

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN
INSUMOS Y PRODUCTOS DE TORTILLERÍAS DE
QUERÉTARO Y ALTERNATIVAS DE
DESCONTAMINACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ARISBE CASTELLANOS NAVA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. MAYO DE 2000

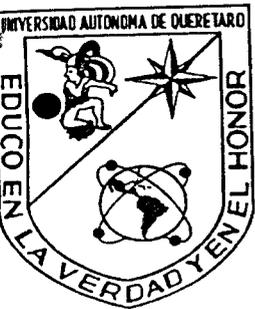
Nº Adq. H63277

Clas. TS

664.725

C348e

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN INSUMOS Y PRODUCTOS DE TORTILLERÍAS DE QUERÉTARO Y ALTERNATIVAS DE DESCONTAMINACIÓN

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

ARISBE CASTELLANOS NAVA

Dirigida por :

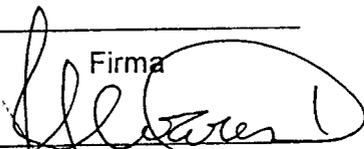
DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODALES

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA
Presidente


Firma

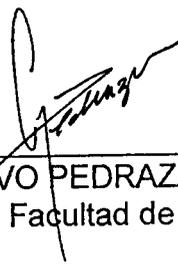
DR. JUAN DE DIOS FIGUEROA CÁRDENAS
Propietario


Firma

M. en C. JORGE ALVAREZ DOMINGUEZ
Propietario


Firma

M. en C. CRISTINA CABRERA MUÑOZ
Vocal


M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
Director de la Facultad de Química

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y en el Laboratorio de Investigación en Materiales del CINVESTAV (UAQ), Cerro de las Campanas S/N., Santiago de Querétaro, Qro., bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña y el Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas.

Una mención especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento e la beca para la realización de esta tesis y apoyo al proyecto "Desarrollo de métodos para desoxificar y desactivar aflatoxinas en tortillas de maíz" (número de referencia 25756-B).

***Las cosas que realmente valen la pena
son aquellas que cuestan mas trabajo.***

A mis padres Victor y Rita por todo su amor, cariño y confianza que a través de toda la vida me han dado, por el apoyo incondicional a pesar de mis decisiones, por ese ejemplo de lucha incansable y humildad. Gracias por todo ello y por la hermosa familia que me han dado, los amo.

A mis hermanos Yisel, Ale, Oyuki y Aiko por ser los mejores del mundo y por que aún con la distancia y los momentos difíciles que hemos vivido seguimos estando juntos. Gracias a cada uno de ustedes por llenar de alegría mi vida. Los amo.

A mi gran amiga Yola, por todos los retos que enfrentamos juntas, por todas la alegrías y tristezas que compartimos, ya que de ellas hemos aprendido y seguimos creciendo.

A mis amigos Poly y Gaby por su amistad incondicional y por la confianza que han tenido en mi en todo momento; a Koko y Gisela por los sueños que emprendimos juntas y por todas esas risas que nos ayudaron a aligerar la carga.

A Lucy y Gely por la gran amistad que hemos construido y por su apoyo incondicional en todas momentos, por escucharme y por esas palabra de aliento cuando las necesite. A Rafa por tu gran paciencia, apoyo y cariño.

A la Dra. Chacha, por la confianza y apoyo que deposito en mi para realizar este trabajo, pero sobre todo por su amistad y cariño.

A mis amigas Luzma, Adriana, Lulu y Chío, por su inigualable amistad, apoyo y ayuda para realizar este trabajo, sin ustedes hubiera sido muy difícil.

Señor, gracias por el gran amor que me has demostrado al haber puesto en mi camino a estas personas ya que de cada una he aprendido algo bueno; gracias por aquellas que vienen en camino, pero sobre todo por permitirme estar viviendo hoy este momento tan maravilloso, tu mejor que nadie sabes el gran esfuerzo, amor y entusiasmo que hay en el. Gracias por los obstáculos que me pusiste, crecí con ellos.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iii
I. RESÚMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. JUSTIFICACIÓN	6
IV ANTECEDENTES	7
A. MAÍZ	7
1. Generalidades	7
2. Contaminación por aflatoxinas	7
B. Micotoxinas	8
1. Generalidades	8
2. Aflatoxinas	10
3. AFB ₁	12
C. DESCONTAMINACIÓN DE AFLATOXINAS	14
1. Tratamientos químicos	14
2. Tratamientos físicos	17
D. NIXTAMALIZACIÓN	18
E. EXTRUSIÓN	20
V. OBJETIVOS	22
A. Objetivo general	22
B. Objetivos específicos	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	23
A. Material	23
1. Compuestos químicos	23

2. Material biológico	23
B. Métodos	23
1. Muestreo en tortillerías	23
1.1 Curva de calibración	25
1.2 Extracción, purificación y cuantificación de los niveles de AFB ₁	25
2. Extrusión	26
2.1. Método de extrusión	26
2.2. Harinas instantáneas	27
3. Nixtamalización	27
4. Tratamientos a evaluar	28
4.1 Tratamientos físicos	28
4.2 Tratamientos químicos	28
5. Parámetros de evaluación en tortillas	30
5.1 Capacidad de absorción de agua	30
5.2 Pérdida de peso	30
5.3 Rolabilidad	30
5.4 Inflado	31
5.5 Fuerza a la tensión y al corte	31
5.6 Humedad	32
6. Análisis estadístico	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
1. Curva de calibración	33
2. Muestreo en tortillerías	34
3. Eliminación de AFB ₁ en tortillas elaboradas por el el proceso de extrusión	43

3.1 Efecto de cal, peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y su combinación sobre los niveles de AFB ₁ en tortillas elaboradas por el proceso de extrusión	43
3.2 Efecto de cal, peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), hidróxido de amonio (NH ₄ OH) y su combinación sobre los niveles de AFB ₁ en tortillas elaboradas por el proceso de extrusión	45
3.3 Características organolépticas	50
4.0 Eliminación de AFB ₁ en tortillas elaboradas con harina instantánea obtenida por el proceso de extrusión.	54
4.1 Efecto de cal, peróxido de hidrógeno, hidróxido de amonio, dióxido de titanio y peróxido de benzóilo en tortillas elaboradas con harinas instantáneas obte- nida por el proceso de extrusión.	54
4.2 Características organolépticas	58
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Estructura de algunas micotoxinas	11
2	Metabolismo de biotransformación de AFB ₁	13
3	Posibles productos de obtención después de la aplicación de diversos tratamientos físicos y químicos	15
4	Estructura del extrusor	21
5	Curva de calibración de AFB ₁	33
6	Productos de maíz contaminados con aflatoxina B ₁ en tortillerías de Querétaro, primer muestreo (Febrero – Marzo de 1998)	36
7	Productos de maíz contaminados con aflatoxina B ₁ en tortillerías de Querétaro, segundo muestreo (Agosto - Septiembre de 1998)	38
8	Productos de maíz contaminados con aflatoxina B ₁ en tortillerías de Querétaro, muestreo global (ambos muestreos)	40
9	Porcentaje de eliminación de aflatoxina B ₁ sobre el grano de maíz por efecto de algunos tratamientos químicos en obtención de tortillas.	48

10	Porcentaje de eliminación de aflatoxina B ₁ sobre el grano de maíz por efecto de algunos tratamientos químicos en obtención de tortillas	49
11	Porcentaje de eliminación de aflatoxina B ₁ por efecto de algunos tratamientos químicos a harinas instantáneas para la obtención de tortillas	55

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Ejemplo de micotoxinas producidas por hongos	9
2	Encuesta aplicada en las diversas tortillerías	24
3	Tratamientos químicos evaluados	29
4	Niveles de AFB ₁ en productos de maíz, primer muestreo (Febrero - Marzo de 1998)	
5	Niveles de AFB ₁ en productos de maíz, segundo muestreo (Agosto - Septiembre de 1998)	37
6	Niveles de AFB ₁ en productos de maíz, muestreo global.	39
7	Efecto de cal, peróxido de hidrógeno y su combinación sobre la desactivación de AFB ₁ en tortilla elaboradas por el método de extrusión.	44
8	Efecto de cal, peróxido de hidrógeno y su combinación, hidróxido de amonio y su combinación con cal, sobre la desactivación de AFB ₁ en tortilla elaboradas por el método de extrusión.	46
9	Efecto de algunos químicos aplicados al grano de maíz sobre algunas características organolépticas de tortilla	51
10	Efecto de algunos químicos aplicados al grano de maíz sobre algunas características organolépticas de tortilla	52

BIBLIOTECA CENIMEX, U.A.G.

- 11 Efecto de cal, peróxido de hidrógeno y su combinación, hidróxido de amonio y su combinación con cal, dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno, sobre la desactivación de AFB1 en tortilla elaboradas con harinas instantáneas obtenidas por el método de extrusión. 57
- 12 Efecto de algunos químicos aplicados a harinas instantáneas de maíz sobre algunas características organolépticas de tortilla. 59

I. RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las aflatoxinas son las micotoxinas mas estudiadas debido a su actividad biológica que presentan sobre los organismos que las ingieren, producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, y se les puede encontrar contaminando alimentos básicos como el maíz, los cacahuates, el arroz, etc., y en algunos alimentos de origen animal como la leche. La aflatoxina B₁ (AFB₁) es una toxina altamente mutagénica y carcinogénica, sin embargo requiere de ser activada principalmente por el Citocromo P₄₅₀ (Cyt P₄₅₀) para ejercer su actividad biológica (Roebuck y Mauxitenko, 1994).

El maíz representa para México su componente mas importante de la producción agrícola, pues representa aproximadamente la mitad del territorio cultivable, es un grano muy susceptible a la contaminación por micotoxinas como la aflatoxina B₁ (AFB₁), por lo que es necesario evitar este problema, o en dado caso, resolverlo de la manera mas adecuada y práctica, para evitar que el consumo de este llegue a afectar la salud de los consumidores. En nuestro país la elaboración de tortillas a partir de maíz, se realiza principalmente, por medio del proceso tradicional de nixtamalización. Método inventado por nuestros ancestros, el cual además de dar características organolépticas y nutricionales adecuadas a las tortillas, logra el abatimiento de la AFB₁. La nixtamalización presenta la desventaja de ser una técnica que requiere mucho tiempo (aproximadamente 14 horas) y produce efluentes contaminantes (nejayote), por lo que uso de harinas instantáneas en la producción de tortilla esta cobrando cada día más auge.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la presencia de AFB₁ en las tortillas e insumos de diferentes tortillerías de la ciudad de Querétaro, así como el empleo de sustancias químicas para disminuir la concentración de aflatoxinas en harinas instantáneas empleadas en la elaboración de las tortillas.

En primer lugar se procedió a realizar un muestreo en diferentes tortillerías de la ciudad, las cuales fueron elegidas aleatoriamente. En cada una de ellas se tomaron muestras de la ma

teria prima (maíz y harina), masa, nixtamal, harina instantánea y tortilla; de igual forma se llevó a cabo una encuesta a los encargados del lugar, con el fin de ampliar la información. El muestreo se realizó en dos épocas del año, Febrero - Marzo y Agosto - Septiembre, conservando las muestras en congelación hasta su extracción. La extracción se llevó a cabo siguiendo la técnica 930.33 del AOAC (1995) en su 18ª edición, y la cuantificación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Esta parte del estudio mostró que la gran mayoría de la contaminación de aflatoxinas en las tortillas era aportada por las harinas instantáneas empleadas en su elaboración, por lo que la siguiente parte del estudio consistió en adicionar compuestos químicos en diferentes concentraciones a harinas instantáneas obtenidas por el método de extrusión patentado por Martínez, et al (1996), para probar su posible efecto en la eliminación de AFB₁.

La adición de los compuestos se realizó de dos formas distintas: primero de forma directa al maíz molido para después cocerlo en el extrusor a 83°C y 35 rpm y posteriormente hacer las tortillas, en este caso los agentes utilizados se dividieron en cinco tratamientos: a) extrusión (control), b) hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) 0.3%, c) peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.75%, d) la combinación de ambos (0.3 % cal y 0.75% H₂O₂), e) hidróxido de amonio (NH₄OH) 0.2% y f) su combinación con cal (0.3% cal y 0.2% hidróxido de amonio NH₄OH). En todos los tratamientos se cuantificó la concentración final de AFB₁ en la tortilla y determinó el porcentaje de eliminación. La adición de los distintos agentes químicos redujo, en todos los casos, la concentración de AFB₁ a niveles por debajo de lo permitido, sin embargo la utilización de cal al 3% y su combinación con 0.75% de H₂O₂ resultaron en una eliminación total de la aflatoxina.

Al obtener un efecto positivo en la descontaminación de AFB₁ en la tortilla, se evaluó el efecto que tenía la adición de los químicos en las características organolépticas del producto. La calidad disminuyó ya que los agentes químicos provocaron la deshidratación de la tortilla dando como consecuencia un pobre inflado, así como una rolabilidad deficiente haciéndose mas notoria al adicionar NH₄OH al 0.2%

La otra forma de adición de los químicos fue a las harinas instantáneas, aplicandose los mismos tratamientos que al maíz molido y dos adicionales g) dióxido de titanio (TiO₂) 1.0% y

h) peróxido de benzoilo 0.009%. Al igual que en el caso anterior al final se cuantificó la concentración de AFB₁ en la tortilla y se determinó el porcentaje de eliminación.

Para las harinas instantáneas el mejor tratamiento para la eliminación de aflatoxina B₁ fue la combinación de 0.3% cal + 0.75% H₂O₂, así como la adición de 0.2% NH₄OH, eliminando al 100% la contaminación. Sin embargo, los demás tratamientos eliminaron la toxina en porcentajes que permitieron niveles menores a los establecidos. Es sabido que las tortillas obtenidas con esta materia prima son susceptibles a la rápida deshidratación, fenómeno que se vio aún mas reflejado al adicionar los diferentes tratamientos. Al evaluar las características organolépticas como el inflado y rolabilidad la utilización de 0.75% H₂O₂ y la combinación 0.3% cal + 0.2% NH₄OH afectaron de manera mas significativa a las tortillas ya que a parte de no permitir el inflado, la rolabilidad resultó ser muy deficiente provocando un ruptura de la tortilla de mas del 50%.

Con los resultados obtenidos es evidente que aún no hay método que supere a la nixtamalización, tanto en la eliminación de AFB₁ como en calidad final del producto.

II. INTRODUCCIÓN

En México, el maíz representa el componente más importante de la producción agrícola, pues ocupa aproximadamente la mitad de la superficie destinada a la agricultura (Figueroa et al., 1994).

Se sabe que en México el consumo del maíz en forma de tortilla es muy elevado (325 gr/día/per capita) y el proceso para su obtención es en su mayoría por nixtamalización, método que requiere de tiempos largos y grandes cantidades de efluentes contaminantes, es por ello que diversos grupos científicos y empresariales están estudiando e implementando tecnología más sencilla, que produzca menos contaminación y que sea más eficiente sin perder la calidad nutricia de la tortilla. Una de las tecnologías más recientemente utilizadas es la elaboración de tortillas mediante el uso de harinas instantáneas que dan tortillas de buena calidad, aunque ello no evita que se presente contaminación con micotoxinas (aflatoxinas, zeralonina, fumosina, T₂, etc.), por lo que el desarrollo de métodos de detoxificación se vuelve cada día más indispensable y necesario para poder ofrecer al consumidor un producto que satisfaga sus necesidades sin poner en riesgo su salud.

Es conocido que el proceso tradicional de nixtamalización en la producción de tortillas logra abatir hasta en un 90 % los niveles de aflatoxinas presentes en el maíz naturalmente contaminado, así como elevar la calidad nutricia de la tortilla comparada con el maíz crudo, sin embargo no se sabe si este abatimiento se deba al tratamiento físico de lavado del nejayote o al efecto de la cal (Arriola et al., 1988).

En estudios preliminares se demostró que el proceso de extrusión reducía la contaminación de AFB₁ en un intervalo de 30-46% en la tortilla.

Por otro lado en una evaluación preliminar de la incidencia de aflatoxinas en materia prima, productos intermedios y tortilla en tortillerías muestreadas en la ciudad de Querétaro se vio que el principal problema de contaminación por aflatoxina B₁ (AFB₁) lo presentan las harinas instantáneas. Por lo que resultaba interesante evaluar la adición de diferentes productos químicos a las harinas sobre el abatimiento de la micotoxina.

El proyecto se desarrolló en el Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y en el Laboratorio de Investigación en Materiales del CINVESTAV, Unidad Querétaro.

III. JUSTIFICACIÓN

En México el consumo de maíz por el humano es mayor que en cualquier otro país del mundo, siendo aproximadamente de 14 millones de toneladas anuales. Esta cantidad es principalmente consumida en forma de tortillas, que constituyen la base de la alimentación de la mayoría de los mexicanos, las cuales, en su mayoría, son fabricadas por el proceso tradicional de nixtamalización, proceso que logra abatir considerablemente la contaminación por aflatoxinas. Sin embargo, en un estudio preliminar donde se muestrearon tortillerías de la ciudad de Querétaro, el uso de harinas instantáneas va en aumento y se encontró que algunas de las harinas instantáneas comerciales contenían AFB₁. En este contexto resultó importante conocer la incidencia de aflatoxinas en maíz, productos intermedios y tortilla en la ciudad de Querétaro, esto nos permitirá dar recomendaciones para proteger la salud de la población. Por otra parte, este estudio, donde se evaluó la adición de diferentes productos químicos a las harinas instantáneas sobre el abatimiento de AFB₁, permitió proponer alternativas reales de destoxificación en los métodos que se han ido generando recientemente para la producción de harinas instantáneas, las cuales han tenido mucho éxito en la elaboración de tortillas en un menor tiempo.

IV. ANTECEDENTES

A. MAÍZ

1. Generalidades

En los pasados 8000 a 10000 años aparecieron, tres cereales importantes: el maíz, el arroz y el trigo (Figuroa et al., 1994). El maíz (*Zea mays*) fue domesticado en el hemisferio occidental, y en México ha sido empleado como alimento, moneda y religión (Katz et al., 1974). Paralelamente a la domesticación de estos granos se desarrollaron las civilizaciones y las tecnologías. Por ejemplo nuevas técnicas de conservación y almacenamiento de los productos.

Del reino planta la planta más domesticada y evolucionada es el maíz. Ya que el maíz ha llegado de una forma muy evolucionada hasta nosotros, su origen es aún un misterio, pero a pesar de ello se han planteado cuatro hipótesis principales: (1) plantea que el maíz tunicado (forma primitiva del maíz en el que cada grano está cubierto por una gluma) da origen al maíz cultivado; (2) sugiere que el maíz descende directamente del teocintle, ya sea por selección directa, mutación o cruza de este con algún pasto desconocido; (3) propone que existe un ancestro común para el maíz, el teocintle y el teocintle Guatemalteco, pero cada uno por líneas independientes; (4) esta teoría sugiere un origen tripartita del híbrido del teocintle (Figuroa y Aguilar, 1997).

2. Contaminación por aflatoxinas

Frecuentemente el maíz se encuentra contaminado por toxinas que son producidas por diferentes especies de hongos. Dichas toxinas se conocen como micotoxinas y se les da un nombre específico según el género productor. Las micotoxinas más estudiadas son las producidas por *Aspergillus* y se les conoce como aflatoxinas (Torres et al., 1996). Las aflatoxinas posiblemente hayan acompañado al maíz desde sus orígenes (Figuroa et al., 1994). En años recientes, sin embargo, la gran cantidad de brotes en productos agrícolas con aflatoxinas ha despertado el interés y la necesidad de su prevención y descontaminación, una vez que se ha presentado el problema. Por otro lado, el maíz puede contaminarse con aflatoxinas en el almacenamiento (postcosecha) o durante la fase de precosecha, lo que ha alentado a los investigadores estar de acuerdo en que el mejor

método de prevención es evitar la infección por *Aspergillus* en el campo. Sin embargo, en nuestro país no se ha podido controlar aún durante la postcosecha, lo que hace necesario el uso de métodos de descontaminación eficiente y económicos, y ello ha llevado a concentrar la atención en el desarrollo de métodos para eliminar la contaminación por aflatoxinas en ciertos productos de consumo humano protegiendo así su salud (Payne, 1992).

B. MICOTOXINAS

1. Generalidades

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, puesto que no se requieren para el crecimiento del organismo y que al ser ingeridas pueden producir efectos tóxicos (Smith et al., 1994). Se pueden encontrar en alimentos básicos como el maíz, el frijol, el arroz y el trigo, entre otros, de igual forma en alimentos de uso común y diverso, tales como el cacahuate y sus derivados; pistaches, nueces y semilla de algodón (Pariza and Ha, 1990).

En general las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular y termorresistentes (Hsieh, 1989). Existen principalmente cinco géneros de hongos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps*) (Tabla 1) productores de diversos tipos de micotoxinas y que crecen durante la cosecha o el almacenamiento de granos, así como en una gran variedad de alimentos (Harvey et al., 1991).

El término micotoxina proviene del griego "mykes" que significa hongo y de "toxicum" que quiere decir veneno (Ellis et al., 1991)

Tabla 1. Ejemplos de micotoxinas producidas por hongos.

GÉNERO	MICOTOXINA
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina B ₁ Aflatoxina G ₁ Aflatoxina M ₁ Sterigmaocystina Ochratoxina A
<i>Fusarium</i>	Nivalenol Zeralenona T-2
<i>Penicillium</i>	Patulina Citrinina
<i>Alternaria</i>	Alternariol Acido tenuazónico
<i>Claviceps</i>	Alcaloides ergóticos

(Hsieh, 1989)

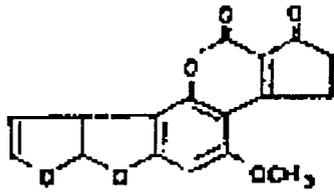
2. AFLATOXINAS

El descubrimiento de las aflatoxinas se remonta a los años 60's cuando se presentó la muerte repentina de alrededor de 100,000 pavos y algunos otros animales de granja. Después de estudios se encontró que la causa fue la ingesta de pasta de cacahuate que estaba altamente contaminada con *Aspergillus flavus* y su micotoxina (Ellis et al., 1991).

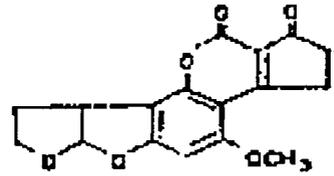
Las aflatoxinas son producidas por hongos del género *Aspergillus*, especialmente *A. Flavus* y *A. parasiticus*. Cabe mencionar que no todas las cepas de éstos producen aflatoxinas, de igual forma la ausencia visible de estos hongos no indica que no este presente la micotoxina, esto debido a que la toxina puede estar aun cuando el hongo haya desaparecido (Ellis et al., 1991; Torres et al., 1996).

Las aflatoxinas son las micotoxinas mas estudiadas debido a su actividad biológica (toxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad) que presentan sobre los organismos que de alguna manera las ingieren, siendo el hígado el órgano más afectado, por lo que son consideradas como hepatoxinas (Torres et al., 1996). Existen 18 diferentes tipos de aflatoxinas, siendo la aflatoxina B₁ (AFB₁), la G₁ (AFG₁), la G₂ (AFG₂) y la M₁ (AFM₁) (Fig.1) las que se presentan con mayor frecuencia en alimentos de consumo humano (Wilson and Payne, 1994). Las letras B y G se deben a las iniciales (en inglés) del color que presentan bajo el efecto de luz ultravioleta, mientras que los números 1 y 2 son debidos al patrón de separación que siguen al emplear cromatografía de capa fina (TLC) (Ellis et al., 1991). La toxicidad de estas aflatoxinas, en orden decreciente, es el que se presenta a continuación: AFB₁>AFG₁>AFG₂>AFM₁ (Roebuck y Maxuitenko, 1994).

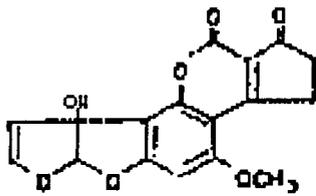
Las cepas toxigénicas requieren de condiciones especiales para su desarrollo, por ejemplo, actividad acuosa (A_w) mínima de 0.85, que equivale a 16.5% de humedad en los cereales, pueden crecer en un intervalo de temperatura de 25 a 30°C, también se ha demostrado que a bajas concentraciones de CO₂ la germinación de las esporas se ve favorecida (Ellis et al., 1991; Torres et al., 1996).



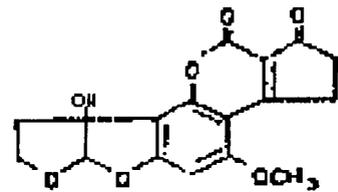
AFLATOXINA B₁



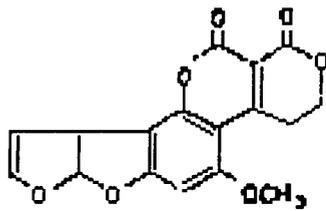
AFLATOXINA B₂



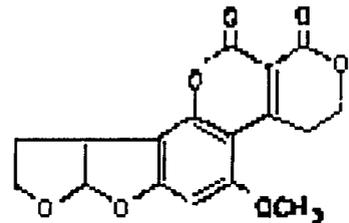
AFLATOXINA M₁



AFLATOXINA M₂



AFLATOXINA G₁



AFLATOXINA G₂

Figura 1. Estructura de algunas micotoxinas

(Ellis et al, 1991)

3. AFLATOXINA B₁

La AFB₁ es una toxina altamente mutagénica y carcinogénica, sin embargo requiere de activación metabólica para ejercer su actividad biológica (Hanigan y Laishes, 1984). La vía de exposición más importante para humanos y animales es la oral, y su absorción y biotransformación dependerá de la vía de administración (Hsieh and Wong, 1994). Una vez absorbida pasa al hígado vía vena porta donde es biotransformada por el complejo enzimático citocromo P₄₅₀ (Cyp 450), como se muestra en la Figura 2, siendo el metabolito más reactivo 8, 9-AFB₁ epóxido, por su capacidad de formar aductos con AND o proteínas (Van Egmon, 1994).

Dada la toxicidad de la AFB₁, la administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), con el fin de proteger la salud, ha establecido como límite 10 µg/kg de AFB₁ en granos y 0.5 µg/kg en leche (Van Egmond, 1994). En México se sigue como práctica común que granos con concentraciones superiores a 10 µg/kg de AFB₁ se destinan a la alimentación de ganado.

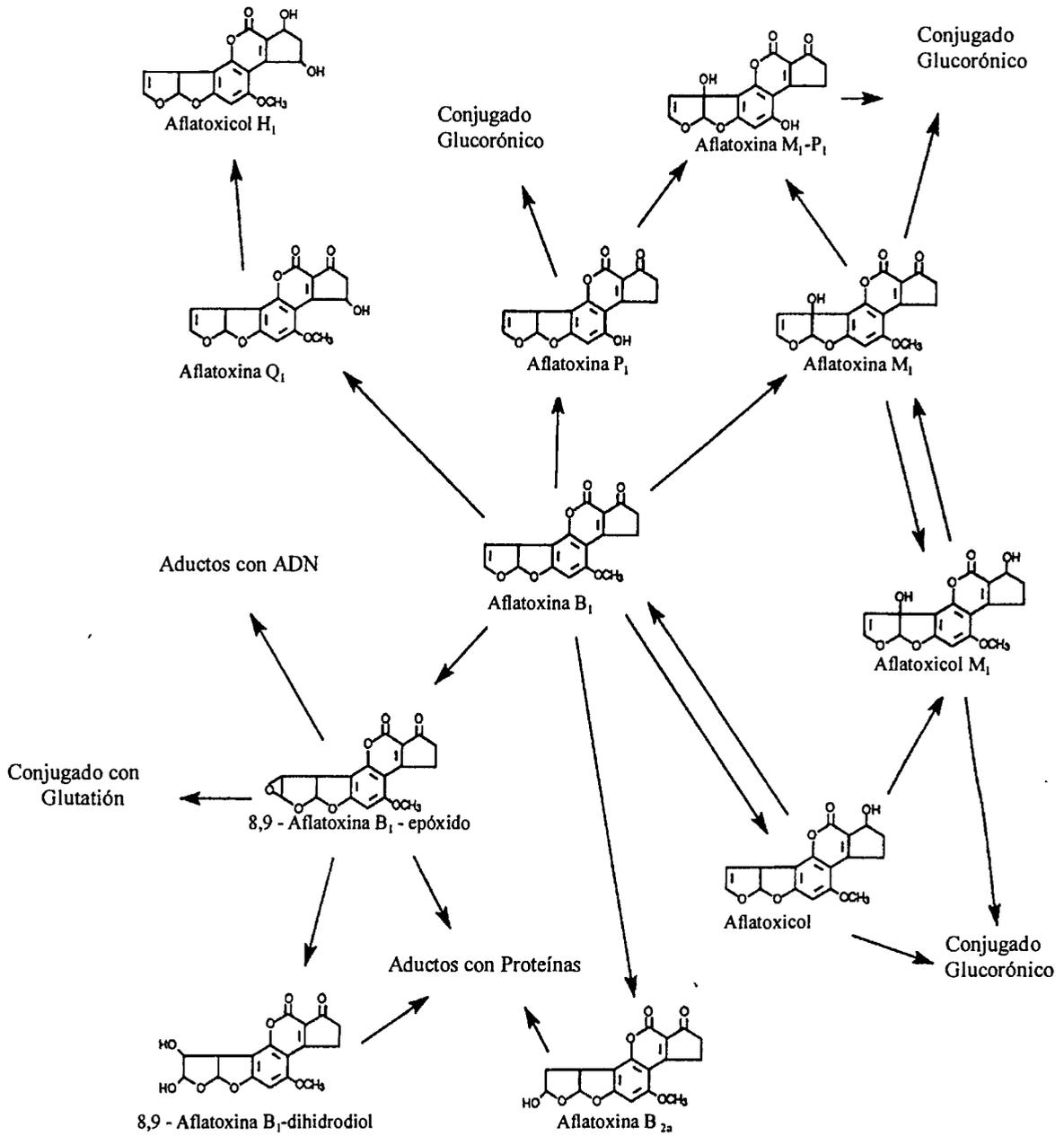


FIGURA 2. Metabolismo de biotransformación de AFB1

(Eaton et al, 1994)

C. DESCONTAMINACIÓN DE AFLATOXINAS

El evaluar el daño interno provocado por el consumo de aflatoxinas a llevado al desarrollo de métodos de su eliminación y su desactivación efectivos, y económicos. En la destoxificación se han propuestos varios métodos que incluyen tratamientos químicos y físicos, o ambos. No obstante, su uso no debe ocasionar alteraciones organolépticas ni nutricionales en los alimentos.

La molécula de AFB₁ muestra dos sitios importantes de actividad tóxica, el primero se localiza en el doble enlace de la posición 8,9 del anillo furano y el segundo sitio reactivo se encuentra en el anillo de lactona, el cual es fácilmente hidrolizable, responsable de fluorescencia y por lo tanto ideal para la degradación de la molécula (Fig. 3). Lo que sugiere que el remover el doble enlace o abrir el anillo de lactona puede degradar la molécula (Samarajeewa et al., 1990).

1. TRATAMIENTOS QUÍMICOS

Se ha demostrado que la reducción de la contaminación de alimentos con aflatoxinas es factible y práctica si se hace por medio de tratamientos químicos. Para lo que se han empleado diversos agentes químicos, los más eficientes son los agentes clorantes, oxidantes e hidrolíticos. Es importante señalar que la mayoría de los estudios se han realizado con AFB₁ pura. Dichos químicos actúan en alguno de los sitios activos de la molécula de aflatoxina B₁ (residuo de cumarina y doble enlace terminal en el furano) provocando con ello su degradación.

CAL. Se ha demostrado que el tratamiento alcalino provoca la degradación de la AFB₁ y esto lo hace abriendo el anillo de lactona (hidrólisis) presente en la molécula como se muestra en la Figura 3 (Samarajeewa et al., 1990). En un estudio preliminar de Ulloa-Sosa y Schroeder (1969), demostraron que la cal redujo los niveles de aflatoxinas de 49 ppb iniciales a 16 ppb en tortilla lo que implica cerca del 70% de eliminación. Arriola et al., 1998 utilizaron una proporción de 3% p/p de cal para descontaminar maíz con una concentración inicial de 1603.51 µg/Kg, la nixtamalización logró reducir los niveles hasta 82.36 % y 88.58 % para masa y tortilla respectivamente.

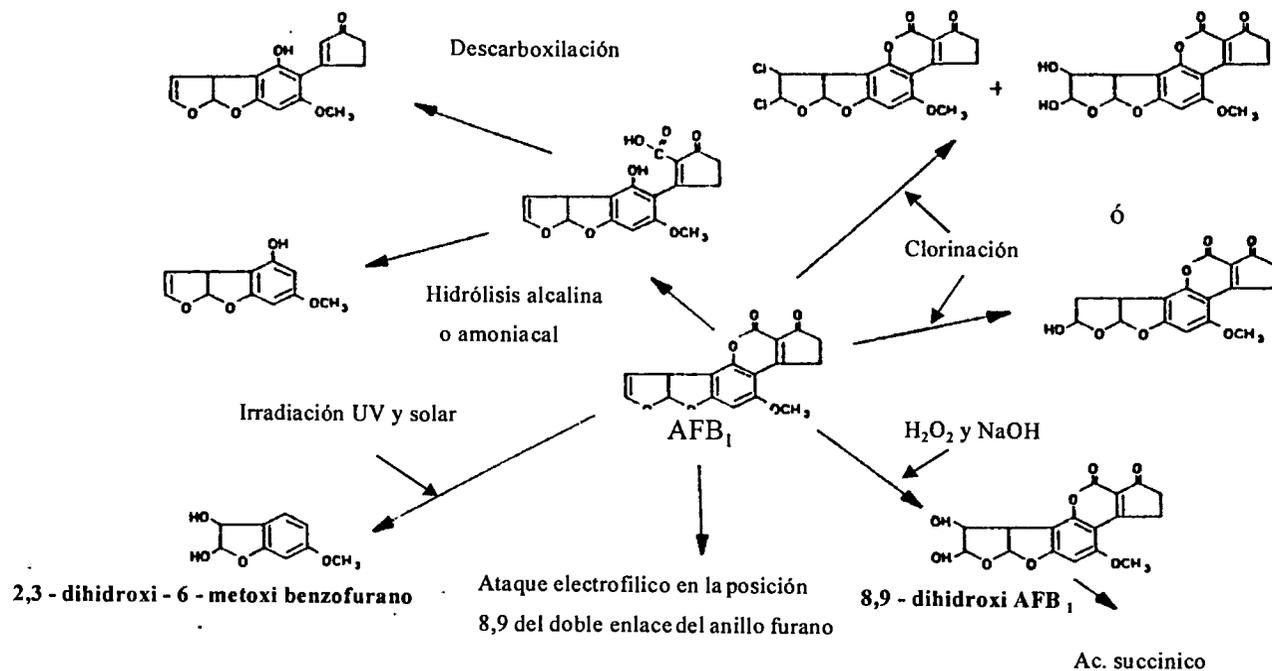


Figura 3. Posibles productos de obtención después de la aplicación de diversos tratamientos químicos y físicos a la molécula de AFB₁

(Samarajeewa, 1990)

AMONIACO. El amoníaco en estado gaseoso o en soluciones, con o sin temperatura, con o sin presión, parece ser la forma más eficiente para descontaminar materiales con aflatoxinas. Este medio puede reducir los niveles de aflatoxinas en maíz y sus productos hasta en un 90%. Sin embargo, aún cuando el proceso de amonificación incrementa el nivel total de nitrógeno, el contenido de lisina y metionina se ven disminuidos, lo que le confiere menor valor nutricional (Park et al., 1984; Samarajeewa et al., 1990).

El proceso de degradación de la molécula de AFB₁, por efecto del uso de amoníaco, se lleva a cabo al hidrolizarse el anillo de lactona, seguido de una descarboxilación, lo que produce dos compuestos mayoritarios no tóxicos, AFD₁ y dihidro-4-hidroxi-6-metoxifuro [2,3-b] benzofurano (Fig. 3) (Samarajeewa et al., 1990).

PÉROXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂). Este compuesto ha sido empleado como técnica común para la descontaminación oxidativa de pastas de cacahuate contaminadas con aflatoxinas. La adición de compuestos básicos facilita la degradación oxidativa de la toxina y ello ocurre por el ataque del peróxido al anillo de furano lo que conduce a la reducción del doble enlace como se muestra en la Figura 3.

Un 3 % de H₂O₂ ha sido empleado en maíz para reducir los niveles de aflatoxinas de 397 ppb a menos de 20 ppb, además las pérdidas de proteínas y lípidos son menores la 6% (Ellis et al., 1991). Se ha observado que los residuos presentes en alimentos tratados con este químico no son tóxicos por si solos (Samarajeewa et al., 1990).

HIPOCLORITO DE SODIO. Se ha demostrado que este compuesto tiene efectos positivos en la degradación de aflatoxinas en alimentos. Se han probado soluciones con diferentes concentraciones y se encontró una degradación casi total tanto cuando se utilizó de la AFB₁ pura, como en alimentos para ganado (Mann et al., 1970). Sin embargo la presencia de cloro residual en alimentos tratados, la producción de grasas modificadas y proteínas con toxicidad desconocida debidas al tratamiento aplicado deben ser estudiadas mas a fondo para evitar daño a al salud (Samarajeewa et al., 1990).

OZONO. Agente oxidante muy poderoso, por lo que tiene un potencial elevado para la degradación de aflatoxinas mediante el ataque al doble enlace 8,9 del anillo furano (Figura 3)

Se ha informado que el ozono reduce los niveles hasta en un 91% en semillas de algodón (con 22% de humedad), tratamiento que degradó la calidad nutricia ya que el contenido de lisina se vio disminuido, siendo esto una desventaja para este método (Samarajeewa et al., 1990).

OTROS QUÍMICOS. Una variedad de otros químicos han sido probados para evaluar su habilidad en la destrucción de aflatoxinas. De ellos se han preparado soluciones conteniendo diferentes concentraciones de metanol, aldehidos, peróxido de benzoílo, permanganato de potasio, los cuales son notablemente eficientes, sin embargo su aplicación en alimentos es restringida por problemas de salud que puedan traer los residuos químicos (Samarajeewa et al., 1990).

2. TRATAMIENTOS FÍSICOS

TEMPERATURA. Las aflatoxinas pueden ser destruidas parcialmente por tostado o rostizado, estando directamente relacionado con la temperatura empleada, el tiempo y el contenido de humedad. En cuanto a otros tratamientos térmicos (pasteurización, horneado, esterilización, etc.) los datos son contradictorios (Purche et al., 1972; Stoloff et al., 1975). La AFB₁ es estable a 260°C, siendo este su punto de fusión, y aunque su temperatura de descomposición es de 269°C se ha observado que para algunos alimentos se necesitan temperaturas tan altas como 300°C para eliminar la toxina. Las temperaturas necesarias van a depender de las condiciones ambientales a las que estén expuestas las aflatoxinas (Samarajeewa et al., 1990). Por lo tanto debe tenerse especial cuidado en las condiciones bajo las cuales se cultiva el maíz así como en las prácticas de almacenamiento de los granos, esto es, en su etapa de postcosecha.

RADIACIONES. Bajo condiciones apropiadas de luz las aflatoxinas pueden ser degradadas, especialmente con la luz ultravioleta. La luz solar ha sido utilizada para reducir los niveles de aflatoxinas en pastas de cacahuete y aceites vegetales.

La luz ultravioleta ha sido ampliamente utilizada en la degradación de AFB₁ en leche, el proceso puede llegar a eliminar toda la toxina de la leche y lo hace más eficiente en presencia de peróxido de hidrógeno (Yousef y Marth, 1989). La AFB₁ absorbe radiación UV en su mayoría a 362 nm en la cual su actividad aumenta haciéndose más susceptible a su degradación, siendo afectada en la parte terminal del anillo furano (Figura 3). Sin embargo, pruebas de laboratorio indican un uso limitado ya que los compuestos de degradación parecen ser tóxicos (Samarajeewa et al., 1990).

ATMOSFERAS MODIFICADAS. Una atmósfera modificada es aquella en la cual la composición normal del aire ha sido cambiada; regularmente se disminuye la cantidad de O₂ mientras que se aumentan las concentraciones de CO₂ y N₂. Este tipo de tratamientos ha sido utilizado para controlar el crecimiento de *A. flavus* y con ello la producción de aflatoxinas (Ellis et al., 1991).

ADSORCIÓN. Masimango et al. (1979), mostraron que la AFB₁ en solución era adsorbida por la bentonita cuando esta se adicionaba a la solución, de tal forma que al remover la bentonita se observó que la gran mayoría de la aflatoxina presente también era removida de la solución. La habilidad de la bentonita de adsorber y retener aflatoxina dependió del tamaño de partícula y la temperatura del tratamiento (Ellis et al., 1991).

D. NIXTAMALIZACIÓN

Desde hace 3500 años a la fecha la gran mayoría de las tortillas producidas a nivel mundial se elaboran mediante el proceso tradicional de nixtamalización, tecnología mexicana que no había sufrido modificaciones en ninguno de sus pasos básicos desde su comienzo. El inicio de modificaciones comenzó con la introducción del molino de piedras, seguido por la tortilladora y hasta hace 75 años se utilizaron las tortilladoras automáticas (Figueroa et al., 1997).

La nixtamalización consiste de un cocimiento del maíz a temperaturas de ebullición del agua en un medio alcalino (el cual se logra mediante la adición de cal, ocasionando con ello un pH elevado), seguido de un periodo de reposo, posteriormente el maíz es lavado y finalmente molido, para así obtener la masa que será empleada para la elaboración de las tortillas.

Químicamente, la nixtamalización es la gelatinización del almidón presente en el maíz. Este proceso presenta desventajas importantes tales como la generación de aguas residuales con elevada concentración de sólidos, lo que representa una severa contaminación al medio ambiente, consumo de una gran cantidad de energía así como el requerimiento de largos tiempos, todo ello con el fin de obtener un producto con las características adecuadas de textura, sabor y color (Figuroa et al., 1997).

Este procedimiento ha sido considerado para la destoxificación de maíz contaminado con aflatoxinas. Price y Joergensen (1985) variaron los porcentajes de hidróxido de calcio, tiempos de cocimiento y reposo en las etapas del proceso, obteniendo resultados que fluctúan entre 40 y 70 % de eliminación de la toxina, cabe mencionar que estos estudios se realizaron en maíz artificialmente contaminado. Guzmán de Peña et al. (1995), realizaron un estudio acerca del abatimiento de la AFB₁ en maíz naturalmente contaminado por medio del uso de nixtamalización como proceso tradicional de obtención de tortillas. La concentración de AFB₁ en maíz fue de 37 y 251 µg/Kg al que llamaron mediana y altamente contaminado respectivamente, logrando una eliminación del 100% para el primero y 97% para el altamente contaminado.

Uno de los mayores logros obtenidos en la tecnología de las tortillas ha sido la obtención de harinas instantáneas nixtamalizadas, lo que ha reducido las labores cotidianas y tediosas del proceso tradicional. Dichas harinas son muy accesibles en el mercado, aunque también presentan desventajas como el incremento de costos y que las tortillas obtenidas a partir de ellas carecen de olor y textura adecuadas, ya que son frágiles, pálidas y se deshidratan rápidamente, viéndose afectadas principalmente del centro (Figuroa et al., 1997).

E. EXTRUSIÓN

La extrusión es un proceso termoquímico en el cual el material crudo es alimentado en una tolva alimentadora y forzado a pasar entre un tornillo giratorio y un cilindro. El material procesado sale por un orificio con forma específica. La ranura del tornillo y temperatura elevada permiten que el material se mezcle y con ello se conduce a reacciones químicas que finalmente dan como consecuencia la cocción del material (Chi-Tang Hu., 1992; Acosta 1994). Este método es ampliamente empleado en la industria de los alimentos para el procesamiento de muchos productos tales como botanas, sopas, cereales, etc.

Existen diversos grupos de investigadores, que preocupados por el desarrollo de la tecnología de la producción de la tortilla, han diseñado diferentes métodos para modernizar y mejorar el tradicional, lo que implica reducir tiempos de elaboración, disminuir la cantidad de contaminantes, ahorrar energía y mejorar la calidad nutricia de la tortilla. Algunos de estos problemas han sido resueltos de manera parcial. Al estudiar los aspectos básicos de la nixtamalización se ha llegado a la eliminación de efluentes, aprovechando así todas las partes del grano, también el gasto energético se vio disminuido al aumentarse la transferencia de calor, se utiliza la cantidad de agua mínima necesaria, emplea tiempos de procesamiento cortos, produce mayor rendimiento al procesar el grano integral, se obtienen productos con buena capacidad de absorción de agua y se tiene la facilidad de agregar aditivos y/o nutrientes. Con ello se reduce también el tiempo de elaboración de las tortillas de horas a solo unos minutos. Dicho método hecha mano del uso de la extrusión y ha sido el resultado de un gran esfuerzo de un grupo multidisciplinario del CINVESTAV Unidad Querétaro (Figueroa et al., 1997).

El extrusor utilizado (Fig. 4) consiste básicamente de un alimentador (1) el cual proporciona un flujo de entrada constante al equipo del maíz previamente molido. Para hacer pasar el material a través de la tolva se utiliza un agitador de madera, con el cual se mantiene un flujo constante y evitar con ello el aumento de temperatura, que podría ocasionar un sobrecocimiento de la masa.

Para cocer y transportar el maíz, el equipo consta de un tornillo (2) el cual va colocado dentro de un cilindro (3) el cual se encarga de mantener la temperatura deseada y con ello, aunado a la presión que ejerce el tornillo sobre el maíz, se logra el cocimiento dando la masa, que finalmente sale por una boquilla (4) que le da forma al producto (Martinez-Bustos et al., 1996).

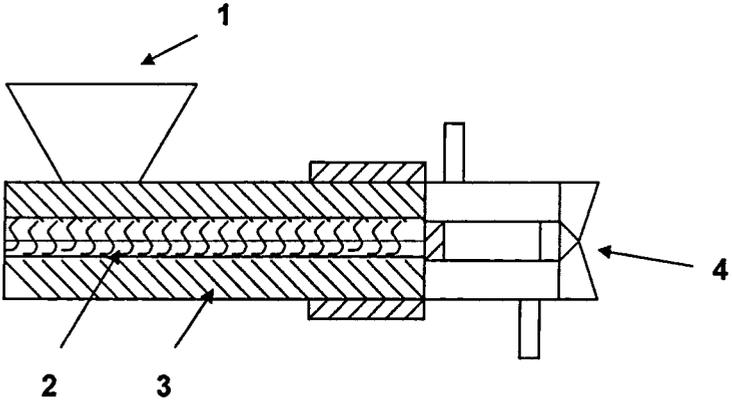


Figura 4. Estructura del extrusor

En base a todo lo anterior se plantearon los siguientes objetivos

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes tratamientos físicos y químicos para la destoxificación y desactivación de aflatoxinas en harinas instantáneas y tortilla a niveles permisibles.

B. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Muestreo aleatorio de tortillerías (50) ubicadas en la ciudad de Querétaro que nos permita identificar las posibles fuentes de contaminación de aflatoxinas.
2. Cuantificar los niveles de aflatoxinas en los productos de las tortillerías previamente seleccionadas.
3. Evaluar la acción de tratamientos físicos en maíz y harinas (molienda y temperatura) sobre la concentración de aflatoxinas.
4. Evaluar la acción de tratamientos químicos sobre la concentración de aflatoxinas en harina instantánea, masa y tortilla.
5. Estudiar si los tratamientos planteados logran abatir los niveles de aflatoxinas encontrado naturalmente en las muestras comerciales

VI. MATERIAL Y METODOS

A. MATERIAL

1. COMPUESTOS QUIMICOS

Aflatoxina B₁ (AFB₁), se obtuvo en Sigma Chemical Co (St Louis MO); peróxido de hidrógeno, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, peróxido de benzoilo, dióxido de titanio, sulfato de sodio anhidro, sílica gel, cloruro de metileno, ácido acético, grado reactivo; metanol, acetonitrilo, agua, grado HPLC. La pureza de la micotoxina se verificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2. MATERIAL BIOLÓGICO

Maíz (materia prima), nixtamal, masa, harina de maíz , tortilla.

B. MÉTODOS

1. MUESTREO EN TORTILLERÍAS

Con el propósito de conocer la problemática de las aflatoxinas a nivel comercial, preliminarmente se realizó un muestreo aleatorio (49) de tortillerías localizadas en la ciudad de Querétaro. Se tomaron muestras representativas de maíz, nixtamal, masa, harina y tortilla, en cada una de las tortillerías elegidas, al mismo tiempo se realizó una encuesta al encargado de cada tortillería con el objetivo de tener información referente al origen de la materia prima, tipo de materia prima, tiempo y condiciones de almacén, y con ello conocer de donde provenía la contaminación por aflatoxinas a nivel comercial (Tabla 2). Las muestras, por ser productos perecederos, fueron transportadas en bolsas de plástico, previamente etiquetadas con el número de tortillería y fecha del muestreo, posteriormente fueron congeladas hasta el momento de extracción.

Tabla 2. Encuesta aplicada en las diversas tortillerías

Fecha _____

Nombre de tortillería _____

Dirección _____

1. Fuente de su materia prima:

2. Tipo de materia prima:

a. Grano _____

b. Masa _____

c. Harina instantánea _____

- Maseca _____

- Minsa _____

- Hamasa _____

- Agroinsa _____

- Combinación _____

- Otros _____

3. Almacena la materia prima: Sí _____ No _____

4. En que condiciones almacena su materia prima.

5. El tiempo de almacenamiento de su materia prima.

6. Conoce el tipo o variedad de maíz que compra?

 Sí _____ No _____

 Nombre del tipo o variedad de maíz _____

 Procedencia _____

7. Cantidad de materia prima que compra _____

8. Frecuencia con que compra su materia prima _____

1.1. Curva de calibración de AFB₁

La concentración de aflatoxina en las muestras se determinó por medio de una curva de calibración, que se realizó a partir de 6 concentraciones, 0.03175, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 µg de AFB₁/ml, las soluciones estándares fueron preparadas a partir de una solución stock de 1 mg/ml AFB₁ (Metanol HPLC) e inyectadas 4 veces cada una. La curva fue procesada con el paquete Millenium 2010 y las muestras con Excel.

1.2. Extracción, purificación y cuantificación de los niveles de aflatoxina B₁ (AFB₁)

La extracción de AFB₁ de las diferentes muestras se llevó a cabo de acuerdo al método 930.33 del AOAC (1995) (que permite la detección de concentraciones mayores o iguales a 13 ppb de aflatoxinas totales o 5 ppb de AFB₁ en maíz o crema de cacahuate), el cual consistió de tres fases principales: extracción, partición y columna cromatográfica. La extracción se realizó mediante la molienda de 25 gr de la muestra a analizar con 100 ml de alcohol metílico y 25 ml de una solución de HCl 0.1 N por tres minutos en una licuadora. La mitad de la mezcla se centrifugó en una centrifuga IEC-Centra por 4 min a 4000 rpm y a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró con papel Whatman No. 1 y se recolectaron 25 ml de él. A continuación se llevó a cabo una fase de partición, en la cual se transfirieron estos 25 ml a un embudo de separación y se adicionaron 25 ml de una solución de NaCl al 10% y 25 ml de hexano, se agitaron por 30 seg. y se dejó reposar para provocar la separación de las fases. La fase acuosa (inferior) fue transferida a otro embudo de separación mientras que la fase orgánica se eliminó. Se adicionaron 12.5 ml de cloruro de metileno (CH₂Cl₂), y se agitó moderadamente por 30 seg., se permitió la separación de capas y la fase inferior se hizo pasar por una columna empacada con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), la cual contenía una cama de teflón. El proceso de partición se repitió dos veces mas con 12.5 ml de CH₂Cl₂, agitando vigorosamente y drenando en la columna previamente empacada. Los eluatos fueron colectados en un mismo tubo de ensaye. El eluato total se evaporó bajo una atmósfera de nitrógeno hasta obtener un volumen final de 2-3 ml. Posteriormente se preparó la sílica gel para empacar la columna cromatográfica, se pesaron 2 gr de sílica gel en un vaso de 50 ml y se adicionaron 15 ml de una solución de éter-hexano (3+1). La pasta se vació, con mucho cuidado, a la columna limpia y con cama de teflon, se enjuagó el vaso con 5 ml de la misma solución y se transfirieron a la columna.

Se cerró la llave de paso para dejar asentar la sílica, la columna se lavó con 2-3 ml de la solución éter-hexano (3+1) dejándola caer por las paredes. Asentada la sílica gel se abrió la llave de paso y se drenó completamente la solución. Se adicionó a la columna 1 cm de Na_2SO_4 anhidro y se hizo pasar el eluato del proceso de partición así como el volumen empleado para enjuagar el tubo (4 ml de CH_2Cl_2) para ahí adicionarle por triplicado 12.5 ml de cloruro de metileno, la columna fue lavada con 12.5 ml una mezcla benceno-ác. acético y 15 ml de una solución de éter-hexano, finalmente se eluyó con una 50 ml de una mezcla cloruro de metileno-acetona. Obtenido el eluato, éste se evaporó bajo una atmósfera de nitrógeno, hasta un volumen aproximado de 1 ml, posteriormente se transfirió a un vial en el cual se lleva hasta evaporación total. Por último se hizo una reconstitución de la muestra con 1 ml de alcohol metílico HPLC.

La cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando un HPLC Waters equipado con dos bombas (modelo 510), un inyector de 50 μl de capacidad, una columna Waters nova-pak C18 fase reversa (3.9 x 150 mm, 4 m) y un software Millennium 2010, mediante un programa isocrático, utilizando como fase móvil 60 % de ácido acético 0.0125 N/40 % acetonitrilo, 60:40 (v/v) con un flujo de 1 ml/min. Las muestras y estándares se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 470 AC, con un filtro de longitud de onda de 338 nm de excitación y 425 nm de emisión, teniendo como límite de detección inferior la concentración de 0.0625 μg de AFB_1 /ml.

2. EXTRUSION

2.1 Método de extrusión

El maíz naturalmente contaminado con AFB_1 se molió en un molino PULVEX 200 con un amalla de 0.8. A un kilo de maíz molido se le adicionó el químico correspondiente a su tratamiento y 735 ml de agua, posteriormente la mezcla se procesó en un extrusor de bajo cizallamiento a temperatura constante de $87^\circ\text{C}\pm 5$ en la camisa de calentamiento y con velocidad del tornillo de 35 r.p.m. para producir una masa fresca con características apropiadas. Las tortillas se formaron en una tortilladora de rodillos manual y se cocieron en un comal a una temperatura de 280°C , por 30 segundos por un lado, 40 segundos por el otro lado y finalmente se voltearon al lado inicial hasta lograr el inflado.

2.2. Harinas instantáneas

El maíz naturalmente contaminado con AFB₁ se molió en un molino PULVEX 200 con una malla 0.8 mm. A un kilogramo de maíz molido se adicionaron 735 ml de agua, posteriormente la mezcla se procesó en un extrusor de bajo cizallamiento a temperatura constante de 87°C±5 en la camisa de calentamiento y con velocidad del tornillo de 35 r.p.m. para producir una masa fresca con características apropiadas. La masa obtenida fue secada en un horno Shel Lab por 24 hrs a 60°C, a continuación molida en un molino Pulvex 200 con malla 0.8, obteniéndose de esta forma la harina instantánea. Las tortillas se prepararon adicionando la cantidad necesaria de agua para obtener una masa manejable y los químicos fueron adicionados. La tortilla se formó y coció se describe en el punto 2.1

3. NIXTAMALIZACIÓN

El método tradicional de nixtamalización consiste en un cocimiento alcalino del grano de maíz en agua con 3% de cal (P/V). El cocimiento se llevó a cabo a una temperatura cercana a la ebullición por 30 o 40 min. y se dejó remojar la mezcla cocida por un lapso de 12 a 15 horas. El nejayote o agua de cocimiento fue removido, y el maíz cocido y remojado se lavó para remover el exceso de cal, y el pericarpio. El nixtamal (maíz cocido y lavado) fue molido en un molino de piedras para así obtener la masa. Las tortillas se formaron en una tortilladora de rodillos manual y se cocieron en un comal a una temperatura de 280°C, por 30 segundos por un lado, 40 segundos por el otro lado y finalmente se voltearon al lado inicial hasta lograr el inflado tradicional.

4. TRATAMIENTOS A EVALUAR

4.1. Tratamientos físicos

Se ha informado que los tratamientos físicos ayudan a la destoxificación de aflatoxinas, por lo que en el presente trabajo se evaluó tanto el tamaño de partícula, como la temperatura en el proceso de extrusión. Inicialmente se probaron 0.8 y 0.5 mm en cuanto al tamaño de malla. Para ello se molió el maíz en un molino Pulvex 200, posteriormente se mezcló con cal y agua, se pasó por el extrusor obteniéndose de esta forma la masa para elaborar las tortillas, las cuales se hicieron de forma manual en una tortilladora de rodillos, y finalmente se llevó a cabo la extracción y cuantificación de AFB₁. Metodología aplicada tanto para 0.8 como para 0.5mm de tamaño de malla.

Una vez obtenido el mejor tamaño de partícula se procedió a variar la temperatura para ver cual sería la mejor para nuestras condiciones de trabajo, es decir, obtener una masa con características necesarias para la elaboración de las tortillas, no sobrecocida y gelatinizada, ni cruda y grumosa.

Para esto, la mezcla de maíz, cal y agua se pasó por el extrusor a las diferentes temperaturas (70±5, 80±5, 90±5) y la masa obtenida fue evaluada para en base a ello tomar una determinación.

4.2. Tratamientos químicos

La literatura informa que algunos compuestos químicos logran abatir considerablemente la contaminación de aflatoxinas, por ello, se aplicaron diferentes tratamientos químicos, aunados a la extrusión y con ello poder evaluar la mejor alternativa para la descontaminación.

Una vez que se tuvo el maíz molido y las harinas instantáneas se procedió a adicionar los tratamientos con algún agente químico. En la Tabla 3 se describen dichos tratamientos (utilizando cantidades autorizadas para alimentos).

Tabla 3. Tratamientos químicos evaluados

TRATAMIENTO	AGENTE QUÍMICO	PORCENTAJE (P/P)
1	Agua	
2	Hidróxido de calcio (cal) Ca(OH)_2	0.3 %
3	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	0.75 %
4	Cal + H_2O_2	0.3% + 0.75%
5	Hidróxido de amonio (NH_4OH)	0.2 %
6	Cal + NH_4OH	0.3% + 0.2%
7	Dióxido de titanio (TiO_2)	1%
8	Peróxido de benzoílo	0.009%

5. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN EN TORTILLAS

Una vez obtenidas las tortillas, fueron evaluadas bajo ciertos parámetros de aceptación para el consumidor. Dichas pruebas se describen a continuación.

5.1 Capacidad de absorción de agua (CAA)

La CAA se determinó pesando una cantidad conocida de harina instantánea y adicionando agua electropura a 35°C hasta obtener una consistencia adecuada, es decir, sin que la masa presentara cuarteaduras y de esta manera poder elaborar las tortillas.

5.2 Pérdida de peso

Para evaluar este parámetro, se pesó la tortilla tanto cruda como cocida en una balanza granataria, posteriormente, y por medio de la siguiente fórmula, se determinó el porcentaje de pérdida de peso.

$$PP = \frac{\text{peso de tortilla cocida} - \text{peso de tortilla cruda}}{\text{peso de tortilla cruda}} \times 100$$

5.3 Rolabilidad

Las tortillas, a temperatura ambiente (aproximadamente a los 30 min de haber sido cocidas), se enrollaron en un tubo de vidrio de 2 cm de diámetro. Se observó si presentaban ruptura y en base a ello se asignó una calificación arbitraria que osciló de acuerdo a una escala preestablecida que a continuación se presenta:

% de ruptura	Valor asignado
0	5
25	4
50	3
75	2
100	1

Donde 5 se asignó a la mejor calidad, y 1 con el 100% de ruptura, lo que refleja una pobre calidad.

5.4 Inflado

Este parámetro se determinó en el momento de la cocción de las tortillas, ya que se evaluó de forma visual y dependiendo del grado de inflado se le asignó un valor arbitrario, como lo muestra la siguiente tabla.

% de inflado	Valor asignado
0 – 25	3
25-50	2
75-100	1

Asignando un valor de 1 a la de mejor inflado, lo que implica mejor calidad.

5.5 Fuerza a la tensión y al corte

Tensión

La tensión representa la fuerza necesaria para romper la tortilla, la cual no debe ser ni muy suave ni muy dura. Esto se refleja en la calidad de la tortilla, y para evaluarla se eligieron al azar tres tortillas de cada tratamiento, se recortaron en la parte central en forma de probeta, utilizando una lámina específica para esta prueba. El recorte se colocó en las pinzas de retención del Texture Analyser (TA-XT2). La prueba se realizó a una velocidad de 2 mm/seg y 15 mm de distancia, y la fuerza máxima de tensión fue registrada.

Corte

El corte es la fuerza necesaria para cortar y moler con los dientes la tortilla, el equipo empleado hace la simulación de esta función. Esta prueba se realizó con las fracciones de los recortes de las tortillas utilizadas en la tensión, con el objetivo de cuantificar el mismo producto. En una placa se colocó una de las fracciones y se hizo deslizar una cuchilla plana que al desplazarse hacia abajo pasó por la muestra, ocasionando que el material a prueba fuera cortado. La prueba se realizó a una velocidad de 2 mm/seg y 15 mm de profundidad, y la fuerza máxima de tensión fue registrada.

5.6 Humedad

La humedad se determinó por medio de una estufa de humedad OHAUS (MB200). En una charola de aluminio, previamente tarada, se colocaron 10 gr de muestra previamente molida en un molino de aspas y uniformemente distribuida. La temperatura para determinar este parámetro fue de 165°C con una velocidad de deshidratación de 0.01 gr/10seg, y el tiempo de prueba de 10 min.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico (análisis de varianza y comparación de medias mediante prueba de rango múltiple de Duncan) de los diferentes tratamientos de destoxificación evaluados se utilizó el paquete computacional Statistical Analysis System (SAS, 1989).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Curva de calibración de AFB₁.

Para cuantificar la concentración de AFB₁ en maíz, nixtamal, harina, masa y tortilla, tanto del muestreo de las tortillerías, como en los experimentos de desactivación se realizó una curva de calibración para AFB₁. En la Figura 5 se muestra la curva de calibración de AFB₁ que utilizó para determinar las concentraciones en las diferentes muestras analizadas como: maíz, harina, masa, nixtamal, tortilla, tanto de las tortillerías estudiadas como de los procesos de extrusión (con y sin agentes químicos) como el tradicional de nixtamalización, siendo su coeficiente de determinación $r^2=0.995$ con un $\alpha = 0.005$.

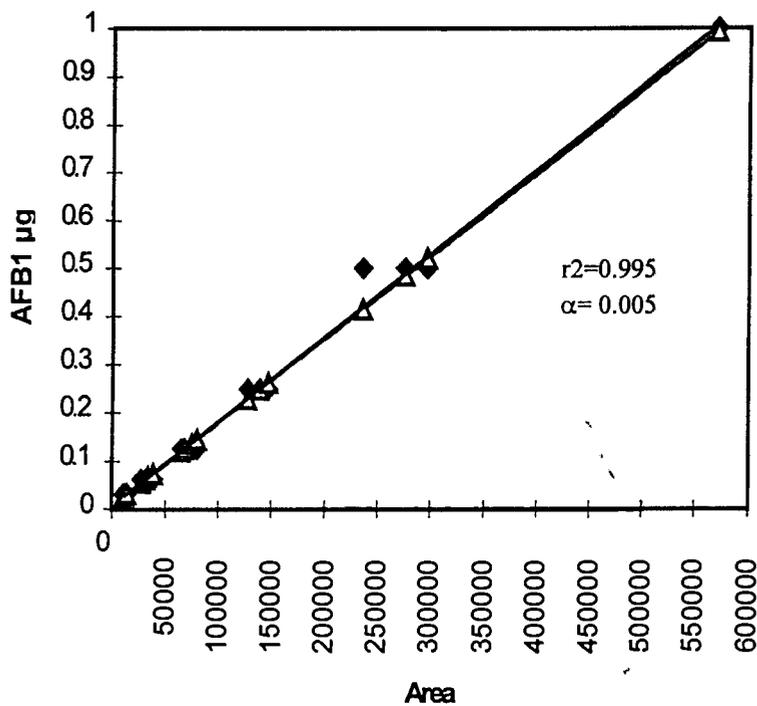


Figura 5 . Curva de calibración de AFB₁

Cada punto representa la media
cuatro inyecciones.

2. Muestreo en tortillerías

De las 250 tortillerías que se encuentran asociadas a la Federación de la masa y la tortilla de la ciudad de Querétaro, se efectuó un muestreo aleatorio de 49 tortillerías en diferentes colonias de la ciudad. El muestreo se llevó a cabo en dos diferentes periodos, el primero en Febrero - Marzo; y el segundo en Agosto - Septiembre de 1998. De los datos arrojados de la encuesta que se aplicó en cada tortillería cabe hacer mención que de las 49 muestreadas solo dos de ellas utilizaban únicamente maíz como materia prima, 31 la mezcla maíz + harina (50:50 p/p) y 17 de ellas solo harina. Las condiciones de almacenamiento en general eran buenas (ventilación y limpieza adecuada); además la materia prima (maíz y harina) no se mantenían mas de 15 días en almacenamiento. En las Tablas 4 y 5 se muestran los niveles de aflatoxinas en los diferentes productos de maíz analizados ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) correspondientes al primer y segundo muestreo, respectivamente. La tabla 6 muestra los resultados globales de ambos muestreos.

BIBLIOTECA CENTRAL U.A.Q.

Tabla 4. Niveles de Aflatoxina B₁ (AFB₁) en Productos de Maíz, primer muestreo (Febrero - Marzo de 1998)

Producto	AFB ₁ (µg/Kg)				Total de muestras	Número de contaminadas
	Mínimo	Máximo	\bar{x}	σ_{n-1}		
Maíz	<LD	23.42	3.007	7.159	19	4
Harina	<LD	54.68	8.839	12.253	27	14
Nixtamal	<LD	5.04	0.593	1.531	19	3
Masa	<LD	19.79	2.024	4.159	26	11
Tortilla	<LD	11.63	2.681	3.872	26	10

<LD= Menor al límite de detección

σ_{n-1} = Desviación estándar

\bar{x} = Media

Figura 6. Productos de maíz contaminados con aflatoxina B₁ en tortillerías de Querétaro, primer muestreo (Febrero - Marzo de 1998)

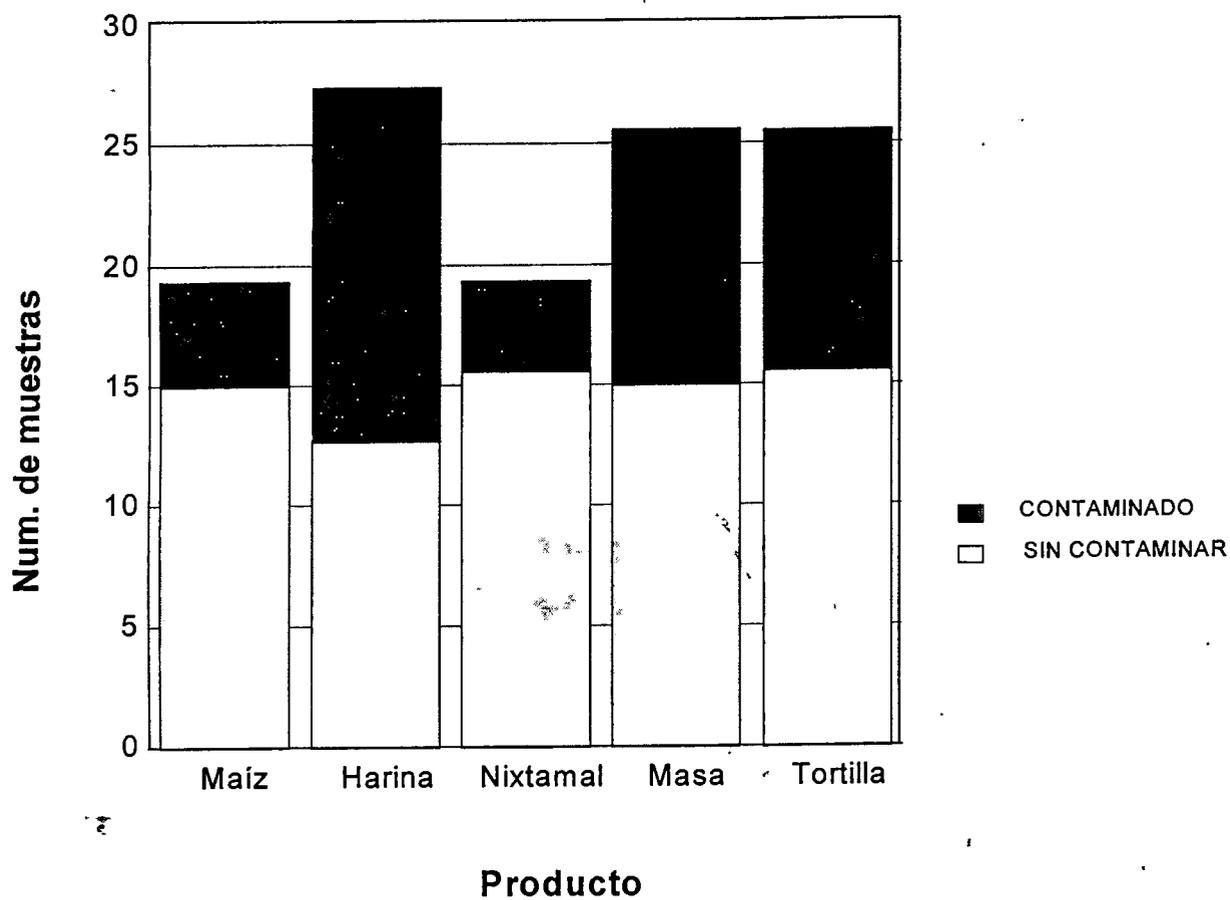


Tabla 5. Niveles de Aflatoxina B₁ (AFB₁) en Productos de Maíz, segundo muestreo (Agosto – Septiembre de 1998)

Producto	AFB ₁ (µg/Kg)				Total de muestras	Número de contaminadas
	Mínimo	Máximo	\bar{x}	σ_{n-1}		
Maíz	<LD	933.0	79.0	257.1	13	5
Harina	<LD	37.0	13.3	10.7	20	19
Nixtamal	<LD	13.6	3.4	5.1	10	6
Masa	<LD	28.5	6.2	7.7	20	16
Tortilla	<LD	40.4	5.3	9.1	23	15

<LD= Menor al límite de detección

σ_{n-1} = Desviación estándar

\bar{x} = Media

Figura 7. Productos de maíz contaminados con aflatoxina B₁ en tortillerías de Querétaro, segundo muestreo (Agosto - Septiembre de 1998)

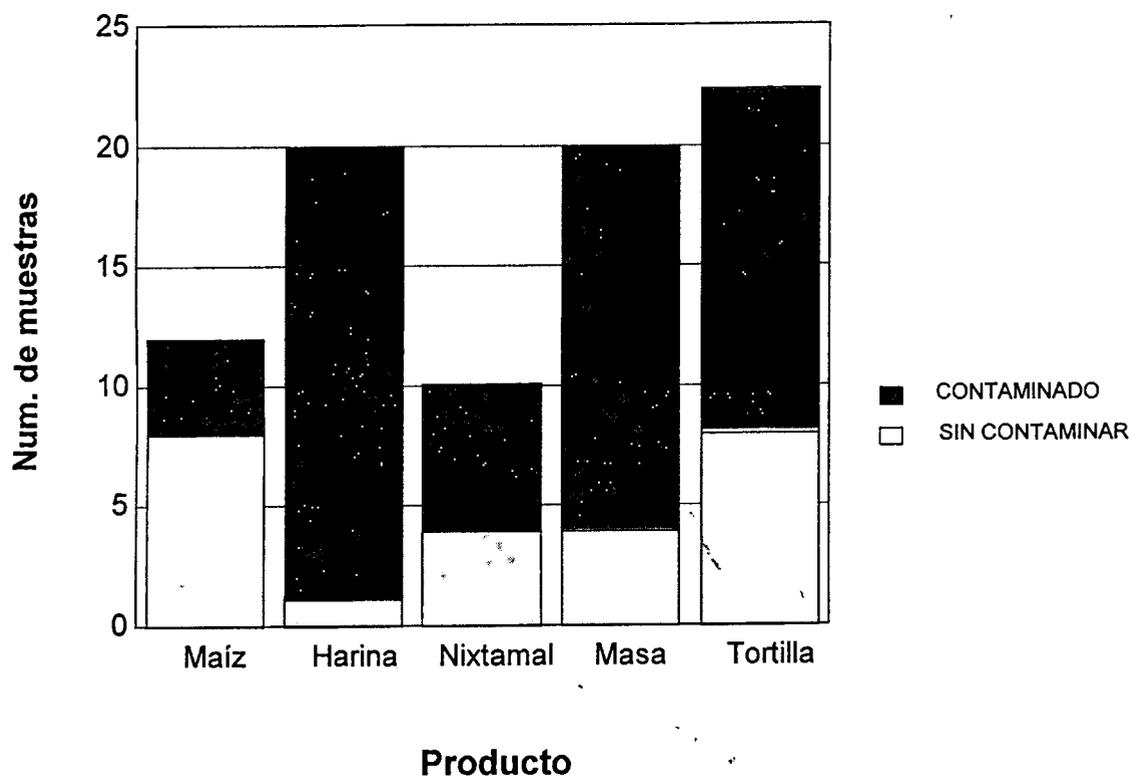


Tabla 6. Niveles de Aflatoxina B₁ (AFB₁) en Productos de Maíz, muestreo global ambos muestreos)

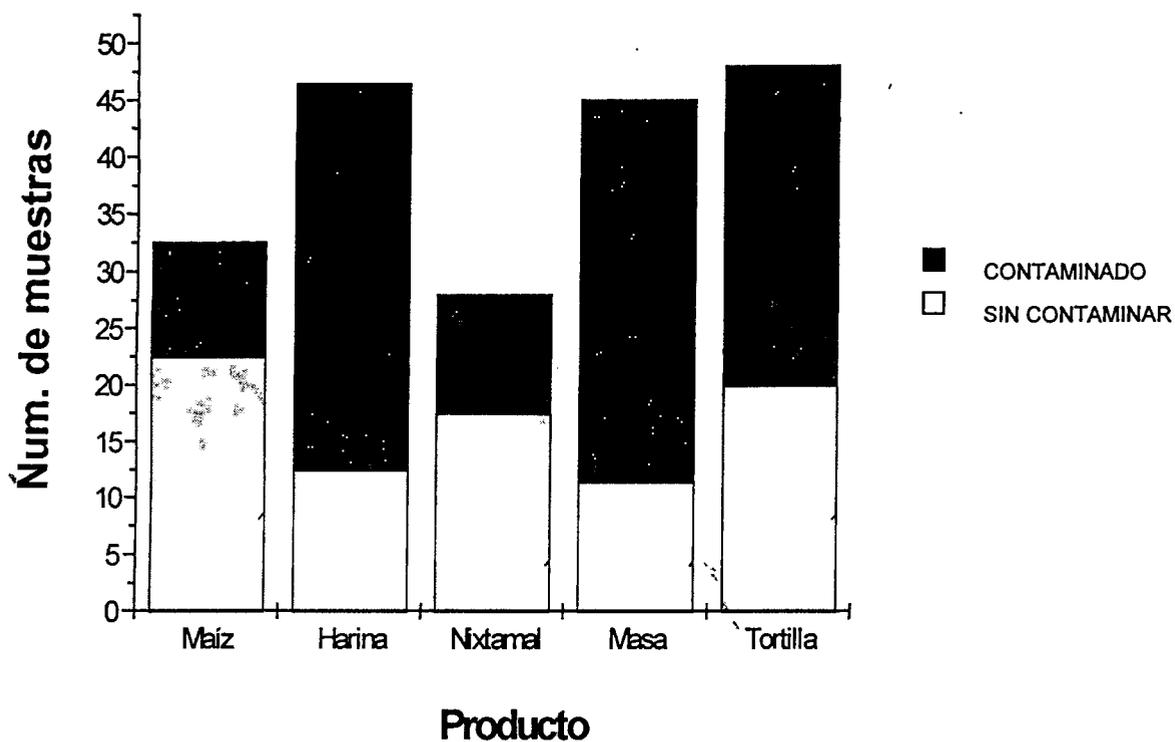
Producto	AFB ₁ (µg/Kg)				Total de muestras	Número de Contaminadas
	Mínimo	Máximo	\bar{x}	σ_{n-1}		
Maíz	<LD	933.0	33.93	164.5	32	10
Harina	<LD	54.7	10.73	11.7	47	35
Nixtamal	<LD	13.6	1.60	3.4	29	10
Masa	<LD	28.5	3.80	6.2	46	33
Tortilla	<LD	40.4	3.90	6.9	49	27

<LD= Menor al limite de detección

σ_{n-1} = Desviación estándar

\bar{x} = Media

Figura 8. Productos de maíz contaminados con aflatoxina B₁ en tortillerías de Querétaro, muestreo global (ambos muestreos).



En la primera parte del estudio se muestrearon un total de 26 tortillerías y en cada una de ellas se colectaron muestras de maíz, nixtamal, harina, masa y tortilla. Como se puede observar en la Tabla 4 el mayor problema de contaminación con AFB₁ lo presentan las harinas instantáneas ya que del total de las 27 muestras obtenidas, 14 de ellas presentaron una elevada contaminación rebasando muy por encima los límites permitidos para el consumo humano de 20 µg AFB₁/Kg en la dieta total/día (Roebuck y Maxuitenko, 1994). El maíz también presentó problemas aunque no tan alarmantes, ya que de las 19 muestras solo 4 presentaron contaminación, dos de manera grave y dos dentro de los límites permisibles. Respecto a la tortilla de las 26 muestras analizadas 10 presentaron problema de contaminación con AFB₁ pero solo 5 de ellas tuvieron valores mayores o iguales a lo permitido.

BIBLIOTECA CENTRAL U.A.C.

Para la segunda parte del estudio se muestrearon las restantes 23 tortillerías del total, y la Tabla 5 nos presenta una vez mas que las harinas instantáneas representan el mayor problema de contaminación con AFB₁ ya que de las 20 muestras obtenidas, 19 de ellas presentan valores elevados de contaminación que exceden el límite permitido. De las 13 muestras de maíz, 5 tortillerías tuvieron presencia de AFB₁, pero solo una de ellas representó un problema severo para la salud ya que la concentración presente fue de 933 µg/kg, lo que representa 46.65 veces el límite permitido. Al analizar la masa es notorio que la concentración de AFB₁ que presenta es menor que la tortilla cuando deberían ser iguales, este fenómeno se puede atribuir a que al mezclar el nixtamal molido (baja contaminación) con la harina instantánea (concentración elevada) para obtener la masa, sin embargo la tortilla resulta sin diferencia con respecto a la masa. Las tortillas que presentaron contaminación fueron 15 de un total de 23 lo que representa un 65 %, aunque la concentración mas elevada la presentó la tortillería del maíz extremadamente contaminado, mientras que las demás estuvieron dentro de lo permitido.

La Tabla 6 nos presenta los resultados globales de ambos muestreos, en ella podemos observar que las harinas instantáneas son el mayor problema de contaminación con AFB₁, siguiendo la misma tendencia de cada muestreo por separado.

De las 47 muestras totales de harina, 35 resultaron con contaminación, lo cual representa un 75%. El maíz, sin ser tan grave el problema, presentó 10 tortillerías contaminadas de un total de 32 lo cual representa un 31%, y de ellas 6 fueron las que presentaron problemas graves. Cabe resaltar que solo una de ellas presentó una concentración de AFB₁ igual a 933µg/Kg, 47 veces el límite máximo permitido para consumo humano diario de 20µg de aflatoxinas totales/Kg (AFB₁ + AFG₁ + AFB₂ + AFG₂). Dato que sugiere una alarma de ser atendida ya que se ha demostrado que si bien la contaminación por aflatoxinas en maíz es un problema no continuo no se podría asegurar cuando y en que niveles se presenta.

El nixtamal, al ser analizado, presentó valores muy por debajo de los niveles originales del maíz, cayendo en valores incluso menores que el máximo límite permitido. Esto es una referencia mas para considerar a la nixtamalización como método efectivo para la descontaminación de maíz. La tortilla, que finalmente es el producto consumido, presentó 27 tortillerías contaminadas de un total de 49 muestreadas, lo que nos representa un 55%, de ellas solo 6 representarían un riesgo de salud publica dado a que, como ya se dijo, el valor máximo permitido es de 20 µg de aflatoxinas totales/Kg.

Los resultados sugieren que la contaminación del maíz con aflatoxinas va a depender de la estación del año, ya que en el primer muestreo efectuado la presencia de contaminación fue menor que en el periodo del segundo muestreo. Esto se debe a que en los primeros meses del año (Febrero-Marzo) el maíz utilizado es nuevo, tiene aproximadamente entre 4 y 5 meses de almacenamiento y conforme pasan los meses el tiempo de almacenamiento aumenta y con ello el riesgo de contaminación. En otras palabras, en el segundo muestreo todavía no se contaba con maíz de la cosecha del verano, es decir la materia prima muestreada tenía casi un año en almacén, por ello el alto índice de contaminación. Cabe recordar la elevada contaminación que se presentó en el estado de Tamaulipas en los años 1989 a 1995, en la cual por un prolongado e inadecuado almacenamiento del grano de maíz sufrió una severa contaminación (Carvajal y Arroyo, 1997).

3. Eliminación de AFB₁ en tortillas elaboradas por el proceso de extrusión.

3.1 Efecto de la cal, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y su combinación sobre los niveles de AFB₁ en tortillas elaboradas por el proceso de extrusión

Para llevar a cabo los diferentes estudios del efecto de la cal, H₂O₂ y su combinación sobre el abatimiento de la AFB₁ en el maíz, primeramente se determinó la concentración inicial de la toxina en el maíz a utilizarse como materia prima. Después de varias extracciones y de repetidas inyecciones en el HPLC (al menos tres para ambos casos) se obtuvo una media con concentración de AFB₁ de 20.866 µg/Kg al que se denominó maíz naturalmente contaminado. En la Tabla 7 se muestra la concentración de AFB₁ del maíz utilizado como materia prima y de las tortillas elaboradas por el método de extrusión con y sin la adición de cal, H₂O₂ y su combinación. Estadísticamente los datos muestran que la presencia de cal abate la AFB₁ comparado con su control de solo extrusión y que el H₂O₂ no juega un papel importante en dicho abatimiento. Parecería ser que el tratamiento extrusión + 0.75% de H₂O₂ generara mas aflatoxina, dato fácil de explicar ya que la distribución de esta micotoxina en la materia prima (maíz) no es uniforme, comportamientos similares a lo obtenido por Elías 1999. Para fines de comparación se utilizaron los datos arrojados del proceso tradicional de nixtamalización y es fácil de observar que la concentración de aflatoxinas es menor que el de extrusión. A pesar de que la eliminación de la AFB₁ es total con la adición de cal y su combinación con H₂O₂ las características organolépticas de la tortilla se ven afectadas de manera negativa. Lo que nos indica que el método tradicional de nixtamalización sigue siendo el mejor método para la obtención de tortillas.

Tabla 7. Efecto de cal, peróxido de hidrógeno y su combinación sobre la desactivación de AFB₁ en tortillas elaboradas por el método de extrusión.

Tratamiento	AFB ₁ (µg/Kg)*
*Maíz	20.87 ± 11.45**
Extrusión	4.96 ± 4.65 ^a
Extrusión + 0.3% cal	0.0 ± 0 ^b
Extrusión + 0.75% H ₂ O ₂	6.27 ± 7.25 ^a
Extrusión + 0.3% cal +0.75% H ₂ O ₂	0.0 ± 0 ^b
Nixtamalización	2.41 ± 0.69 ^a

*La concentración de AFB₁ está dada en base a peso seco.

** Representa la concentración de AFB₁ en el maíz utilizado como materia prima.

Cada valor representa la media de 5 repeticiones independientes y su desviación estándar

Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa aplicando la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

3.2. Efecto de la cal, H₂O₂, hidróxido de amonio NH₄OH y su combinación con cal, sobre los niveles de AFB₁ en tortillas elaboradas por el proceso de extrusión.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de un experimento independiente donde partiendo del mismo maíz naturalmente contaminado con 20.87 µg de AFB₁/Kg se trató con cal, H₂O₂, hidróxido de amonio (NH₄OH) y la combinación de cal con H₂O₂ y NH₄OH.

El tratamiento extrusión + 0.2% NH₄OH presenta la misma tendencia y comportamiento estadístico que los tratamientos de extrusión + 0.3% cal y el de extrusión + 0.3% cal + 0.75% H₂O₂. Mientras que los tratamientos extrusión + 0.75 H₂O₂ y extrusión + 0.3% cal + 0.2% NH₄OH son estadísticamente iguales y no contribuyen en la destoxificación de la micotoxina. Al igual que en el experimento anterior se tomó como parámetro de comparación el proceso tradicional de comparación.

Tabla 8. Efecto de cal, peróxido de hidrógeno y su combinación, hidróxido de amonio y su combinación con cal, sobre la desactivación de AFB₁ en tortillas elaboradas por el método de extrusión.

Tratamiento	AFB ₁ (µg/Kg)*
Maíz	20.87 ± 11.45**
Extrusión	0.86 ± 0.98 ^c
Extrusión + 0.3% cal	0.0 ± 0 ^c
Extrusión + 0.75% H ₂ O ₂	3.6 ± 2.73 ^a
Extrusión + 0.3% cal + 0.75% H ₂ O ₂	0.0 ± 0 ^c
Extrusión + 0.2% NH ₄ OH	0.0 ± 0 ^c
Extrusión + 0.3% cal + 0.2% NH ₄ OH	3.61 ± 0.77 ^a
Nixtamalización	2.41 ± 0.69 ^b

* La concentración de AFB₁ está dada en base a peso seco.

** Representa la concentración de AFB₁ en el maíz utilizado como materia prima. Cada valor representa la media de 5 repeticiones independientes y su desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa aplicando la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

La representación gráfica sobre la reducción de AFB₁ después de la adición de los diferentes tratamientos químicos sobre maíz se presentan en las Figuras 6 y 7. Podemos observar que el mayor abatimiento se obtiene con extrusión + cal (proceso propuesto por el CINVESTAV-QRO) y la combinación extrusión + cal + H₂O₂ (Figura 6). Mientas que en el segundo experimento independiente lo fueron estos dos, mas el de extrusión + NH₄OH. La nixtamalización ocasionó la eliminación de AFB₁ en un 92%.

En la Figura 6 podemos observar que la combinación de dos agentes químicos (cal y H₂O₂) abaten de manera mas eficiente a la micotoxina que la utilización de uno solo y este mismo comportamiento esperaríamos observar en la combinación cal+NH₄OH (Figura 7), sin embargo no es el caso, y podemos atribuirlo a que el NH₄OH es un agente menos oxidante que el H₂O₂. De igual manera puede suceder que los compuestos químicos reaccionen entre si antes de llegar a la molécula de aflatoxina disminuyendo con ello su potencia global.

Como podemos observar en estas mismas figuras, la extrusión por si sola no abate la toxina de manera tan eficiente como lo hace con un agente químico o la combinación de ellos, sin embargo la reducción llega hasta 4.9 µg de AFB₁/Kg (80%), lo cual esta por debajo del limite permitido para consumo humano. En un estudio preliminar, Elías (1999) realizó un estudio comparativo entre la extrusión más la adición de diferentes químicos contra el proceso tradicional de nixtamalización para el abatimiento de AFB₁. El maíz utilizado era naturalmente contaminado con una concentración de 494.58 µg de AFB₁/Kg, obteniendo hasta un 50% de eliminación con la sola extrusión sin embargo no llega a limites permitidos, esto debido a la elevada concentración inicial de su material de estudio.

Elías (1999) utilizó extrusión mas la adición de 0.3% de cal, 0.75% de H₂O₂ y la combinación de ambos, mismos tratamientos que utilizados en el presente trabajo. El uso de cal permitió el abatimiento del 74% de la toxina, mientras que la reducción al emplear H₂O₂ fue de 64% y de 67% en la combinación de ellos. Al comparar estos porcentajes con lo obtenido en el presente estudio (100%, 80% y 100% respectivamente) (Figura 6 y 7), podemos observar que hay una diferencia en cuanto a la eliminación, esto se puede atribuir a que el maíz naturalmente contaminado que se utilizó en esta investigación tuvo una concentración de 20.87 µg de AFB₁/Kg muy por debajo del utilizado por Elías, (1999) de 498.59 µg de AFB₁/Kg.

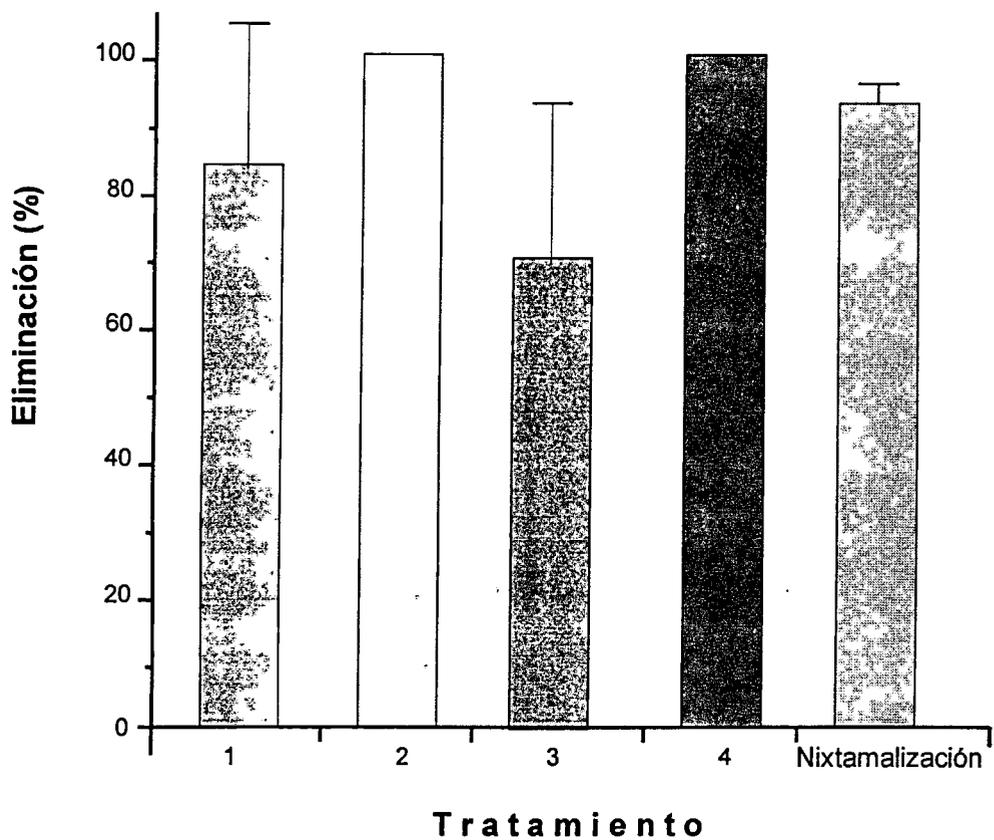


Figura 9. Porcentaje de eliminación de aflatoxina B₁ sobre el grano de maíz por efecto de algunos tratamientos químicos en la obtención de tortillas

Tratamiento 1= Extrusión
 Tratamiento 2 = Extrusión + 0.3 % cal
 Tratamiento 3 = Extrusión + 0.75 %
 Tratamiento 4 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.75 % H₂O₂
 Nixtamalización

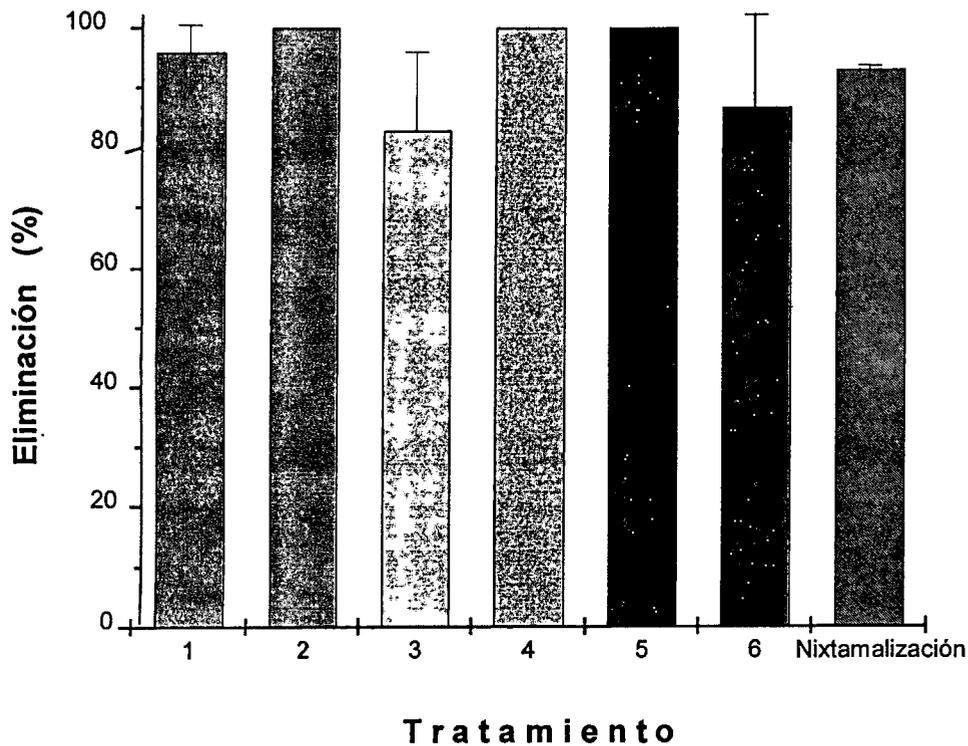


Figura 10. Porcentaje de eliminación de aflatoxina B₁ sobre el grano de maíz por efecto de algunos tratamientos químicos en la obtención de tortillas.

- Tratamiento 1= Extrusión
- Tratamiento 2 = Extrusión + 0.3 % cal
- Tratamiento 3 = Extrusión + 0.75 % H₂O₂
- Tratamiento 4 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.75 % H₂O₂
- Tratamiento 5 = Extrusión + 0.2 % NH₄OH
- Tratamiento 6 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.2 % NH₄OH
- Nixtamalización

En México ya algunos investigadores han informado brotes de contaminación en maíz, por ejemplo Carvajal et al (1997) en un estudio realizado en Tamaulipas de la cosecha de 1989, encontraron concentraciones promedio de 468 µg/kg de AFB₁ para maíz no cernido y valores promedio de 156 µg/kg en el maíz cernido. Mientras que Guzmán de Peña et al (1995) informa para la misma región de Tamaulipas una concentración de AFB₁ en maíz de 251 µg/kg. Estos últimos investigadores, con el propósito de evaluar la efectividad de la nixtamalización para la eliminación de la toxina en maíz naturalmente contaminado, decidieron muestrear el material y determinar en cada paso del proceso tradicional la concentración de AFB₁, obteniendo en el producto final la tortilla, una concentración de 6.1 µg/Kg, la cual corresponde a una eliminación del 97%. Partiendo de una concentración de 494.58 µg de AFB₁/Kg y después de utilizar la nixtamalización, Elías (1999) obtiene un reducción de hasta 95 %. Estos estudios nos permiten comparar los resultados obtenidos en nuestros experimentos, donde la disminución es de un 92% de la concentración inicial. A pesar de que la eliminación por el método tradicional no fue total, estadísticamente hablando no hay diferencia significativa con los demás tratamientos (Tabla 7 y 8), por lo que podemos corroborar que este método sigue teniendo ventajas sobre los demás.

3.3 Características organolépticas

Con el objetivo de saber si los agentes químicos utilizados para abatir la AFB₁ (cal, H₂O₂, cal+H₂O₂, NH₄OH y cal +NH₄OH) no alteraban las características organolépticas de la tortilla se procedió a medirlas (rolabilidad, inflado, humedad y peso en base seca).

En las Tablas 9 y 10 podemos observar los resultados obtenido para las características organolépticas para cada uno de los tratamientos aplicados al maíz. El inflado es un

Tabla 9. Efecto de algunos químicos aplicados al grano de maíz molido sobre algunas características organolépticas de tortilla.

Tratamiento	Rolabilidad	Inflado	Humedad (%)	Peso en base seca (gr)
Tratamiento 1= Extrusión	4 ± 0.45	2 ± 0.45	28.5 ± 0.35	17.88
Tratamiento 2 = Extrusión + 0.3 % cal	4 ± 0.71	2 ± 0.55	33.53 ± 0.35	16.55
Tratamiento 3 = Extrusión + 0.75 % H ₂ O ₂	5 ± 0.41	2 ± 0.75	33.01 ± 0.41	16.75
Tratamiento 4 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.75 % H ₂ O ₂	5 ± 0.55	2 ± 0.55	34.2 ± 0.62	16.45
Nixtamalización	5 ± 0	1 ± 0.49	41.16 ± 0.41	14.71

Cada valor representa la media de al menos seis repeticiones ± D.S.

Las mediciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos

Tabla 10. Efecto de algunos químicos aplicados al grano de maíz molido sobre algunas características organolépticas de tortilla.

Tratamiento	Rolabilidad	Inflado	Humedad (%)	Peso en base seca (gr)
Tratamiento 1= Extrusión	4 ± 1.3	3 ± 0.38	26.85 ± 0.48	18.29
Tratamiento 2 = Extrusión + 0.3 % cal	5 ± 0.53	1 ± 0.52	29.67 ± 0.21	17.58
Tratamiento 3 = Extrusión + 0.75 % H ₂ O ₂	5 ± 0.49	1 ± 0.49	27.91 ± 0.48	18.02
Tratamiento 4 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.75 % H ₂ O ₂	4 ± 0.53	2 ± 0.46	30.39 ± 0.82	17.4
Tratamiento 5 = Extrusión + 0.2 % NH ₄ OH	3 ± 0.93	2 ± 0.52	30.25 ± 0.07	17.44
Tratamiento 6 = Extrusión +0.3 % cal + 0.2 % NH ₄ OH	4 ± 0.35	1 ± 0.46	30.05 ± 0.62	17.49
Nixtamalización	5 ± 0	1 ± 0.49	41.16 ± 0.41	14.71

Cada valor representa la media de al menos seis repeticiones ± D.S.

Las mediciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos

parámetro subjetivo y a la vez uno de los importantes que evalúa un consumidor al momento de su cocimiento. Este se presenta debido al vapor de agua que se genera en el momento de su cocción. Para su evaluación se utilizó una escala subjetiva en la cual se asignó un valor de 1 para un inflado de 75 a 100%, mientras que para un porcentaje de 0 a 25% de inflado se asignó un valor de 3. En base a esto es evidente que el proceso tradicional de nixtamalización toma el valor más deseado para una tortilla, formándose de manera total la ampolla, mientras que la aplicación de agentes químicos disminuyen el inflado, este efecto es aún más evidente en los tratamientos en los que se combinan dos químicos como son $\text{cal} + \text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{cal} + \text{NH}_4\text{OH}$ (Tablas 9 y 10), arrojando un valor de 2 (50 a 75% de inflado). Por otro lado, los tratamientos que solo implicaron la adición de un químico presentaron un inflado muy cercano al de la nixtamalización (75 a 100%), esto puede atribuirse a que los agentes químicos compiten por el agua presente en la masa, provocando que la cantidad del líquido disponible para el inflado sea menor y por consecuencia el abultado menos notorio. La adición de NH_4OH provocó una deshidratación mayor que los demás agentes, esto puede deberse a que la reacción que presentó con las moléculas de agua fue más violenta y con ello menor inflado.

La pérdida de agua durante el cocimiento de la tortilla también se hace notoria en la facilidad para enrollar la tortilla y formar el tradicional taco sin que se rompa, parámetro que llamaremos rolabilidad, el cual, al igual que el inflado, es una forma subjetiva de medir la calidad de la tortilla. Para evaluar esta característica se determinó una escala subjetiva en la cual se asignó un valor de 5 cuando se hizo presente 0% de ruptura y 1 para un porcentaje de ruptura que varió de 75% a 100%, tomando 2,3 y 4 como valores intermedios (ver escala de inflado). Esta propiedad está estrechamente relacionada con el inflado, ya que si una aumenta la otra de igual manera lo hace y viceversa. Esto podemos apreciarlo en la Tabla 10, donde el uso de un solo agente químico (cal o H_2O_2) provoca una menor deshidratación que la combinación de ellos, reflejándose en un menor quebrado. Al igual que en el inflado, el NH_4OH provocó la menor calidad de la tortilla ya que presentó el mayor porcentaje de ruptura (25% a 50%).

4.0 Eliminación de AFB₁ en tortillas elaboradas con harina instantánea obtenida por el proceso de extrusión.

4.1 Efecto de cal, H₂O₂, cal + H₂O₂, NH₄OH, cal +NH₄OH, TiO₂, peróxido de benzoilo sobre los niveles de AFB₁ en tortillas elaboradas con harinas instantáneas obtenidas por el proceso de extrusión.

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

Para esta parte del estudio, se trabajó con harinas instantáneas, para lo cual tanto en el maíz como en la harina, sin la aplicación de ningún agente químico, se extrajo y determinó la concentración inicial de AFB₁, y con ello evaluar la eficiencia de los tratamientos químicos anteriormente aplicados y se probaron además otros dos agentes químicos (dióxido de titanio y peróxido de benzoilo). Estos compuestos químicos son agentes oxidantes y se utilizan en los alimentos como conservadores, las cantidades empleadas fueron las permitidas para su uso en alimentos. En la extracción y cuantificación de AFB₁ tanto en maíz crudo como en harinas se hicieron 7 repeticiones teniendo como concentración inicial 33.55 µg de AFB₁/Kg de maíz y 6.43 µg de AFB₁/Kg de harina instantánea (Tabla 11)

El efecto de los agentes químicos evaluados: cal, H₂O₂ y su combinación; cal, NH₄OH y su combinación, dióxido de titanio (TiO₂) y peróxido de benzoílo se muestran en la Tabla 11 Podemos observar que a pesar que la extrusión no abate de manera total la toxina reduce de manera significativa la concentración hasta en un 90%, llevándola a 6 µg/kg, valor que se encuentra por debajo del límite permitido, esto puede deberse a que la molécula de AFB₁ se acompleja con algún componente del maíz (por ejemplo una proteína) al momento de pasar por el tornillo sin fin, incrementándose el efecto con la temperatura aplicada, la cual puede ayudar al rompimiento de la molécula. En esta misma tabla podemos observar que la adición de agentes químicos ayudan a reducir la concentración de la toxina, obteniendo valores aceptables, sin embargo es notable el hecho de que el abatimiento es menor al adicionar un solo agente químico que la combinación de dos de ello, es probable que los químicos reaccionen y la fuerza final sea menor. De acuerdo a estos resultados la nixtamalización sigue siendo el mejor método para la eliminación de AFB₁ en maíz.

Tabla 11. Efecto de cal, peróxido de hidrógeno y su combinación, hidróxido de amonio y su combinación con cal, dióxido de titanio y peróxido de benzoilo, sobre la desactivación de AFB₁ en tortillas elaboradas con harina instantánea obtenida por el método de extrusión.

Tratamiento	AFB ₁ (µg/Kg)*
Maíz	33.55 ± 2.8**
Extrusión	6.43 ± 2.72 ^c
Extrusión + 0.3% cal	4.07 ± 0.5 ^b
Extrusión + 0.75% H ₂ O ₂	3.75 ± 3.34 ^c
Extrusión + 0.3% cal + 0.75% H ₂ O ₂	4.21 ± 0.22 ^c
Extrusión + 0.2% NH ₄ OH	3.86 ± 0.38 ^c
Extrusión + 0.3% cal + 0.2% NH ₄ OH	9.62 ± 1.84 ^a
Extrusión + 1.0% TiO ₂	8.07 ± 2.76 ^a
Extrusión + 0.009% peróxido de benzilo	3.87 ± 0.64 ^c
Nixtamalización	2.41 ± 0.69 ^c

* La concentración de AFB₁ está dada en base a peso seco.

** Representa la concentración de AFB₁ en el maíz utilizado como materia prima.

Cada valor representa la media de 3 repeticiones independientes y su desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa aplicando la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

Al adicionar de forma independiente cal y NH_4OH a la harina instantánea observamos para ambos tratamientos una eliminación del 95% (Figura 8), esto es debido al ataque del agente sobre el anillo de lactona, provocando con ello la hidrólisis del grupo. El H_2O_2 ataca a la toxina en el doble enlace del anillo furano, provocando la oxidación de la molécula y con ello reduciendo la concentración hasta en un 95%. Al llevarse a cabo la combinación cal + H_2O_2 nos da como resultado un 100% de eliminación, y esto sería de esperarse ya que ambos agentes atacan la estructura en diferentes puntos, dando como consecuencia una mayor destrucción de la molécula. Por tratarse de dos agentes químicos diferentes, podría esperarse una reacción similar al combinar cal con NH_4OH , sin embargo no es así ya que ambos atacan el mismo punto de la molécula de AFB_1 (anillo de lactona), pudiendo suceder que antes de llegar a este reaccionen entre sí dando como consecuencia una menor fuerza, que se refleja en tan solo el 80% de eliminación.

Al utilizar el TiO_2 en nuestro experimento obtuvimos un porcentaje de eliminación del 75%, valor que, al compararlo con los demás tratamientos es bajo, y podemos atribuirlo a que es un agente poco oxidante, utilizado en alimentos básicamente para blanquearlos, sin embargo nos lleva a valores por debajo del nivel permitido. El peróxido de benzoilo otro agente oxidante, por lo tanto ataca el doble enlace del anillo furano, provocando la destrucción de la molécula y dando un porcentaje de eliminación del 90%, que al compararlo con el otro agente oxidante empleado (H_2O_2) arrojan porcentaje de eliminación.

Comparando todos los tratamientos se puede inferir que los agentes químicos utilizados cal, H_2O_2 , NH_4OH , peróxido de benzoilo y dióxido de titanio bajo las condiciones probadas logran disminuir la concentración de AFB_1 a niveles aceptables sin embargo las características de textura se ven afectadas dando productos indeseables.

A la actualidad la literatura no reporta investigaciones de este tipo, lo que pone de manifiesto la originalidad e interpretación de realizar estudios al respecto.

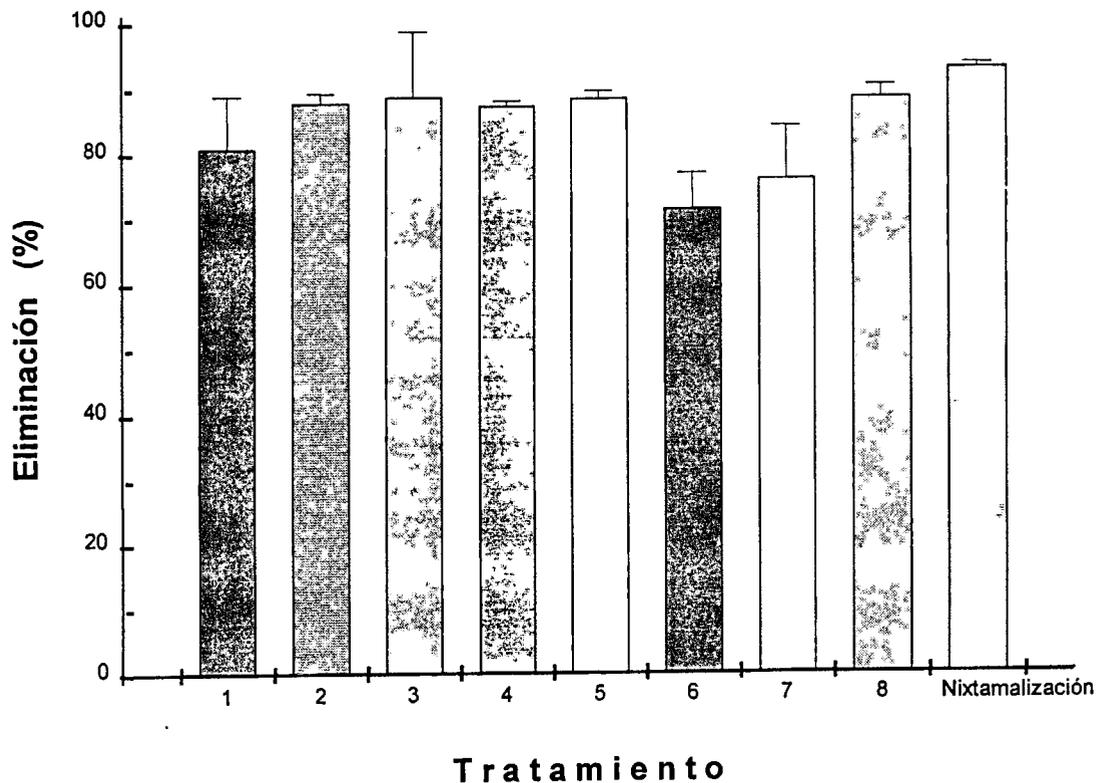


Figura 11. Porcentaje de eliminación de aflatoxina B₁ por efecto de algunos tratamientos químicos a harinas instantáneas para la obtención de tortillas

- Tratamiento 1= Extrusión
- Tratamiento 2 = Extrusión + 0.3 % cal
- Tratamiento 3 = Extrusión + 0.75 % H₂O₂
- Tratamiento 4 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.75 % H₂O₂
- Tratamiento 5 = Extrusión + 0.2 % NH₄OH
- Tratamiento 6 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.2 % NH₄OH
- Tratamiento 7 = Extrusión + 1.0 % TiO₂
- Tratamiento 8 = Extrusión + 0.009 % peróxido de benzolilo
- Nixtamalización

Los resultados obtenidos sugieren que a concentraciones bajas de AFB₁ en la materia prima (maíz) la adición de los agentes químicos probados en las harinas instantáneas reducen los niveles de la micotoxina en la tortilla tanto como el proceso tradicional de nixtamalización.

4.3 Características organolépticas

De igual manera que en 3.0, las tortillas elaboradas con maíz mediante el proceso de extrusión, se evaluó el efecto de la adición de los agentes químicos probados sobre las características de calidad de la tortilla.

En la Tabla 12 se puede observar que el proceso de extrusión afecta de manera gradual a la tortilla provocando que se quiebre demasiado, y la adición de los diversos químicos y su combinación también afectan la calidad final de la tortilla provocando que la ruptura sea excesiva (valores por abajo de 3, más del 50 % de quiebre) e indeseable para el consumidor.

La obtención de tortillas a partir de harinas instantáneas provocó la deshidratación, lo que se tradujo a un no inflado de la tortilla sin importar para dicho parámetro la adición de los agentes químicos. Esto se debe a que durante el proceso de obtención de las harinas instantáneas la masa sufre una deshidratación prácticamente total y al momento de hacer las tortillas rehidratando la harina puede suceder que la capacidad de absorción de agua de las harinas se disminuya dando como consecuencia productos muy secos. En un estudio preliminar, Mauricio (1997) elaboró tortillas a base de harinas instantáneas obtenidas por el método de extrusión, examinando el efecto de la adición de diversos hidrocoloides tales como goma xantana, guar, etc., lo que ayudó a incrementar la calidad de la tortilla en cuanto al inflado y roabilidad sobre todo en la goma xantana.

Tabla 12. Efecto de algunos químicos aplicados a harina instantánea de maíz molido sobre algunas características organolépticas de tortilla.

Tratamiento	Rolabilidad	Inflado	Humedad (%)	Peso en base seca (gr)
Tratamiento 1= Extrusión	2 ± 0.5	3 ± 0.04	27.55 ± 0.41	18.11
Tratamiento 2 = Extrusión + 0.3 % cal	3 ± 0.53	3 ± 0.47	27.73 ± 0.21	18.06
Tratamiento 3 = Extrusión + 0.75 % H ₂ O ₂	2 ± 0	3 ± 0.52	25.98 ± 0.48	18.51
Tratamiento 4 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.75 % H ₂ O ₂	3 ± 0.6	3	26.42 ± 0.14	18.39
Tratamiento 5 = Extrusión + 0.2 % NH ₄ OH	3 ± 0.5	3	25.74 ± 1.37	18.57
Tratamiento 6 = Extrusión + 0.3 % cal + 0.2 % NH ₄ OH	2 ± 0.52	3	27.14 ± 0.62	18.22
Tratamiento 7 = Extrusión + 1.0 % TiO ₂	2 ± 0.52	3	27.97 ± 0.12	18.01
Tratamiento 8 = Extrusión + 0.009 % peróxido de benzolilo	3 ± 0.5	3	25.98 ± 0.21	18.51
Nixtamalización	5 ± 0	2 ± 0.49	41.16 ± 0.41	14.71

Cada valor representa la media de al menos seis repeticiones ± D.S.
Las mediciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos

Un área de oportunidad sería probar la adición de agentes químicos para la eliminación de AFB₁ y al mismo tiempo adicionar hidrocoloides y observar el efecto que pudiera tener la adición de ambos sobre la calidad final de la tortilla. ya que la humedad en las tortillas obtenidas al adicionar los agentes es mucho menor a la presentada en las obtenidas por el método tradicional. Al compara este resultado con los obtenidos en rolabilidad e inflado es obvio que la nixtamalización por mucho supera a los demás tratamientos.

VIII. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos en los muestreos, de las 49 tortillerías analizadas en la ciudad de Querétaro seis de ellas presentaron niveles de contaminación en maíz con AFB₁ que ponen en riesgo la salud del consumidor, por lo que es necesario tomar medidas preventivas que tiendan a resolver el problema.
- Las harinas instantáneas aportan la mayor parte de la contaminación con AFB₁ encontrada en las tortillas, ya sea sola o combinada con nixtamal. Este elevado nivel de contaminación pone en riesgo la salud del consumidor por lo que se hace necesario el control en este producto.
Se sugiere proponer a la instancia gubernamental adecuada la implementación de un programa de monitoreo de esta materia prima.
- Los resultados arrojados del muestreo sugieren que el nivel de contaminación con AFB₁ en el maíz se ve afectado según la época del año, incrementándose en la segunda mitad de este debido al almacenamiento.
- La roabilidad y el inflado, en las tortillas elaboradas con maíz por el proceso de extrusión, se ven afectados de manera negativa al adicionar diferentes agentes químicos al maíz, comparado con las tortillas elaboradas por el proceso tradicional de nixtamalización.
- La adición de compuestos químicos al maíz y la utilización de extrusión para obtener tortillas ocasiona una elevada pérdida de humedad en el producto final, dando como consecuencia productos quebradizos.
- La aplicación de compuestos químicos al maíz para la elaboración de tortillas por medio de extrusión logra el abatimiento de la AFB₁ presente en la materia prima en un 100%.

- Las harinas instantáneas de maíz obtenidas a partir de extrusión para la elaboración de tortillas, dan productos extremadamente quebradizos, reflejándose en la poca humedad del producto.
- El inflado de las tortillas elaboradas con harinas instantáneas obtenidas por extrusión y adicionadas de algún agente químico se ve drásticamente afectado ya que no se detecta este.
- El abatimiento de AFB₁ en harinas instantáneas por la adición de diversos compuestos químicos es considerablemente elevada, aunque las características organolépticas de estas se ven afectadas de manera negativa comparadas con características de las tortillas elaboradas por el proceso de nixtamalización.
- La nixtamalización sigue siendo el mejor método para la eliminación de AFB₁ sin afectar a sus propiedades físicas y organolépticas del producto final, la tortilla.
- Los tratamientos aplicados a las harinas instantáneas reducen notablemente los niveles de contaminación, sin embargo algunas de las características físicas (rolabilidad y contenido de humedad) se ven afectadas de manera negativa, resultando productos de mala calidad.

IX. BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C., 1995. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis. 16th edn., Vol. II, Analytical Chemistry, pp. 18-19.
- Acosta, M.H., 1994. Descripción del equipo de extrusión. Memorias de la 1a Reunión Panamericana de Extrusión de Alimentos. Chihuahua, México.
- Arriola, M.C., Porres, E., Cabrera, S., Zepeda, M., Rolz, C. 1988. Aflatoxin Fate during Alkaline Cooking of Corn for Tortilla Preparation. J. Agric. Food Chem. 36:530-533.
- Carvajal, M., Arroyo, G. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, México. American Chemical Society.
- Chi-Tang Hu, Karwe, M., 1992, Food extrusion science and technology. Marecel Dekker Inc. 3
- Eaton, D. L., H. S. and Neal, G.E. 1994. Biotransformation of aflatoxins. Chap. 3. En The toxicology of aflatoxins, D.L. Eaton, and J.D. Groopman (Eds.)
- Elías, O.R., 1999. Comparación del contenido de aflatoxinas en tortillas obtenidas con el proceso tradicional de nixtamalización y por extrusión. Tesis para obtener al grado de Químico en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ellis, W.O., Smith, J.P. and Simpson, B.K. 1991. Aflatoxins in Food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 30 (3): 403-439.

- Figueroa, J.D.C., González-Hernandez, J., Arámbula, G. y Morales., E. 1997. Tecnologías ecológicas para la producción de tortilla. *Avance y Perspectiva*. 16,363-374.
- Figueroa, J.D.C., Martínez-Bustos, F., González-Hernández, J., Sánchez-Sinécio, F., Martínez, J.D.L.L., y Ruiz-Torres, M. 1994. Modernización tecnológica del proceso de nixtamalización. *Avance y Prespectiva*. 13, 323-329.
- Figueroa, J.D.C. y Aguilar G.R. 1997. El origen del maíz. *Avance y Prespectiva*. 16, 91-98.
- Guzmán de Peña, D., Trudel, L. and Wogan, G.N. 1995. Corn "Nixtamalización" and the fate of Radiolabelled Aflatoxin B1 in the Tortilla Making Process. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55:858-864.
- Hanigan H.M., and Laishes B.A., 1984. Toxicology of Aflatoxin B1 in rat and Mouse Hepatocytes *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology*, 30: 185-193.
- Harvey R.B., Phillips T.D., Ellis J.A., Kubena L.F., Huff W.E., Petersen H.D. 1991. Effects on Aflatoxin M₁ Residues in Milk by Addition of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicates to Aflatoxin-Contaminated Diets of Dairy Cows. *American Journal of Veterinary Research*. V. 52. No. 9, 1556.
- Hsieh D., 1989. Cancer Risk Posed by Mycotoxins in Foods *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insects Pheromones and Allomonones*. C.H. Chou and G.R. Waller (Eds). Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 9. pp: 343-354.
- Hsieh D. and Wong J.J., 1994. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. Chapter 4. en: *The toxicology of Aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*. David L. Eaton and John D. Groopman (Eds). pp: 73

- Katz, S.H., Hediger, M.L. and Valleroy, L.A. 1974. Traditional maize processing techniques in the new world. *Science* 184, 765.
- Mauricio, S. A. 1997. Efecto de los hidrocoloides en las características de deshidratación de masa de harinas instantáneas y en la calidad de la tortilla de maíz. Tesis para obtener al grado de Químico en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Masimango N. Remacle J. and Ramaut J. 1979. Elimination of aflatoxin B1 by clays from contaminated substrates. *Ann Nutr Aliment* .33:137-147.
- Mann, G.E., L.P. Codifer, H.K. Gardner, S.P. Koltun and F.G. Doller. 1970. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47:173-176.
- Martínez-Bustos, F., Figueroa, J.D.C., Sanchez-Sinicio, F., González-Hernández, J., Martínez, J.D.L.L., Ruíz-Torres, M. 1996. Method for the preparation of instant fresh corn dough or masa. Patente no. 5,532,013, USA.
- Pariza, M.W. and Ha, Y.Y. 1990. Conjugated dieonic derivatives of linoleic acid: mechanism of anticarcinogenic effect. Chap. Antimutagens and carcinogens, in *Mutagens and carcinogens in the diet*. M.W. Pariza, H-U. Aeschbacher, J.S. Felton and S. Sato (Eds). Wiley-liss. New York.
- Park D.L., Lee L.S. and Kolton S.A. 1984. Decontamination of Aflatoxin Contaminated Peanut Meal using Monomethylamine: $\text{Ca}(\text{OH})_2$. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 61: 1071-1074.
- Payne, G.A. 1992. Aflatoxin in maize. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 10, 423-440.

- Price R.L. and Jorgensen K.V. 1985. Effects of Processing on Aflatoxin Levels and on Mutagenic Potential of Tortilla made from Naturally Contaminated Corn. *Journal of Food Science*. 50:347-349.
- Purche, I.F.H., Steyn M., Rinsma R. and Tustin R.C. 1972. Reduction of Aflatoxin M Content of Milk by Processing. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 10, 383-387.
- Roebuck, B.D. and Maxuitenko, Y.Y. 1994. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. Chap.2, en: *The toxicology of aflatoxins*, D.L. Eaton y J.D. Groopman (Eds). Academic Press, San Diego, pp 27-41.
- Samarajeewa, U. , Sen, A.C., Cohen, M.D. and Wei, C.I. 1990. Destoxification of Aflatoxins in Food and Feeds by Physical and Chemical Methods. *Journal of Food Protection*. 53:489-501.
- Smith E.E., Phillips T.D., Ellis J.A., Harvey R.B., Kubena L.F., Thompson J., and Newton G. 1994; Dietary Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate Reduction of Aflatoxin M₁ Residue in Dairy Goat Milk aand Effects on Milk Production and Components. *Journal of Animal Science*. 72: 677-682.
- Statistical Analysis System (SAS). 1989. SAS user's guide. Release 6.12. SAS Institute Inc. Cary, NC 27513, USA.
- Stoloff L., Trucksess M., Harding N., Francis O.J., Hayes J.R., Polan C.E. and Campell T.C. 1975. Stability of Aflatoxin M in Milk. *Journal of Dairy Science*. 58:1789-1793.
- Torres, F., Moreno, E., Chong, I. y Quintaila, J. 1996. La industria de la masa y la tortilla : Desarrollo y tecnología. UNAM. 139-146.

- Ulloa – Sosa M and Shoroeder H.W. 1969. Note on Aflatoxin Descomposition in the Process of Making Tortillas from Corn. *Cereal Chemistry*. 46:397- 400.
- Van Egmond H.P. 1994. Aflatoxin in Milk. In: *The Toxicology of Aflatoxins*. D.L. Eaton and J.D. Groopman (Eds) Academic Press. San Diego. Chap. 17:365-380.
- Wilson, D. PM. and Payne, G.A.1994. Factors affecting *Aspergillus Flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. Chap. 14, en *The toxicology of aflatoxins*. D.L. Eaton y J.D. Groopman (Eds) Academic Press, San Diego, pp 309-322.
- Yousef A.E. and Marth E.H. 1989. Stability and Degradation of Aflatoxin M₁. En: *Mycotoxins in Diary Products*. H.P. Van Egmond (Ed) Elsevier Applied Science. London. pp:127-161