Posible dosis oral letal a un hombre adulto
Extremadamente tóxico	<1 mg/kg	<5 mg/kg	10	1 gota
Altamente tóxico	1-50 mg/kg	5-50 mg/kg	10-100	5 gramos
Moderadamente tóxico	50-500 mg/kg 100 mg/kg	50-350 mg/kg	100-1000 448 ppm/2.5 h	30 gramos
Ligeramente tóxico	0.5-5 g/kg	0.35-3.0g/kg	1000-10000 2400 mg m⁻³/2 h	250 gramos
Prácticamente no tóxico	5-15 g/kg	3.0-25 g/kg	10000-100000	1 L
Relativamente inocuo	>15 g/kg	25 g/kg	>100000	>1 L

Tabla 5. Valores de CL₅₀ y DL₅₀ de la metilamina (TCI América, 2005)

	Vía de administración	Valor
LC₅₀ rata	Inhalación	448 ppm/2.5 h
LD₅₀ rata	Oral	100 mg/kg
LC₅₀ ratón	Inhalación	2400 mg m ⁻³ /2h

Los efectos agudos (a corto plazo) sobre la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco tiempo después de la exposición a la metilamina. Estos efectos son irritación y quemaduras. Los efectos crónicos (a largo plazo) pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición a la metilamina y pueden durar meses o años. Según la información actualmente disponible en el Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey (New Jersey Department of Health, 2004), otros efectos a largo plazo de la metilamina es que puede irritar los pulmones. La exposición repetida puede causar bronquitis, con tos, flema y falta de aire. Y la exposición a una concentración a 100 ppm de metilamina, constituye un peligro inmediato a la vida y la salud humana.



2.7.4. Límites máximos permitidos en alimentos y ambiente laboral

La exposición ocupacional a la metilamina puede ocurrir a través de la inhalación y el contacto dérmico con el compuesto en los lugares de trabajo donde la metilamina se utiliza o se produce como intermediario químico. En la Tabla 6 se comparan los límites máximos de exposición de la metilamina dados por dependencias internacionales y nacionales.

La normativa nacional, NOM-010-STPS-1999 (STPS, 1999), establece como límite máximo permisible de exposición promedio ponderado en el tiempo (LMPE-PPT), que es la concentración promedio ponderada en el tiempo de un contaminante del ambiente laboral para una jornada de ocho horas diarias y una semana laboral de cuarenta horas a la cual se pueden exponer la mayoría de los trabajadores sin sufrir daños a su salud, de 10 ppm y 12 mg m⁻³.

En la Tabla 6 se hace una comparación de los límites de exposición establecidos por diferentes instancias internacionales con los límites propuestos por la normativa mexicana.

Como se observa en la Tabla 6 no existe diferencia entre los límites establecidos entre las diferentes dependencias a excepción de la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)*, que maneja un límite más estricto, el cual es 50% menor en comparación de la normativa nacional.

Los límites de exposición antes mencionados sólo son para niveles en el aire. Si también hay contacto con la piel, puede estar sobreexposto aún cuando los niveles en el aire sean inferiores a los límites establecidos. Por otro lado el límite de exposición a corto plazo (*STEL*, por sus siglas en inglés) de la metilamina es de 15 ppm.



Tabla 6. Límites máximos de exposición de MA en una jornada laboral

Dependencia	Límite máximo de exposición	Tiempo de exposición Jornada laboral
STPS	10 ppm o 12mg m ⁻³	8 horas
OSHA	10 ppm	8 horas
NIOSH	10 ppm	10 horas
ACGIH	5 ppm	8 horas

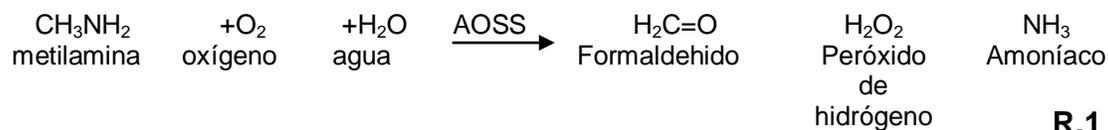
STPS, Secretaría del Trabajo y Previsión Social; OSHA, Occupational Safety & Health Administration; NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health; ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists

La legislación europea establece un valor de contenido de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de amonio y nitrógeno Kjeldahl respectivamente para agua de consumo y entre 15 y 85 mg L⁻¹ para aguas residuales.

2.7.5. Absorción de la metilamina

Las aminooxidasas (AO) catalizan, en presencia de oxígeno, la reacción de oxidación de una amina a aldehído con la liberación de amoníaco (NH₃) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las características que debe tener la amina para que sea oxidada dependen del tipo de enzima que cataliza la reacción. Así, por ejemplo (Fig. 10), mientras que la mono-aminooxidasa (MAO) oxida aminas primarias, secundarias y terciarias, la poliamina-oxidasa (PAO) oxida poliaminas, la diamino-oxidasa (DAO) diaminas y la amino-oxidasa sensible a semicarbazida (AOSS), mayoritariamente, aminas primarias (Hernández-Guillamón, 2005).

Por lo tanto, la metilamina entra en el sistema circulatorio donde es metabolizada por la enzima amino-oxidasa sensible a semicarbazida a formaldehído (Díaz-Solares, 2004), conforme a la siguiente reacción **(R.1)**:





Se han hecho estudios para analizar la concentración de la metilamina en el cuerpo humano dando como resultado un valor de 3.7 ± 0.4 nmol / mL en flujo gástrico (Zeisel y LaMont, 1988).

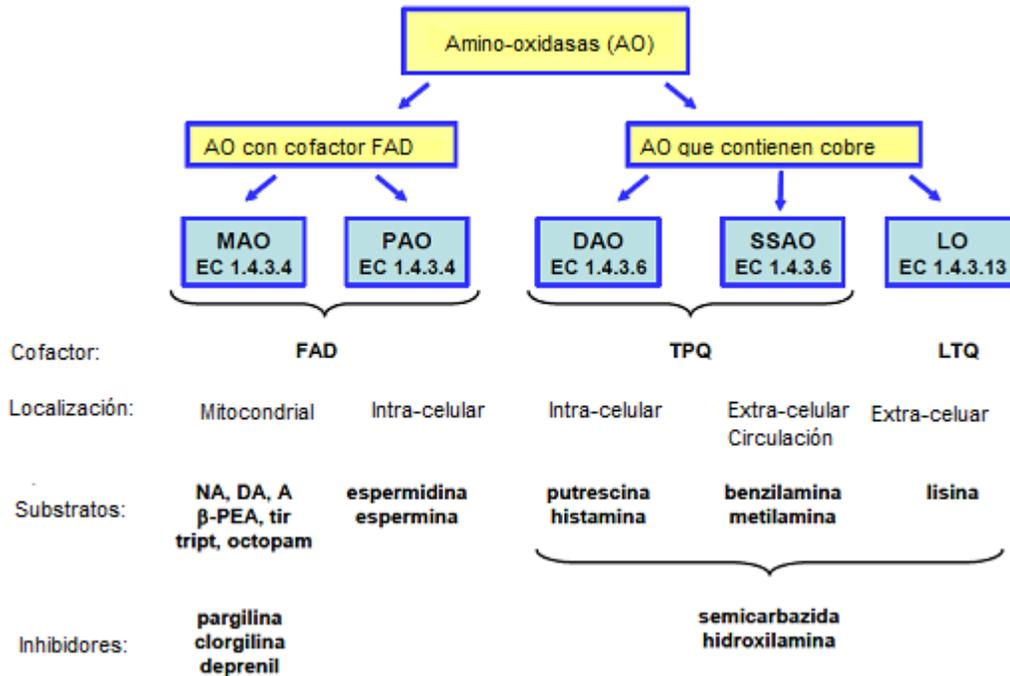


Fig. 10. Clasificación de amino-oxidases (Hernández-Guillamón, 2005)

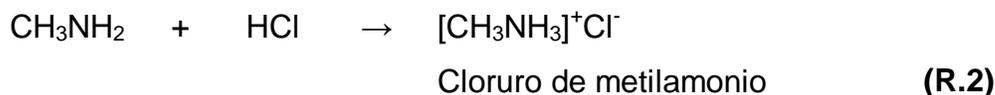
Por otro lado, en un estudio reciente se analizó la excreción urinaria diaria de metilamina en una población de voluntarios sanos no relacionados e investigó una variedad de sustancias alimenticias como posibles fuentes dietéticas.

La producción media diaria de metilamina fue de 11.00 ± 8.17 mg. Los resultados indicaron que los precursores químicos y la dieta no son una fuente exógena importante de esta amina y sugirieron que el origen de la mayoría de metilamina urinaria humana es endógeno con sólo contribuciones de la dieta sutiles (Stephen y Zhang, 2001).



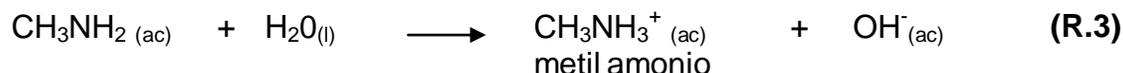
2.7.6. Reactividad de la metilamina

La principal característica de las aminas alifáticas es la de ser básicas. Éste carácter básico se debe a la presencia de un par de electrones en el nitrógeno que puede coordinarse con un protón y se combinan con los ácidos formando sales como se presenta en la reacción **(R.2)**:



Como los radicales alquilo, presentan un efecto inductivo donando electrones a los átomos más electronegativos, en este caso el nitrógeno, las aminas alifáticas son más básicas que el amonio (Teijón *et al.*, 2006).

La metilamina reacciona fuertemente, hidrolizándose y formando soluciones alcalinas, debido a que es una base débil que se disocia en agua a 25°C, con una constante de disociación $k_d = 4.4 \times 10^{-4}$, de acuerdo con la reacción que se presenta abajo **(R.3)** (Linstromberg, 1977):



En el jugo de caña la metilamina puede dar como resultados productos coloreados, ya que, existen dos fuentes básicas de colorantes provenientes de la caña: (1) los que se originan en la planta y (2) los que se forman durante su procesamiento. En los jugos de la planta se encuentran compuestos de carácter fenólico, que pueden ser de naturaleza sencilla o compleja como los flavonoides. Estos últimos pueden existir en forma libre o como glucósidos unidos a las moléculas de azúcar. Algunos fenoles son incoloros dentro de la planta, pero se oxidan o reaccionan con aminas produciendo sustancias coloridas. Estos compuestos se forman durante el procesamiento provienen de la descomposición térmica de la sacarosa y de los azúcares reductores (glucosa o fructosa), o se



originan en las reacciones de estos carbohidratos con compuestos amino-nitrogenados (Reacción de Maillard) (Fig. 11), produciendo polímeros coloridos denominados melanoidinas.

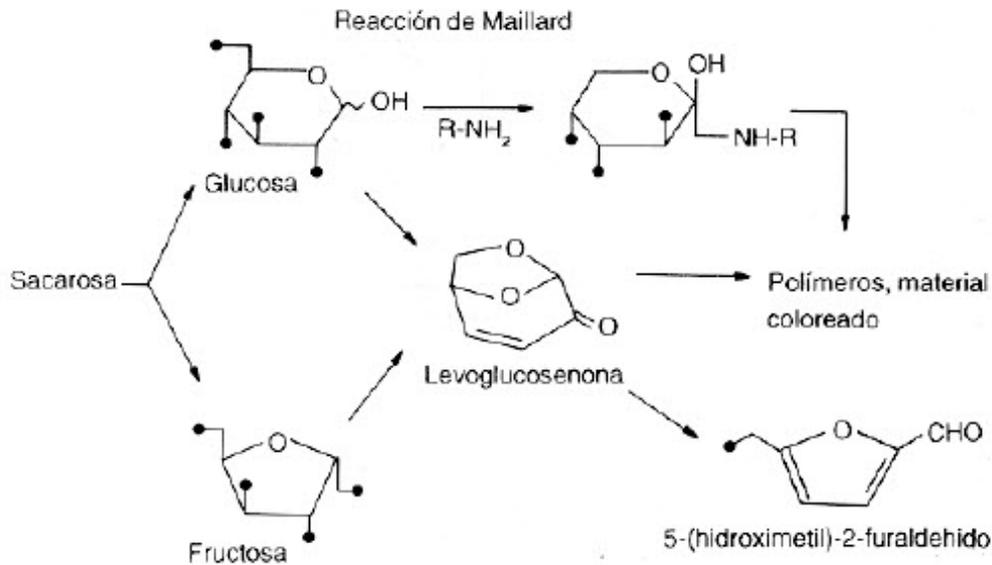


Fig. 11. Formación de melanoidinas durante la producción de azúcar (Larrañondo, 1995)

La reacción de Maillard se considera una reacción de pardeamiento no enzimática, la cual se lleva a cabo en 3 etapas. Inicia con la reacción de los grupos amino, particularmente los grupos amino de proteínas, péptidos o aminoácidos libres con los grupos carbonilo de los azúcares reductores. En la etapa intermedia de la reacción, se forman compuestos no coloridos que absorben la radiación UV, así como compuestos fluorescentes. En la etapa avanzada, se forman compuestos volátiles (aldehídos) y polímeros pardos de alta masa molecular (>1200 Daltones) denominados melanoidinas, como ya se mencionó arriba. En la reacción de Maillard pueden influir diferentes factores, entre los que destacan: el pH, la temperatura, la actividad acuosa, el tipo de aminoácido y azúcar reductor que intervienen (Sumaya-Martínez *et al.*, 2010).



2.8. Cinética química

La cinética química es el estudio de las velocidades de las reacciones químicas y de los mecanismos mediante los que tienen lugar. Introduce la variable tiempo en el estudio de las reacciones químicas y estudia el camino que siguen los reactivos para convertirse en productos.

La velocidad de reacción (k) corresponde a la rapidez con que tiene lugar una reacción; durante el cambio, la concentración de los reactantes o reactivos disminuye, mientras que la concentración de los productos aumenta. La velocidad media, entonces, se mide a través del cambio de concentración en un periodo determinado de tiempo.

Para medir la rapidez de una reacción química, el método más directo consiste en realizar un análisis químico de un constituyente del sistema a intervalos de tiempo adecuados (Fig. 12). El orden de reacción (n), es un número entero o fraccionario que se obtiene experimentalmente y describe la forma en que la velocidad depende de la concentración del reactante. Con base en los valores más comunes de n , se clasifican las reacciones químicas, de la manera siguiente:

- Reacciones de orden cero ($n=0$)

La velocidad de reacción es constante y entonces, es independiente de la concentración del reactivo. En esta reacción la concentración del producto es directamente proporcional al tiempo transcurrido.

- Reacciones de primer orden ($n=1$)

La velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del reactivo. Al graficar la concentración del reactivo *versus* tiempo se observa como la concentración decae exponencialmente con el tiempo.



- Reacción de segundo orden ($n=2$)

La velocidad es proporcional al cuadrado de la concentración del reactivo.

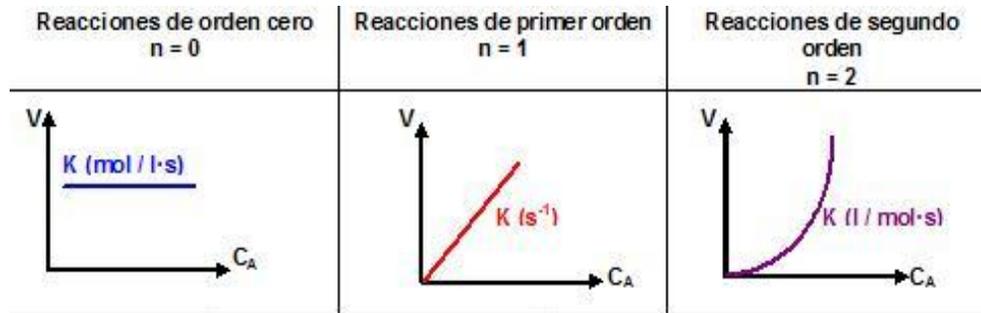


Fig. 12. Comportamiento de la velocidad según su orden de reacción (Anónimo, 2012a)



3. Fundamentos analíticos

3.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) (García y Del Castillo, 1988; Skoog *et al.*, 2001; Gomis-Yagües, 2008)

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación física basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil que en este caso es un líquido. La fase móvil circula en contacto con la fase estacionaria y al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la fase estacionaria cada analito introducido en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas. Por ello, la cromatografía es un proceso de separación y se conceptualiza como tal.

3.1.1. Cromatografía de fases químicamente unidas

Se basa en el uso de fases estacionarias unidas o enlazadas químicamente. Este tipo de fases están constituida por un soporte sólido, generalmente gel de sílice, sobre el que se unen covalentemente a través de sus grupos silanoles, distintos grupos reactivos que darán lugar a la separación de los componentes. Este tipo de cromatografía se puede producir en fase normal o fase inversa.

- Fase normal, los grupos reactivos que se unen al soporte son polares formando un fase estacionaria polar, mientras que la fase móvil es no polar. La fase estacionaria está formada por el soporte enlazado a un grupo funcional (ciano, amino, dimetilamino, diamino, etc.) y la fase móvil puede ser diclorometano, dietiléter, cloroformo, etc. Los compuestos menos polares se eluyen primero y los compuestos más polares se eluyen más lentamente.
- Fase inversa, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. Las columnas están formadas por partículas de gel de sílice con grupos



apolares enlazados a sus grupos silanoles. Estos grupos apolares son cadenas de hidrocarburos de diferente longitud y los más utilizados son: n-octadecil (C_{18}) y los n-octil (C_8). La fase móvil puede ser el acetonitrilo, metanol, agua, etc. El mecanismo de separación está basado principalmente en interacciones hidrofóbicas. Los analitos más polares se eluyen primero y los no polares se eluyen más lentamente.

3.2. Instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución (Gomis-Yagües, 2008; Skoog *et al.*, 2001)

Un equipo de CLAR, consiste esencialmente de un reservorio para el disolvente, una bomba, sistema de inyección, una columna, un detector y un aparato de registro (Fig. 13).

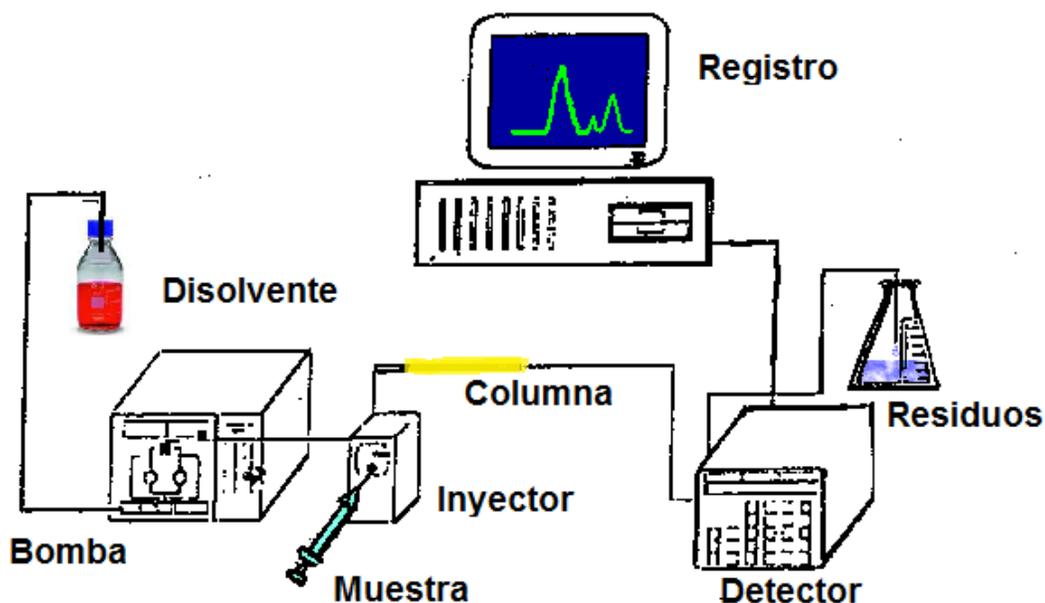


Fig. 13. Esquema de un equipo de CLAR

Para separar una mezcla de compuestos, un pequeño volumen de ésta es inyectado en la columna y eluido con la fase móvil más adecuada. La elución de la muestra puede ser obtenida con disolventes de composición constante (modo isocrático) o con disolventes de composición variable (modo gradiente). Los



componentes que son eluidos de la columna pueden ser detectados por luz ultravioleta, fluorescencia, índice de refracción y por detección electroquímica.

- **Reservorio para el disolvente**

Los reservorios o recipientes utilizados son frascos de vidrio, acero inoxidable o plástico inerte, los cuales contendrán la fase móvil. Los recipientes cuentan con membranas, equipo de sonicación o de burbujeo de un gas (helio), para la eliminación de los gases disueltos en la fase móvil.

- **Bomba**

Los requisitos para un sistema de bombeo en CLAR son rigurosos e incluyen: (1) la generación de presiones por encima de 400 kg/cm^2 , (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de caudal de 0.1 a 10 mL/min, (4) el control y reproducibilidad del caudal y (5) componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón).

Los tipos de bombas existentes para CLAR son:

- Bombas neumáticas entre las que se encuentran, bombas de desplazamiento directo y amplificadoras de aire
- Bombas de motor eléctrico como: bombas de jeringa y bombas alternantes (pistón o membrana)

- **Sistema de inyección**

La muestra se introduce a la válvula de inyección conocida como bucle. Estos dispositivos están normalmente integrados en el equipo cromatográfico, existen piezas intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 μL .

- **Columna**

Las columnas más utilizadas son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo de separación. El diámetro varía entre 2 y 60 μm y su longitud varía entre 5 y 30 cm.



- **Detectores**

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos: a) Los detectores basados en el cambio de una propiedad de la fase móvil, tales como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifican por la presencia de los analitos y b) los detectores como el UV, absorbancia, fluorescencia o intensidad de difusión, que se basan en alguna de las propiedades del soluto.

3.2.1. Detector de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Los detectores de fluorescencia representa el tercer tipo de detectores más utilizados en la CLAR. Para los compuestos que presentan fluorescencia natural (Tabla 7), así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por medio de una derivatización simple. Normalmente, la sensibilidad del detector de fluorescencia es 1000 veces mayor que la del detector UV.

Tabla 7. Compuestos de fluorescencia natural (MNCN, 2012)

Compuesto	$\lambda_{\text{excitación}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$ (nm)
Benceno	270	310
Tolueno	270	320
Clorobenceno	275	345
Fenol	285	365
Anilina	210	405
Acido benzoico	310	390
Benzonitrilo	280	360

3.3. Reacción de derivatización

Las técnicas de derivatización fluorescentes, han sido utilizadas con éxito para realizar muchos tipos de análisis. Como reactivo para la derivatización, se pueden utilizar cloruro de dansilo, fluorescamina, etc. Dependiendo de la naturaleza de los



compuestos a analizar (Skoog *et al.*, 2001). La derivatización es un procedimiento por el que se modifica químicamente el analito para detectarlo o separarlo con más facilidad. La transformación química que tiene lugar en la derivatización puede ser muy variada. En general, se distinguen dos situaciones:

- a) Derivatización destructiva, que se basa en la transformación total de los analitos en una reacción que se origina en condiciones experimentales “forzadas”. Tal es el caso de la pirólisis previa en cromatografía de gases o de la fotodescomposición post-columna en CLAR
- b) Derivatización basada en la adición de un reactivo. La naturaleza de las reacciones químicas originadas es muy variada. Cabe hacer la distinción general entre reacciones sustractivas y no sustractivas, dependiendo de que el producto de reacción pase o no por la columna o por el sistema de detección.

El objetivo general de la derivatización en CLAR es facilitar/posibilitar/mejorar la detección cromatográfica. Desde el punto de vista de la detección, son varias finalidades de la derivatización en CLAR.

En primer lugar aumentar la sensibilidad, lo que puede dar lugar tanto a la disminución de los límites de detección y cuantificación como a hacer posible la detección de un analito o un grupo de analitos hacia los que el detector continuo es insensible. En segundo lugar puede aumentar la selectividad introduciendo como factores complementarios a la separación cromatográfica, la reacción analito-reactivo y las características diferenciales ópticas y electroquímicas de los productos de reacción. Este aspecto es importante en CLAR dada la escasa información cualitativa suministrada, a no ser que se recurra a la hibridación instrumental. Son ejemplos característicos la formación de derivados fluorescentes.



3.4. Extracción en fase sólida (EFS) (Van, 1985; Zhang y Zu, 2000)

La EFS es una potente y simple técnica de adsorción, que consiste en separar, extraer, purificar y concentrar el analito de estudio de una manera rápida. Un cartucho de EFS consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas sostenido entre dos discos porosos en un tubo desechable, que permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen (Fig.14). Los tipos de adsorbentes pueden ser: polares (sílice), poco polares (C18), fases químicamente enlazadas, intercambio iónico, etc.

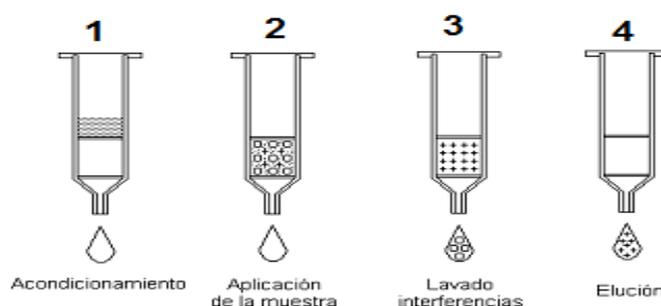


Fig. 14. Tratamiento de la muestra mediante EFS (Anónimo, 2012b)

- **Etapas de la extracción en fase sólida**

1. **Acondicionamiento.** Se realiza con un solvente orgánico, el cual permite activar la fase estacionaria mediante la solvatación y activación de los grupos funcionales del material adsorbente y removiendo las impurezas de fábrica.
2. **Retención.** Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de EFS. Para maximizar las interacciones la muestra deben cargarse en el adsorbente de EFS a aproximadamente 3 mL/min. Este caudal puede controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés



3. **Eliminación de interferencias.** Usando un solvente o una serie de solventes de fuerza creciente los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de EFS hasta que solo los analitos de interés queden atrapados. Por ejemplo, al retener compuestos hidrofóbicos en C₁₈ la contaminación puede eliminarse con un lavado de agua: metanol 50:50 puesto que los compuestos de interés no se eluyen del adsorbente de EFS hasta que no se use un mayor porcentaje de solvente orgánico. Con un lavado adecuado las impurezas se eliminan con un adecuado eluyente de lavado
4. **Elución del analito.** Se efectúa mediante un eluyente adecuado y a un caudal de 1 mL min⁻¹. El adsorbente de EFS y la interacción analito-adsorbente determinan el eluyente a elegir.

3.5. Metodologías reportadas para el análisis de aminas alifáticas

Para conocer cuáles son las mejores condiciones en el estudio de la metilamina se realizó una revisión bibliográfica (Tabla 8), tomando en cuenta diversos factores tales como disponibilidad de los equipos necesarios, una metodología amigable, obtener los límites de detección más bajos, etc. De acuerdo con esta revisión bibliográfica se optó por usar la metodología propuesta por Meseguer-Lloret y colaboradores reportada en 2002. Se realizaron pequeñas modificaciones que serán descritas en la metodología y que tuvieron como fundamento la mejor operación del equipo siguiendo otros artículos relacionados con este método.

3.5.1. Preconcentración y derivatización en cartuchos C₁₈

Los diferentes pasos involucrados en esta metodología fueron optimizados por Meseguer Lloret *et al.* (2002). Los parámetros involucrados en la reacción de derivatización (Fig. 15), tal como el pH del medio, tiempo de retención y temperatura fueron optimizados. La reacción fue llevada a cabo en un pH básico y la influencia de este parámetro fue estudiado en un intervalo de 8.5 a 11.4. La



reacción también fue evaluada a una temperatura ambiente durante 30 min. El rendimiento de conversión se incrementó a valores de pH mayores de 9.5, aunque no considerablemente.

Tabla 8. Técnicas reportadas para el análisis de aminas alifáticas

Referencias	Kaminski <i>et al.</i> ,2002	Cobo y Silva, 1999	Herráez <i>et al.</i> , 2006	Meseguer-Lloret <i>et al.</i> , 2002	Gao <i>et al.</i> , 2011
Columna	Nucleosil 100-5	C ₁₈	C ₁₈	C ₁₈	C ₁₈
Derivatización	NA	Cloruro de dansilo pH=11	Solución amortiguadora de carbonato al 1% (m/m) Fmoc	Cloruro de dansilo pH=9.5	TMBB-Su
EFS	NA	Columna de intercambio catión IRC-50	Cartuchos C ₁₈	Cartuchos C ₁₈	NA
Fase móvil	NaH ₂ PO ₄ 0.088M/pH=2.6	Acetonitrilo Agua 25:50/50/50:75	Acetonitrilo- Agua 40:60	Imidazol- Acetonitrilo 50:50/90:10/50:50	MeOH-THF (11:1) v/v HAc-NaAc pH:6.5(60:40)
Flujo	2.0 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹
Detector	Índice de refracción	Quimio-luminiscencia	Fluorescencia	Fluorescencia	Fluorescencia
Límites de detección	1 mg L ⁻¹	15 ng L ⁻¹	0.5 µg L ⁻¹	2 µg L ⁻¹	0.02 nM
Tiempo de retención	4.3 min	14 min	9 min	3.7 min	13 min

Fmoc, 9-fluorenilmetilcloroformato; HAc-NaAc, Mezcla de ácido bórico y borato de sodio en acetonitrilo; MeOH-THF, Metanol-Tetrahidro furano; TMBB-Su, 1,3,5,7 tetrametil-8-(N-hidroxisuccimidil éster butírico de difluoroboradoza-s-indaceno; NA, no aplica

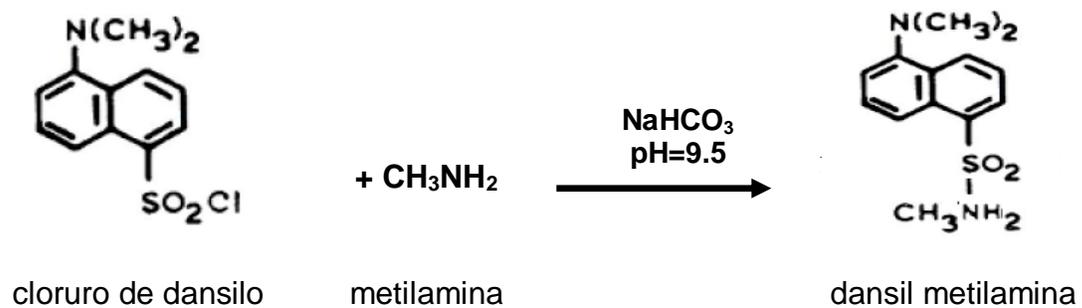


Fig. 15. Reacción de derivatización de la MA en un medio básico



4. Metodología

4.1. Material y equipo

El equipo y material utilizados en esta investigación se enlistan en la Tabla 9.

Tabla 9. Equipo y materiales con especificaciones técnicas

Equipo y material	Especificaciones técnicas
Cromatógrafo de líquidos Varian con bomba terciaria	Modelo Varian 9010 Varian Intert 9012
Detector de fluorescencia	Varian 9075
Software de control y procesamiento de datos	Varian Star Workstation, versión 4.5 1989-1990, Varian Associates. Inc
Columna	C ₁₈ (125x4 mm d. i., 5-µm diámetro de partícula)
Cartuchos de extracción en fase sólida	C ₁₈ 6 mL / 500 mg <i>Octadecyl-modifiziertes kieselgel</i> <i>Octadecyl-modified silica</i> Sílice modificada con octadecilo
Automuestreador	Modelo Varian 9100
Jeringa Hamilton	Capacidad de 100 µL
Micropipeta Transferpette	De volumen variable de 100-1000 µL
Micropipeta Transferpette	De volumen variable de 10-100 µL
Kit de viales	Viales de vidrio con tapa de silicón de 8 mm y capacidad de 2.0 mL
Frascos de vidrio	Duran de 500 mL y 250 mL de capacidad
Baño ultrasónico	Brasonic Mod. 3210, 0-60 Hz
Estufa	Felisa Digital (+5 a 250°C)

4.2. Reactivos

En la Tabla 10 se presentan los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones para llevar a cabo la derivatización de la metilamina y la fase móvil.



Tabla 10. Reactivos utilizados

Reactivo	Especificaciones
Agua	J.T Baker HPLC; pureza: 99.9%
Metanol	J.T Baker HPLC; pureza: 99.9%
Acetonitrilo	J.T Baker HPLC; pureza: 99.9%
Imidazol	Sigma HPLC; pureza >99%
NaHCO ₃	J.T. Baker; pureza 98.6%
Cloruro de dansilo	Sigma HPLC; pureza, >99.9%
NaOH	J.T. Baker; pureza 98.4%
Acetona	J.T Baker HPLC; pureza: 99.9%

- **Solución estándar**

Metilamina en agua J.T Baker al 40%

4.2.1. Preparación de soluciones

Todo el material de vidrio utilizado para la preparación de las soluciones así como para su almacenamiento llevó un lavado específico, el cual se muestra en el Anexo A.

Las soluciones se almacenaron en frascos Duran a temperatura ambiente, a excepción de la solución madre y el cloruro de dansilo los cuales se almacenaron en frascos color ámbar a una temperatura de 4°C.

- Solución madre de metilamina 5 mg L⁻¹ (MM: 31.1g mol⁻¹). Medir 9.875 mL de agua grado cromatográfico con una micropipeta y transferir dicho volumen a un vial color ámbar al cual se le añade un volumen de 125 µL del estándar de metilamina al 40%
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y 0.1N (40 g mol⁻¹). Pesar 4.0 gramos de hojuelas de NaOH, disolver con 20 mL de agua grado cromatográfico, transferir a un matraz aforado y llevar a un volumen final de



- 100 mL con agua. La solución 0.1N fue preparada de igual forma, pesando 0.4g de NaOH
- c) Solución de imidazol 1 mM, pH= 7(MM: 68.077 g mol⁻¹). Pesar 6.81 mg de imidazol, disolver con agua grado cromatográfico, transferir a un matraz aforado y llevar a un volumen final de 100 mL con agua. El pH se ajusta con la adición de NaOH 1N
 - d) Solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃)10 mM pH=12 (MM: 84.01 g mol⁻¹). Pesar 0.084 g de NaHCO₃, disolver con 20 mL de agua y se transferir a un matraz volumétrico para llevar a la marca de aforo de 100 mL con agua grado cromatográfico. Se ajusta el pH a 12 añadiendo una solución de NaOH 1N
 - e) Solución de bicarbonato de sodio 33.3 mM pH=9.5. Pesar 0.28 g de NaHCO₃, disolver con agua y transferir a un matraz volumétrico en donde se lleva al aforo a 100 mL con agua grado cromatográfico. Se ajusta el pH= 9.5 con gotas de la solución de NaOH 1N
 - f) Solución saturada de bicarbonato de sodio. Pesar 10.30 g de NaHCO₃, colocar en un frasco Duran de 250 mL y añadir un volumen de 100 mL de agua grado cromatográfico, agitar hasta que se disuelva por completo
 - g) Solución de cloruro de dansilo (Dns-Cl) 12.5 mM (MM: 269.75). Pesar 3.372 g de cloruro de dansilo, disolver con acetona y transferir a un matraz volumétrico donde se lleva a la marca de aforo de 100 mL con acetona grado cromatográfico
 - h) Solución para llevar a cabo la reacción de derivatización (Dns-Cl: NaHCO₃). Medir un volumen de 2 mL de la solución de cloruro de dansilo 12.5mM y 3 mL de la solución de bicarbonato de sodio 33.3 mM, transferir a un vial color ámbar y agitar. Dicha mezcla fue preparada diariamente.

4.3. Análisis de la metilamina

Para el estudio de la metilamina se tomó como referencia lo descrito por Meseguer-Lloret *et al.* (2002). Dicha metodología consiste en tres etapas esenciales (Fig.16): derivatización, extracción en fase sólida y, finalmente, su



análisis mediante el equipo de CLAR con un detector de fluorescencia. Las dos primeras etapas son técnicas de preparación de la muestra que sirven para obtener una mejor identificación del compuesto.

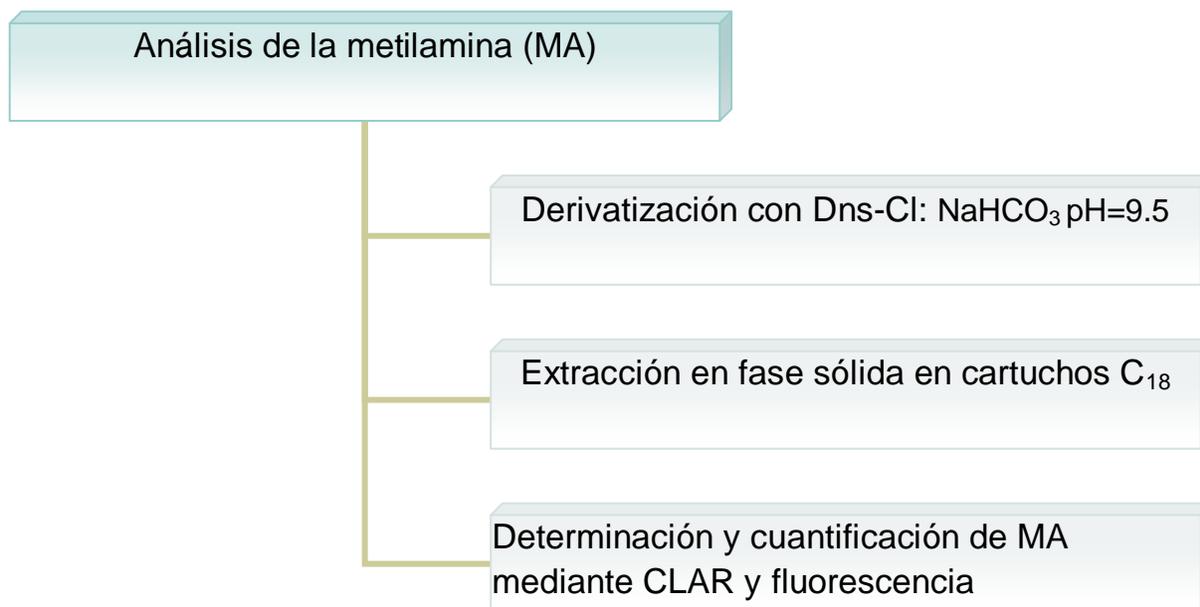


Fig.16. Principales etapas de la metodología

4.3.1. Derivatización y EFS de la metilamina

La derivatización de la metilamina se realizó de forma distinta en las diferentes matrices debido a la complejidad de la matriz del jugo de caña, por lo que en los puntos 4.3.1.1 y 4.3.1.2 se describe el procedimiento de la derivatización y EFS de la metilamina en agua y jugo de caña, respectivamente.

4.3.1.1. Derivatización y EFS de la metilamina en agua

El cartucho C₁₈ fue acondicionado con un 1 mL de metanol y 1 mL de NaHCO₃ (10 mM). Una vez acondicionado el cartucho, se tomaron 2 mL de la metilamina disuelta en agua más 1 mL de la mezcla¹ de Dsn-Cl:NaHCO₃ (2:3 v/v), para que se lleve a cabo la reacción de derivatización. Posteriormente, el cartucho fue

¹ La metodología indica que se añade 0.5 mL de la mezcla Dsn-Cl-NaHCO₃, pero en una lectura bibliográfica se encontró que la reacción se veía favorecida al aumentar el volumen de dicha mezcla y por ello se modificó el volumen a 1 mL



colocado en una gradilla y puesto en una estufa a 85°C durante 15 minutos. Una vez transcurridos los 15 minutos, el cartucho fue retirado de la estufa, colocando 1 mL de la mezcla NaOH (0.1 N):NaHCO₃ (saturada), (1:1) para la limpieza del cartucho². Finalmente la muestra de interés fue eluida con 1 mL de acetonitrilo y recolectada en un vial. Cada una de las soluciones que se hicieron pasar por el cartucho eluyeron por efecto de gravedad.

4.3.1.2. Derivatización y EFS de la metilamina en jugo

Se tomó una alícuota de 2 mL de la muestra (metilamina disuelta en jugo de caña) y se colocó en un vial al cual se le añadió 1 mL de la mezcla de Dsn-Cl:NaHCO₃ (2:3 v/v) y se agitó dicha mezcla con la ayuda de un *vórtex*. El cartucho C₁₈ fue acondicionado con un 1 mL de metanol y 1 mL de NaHCO₃ (10 mM), y se vertió el contenido del vial al cartucho. Una vez que la mezcla pasó a través del adsorbente, se colocó en la estufa y a partir de aquí llevó las mismas condiciones que las mencionadas en el punto 4.3.1.1.

4.3.2. Condiciones del equipo de CLAR y fluorescencia

La solución de imidazol 1 mM y el acetonitrilo (fase móvil), fueron sometidos a una desgasificación por medio de un baño ultrasónico durante 10 minutos diariamente antes de cada análisis. Una vez desgasificada la fase móvil es colocada en la bomba terciaria para ser suministrada bajo un gradiente, el cual fue programado desde el software.

La corrida tenía una duración de 10 minutos, comenzaba con un gradiente 50:50 de acetonitrilo-imidazol y, conforme transcurría el tiempo, el volumen del acetonitrilo aumentaba hasta llegar 90:10 al minuto 9 y en el último minuto el gradiente regresaba a las condiciones iniciales. Las muestras fueron colocadas en el

² Meseguer Lloret *et al.*, (2002) utilizaron un sistema de vacío para lograr una mejor limpieza del cartucho, pero a la par existía una pérdida del compuesto. Es por ello que en esta investigación se prefirió omitir dicho paso



automuestreador el cual inyectaba cada muestra por triplicado, con una alícuota de 20 μL .

El detector de fluorescencia trabajó con una longitud de onda de emisión de 350 nm y una longitud de onda excitación de 530 nm. Los cromatogramas obtenidos fueron registrados por medio de un procesador de datos. En la Tabla 11 se muestran las condiciones cromatográficas para el análisis de la MA mediante CLAR.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas para el análisis de metilamina

Condiciones cromatográficas (Meseguer-Lloret <i>et al.</i> , 2002)	
Columna	C ₁₈ (125x4 mm d.i., 5- μm diámetro de partícula)
Fase móvil	Acetonitrilo e imidazol (1 mM) pH=7
Gradiente	(50:50) tiempo cero (90:10) a 9 min. (50:50) 10 min
Velocidad de flujo	1 mL min ⁻¹
Tiempo de corrida	10 minutos
Volumen de inyección	20 μL
Detector	Fluorescencia (λ_{em} 530 nm; λ_{ex} 350 nm)

4.4. Determinación del tiempo de retención (t_R) y de los límites de detección (L_d)

Una vez observada la reproducibilidad de la metodología elegida, se prosiguió a la determinación del t_R de la metilamina.

Fue inyectada una muestra de metilamina diluida en agua a una concentración de 1 mg L⁻¹, para identificar el pico característico, el cual se identificó al comparar el tiempo de retención con lo reportado por Meseguer-Lloret *et al.* (2002). La concentración inicial fue diluida paulatinamente hasta que la señal del pico no pudiese ser cuantificada y se determinó con esto el límite de detección, así como el tiempo de retención, para la metilamina en una matriz de agua.



El mismo procedimiento fue realizado para determinar el t_R y L_d de la metilamina en una matriz de jugo de caña. En ambas ocasiones se inyectó un blanco para verificar la autenticidad del pico. Los blancos llevaron el mismo tratamiento descrito en el punto 4.3.1; los 2 mL de muestra en este caso fueron las matrices sin adición de metilamina.

4.5. Elaboración de curvas patrón

A partir de la determinación de los límites de detección, se elaboraron las curvas patrón de metilamina, siendo el primer punto de la curva, tres veces el límite de detección identificado en cada matriz. Es importante mencionar que para cada curva se analizaron diez puntos, los cuales se inyectaron por triplicado y el punto medio se inyectó cinco veces.

4.6. Tratamiento de la muestra

Las cañas obtenidas de un mismo lote, fueron cubiertas con papel estroza y almacenadas en refrigeración a una temperatura de 4°C. Para extraer el jugo de caña, las cañas fueron peladas manualmente con cuchillo y picadas en trozos más pequeños, el jugo se obtuvo mediante el uso de un extractor casero marca Moulinex.

El jugo obtenido fue diluido con metanol (50:50) v/v. Se adicionó la metilamina y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. Pasado este tiempo se tomó el sobrenadante y se continuó el análisis descrito en los puntos 4.3.1 y 4.3.2.

4.7. Diseño experimental

Las condiciones ambientales involucradas en el procesamiento del jugo de caña y que pueden afectar directamente la velocidad de degradación del plaguicida (ditiocarbamato de sodio) son cinco: hidrólisis, fotólisis, pH, temperatura y tiempo de exposición (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010). Sin embargo, dado que el método seleccionado para analizar la metilamina involucra un valor de pH



constante, esta variable no podía ser considerada en este diseño experimental. Para las otras cuatro variables, se consideran condiciones relativamente suaves con respecto de las reales en las operaciones de separación del jugo del bagazo de caña, que es donde se agrega el biocida (Tabla 12).

Como se mencionó en el párrafo anterior, las variables estudiadas fueron cuatro, con excepción del pH, ya que la modificación de su valor afecta la reacción de derivatización, la cual debe realizarse a un pH básico mayor a 9.5 (Fig. 15). Los niveles se muestran en la Tabla 12. Se obtuvo así un diseño experimental de $5^1 \cdot 2^3$, dando un total de 40 muestras analizadas por triplicado lo que arrojó un total de 120 inyecciones.

Tabla 12. Diseño experimental

Factores	Niveles				
Tiempo (días)	1	2	3	4	5
Hidrólisis	Agua	Jugo de caña			
Fotólisis	Luz	Oscuridad			
Temperatura (°C)	4	25			

Nota: En condiciones reales, el jugo de caña pasa un tiempo mucho menor a un día en las operaciones unitarias de extracción del bagazo y de clarificación, las temperaturas son mucho mayores a 25°C y está expuesto a fotólisis en un 50% ya que los ingenios operan día y noche (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010)

4.7.1. Evaluación de la degradación de la metilamina

Se preparó una solución de metilamina diluida con agua a una concentración inicial de $1.6 \mu\text{L}^{-1}$, suministrando una alícuota de 10 mL en cuatro viales diferentes, dos de los cuales eran color ámbar y dos transparentes, para obtener las condiciones de fotólisis. Posteriormente en un vial ámbar y otro transparente, fueron colocados en el refrigerador, para la evaluación de la condición a 4°C y los dos restantes se almacenaron a temperatura ambiente (25°C). Las muestras fueron analizadas durante cinco días, en los cuales se dio un seguimiento de la concentración de la metilamina.



Para estudiar la degradación de la metilamina en una matriz de jugo de caña se preparó una solución cuya concentración inicial fue de $0.014 \mu\text{L}^{-1}$ y, a diferencia del agua, la degradación de la metilamina fue evaluada por día; es decir, la MA expuesta a la luz-oscuridad, a una temperatura de 4 y 25°C , analizando cada muestra por triplicado cada 60 minutos aproximadamente.

4.7.2 Cinética de degradación

Una vez obtenidas las áreas correspondientes a la degradación de la MA se realizó una interpolación con la curva de calibración y se obtuvo con esto la concentración correspondiente. Para determinar la velocidad de degradación fue necesario primero determinar el orden de reacción, para esto se graficó la concentración vs el tiempo (Orden 0), el logaritmo del cociente de la concentración medida y la concentración inicial ($\ln C/C_0$) en función del tiempo (primer orden) y el inverso de la concentración versus tiempo (segundo orden). Se eligió la gráfica con tendencia lineal y con un valor del coeficiente de correlación más cercano a uno.

Una vez determinado el orden de reacción fue calculada la ecuación de regresión lineal y se obtuvo el valor de la pendiente, el cual es igual a la velocidad de degradación. A partir de este valor se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el tiempo de vida media.

4.8. Porcentaje de recobro (% R)

El porcentaje de recobro se realizó para analizar la pérdida de MA durante su análisis, así como la eficiencia de las etapas de preconcentración de la muestra (EFS y derivatización). Es así como se decidió aplicar la metilamina después de las etapas con posibles pérdidas del compuesto. Para ello se utilizó la curva de calibración en jugo de caña, para cuantificar la concentración de la metilamina recuperada. La primera condición fue adicionar la metilamina al jugo antes de ser sometido a la centrifugación, tal como se hizo para su análisis de degradación. La segunda condición consistió en diluir el jugo con metanol centrifugar y adicionar la



metilamina al sobrenadante. La tercera condición fue adicionar la metilamina directo al vial, después de la derivatización y elución con acetonitrilo (Fig. 17).



Fig. 17. Esquema de la metodología para determinar el % de recobro

4.9. Análisis estadístico

Con la finalidad de evaluar si existen diferencias significativas entre las respuestas obtenidas, para el diseño experimental descrito en el punto 4.7, se realizó un estudio estadístico de análisis de varianza o andeva (ANOVA, en inglés), utilizando el programa de Statgraphics Plus 5.1.



5. Resultados y discusión

5.1. Identificación y cuantificación de la metilamina

La metilamina fue analizada mediante la metodología descrita por Meseguer-Lloret *et al.* (2002) y, como ya se mencionó, se le realizaron a dicha metodología dos pequeñas modificaciones en la etapa de preconcentración de la muestra. Estas modificaciones se muestran en la Tabla 13. La primera parte experimental no fue reproducible por lo que se realizó una investigación bibliográfica y, para poder detectar los factores que podrían estar afectando el análisis, en dicha investigación se encontró que la reacción de derivatización se veía favorecida al aumentar a 1 mL la mezcla de la solución derivatizante, así que se trabajó con 1 mL de dicha mezcla durante toda la investigación.

El secado del cartucho con el uso de una bomba de vacío después de la limpieza con la solución de NaHCO_3 saturada, la cual contenía NaOH 0.1N (1:1), modificaba la señal del pico, dando como resultado una disminución de dicha señal, por lo que se decidió omitir dicho paso. El efecto consecuente de no hacer uso de la bomba de vacío fue la detección de reactivos residuales, los cuales se observan en las Figuras 18 y 19, como picos anchos que se detectan a partir del minuto 4.0. La diferencia tan notoria del área de los picos de reactivos residuales, se debe al uso de cartuchos lavados que fueron reciclados debido al número de muestras a analizar. En el Anexo A.1 se muestra la metodología de lavado de los materiales de vidrio y en el Anexo A.2 el de los cartuchos C_{18} .

Tabla 13. Comparación de metodologías para la preconcentración de la metilamina

Condiciones de la preconcentración		
	Meseguer-Lloret <i>et al.</i> , (2002)	En esta investigación
Volumen de solución $\text{Dns-Cl}/\text{NaHCO}_3$ (2:3)v/v	0.5 mL	1.0 mL
Limpieza del cartucho	NaHCO_3 : NaOH No especificada la relación	NaHCO_3 : NaOH (1:1 v/v)
Secado de cartucho	Uso de bomba de vacío	No fue secado



5.1.1. Tiempo de retención de la metilamina

Los tiempos de retención (t_R), de la metilamina en las dos matrices estudiadas fueron de 3.305 minutos en agua (Fig. 18) y 3.450 minutos en jugo de caña (Fig. 19).

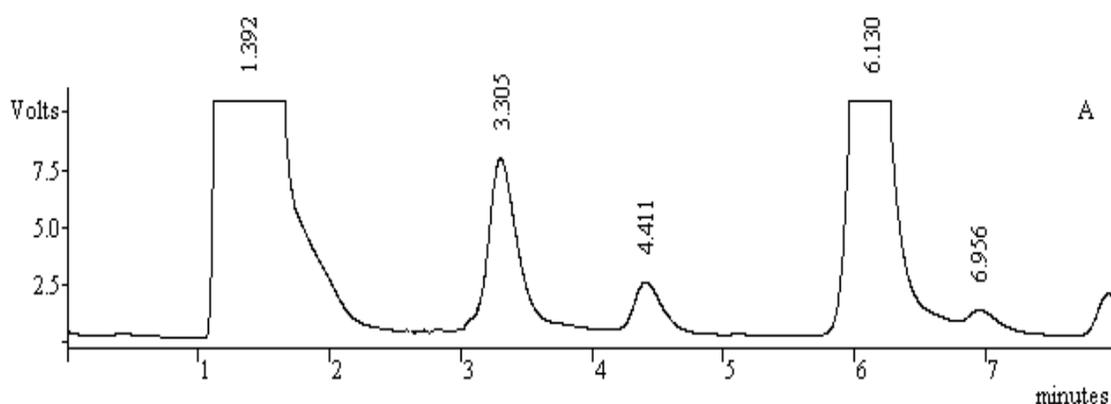


Fig. 18. Cromatograma de la metilamina en agua; Columna: Pickering Laboratories SA 150 x 4.6 mm (5 μ m); fase móvil: ACN:Imidazol (50:50) tiempo cero (90:10) a 9 min, (50:50) 10 min a un flujo: 1 mL min⁻¹; volumen de inyección: 20 μ L; detector fluorescencia λ_{em} =530 nm y λ_{ex} =350 nm

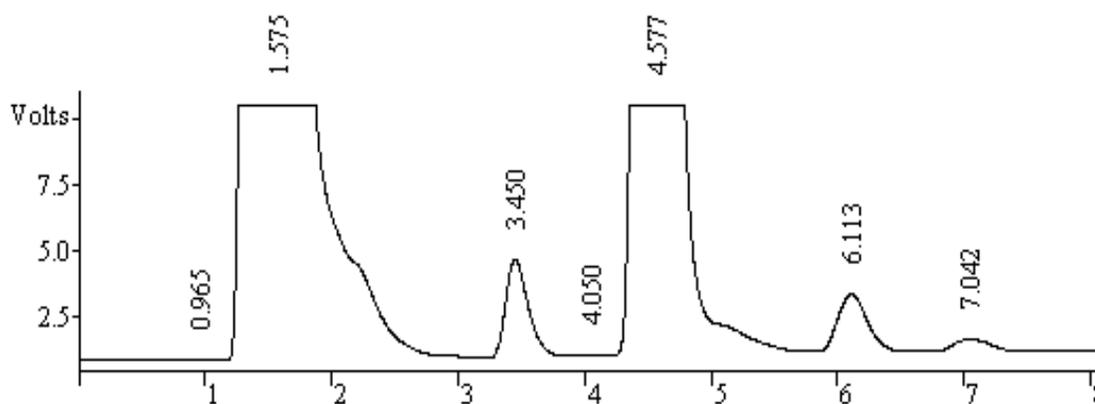


Fig. 19. Cromatograma de la metilamina en jugo de caña; Columna: Pickering Laboratories SA 150 x 4.6 mm (5 μ m); fase móvil: ACN:Imidazol (50:50) tiempo cero (90:10) a 9 min, (50:50) 10 min a un flujo: 1 mL min⁻¹; volumen de inyección: 20 μ L; detector fluorescencia λ_{em} =530 nm y λ_{ex} =350 nm



La diferencia de los tiempos entre ambas matrices es mínima lo que indica que no existen interferencias aportadas por los componentes disueltos en el jugo de caña.

5.1.2. Límites de detección (L_d)

Los límites de detección obtenidos se muestran en la Tabla 14. Como se observa, el límite de detección de la metilamina en la matriz de jugo de caña es cien veces menor que en el agua. Esto podría deberse a una reacción intrínseca entre el grupo amino y los carbohidratos reductores presentes en el jugo que da como resultado compuestos coloreados. Estos compuestos, las melanoidinas, son una de las causas de las diferentes coloraciones que presenta el azúcar entre cada zafra producida (Larrahondo, 1995).

Tabla 14. Tiempo de retención y límite de detección de la metilamina en diferentes matrices

Matriz	Tiempo de retención	Límites de detección. $\mu\text{g L}^{-1}$
Jugo de caña	3.450 ± 0.006	0.001
Agua	3.305 ± 0.039	0.1

5.1.3. Curvas de calibración

Se realizaron dos curvas de calibración de metilamina, una en agua con un intervalo de concentraciones de 0.3 a 1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 20) y la otra en jugo de caña en un intervalo de 0.003 a 0.017 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 21), obteniendo valores para los coeficientes de correlación (r) de 0.9987 y 0.9887 respectivamente. En la Tabla 15 se presentan los coeficientes de variación de las curvas de calibración.

Como puede observarse, la curva patrón de MA en jugo (Fig. 21), presenta una tendencia exponencial, la cual se podría atribuir a la reacción que da lugar a las melanoidinas, las cuales se formarán según la concentración de carbohidratos, reductores presentes en el jugo. Es así que, entre mayor sea la concentración de



dichos carbohidratos: fructosa y glucosa (Fig. 11), la reacción se verá inclinada hacia la formación de las melanoidinas.

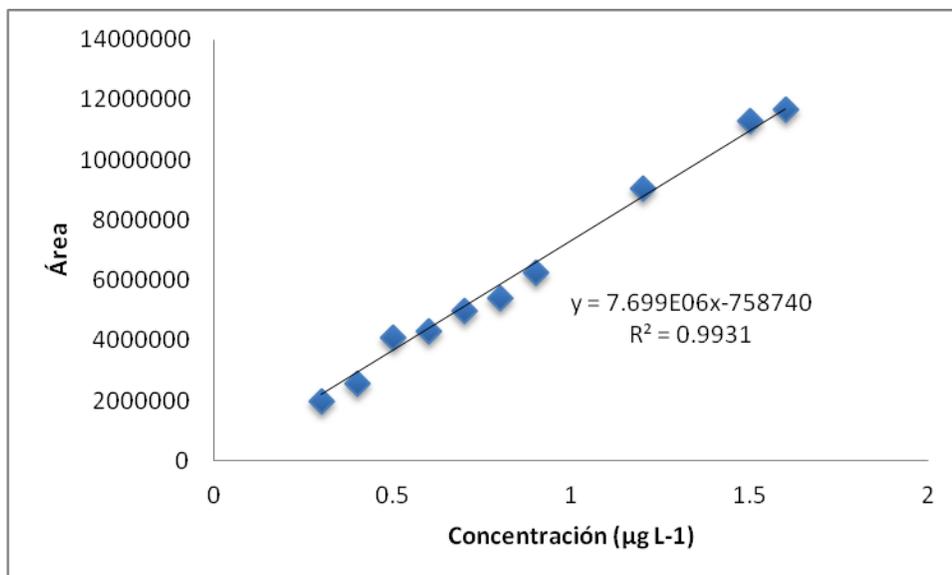


Fig. 20. Curva de calibración de la metilamina en una matriz de agua (A.4)

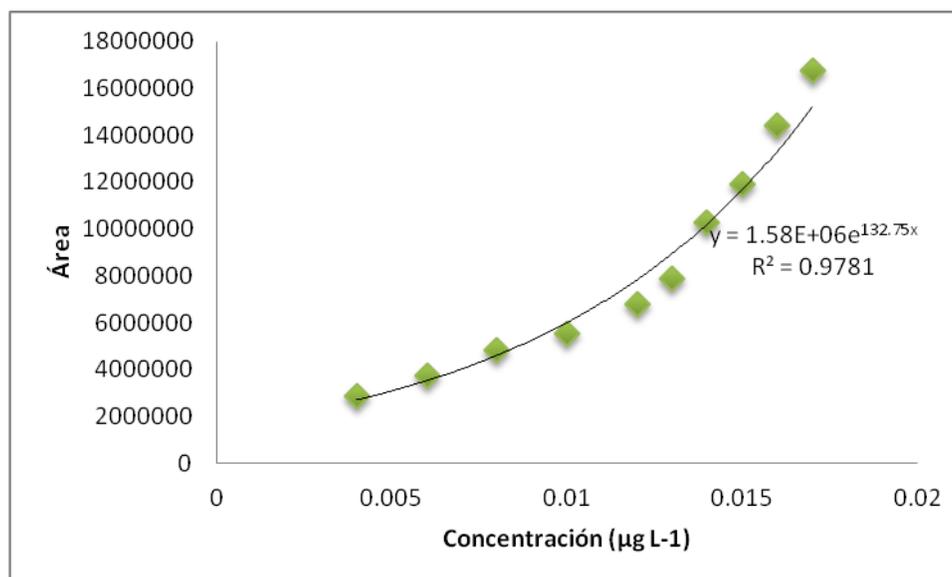


Fig. 21. Curva de calibración de la metilamina en una matriz de jugo de caña (A.5)



Por lo tanto, esta metodología además de mostrar la posible existencia de MA en el jugo de caña, también podrá brindar un panorama de la calidad del jugo de caña, pues la diferencia de respuesta (área bajo la curva) respecto a un blanco será la señal aportada por las melanoidinas, las cuales entre mayor sea su concentración, mayor será el deterioro del jugo y, por ende, dicho jugo será de menor calidad, lo cual se verá reflejado en un menor rendimiento de fábrica.

Tabla 15. Regresión lineal de las curvas patrón de la MA en agua y jugo de caña

Curva	Pendiente	Ordenada al origen	r ²	r
Agua	$7.699 \times 10^6 \pm 69362$	-758740 ± 115722	0.9976	0.9987
Jugo de caña	$\ln 132.75 \pm 5.65$	$1.58 \times 10^6 \pm 142272$	0.9781	0.9889
Jugo de caña linealizada	132.75 ± 5.65	14.281 ± 0.0887	0.9781	0.9889

La curva de MA en jugo de caña fue linealizada, aplicando logaritmos a las áreas y estos valores fueron graficados en función de la concentración (Fig. 22).

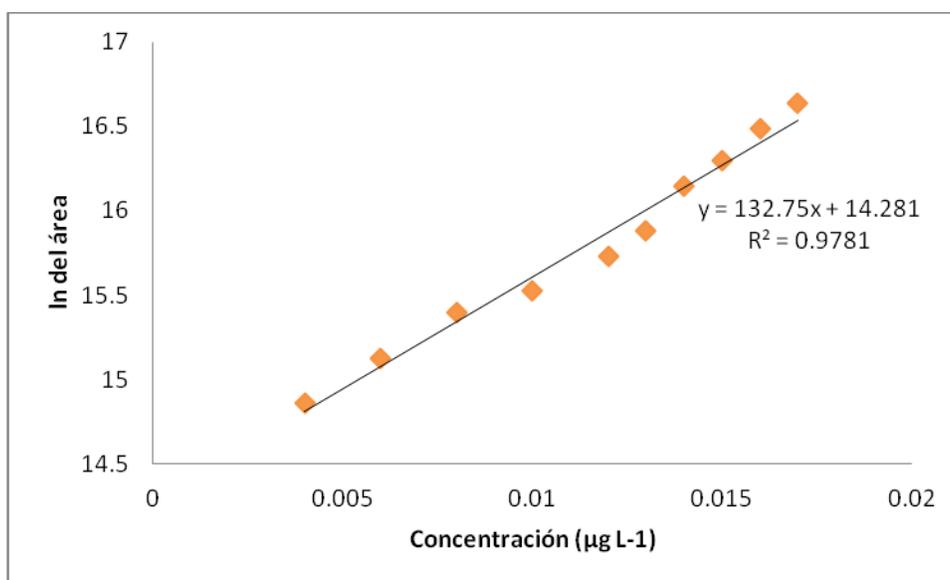


Fig. 22. Curva linealizada de la concentración de MA en jugo de caña



5.2. Precisión

Al efectuar un análisis se debe verificar en primer lugar la precisión de sus mediciones. Dicha precisión se refiere a la dispersión de los datos obtenidos en las repeticiones de un análisis. Con la finalidad de verificar la confiabilidad de la metodología y evaluar su precisión y exactitud, las repeticiones de la inyección del punto medio de cada curva fueron analizadas estadísticamente.

En la Tabla 16 se presentan los valores de la media ($X = \sum x_i / N$) desviación estándar ($S = \sqrt{\sum (x_i - X)^2 / n - 1}$) y coeficiente de variación ($CV = \text{desviación estándar} / \text{media} \times 100\%$), obtenidos de las áreas correspondientes al punto medio de cada curva de calibración. Un valor de CV bajo, representa una mejor reproducibilidad del método y así como su exactitud.

Tabla 16. Análisis estadístico del punto medio de las curvas patrón

Matriz	Media (X)	Desviación estándar (S)	Coficiente de variación (CV)
Agua	4102205.2	67953.4902	1.65%
Jugo de caña	6485787.2	380807.679	5.87%

Los datos obtenidos arrojan un valor de CV relativamente bajo, es decir, hubo una alta reproducibilidad y una exactitud satisfactoria, durante la elaboración de las curvas patrón, por lo que se prosiguió con el análisis de la metilamina.

5.3. Degradación de la metilamina

Para hacer un análisis más detallado, de la degradación de la metilamina en las diferentes matrices, los resultados fueron expuestos por separado. En los puntos 5.3.1 y 5.3.2 se analiza la influencia de la matriz de agua y jugo de caña, respectivamente, sobre la degradación del compuesto.



5.3.1. Degradación en agua

La degradación de la metilamina en agua, expuesta a las condiciones mencionadas en el punto 4.7 fue de orden cero, lo que indica que su rapidez de degradación fue independiente de la concentración de la MA y se vio afectada principalmente por las condiciones a la que se sometió (temperatura, tiempo, exposición a la luz y matriz). En la Fig. 23 se observa que la rapidez de degradación de la MA, fue mayor cuando fue expuesta a las condiciones de luz y temperatura de 25°C (LUZ/25°C). La rapidez de degradación, así como el tiempo de vida media de la MA bajo las diferentes condiciones observadas se detallan en la Tabla 17.

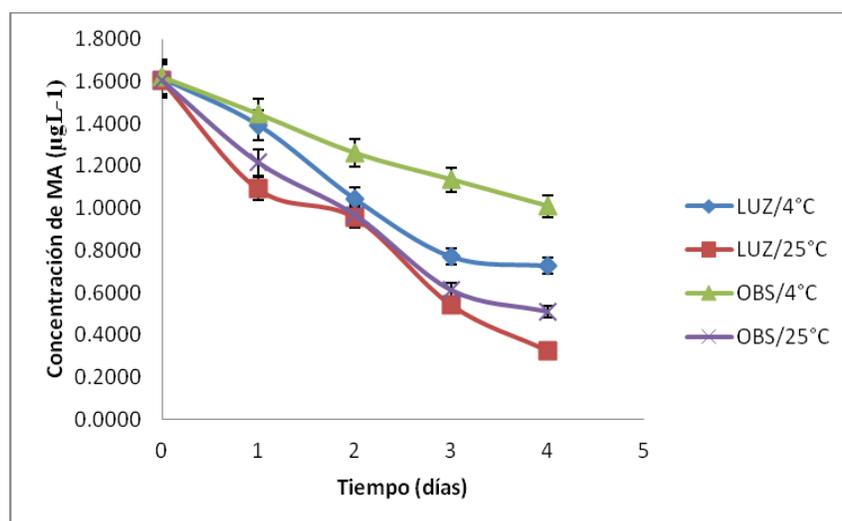


Fig. 23 Curvas de degradación de la MA en de agua

Tabla 17. Cinética de degradación de la metilamina en agua

Experimento	Condiciones experimentales		Cinética de degradación		
	Fotólisis	Temperatura	% Degradación	K ($\mu\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (d)
1	Luz	4°C	54.5	0.2393	3.34
2		25°C	79.6	0.3110	2.57
3	Oscuridad	4°C	36.9	0.1537	5.20
4		25°C	68.0	0.2787	2.87

K: Rapidez de degradación; $t_{1/2}$: Tiempo de vida media



La metilamina sufrió una degradación del 79.6% de su concentración inicial con una rapidez de $0.311 \mu\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ cuando se expuso a la luz solar y a una temperatura ambiente de alrededor de 25°C . Su tiempo de vida media fue de 2.57 días, menos de la mitad del tiempo de vida media de la MA expuesta a una temperatura de 4°C y oscuridad, el cual es de 5.20 días. Esto indica que existe una influencia de la temperatura y exposición a la luz solar sobre su descomposición.

5.3.2. Degradación en jugo de caña

El orden de reacción de la MA en jugo de caña, al igual que con la matriz agua fue de orden cero a excepción de la MA expuesta a la luz a una temperatura de 25°C , la cual tuvo una degradación de segundo orden, es decir la degradación fue mucho mayor a estas condiciones. En la Fig. 24, se observa claramente cómo la concentración de la MA en jugo de caña disminuye considerablemente cuando es expuesta a la luz a una temperatura ambiente (25°C), en comparación con los otros experimentos. Esto indica que, bajo estas condiciones, sucede una mayor degradación de la MA, alrededor del 72%. Por ello, en un proceso cotidiano de elaboración de azúcar ($80\text{-}120^{\circ}\text{C}$), la degradación será mayor dejando pocas posibilidades de su existencia en los subproductos del proceso tales como: miel, cachaza, melaza, etc.

Por otro lado, con la presencia de carbohidratos, existe la posible formación de melanoidinas y, aunque se han evidenciado que poseen actividad antioxidante y antimicrobiana, estos compuestos son indeseables en la producción de azúcar, ya que varían la coloración final del azúcar crudo, existiendo variaciones entre cada zafra que perjudican su calidad para la industria alimentaria, al generar gastos de estandarización de color en sus productos. Otro efecto de la presencia de las melanoidinas es que se tienen que realizar más procesos de refinación.

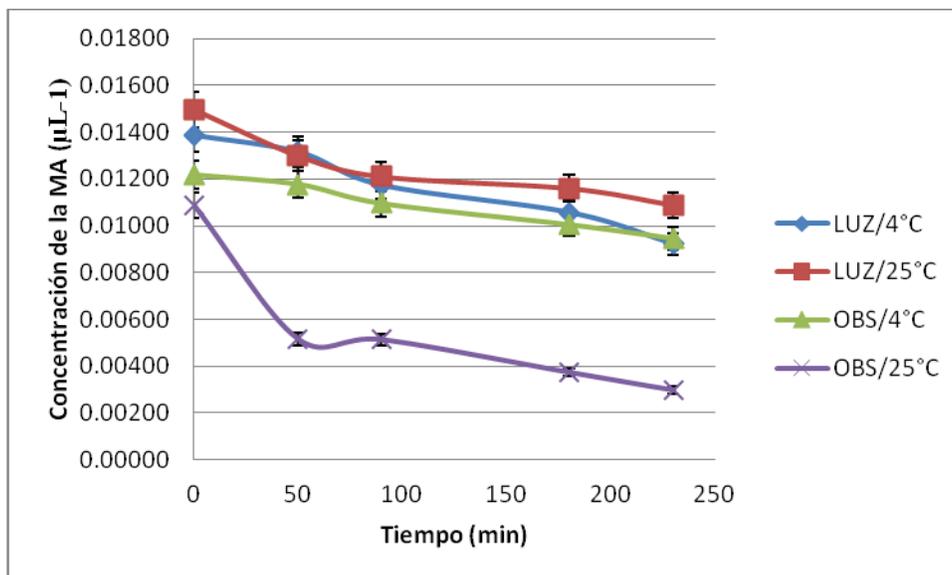


Fig. 24 Curvas de degradación de la MA en jugo de caña

En la Fig. 25 se muestra el inverso de la concentración de la MA en función del tiempo, gráfico donde la reacción mostró un comportamiento lineal y fue utilizado para los cálculos de la cinética de degradación (Tabla 18).

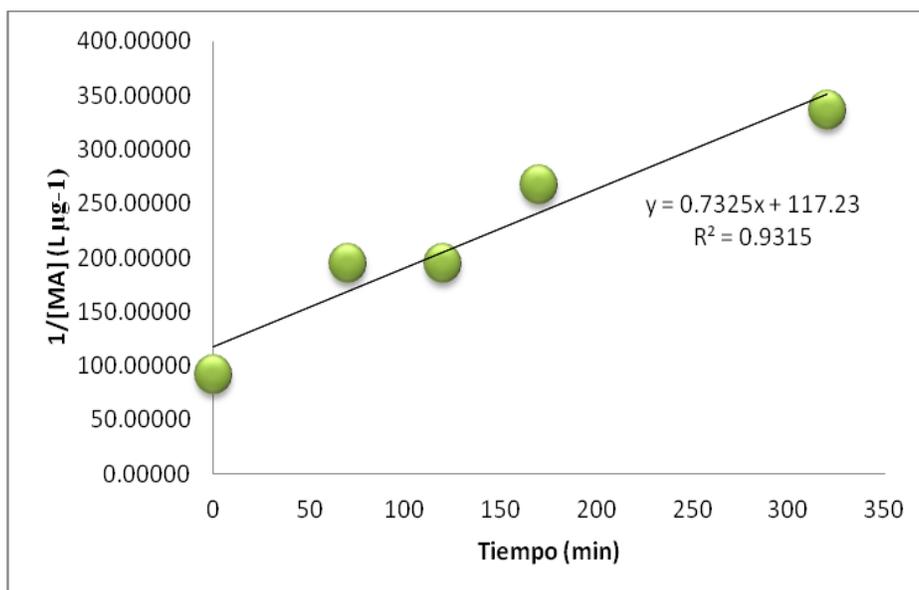


Fig. 25. Gráfico del inverso de la concentración versus el tiempo para la MA en jugo de caña para evaluar la constante de rapidez de reacción



Tabla 18. Cinética de degradación para cada experimento de la MA en jugo

Experimento	Condiciones experimentales		Cinética de degradación				
	Fotólisis	Temperatura	Degradación, %	k , $\mu\text{g L}^{-1}\text{min}^{-1}$	k , $\text{L } \mu\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$	$t_{1/2}$, min	$t_{1/2}$, h
1	Luz	4°C	33.5	$1.99 \cdot 10^{-5}$	-	348.7	5.81
2		25°C	72.7	-	0.7325	125.5	2.10
3	Oscuridad	4°C	27.1	$1.60 \cdot 10^{-5}$	-	466	7.76
4		25°C	24.7	$1.29 \cdot 10^{-5}$	-	470.5	7.84

k : Rapidez de degradación de orden cero; k : Rapidez de degradación de segundo orden (25°C/Luz), respectivamente; $t_{1/2}$: Tiempo de vida media; h: hora; min: minutos

5.4. Análisis estadístico de la influencia de los factores en la degradación

Para determinar cuál o cuáles fueron los factores que contribuyeron de manera significativa en la degradación de la metilamina, se realizó un análisis de varianza o andeva (ANOVA, en inglés) (A.6) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19. En este caso, cinco fuentes de variación tienen los valores de significancia observada inferiores a 0.05 (A: tiempo, C: matriz, AC, BC, y CD), indicando que son significativamente diferentes de cero al 95.0% de nivel de confianza, es decir, estos factores y sus interacciones son los que tiene un aporte significativo sobre la degradación de la metilamina.

Tabla 19. Análisis de varianza para la degradación de metilamina

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estadístico de prueba	Significancia observada
A: Tiempo	2.83668	1	2.83668	92.93	0.0000
B: Temperatura	0.0399192	1	0.039919	1.31	0.2606
C: Matriz	13.4241	1	13.4241	439.79	0.0000
D: Fotólisis	0.0438577	1	0.043858	1.44	0.2387
AB	0.0296421	1	0.029642	0.97	0.3312
AC	3.51028	1	3.51028	115.00	0.0000
AD	0.0411618	1	0.041162	1.35	0.2534
BC	0.15841	1	0.15841	5.19	0.0289
BD	0.0641292	1	0.064129	2.10	0.1561
CD	0.165144	1	0.165144	5.41	0.0259
Bloques	0.0003915	2	0.000196	0.01	0.9936
Error total	1.06833	35	0.030524		
Total	21.3821	47			



Para observar mejor la influencia de estos factores se muestra en la Figura 26 el diagrama de Pareto. Las barras que sobrepasan la línea vertical (nivel de confiabilidad, 95%), son los factores más importantes en el momento de la degradación de la metilamina. Para este caso, los cinco parámetros de mayor de incidencia en orden de importancia son: matriz, la interacción tiempo-matriz, el factor tiempo y, finalmente, las interacciones matriz-fotólisis y temperatura-fotólisis.

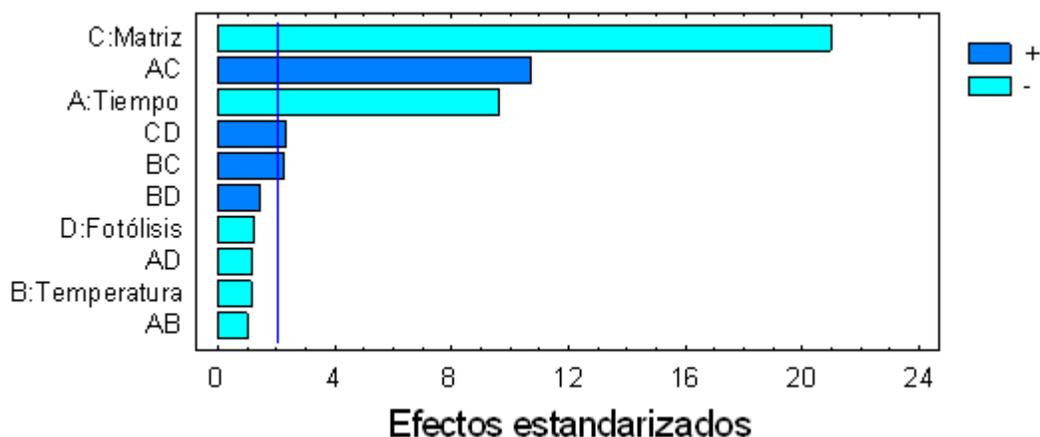


Fig. 26. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de la metilamina

El factor matriz tiene un efecto negativo sobre la concentración de la metilamina, es decir, la metilamina en una matriz de jugo de caña se degradará con mayor facilidad. El factor tiempo, de igual forma, tiene un efecto negativo sobre la concentración de la metilamina, es decir, conforme mayor sea el tiempo transcurrido, menor será la concentración de la MA.

Por otro lado, las interacciones: AC, CD y BC tienen un factor común, el cual es la matriz (C), teniendo todas las anteriores un efecto directamente proporcional a la concentración de la metilamina. Lo que significa que entre mayor sea esta interacción mayor será la degradación del compuesto. En la Tabla 19 se muestra el porcentaje de contribución de cada factor analizado y se observa que el factor matriz contribuye con más del 66% en la degradación de la metilamina. Luego se encuentra la interacción tiempo-matriz con un 17% y, por último, el factor tiempo



con un 14%. Por lo anterior, se recomienda que sólo los factores con una contribución significativa se tomen en cuenta para posteriores análisis.

Tabla 20. Contribución porcentual de cada factor sobre la degradación

Factores	Contribución porcentual
A: Tiempo	14.09%
B: Temperatura	0.198%
C: Matriz	66.69%
D: Fotólisis	0.218%
AB	0.147%
AC	17.44%
AD	0.204%
BC	0.787%
BD	0.319%
CD	0.820%

5.5. Porcentaje de recobro

Se evaluó el porcentaje de recobro según la metodología del punto 4.8 y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Porcentaje de recobro de la MA en jugo de caña

Experimento	Área	Concentración	%
1	8364244 ± 149994	0.0125 ± 0.00013	86.4 ± 0.55
2	10852332 ± 158889	0.0145 ± 0.00011	100 ± 0.77
3	6908616 ± 24268	0.0111 ± 0.00003	76.5 ± 0.76



Con estos resultados se puede saber cuánto compuesto se perdió durante el manejo de la muestra como resultado de la metodología implementada.

El experimento 2 (adición de la MA en el sobrenadante) fue tomado como el 100% de recobro ya que es donde existe una mayor recuperación del compuesto, al no haber pérdida de la MA en el sólido suspendido durante la centrifugación y donde hubo una conversión mayoritaria, durante la reacción de derivatización.

Es así como, al analizar una muestra de MA presente en jugo de caña, se tendrá un promedio de recobro del 86%, es decir, durante el análisis habrá una pérdida de alrededor del 14%, que deberá considerarse en los cálculos finales de la concentración de MA presente en dicha muestra.



6. Conclusiones

Considerando el objetivo general de esta investigación, evaluar la degradación de la metilamina bajo diferentes condiciones ambientales, considerando que ocurren durante la producción del azúcar y determinando su comportamiento bajo dichas condiciones, los objetivos particulares de revisar las metodologías analíticas que utilicen la cromatografía de líquidos de alta resolución, para la determinación y cuantificación de la metilamina en matrices acuosas (agua grado cromatográfico y jugo de caña), de evaluar la degradación de la metilamina bajo los siguientes factores: temperatura, tiempo, fotólisis y matriz, de identificar qué factor o factores contribuyen en mayor proporción con la degradación de la metilamina, de investigar el comportamiento de la metilamina en las diferentes matrices y de determinar los tiempos de vida media de la metilamina así como sus límites de detección en las matrices estudiadas y, finalmente, la hipótesis: La concentración de la metilamina disminuirá al ser expuesta a las condiciones de temperatura, fotólisis, tiempo y matriz presentes en un proceso azucarero, se tienen las siguientes conclusiones.

- Se alcanzó el objetivo general, ya que la metilamina se degrada a las condiciones estudiadas hasta en un 73%. Dado que en un ingenio azucarero se tendrán condiciones aún más drásticas, muy probablemente se logre alcanzar el 100% de su degradación en condiciones reales
- Se implementó la metodología propuesta por Meseguer-Lloret *et al.* (2002) para realizar el análisis de la metilamina en las matrices acuosas (agua y jugo de caña), con dos pequeñas modificaciones operativas y se logró detectar y cuantificar el compuesto en estudio
- Se evaluó la degradación de la metilamina empleando los siguientes factores: temperatura (4,25°C), fotólisis (luz, oscuridad), tiempo (0 a 5 d) y matriz (agua, jugo de caña). Originalmente se había planteado también considerar el pH, ya que se trabaja en condiciones ácidas en los ingenios



azucareros pero, debido a la reacción de derivatización que se lleva a cabo a un pH determinado, no fue posible evaluar su efecto sobre la degradación del compuesto. La variable más importante fue la matriz

- La metilamina en el jugo de caña, expuesta a la luz y a una temperatura ligeramente menor a la ambiente en las zonas cañeras (25°C), se degrada hasta un 73% y su vida media es de aproximadamente dos horas. De acuerdo con las condiciones reales, se considera poco probable que se encuentre en los subproductos de la elaboración del azúcar
- Los factores más importantes en el momento de la degradación de la metilamina en orden de importancia fueron: La matriz, la interacción tiempo-matriz, el factor tiempo y las interacciones: matriz-fotólisis y temperatura-fotólisis. El factor matriz (jugo de caña) tuvo un porcentaje de contribución del 66.7% en la degradación del compuesto
- El comportamiento de la metilamina en su degradación, específicamente en jugo de caña, se focaliza como una reacción de Maillard con la producción de compuestos coloreados (melanoidinas). Esto deberá ser corroborado en experimentos posteriores ya que la estructura de la metilamina es relativamente simple ($\text{CH}_3\text{-NH}_2$)
- Esta metodología, además de cuantificar la presencia de metilamina, también podría ser una herramienta para la vigilancia de la calidad del jugo de caña, al dar una idea del efecto de los carbohidratos reductores presentes en el jugo que son los que reaccionarían con la metilamina
- No existe una legislación para el seguimiento de la presencia de metilamina en alimentos en general, a pesar de su toxicidad; por otro lado, los límites máximos en el ambiente laboral establecidos por la norma nacional y las internacionales consideradas no tienen mayores diferencias, situándose alrededor de 10 ppm durante una jornada laboral de 8 horas. Ésta sería otra línea de investigación interesante para corroborar su inocuidad
- La degradación presentada por el compuesto de interés cuando fue expuesto a la luz solar y a una temperatura ambiente de 25°C presenta, para la matriz



de agua, una constante de velocidad de degradación (**k**) de $0.3110 \mu\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 2.57 días, así como una constante de velocidad de reacción de segundo orden (**k**) de $0.7325 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ o, en días, $1055 \text{ L} \mu\text{g}^{-1}\text{d}^{-1}$, que es más de 3000 veces mayor a la del agua a las mismas condiciones) con un $t_{1/2}$ 125.5 minutos (0.087 d, 30 veces menor que para agua) en la matriz de jugo de caña

- El límite de detección de la metilamina en la matriz de jugo de caña es cien veces menor que en el agua. Esto podría deberse a una reacción intrínseca entre el grupo amino y los carbohidratos reductores presentes en el jugo que da como resultado compuestos coloreados. Estos compuestos, las melanoidinas, que son una de las causas de las diferentes coloraciones que presenta el azúcar entre cada zafra producida, explicarían muy bien el destino de la metilamina, por lo que resulta muy importante corroborarlo en una investigación futura
- En esta investigación se corroboró la hipótesis inicial ya que, en efecto, la concentración de la metilamina disminuyó al ser expuesta a las condiciones de temperatura (4, 25°C), fotólisis, tiempo y matriz presentes en un proceso azucarero.

A continuación se presentan las recomendaciones a seguir para continuar con esta investigación.



7. Recomendaciones

- Realizar una búsqueda bibliográfica de una metodología que permita analizar la contribución del pH del medio en la degradación de la MA y llevarla a cabo, considerando sólo los factores de matriz (jugo de caña), expuesto a la luz a una temperatura de 25°C
- Determinar la presencia, usando esta metodología, de la metilamina en jugo de caña en una planta real considerando la degradación del metil ditiocarbamato de sodio adicionado en el proceso
- Cuantificar la formación de melanoidinas en función de la concentración de metilamina en jugo de caña, considerando solamente los factores que tuvieron una contribución significativa en este estudio, es decir: matriz de jugo de caña, luz, temperatura ambiente y tiempo.

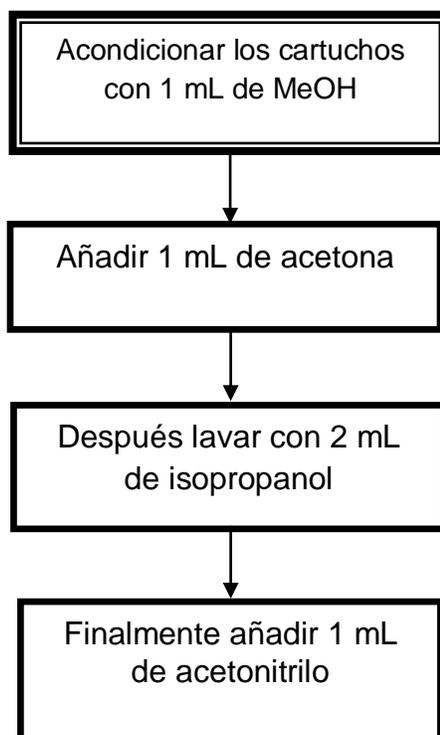


A.1. Lavado de material de vidrio





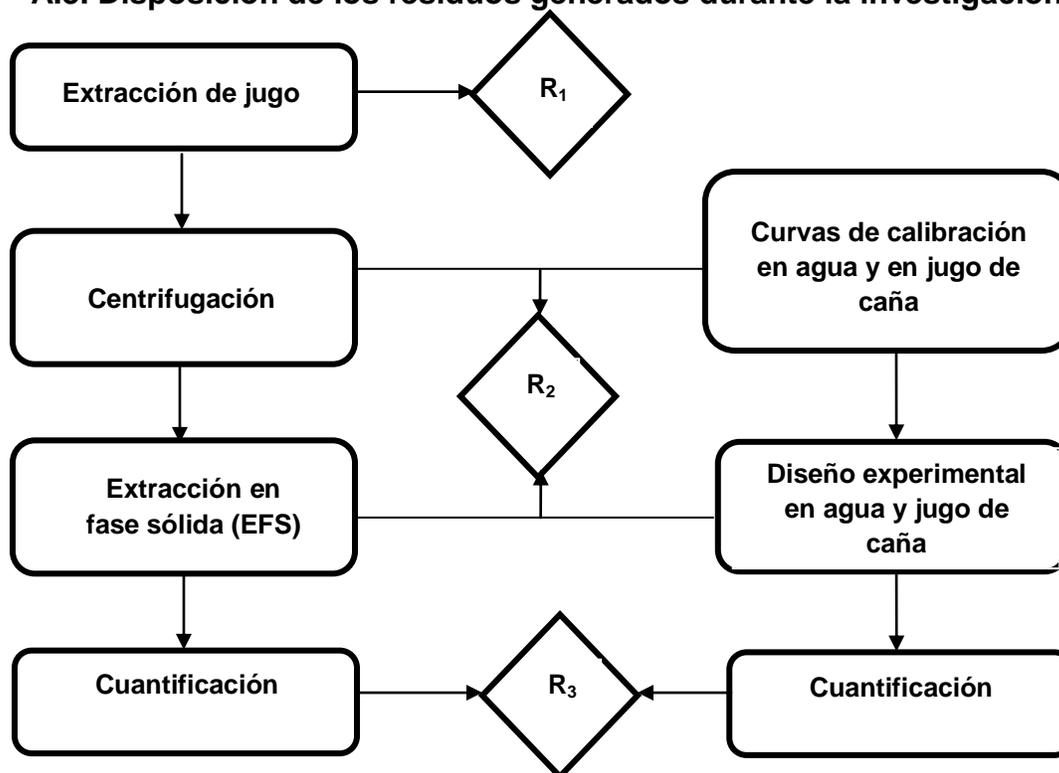
A.2. Lavado de cartuchos C₁₈



- Todos los solventes utilizados en el lavado de los cartuchos fueron grado cromatográfico
- Los cartuchos se reutilizaron mediante su lavado por tres veces. Una vez cumplidos estos tres lavados fueron desechados



A.3. Disposición de los residuos generados durante la investigación



R₁ = Corresponde a los desechos de la extracción del jugo de la caña: la cáscara, el bagazo y demás materia orgánica

R₂ = Corresponde a la mezcla de metanol, cloruro de dansilo, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, agua y jugo de caña de las muestras de las extracciones, curvas de calibración y diseño experimental

R₃ = Corresponde, tanto a la mezcla de fase móvil agua-acetonitrilo-imidazol, así como las muestras inyectadas de la metilamina y a los cartuchos ya desechados

Residuo	Tratamiento
R₁	Se desecha con los residuos orgánicos enviados a la Unidad de Gestión Ambiental, UGA, de la Facultad de Química
R₂	Se realiza una destilación simple para recuperar el metanol para otros proyectos que no requieren grado cromatográfico
R₃	Sometidos a tratamientos para recuperar el acetonitrilo y el imidazol. Se entregan a la Unidad de Gestión Ambiental, UGA, de la Facultad de Química. La metilamina, que puede descomponerse totalmente a sus óxidos por combustión (CO ₂ y NO ₂) se entrega a la Unidad de Gestión Ambiental, UGA, de la Facultad de Química. Los cartuchos gastados se entregan a la Unidad de Gestión Ambiental, UGA, de la Facultad de Química



A.4. Datos de área bajo la curva para la curva de calibración de la metilamina en agua

Concentración	Área bajo la curva
0.3	1974359.7 ± 185019
0.4	2572948.3 ± 107123.7
0.5	4104873.3 ± 140636.7
0.6	4309480.3 ± 106519.6
0.7	4981982.7 ± 102184.5
0.8	5390301.3 ± 137352.8
0.9	6235262.67 ± 186353.5
1.2	9046727.3 ± 142559.3
1.5	11280160.7 ± 149429.8
1.6	11657357.7 ± 189725.3



A.5. Datos de área bajo la curva para la curva de calibración de la metilamina en jugo de caña

Concentración	Área bajo la curva
0.004	2850961 ± 102848.9
0.006	3714995.3 ± 260750.6
0.008	4846404.7 ± 241480.4
0.01	5526647.3 ± 297248.5
0.012	6774029.67 ± 214326.6
0.013	7882726 ± 291949.6
0.014	10247158 ± 254957.6
0.015	11921046.7 ± 471391.8
0.016	14427332 ± 424878.4
0.017	16768776.3 ± 412152.5



A.6. Tabla para análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados, SC	g.l.	Variancias
Externa entre las muestras	$SCE = \sum_{ni} (x_i - \bar{x})^2$ =A-B (*)	k-1	$S^2_E = SCE / k-1$
No externa (Interna) Dentro de las muestras	$SCNE = \sum \sum_{ni} (x_i - \bar{x})^2$ =C-A (*)	n-k	$S^2_R = SCNE / n-k$
Total	$SCT = \sum \sum_{ni} (x_i - \bar{x})^2$ =SCE+SCNE	n-1	$S^2_x = SCT / n-i$

Valor crítico $F_c = F_{k-1, n-k} (1-a)$	Si $F \leq F_c$ Aceptar H_0
Valor estimado $F = S^2_E / S^2_R$	Si $F > F_c$ Rechazar H_0

(*) El cálculo de SCE y SCNE se tiene que determinar tal y como indican las fórmulas calculando las medias de cada muestra, la media total y efectuando las restas que se indican



Bibliografía

- Anónimo. (2012a). [En línea] Disponible en: <http://apuntescientificos.org/ordenes-de-reaccion-ibq2.html>, 2012 [Último acceso el 18 de julio de 2013]
- Anónimo. (2012b). [En línea] Disponible en: <http:// analisisvinicos.com/extrafasesolida.php.htm> [Último acceso el 18 de julio de 2013]
- Arvizu-Bernal, D. I. y Ramos-Medina, J. C. (2010). Degradación del ditiocarbamato de sodio usado como plaguicida en el proceso de elaboración de azúcar en México mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. México.
- Asocaña. 2012. Sector Azucarero Colombiano. Proceso de elaboración de azúcar. Disponible en: <http://www.asocana.org/StaticContentView.aspx?Scid=209>
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera, 2012. Caña de azúcar. *Saccharum officinarum*. [En línea] (Actualizado 24 de octubre de 2012).
- Calero, L., Gil, N., Daza, Z., Socarrás, J., Pereldo, S., Barrientos, D., Erazo, V. (2009). *Factores que inciden en las pérdidas indeterminadas del proceso de elaboración de azúcar*. En TECNICAÑA – VIII Congreso de la Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar. Colombia.
- Chang, D., Yang, F.Y., Yan, J.J., Wu, Y.Q., Bai, S.Q., Liang, X.Z., Zhang, Y.W. (2012). SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum*, from Sichuan, China. Genetic and Model Research On Line Journal ISSN 1676-5658. 11(2), 1245-1253.
- Cobo, M. y Silva, M. (2000). LC analysis of biogenic polyamines in table olives using on-line dansylation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Chromatographia*, 51(11-12), 706-712.



- CONADESUCA/SAGARPA, (2013) [En línea] Disponible en: http://www.infocana.gob.mx/mos_boletin.php?id=129 [Último acceso el 20 de julio de 2013]
- Cox, C. (2006). Metam sodium. *Journal of Pesticide Reform*, 26(1), 12-16.
- CRC. (2010). New product development from sugarcane (Bioproducts). Annual Report. Pp. 22-27.
- Cremllyn, R. J. (1991). Agrochemicals, preparation and mode of action. Editorial John Wiley & Sons, pp. 164-167. Nueva York, N.Y. EEUU.
- Cuddihy, J. A., Porro, M. E., Rauh, J.S. (1998). The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/polysach.pdf>.
- Cuervo-Mulet, R. A., Ledesma, J. Á., Durán-Vanegas, J. A, Argote-Vega, F. E. (2010). Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol / Isolation and microbiological control of *Leuconostoc mesenteroides*, in to sugar refinery to optimize the performance of sugar and ethanol / Isolamento e *Leuconostoc mesenteroides* controle microbiológico em um talento para otimizar o desempenho de açúcar e etanol. *Rev. Bio. Agro.* 8(2), 31-40.
- Díaz-Solares, M. (2004). Estudio de la expresión de la formaldehído-deshidrogenasa dependiente de glutatión de *Arabidopsis thaliana* y su función en la patogénesis. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 200 págs. Barcelona, España.
- Gao, P. F., Zhang, Z. X., Guo, X. F., Wang, H., Zhang, H. S. (2011). Determination of primary and secondary aliphatic amines with HPLC based on the derivatization using TMBB-Su. *Talanta* 84(4), 1093-1098.
- García, A. y Del Castillo, B., 1988. *Cromatografía líquida de alta resolución*. Limusa. México D.F. México.



- GEPLACEA, 1988. Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de azúcar. Secretariado. Manual de los derivados de la caña de azúcar. Pp. 17, 25, 26. México D.F., México.
- Gomis-Yagües, V. (2008). Tema 4 Cromatografía de líquidos de alta resolución, Técnicas instrumentales en el análisis industrial. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf> [Último acceso el 5 de julio de 2012]
- Harris, D. C. (2007). Fundamentos de Química Analítica. Ed. Reverté S.A., 3a ed. Pp. 610-640. Barcelona, España.
- Hernández-Guillamón, M. (2005). Contribució de l'amino oxidasa sensible a semicarbazida en el dany vascular: implicació en la malaltia d'Alzheimer i l'angiopatia cerebral amiloide. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona. 161 págs. Barcelona. España
- Herráez, H, C., Verdú A, J., Campins F, P. (2006). *An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1104(1,2), 40-46.
- Hugot, E. 1963. Manual para ingenieros azucareros. Cía. Editorial Continental. 75 págs. México, DF, México.
- Jiménez, C. (2012). SEMAR anuncia decomiso de metilamina; ya van cuatro. Diario la Razón Disponible en: http://www.razon.com.mx/spip.php?page=imprimir_articulo&id_article=126588 [Último acceso el 20 de julio de 2012]
- Kamiński, M., Jastrzebski, D., Przyjazny, A., Kartanowicz, R. (2002). Determination of the amount of wash amines and ammonium ion in desulfurization products of process gases and results of related studies. *Journal of Chromatography A*. 947(2), 217-225.
- Kumar, D., Kum, S., Gowri, S., Chandra, N., Bala, S. (2011). Determination of aliphatic amines by gas chromatography-mass spectrometry after in-syringe derivation with pentafluorobenzoyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5683-5687.



- LAINCO. (2010). Dirección electrónica (consultada el 25 de mayo de 2010). <http://www.lainco.es/files/pdf/9132%20LAISOL.pdf> LAINCO, S.A.
- Larrahondo, J. (1995). La calidad de la caña de azúcar. En CENICAÑA, El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Pp. 337-354. CENICAÑA. Cali, Colombia
- Linstromberg, W. W. (1977). Curso breve de química orgánica. Editorial Reverté. 515 págs. Barcelona, España.
- Mayeux, P. A., Colmer, A. R. (1960). Studies on microflora associated with *Saccharum officinarum*. Sugar Journal. 23 (7), 28-32.
- Meseguer-Lloret, S., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P. (2002). Preconcentration and dansylation of aliphatic amines using C18 solid-phase packing. Application to the screening analysis in environmental water samples. Journal of Chromatography A, 978(1-2), 59-69.
- Meseguer-Lloret, S., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P. (2004). Sensitive determination of aliphatic amines in water by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. Journal of Chromatography A, 1035(1), 75-82.
- MNCN. 2012. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio//es_ES//investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf [último acceso el 3 de mayo de 2012].
- New Jersey Department of Health. (2004). Hoja informativa sobre sustancias peligrosas (metilamina) [En línea] Disponible en: <http://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1225sp.pdf> [último acceso el 3 de mayo de 2013].
- Parmeggiani, L. Editor. (1999) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo: Volumen 1 A-E, Ministerio de Trabajo y Seguridad Social; 1708 págs. Madrid, España.



- Praxair, 2008. Ficha de datos de seguridad [En línea] (Actualizado el 6 de agosto de 2008). Disponible en: [http://www.praxair.com/eu/es/fseg_vig.nsf/AllContent/C125704B0032C2B2C12570CD00610088/\\$File/082.pdf](http://www.praxair.com/eu/es/fseg_vig.nsf/AllContent/C125704B0032C2B2C12570CD00610088/$File/082.pdf) [último acceso el 23 de mayo de 2013].
- PubChem. 2004. *PubChem compound*. Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6329> [último acceso el 21 de junio de 2012].
- Rodríguez, E. (2005). La dextrana a lo largo de la industria azucarera. *Biotecnología Aplicada*, 22(1), 11-19.
- Rubin, A. (2004). Metam Sodium (Sodium N-Methyldithiocarbamate). Risk characterization document. Medical Toxicology Branch, Department of Pesticide Regulation. Environmental Protection Agency. California, EEUU.
- SAGARPA. (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Importancia de la agroindustria de la caña de azúcar Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Ca%C3%B1a.pdf> [último acceso el 13 de mayo de 2013].
- Sahasrabuddhey, B., Jain A., Verma K.,1999. Determination of ammonia and aliphatic amines in environmental aqueous samples utilizing pre-column derivatization to their phenylthiourea and high performance liquid chromatography. *The Analyst*, 124, 1017-1021.
- Silliker, J. H., Chairman, R. P A., Bryan, J.H.B., Christian, D.S., Clark, J. C., Olson, Jr. T.A. (1980). *Ecología microbiana de los alimentos. 2. Productos alimenticios*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Skoog, D. A., Hiller, F. J., Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, 5ª Edición, 490 págs. Madrid, España.
- Stephen, M. C., Zhang, A. Q. (2001). Methylamine in human urine. *Clinica Chimica Acta*. 312(1), 107-114.



- STPS. (1999). NOM-010-STPS-1999: Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral. Diario Oficial de la Federación. Secretaría del Trabajo y Previsión Social. Poder Ejecutivo Federal. México D.F. México.
- Sumaya-Martínez, M. T., Negrete-Parra, B., Cruz-Jaime, S., Cruz-Cancino, N., Arroyo-Ramírez, M., Alanis-García, E. (2010). Inhibición de la reacción de Maillard en presencia de un extracto acuoso de la flor de *Yucca filifera* con actividad antirradical. Presentado en el VII Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia". Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. Tepic, Nayarit, México.
http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icsa/LI_TecNutri/Ernes_Alanis/3.pdf
- TCI América, (2005) Material Safety Data Sheet, Methylamine [En línea] Disponible en: <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-M0137.pdf> [último acceso el 13 de mayo de 2013].
- Teijón, J., García, J., Jiménez, Y. (2006). Ácidos y bases. En *La Química en problemas*. J. Teijón ed. Cap. 9. Editorial Tébar, S.L. Madrid, España.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson: 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology*, 144(9), 2377-2406.
- Thurman, E. M., Mills, M. S. (1998). Solid-phase extraction: principles and practice (Vol. 16). Wiley. Nueva York, NY, EEUU.
- Valle, P., Lucas, B. (2000). Toxicología de alimentos. Ed. Instituto Nacional de Salud Pública y Centro Nacional de Salud Ambiental. Pp. 267. México. D.F. México.
- Van Horne, K. C (1985). Sorbent extraction technology. Ed. Analytichem International. 124 págs. Harbor City, CA, EEUU.
- Villa, M. D. (2008). Efectos de microbiocidas y antagonistas microbianos sobre microorganismos causales del deterioro poscosecha de caña y su impacto en las pérdidas de sacarosa en el ingenio. Tesis de Maestría en



-
- Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional, IPN. 93 págs. Tlaxcala, Tlax., México.
- Wales, P. (2002). Department of Pesticide Regulation of California. Evaluation of methyl isothiocyanate as a toxic air contaminant. California Environmental Protection Agency. Sacramento, California, EEUU.
- Zhang, H., Zu, P. (2000). Solid phase extraction. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 28(9), 1172-1180.
- Zeisel, S. H., LaMont, J. T. (1988). Mono-, di-and trimethylamine in human gastric fluid: potential substrates for nitrosodimethylamine formation. Carcinogenesis, 9(1), 179-181.