

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO



ELIMINACION DE AFLATOXINA M₁ (AFM₁) EN LECHE LIQUIDA
MEDIANTE *Streptococcus spp.* INMOVILIZADO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

YOLANDA CABRERA RODRIGUEZ

DIRIGIDA POR

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERETARO, MEXICO
2000

CALIFICACION DE LA TESIS
Y ASESORIO DEL OTORGADOR

No. Acta 463378
No. Título TS
Clas. 637-1277
C117a



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

**ELIMINACION DE AFLATOXINA M₁ (AFM₁) EN
LECHE LIQUIDA MEDIANTE *Streptococcus spp.*
INMOVILIZADO**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el titulo de

QUIMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

YOLANDA CABRERA RODRÍGUEZ

Dirigida por :

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODALES

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA
Presidente

DR. DANIEL DE ALBA GONZALEZ
Propietario

M. en C. JORGE ALVAREZ DOMINGUEZ
Propietario

Q. en A. RAFAEL PEREZ MUÑOZ
Vocal




Firma



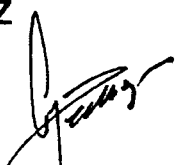
Firma



Firma



Firma



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

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica del Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (U.A.Q.), bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.

*"La diferencia entre lo ordinario y lo extraordinario
es un pequeño esfuerzo"*

Señor Gracias por permitirme llegar hasta aquí, por haberme permitido recorrer este camino, que bueno o malo me ha permitido ser lo que soy. Gracias, porque todas estas experiencias que he tenido para finalmente lograr esto han sido en provecho mío y me han permitido madurar y valorarte. Gracias por estar conmigo siempre...

Leonardo y Yolanda, gracias por darme siempre lo mejor, por esforzarse porque tanto mis hermanos como yo tuviéramos siempre lo que necesitábamos: esto es el fruto de tanto esfuerzo, y tan solo es el principio de todo lo que yo les agradezco...

Alejandra y Juan Leonardo, gracias por comprenderme en mis ratos de tensión y de desesperación, ya ven que al final todo esfuerzo es recompensado, ahora ANIMO!!!, porque siguen ustedes y ahora me tocará a mí estar ahí para apoyarlos. Los quiero mucho...

Abuelita, (Mamá Colo), gracias por TODO, tú sabes que junto con mis papás eres la persona que más quiero y a la que más agradecida estoy, este trabajo creo que te pertenece a TI más que a nadie, porque sin tu apoyo no hubiera podido salir adelante. Te quiero muchísimo.

Arisbe, gracias por tu amistad, por tus consejos; por tu compañía, por tus silencios, por todo lo que hemos pasado juntas, gracias por enseñarme a ver otro punto de vista acerca de la vida...

Jheny, gracias por el enorme don de ser tan oportuna, por siempre estar ahí en los peores momentos, por siempre tener una palabra de aliento...

Luz Ma. , Adrianita, gracias por brindarme su amistad desde que llegué al Posgrado, por las noches bohemias; por los buenos momentos que compartimos juntas. Chio (hija), Lulú (sobrina), gracias porque sin su apoyo y ayuda este trabajo no se hubiera concluido a tiempo... Chagua y Liliana, gracias por el apoyo moral, porque aunque no estuvieron físicamente conmigo, yo sé que siempre podré contar con ustedes (y ustedes conmigo)...

Dra. Chacha, gracias por la confianza depositada en mí, para la realización de este trabajo; pero sobre todo por sus consejos.

Dr. Daniel de Alba, M. en C. Jorge Alvarez y Q. en A. Rafael Pérez Muñoz, gracias por el tiempo que invirtieron en la corrección y por sus valiosas aportaciones al presente trabajo.

M. en C. Luz Ma. Avilés Arellano, gracias por su colaboración en la estandarización de las técnicas de extracción de AFM₁ e inmovilización utilizadas en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	v
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	5
A. MICOTOXINAS	5
B. AFLATOXINAS	8
1. GENERALIDADES	8
2. TOXICIDAD	9
3. AFLATOXINA M ₁	11
a. Transformación	11
b. Toxicidad	12
c. Estabilidad en alimentos	12
d. Regulación	13
C. LECHE	13
1. DEFINICION	13
2. COMPOSICION	14
3. LA LECHE EN MÉXICO	15
D. DESTOXIFICACION DE AFLATOXINAS	19
1. DEFINICION	19
2. CARACTERISTICAS DE UN SISTEMA	19
3. TRATAMIENTOS DE DESTOXIFICACION	19
a. Tratamientos Físicos	19
b. Tratamientos Químicos	20
c. Tratamientos Biológicos	21

E. INMOBILIZACION DE MICROORGANISMOS	21
1. GENERALIDADES	21
2. ALGINATO DE SODIO	22
IV. OBJETIVOS	23
A. OBJETIVO GENERAL	23
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
V. MATERIALES Y METODOS	24
A. MATERIALES	
1. MATERIAL QUIMICO	24
2. MATERIAL BIOLÓGICO	24
B. METODOS	
1. CURVA DE CALIBRACION	24
a. Curva de AFM ₁ en Metanol	25
2. INCIDENCIA DE AFM ₁ EN LECHE PASTEURIZADA PREFERENTE CONSUMIDA EN QUERETARO Y AGUASCALIENTES	25
a. Muestreo de Leche Pasteurizada Preferente	25
b. Extracción y cuantificación de AFM ₁	25
3. CULTIVO DE LA BACTERIA LACTICA <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (CESb)	26
a. Optimización de CESb	26
b. Cuenta bacteriana de las colonias de CESb	26
4. INMOBILIZACIÓN DE CESb EN ESFERAS DE ALGINATO	27
a. Propagación de Cultivo	27
a.1 Cultivos de 48 hrs.	27
a.2 Cultivos de 72 hrs.	27
b. Inmovilización del microorganismo	27

5. ELIMINACION DE AFM ₁ EN LECHE NATURAL Y ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA POR CESb INMOBILIZADA	28
a. Empaquetamiento de columna	28
b. Eliminación de AFM ₁	28
c. Reutilización de la columna	29
6. ANALISIS ESTADISTICO	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
1. CURVA DE CALIBRACION	30
a. Curva de Calibración de AFM ₁ en Metanol	30
2. INCIDENCIA DE AFM ₁ EN LECHE PASTEURIZADA	30
3. ELIMINACION DE AFM ₁ EN LECHE NATURAL Y ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA POR CESb INMOBILIZADA	38
VII. CONCLUSIONES	46
IX. BIBLIOGRAFIA	47

LISTA DE FIGURAS

FIG.		Página
1	Estructura Química de algunas Micotoxinas	6
2	Rutas de biotransformación de AFB ₁	10
3	México: Importaciones de Productos Lácteos en los últimos 6 años	17
4	Usos de la Producción Industrial de Leche en México	18
5	Curva de Calibración de AFM ₁ en Metanol	31
6	Comportamiento de la Concentración de AFM ₁ en leche pasteurizada a través del año	37

LISTA DE TABLAS

No.		Página
1	Principales géneros de hongos productores de micotoxinas	7
2	Composición promedio de la leche	14
3	Composición de la leche: Principales razas bovinas productoras	15
4	Concentración de AFM ₁ en leche pasteurizada durante el periodo de Invierno (1998)	32
5	Concentración de AFM ₁ en leche pasteurizada durante el periodo de Primavera (1998)	33
6	Concentración de AFM ₁ en leche pasteurizada durante el periodo de Verano (1998)	34
7	Concentración de AFM ₁ en leche pasteurizada durante el periodo de Otoño (1998)	35
8	Eliminación de AFM ₁ en leche natural e intencionalmente contaminada por cultivo de 48 horas y 24 horas de inmovilización	38
9	Eliminación de AFM ₁ en leche natural e intencionalmente contaminada por cultivo de 48 horas y 1 semana de inmovilización	39

No.		Página
10	Eliminación de AFM ₁ en leche natural e intencionalmente contaminada por cultivo de 72 horas y 24 horas de inmovilización	40
11	Eliminación de AFM ₁ en leche natural e intencionalmente contaminada por cultivo de 72 horas y 1 semana de inmovilización	41
12	Eliminación de AFM ₁ en leche natural e intencionalmente contaminada con 5 ng/ml mediante esferas de alginato	43
13	Eliminación de AFM ₁ en leche natural e intencionalmente contaminada con 25 ng/ml mediante esferas de alginato	43
14	Eliminación de AFM ₁ utilizando diferentes solventes	45

I. RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos secundarios, producidos por *Aspergillus. flavus* y *Aspergillus. parasiticus*, que se pueden encontrar contaminando una gran variedad de alimentos como: granos, carne, huevo, leche y derivados. Son compuestos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos que requieren de activación metabólica para ejercer este efecto nocivo en los organismos que los ingieren. La aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito hidroxilado de la biotransformación de la aflatoxina B₁ (AFB₁), es más polar e hidrosoluble que ésta, por lo que puede ser excretado en la leche de animales en periodo de lactancia, siempre y cuando hayan ingerido en su dieta AFB₁.

La leche es considerada como un alimento con alto valor nutritivo y es uno de los principales alimentos consumidos a nivel mundial, especialmente por infantes y personas de la tercera edad, poblaciones consideradas como más sensibles; por lo que la presencia de AFM₁ en la leche representa un gran riesgo para la salud, lo que ha llevado a algunos países a establecer límites de tolerancia de ésta, aunque en nuestro país no ha sido regulada su presencia. Además, existen pocos datos de la presencia de AFM₁ en leche consumida en México, por lo que se planteó realizar un muestreo de la leche preferente pasteurizada consumida en los estados de Aguascalientes y Querétaro para conocer el comportamiento de la aflatoxina durante un año de manera estacional.

Por otro lado, debido a las grandes pérdidas económicas que representa la presencia de aflatoxina en los alimentos, donde el gasto económico que representa la pérdida de cosechas hasta la toxicidad que provocan en los organismos que las ingieren incluyendo al humano, se han planteado varios métodos para su eliminación de los cuales los métodos biológicos en la descontaminación de aflatoxinas han empezado a ser prometedores.

Avilés (1998) demostró que una cepa de *Streptococcus spp.* (CESb) inmovilizado en esferas de alginato de sodio, eliminaba la presencia de AFM₁ tanto de leche natural

como artificialmente contaminada; es por esto que el objetivo de este trabajo fue probar la edad del cultivo en cuanto su eficiencia de eliminar la AFM₁ en leche natural e intencionalmente contaminada. Resultando el cultivo de 72 horas e inmovilizado por 24 horas el que tuvo un atrapamiento o eliminación de la AFM₁ más constante (aproximadamente del 50 %) sin importar el tiempo de empaquetamiento. También se demostró que las simples esferas de alginato de sodio empacadas en una columna fueron capaces de atrapar la AFM₁.

(Palabras clave: metabolito, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxina M₁, Aflatoxina B₁, biotransformación, *Streptococcus* spp)

II. INTRODUCCION

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos géneros de hongos; dentro de éste grupo se encuentran las aflatoxinas, importantes debido al impacto que tienen en la salud humana; producidas por el género *Aspergillus*, específicamente por las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Las aflatoxinas pueden estar presentes en una gran variedad de alimentos tales como granos, cereales, leche, frutas e incluso en productos cárnicos, y se han hecho estudios en los que se ha comprobado que éstas son altamente mutagénicas y carcinogénicas (Hsieh,1985).

La aflatoxina B₁ (AFB₁) es la toxina con mayor potencial toxigénico, sin embargo, requiere de activación metabólica para ejercer su actividad biológica y para ser excretada debe sufrir una serie de transformaciones en el organismo. La aflatoxina M₁ (AFM₁) es el metabolito hidroxilado de la AFB₁, de naturaleza más polar que su parenta, y puede ser excretado a través de la leche y de la orina principalmente, cuando se ha ingerido alimentos contaminados con AFB₁ (Saad y col.,1995; Edrington y col., 1996).

La leche es considerada un alimento de excelencia, e indispensable en la dieta de niños, lactantes y personas de la tercera edad; así mismo, es materia prima en la elaboración de un gran número de productos de gran valor nutritivo y de gran demanda en el mundo debido a su composición, es decir, a la cantidad y calidad de las proteínas que contiene (Alais, 1988).

Se sabe que previniendo la contaminación de los alimentos por cepas de hongos toxigénicas (*A. flavus* y *A. parasiticus*) se puede disminuir el riesgo a la salud. Sin embargo, la mayoría de las veces esto no es posible, debido a las condiciones agronómicas y de almacenamiento que se presentan en cualquier parte del mundo. Por ello, se han estudiado algunos métodos, tales como físicos, químicos y biológicos, con

el propósito de llevar a los límites permisibles la presencia de aflatoxinas en los alimentos. De éstos, los menos estudiados y más prometedores parecen ser los métodos biológicos.

Dada la toxicidad de las aflatoxinas, la frecuencia con que se presentan, la diversidad de alimentos que contaminan, el riesgo que representan en la salud humana, han hecho que sea necesaria la eliminación o reducción de éstas en la cadena alimentaria, principalmente en alimentos que han tenido algún tipo de procesamiento y que son ingeridos directamente del envase, como es el caso de la leche pasteurizada.

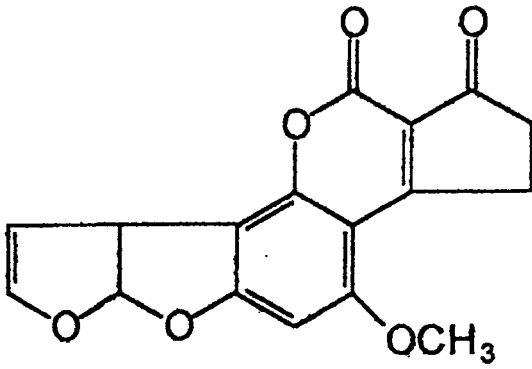
III. ANTECEDENTES

A. MICOTOXINAS

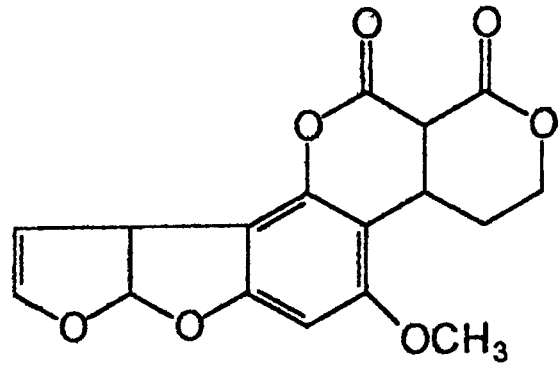
Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos los cuales pueden ejercer efectos tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos y oestrogénicos cuando son ingeridas. La contaminación de semillas y granos principalmente, se da en el campo, de ahí que a las micotoxinas se les considere compuestos tóxicos naturales (Smith y col., 1994).

Existen cinco géneros principales de hongos que crecen comúnmente durante el almacenamiento de granos y en una gran variedad de alimentos, produciendo diversos tipos de micotoxinas dependiendo de la especie (Tabla 1). En el laboratorio por ejemplo, de arroz inoculado con *Aspergillus parasiticus*, pueden sintetizarse cuatro tipos de aflatoxinas: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina B₂ (AFB₂) y aflatoxina G₂ (AFG₂) en 79%, 16%, 4% y 1% respectivamente (Harvey y col. 1991).

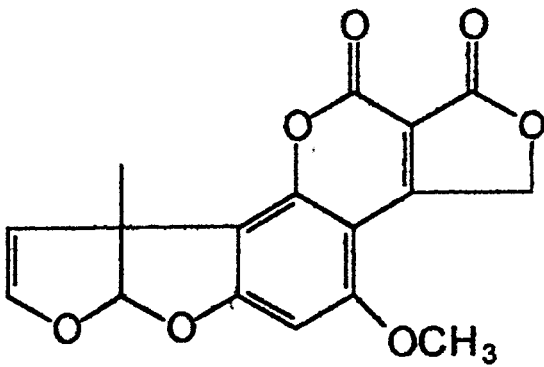
En general, las aflatoxinas presentan bajo peso molecular y son termorresistentes (Hsieh, 1989a). Presentan diversas estructuras químicas formadas por anillos de 5 ó 6 carbonos que presentan dobles enlaces, además de grupos carbonilo e hidroxilo altamente reactivos (Figura 1) propiedad que les confiere la capacidad de reaccionar con un gran número de receptores incluyendo ADN, ARN, proteínas funcionales, constituyentes de la membrana, cofactores enzimáticos, tanto en animales como en el ser humano (Hsieh, 1989b). Además por estudios epidemiológicos se les ha asociado con diferentes tipos de cáncer tales como hepático, renal, esofágico y cervicouterino (Hsieh y Atkinson, 1990; Chu, 1991; Honstead y Dreeser, 1992; ApSimon, 1994).



AFB₁



AFG₁



AFM₁

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNAS MICOTOXINAS

(Hsieh, 1989ab)

TABLA 1. PRINCIPALES GENEROS DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS.

HONGO	TIPO DE TOXINA
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina B ₁ Aflatoxina G ₁ Aflatoxina M ₁ Ocratoxina A
<i>Fusarium</i>	Deoxinivalenol Nivalenol Zearalenona Aflatoxina T-2
<i>Penicillium</i>	Patulina Citrinina Ac. Ciclopiazónico
<i>Alternaria</i>	Ac. Tenuazónico Alternariol Alternariol metil-eter
<i>Claviceps</i>	Alcaloides (ergotamina)

(Hsieh, 1989a)

B. AFLATOXINAS

1. GENERALIDADES

En general, las aflatoxinas son termorresistentes y altamente solubles en solventes polares, no así en agua, lo que les confiere resistencia a la degradación, bajo condiciones normales de procesamiento de los alimentos. tales como la cocción, el freído y la pasteurización (Samarajeewa y col., 1990; Carvajal y Arroyo, 1995).

La AFB₁ es considerada como la micotoxina más potente debido a su propiedad carcinogénica tanto en especies de animales, como en el humano (Hanigan y Laishes, 1984). A pesar de que desde los años 60's se conoció el potencial carcinógeno de las aflatoxinas, especialmente de la AFB₁; no fue sino hasta 1987 cuando la Agencia Internacional de Estudios de Cáncer (IARC) reconoce oficialmente su potencial carcinogénico (Hsieh, 1989a; Hsieh y Atkinson, 1990).

Se conocen alrededor de 18 diferentes tipos de aflatoxinas; de donde la AFB₁, la AFG₁ y la AFM₁ se encuentran contaminando frecuentemente alimentos para consumo humano (Ellis y col., 1991).

Las aflatoxinas son fluorescentes al exponerlas a la luz ultravioleta (UV) de onda larga. La separación cromatográfica de éstas está basada precisamente en sus propiedades fluorescentes. Químicamente, las aflatoxinas corresponden a las bishidro furano cumarinas, dicha estructura, es la que les confiere a las aflatoxinas sus propiedades carcinogénicas (Hsieh y Atkinson, 1990; Carvajal y Arroyo, 1995).

La producción de los distintos tipos de aflatoxinas depende de la especie del hongo, del tipo de cepa, del balance de nutrientes en el medio y de las condiciones de almacenamiento. Se ha informado que pH bajos y la presencia de trazas de metales como Mn²⁺, Mg²⁺ y Va²⁺ favorecen la formación de las aflatoxinas hidroxiladas como lo son la AFM₁ y la aflatoxina M₂ (AFM₂) (Carvajal y Arroyo, 1995).

2. TOXICIDAD

Las aflatoxinas pueden ingresar al organismo a través de la ingestión de alimentos y bebidas, ser absorbidas en el tracto digestivo y rápidamente metabolizadas por éste, principalmente en hígado. Por medio de la biotransformación, estas sustancias pueden modificarse y dar origen a distintos metabolitos, los cuales pasan a torrente sanguíneo, para ser posteriormente excretados a través de orina, bilis, heces, sudor, vómito, leche (Trimbell, 1991).

La AFB₁, tiene varias rutas de biotransformación, y por tanto, una serie de metabolitos directamente relacionados con su toxicidad y su carcinogenicidad (Figura 2); dentro de éstos se encuentra presente la AFM₁ como el primer metabolito hidroxilado de la AFB₁ (Samarajeewa y col, 1990; Van Egmon, 1994; Goodman, 1994).

Cuando el maíz o la leche se encuentran contaminados con aflatoxinas y son utilizados como materia prima para alimentos balanceados, se ha visto que los animales que ingieren dicho alimento presentan una disminución en la ganancia de peso, daño en el hígado, así como una inmunosupresión e incluso la muerte, dependiendo de la dosis ingerida (Honstead y Dreesen, 1992).

La molécula de AFB₁ es un procarcinógeno que requiere de activación metabólica para dar el 8,9-AFB₁ epóxido, metabolito que puede unirse a ADN, ARN y a otras moléculas proteicas (Hsieh y Atkinson, 1990).

De acuerdo a estudios de las características fisicoquímicas y bioquímicas de la AFB₁, se han descubierto dos importantes sitios responsables de que se lleve a cabo su actividad toxicológica; el primer sitio es un doble enlace en la posición 8,9 del anillo furo-furano, sitio donde se llevan a cabo las interacciones entre la aflatoxina, ADN y proteínas (Samarajeewa y col., 1990), ocasionando con ello una serie de cambios bioquímicos en el funcionamiento de estas macromoléculas, y por ende alteraciones a nivel celular. El segundo sitio reactivo es el anillo de lactona que conforma la estructura

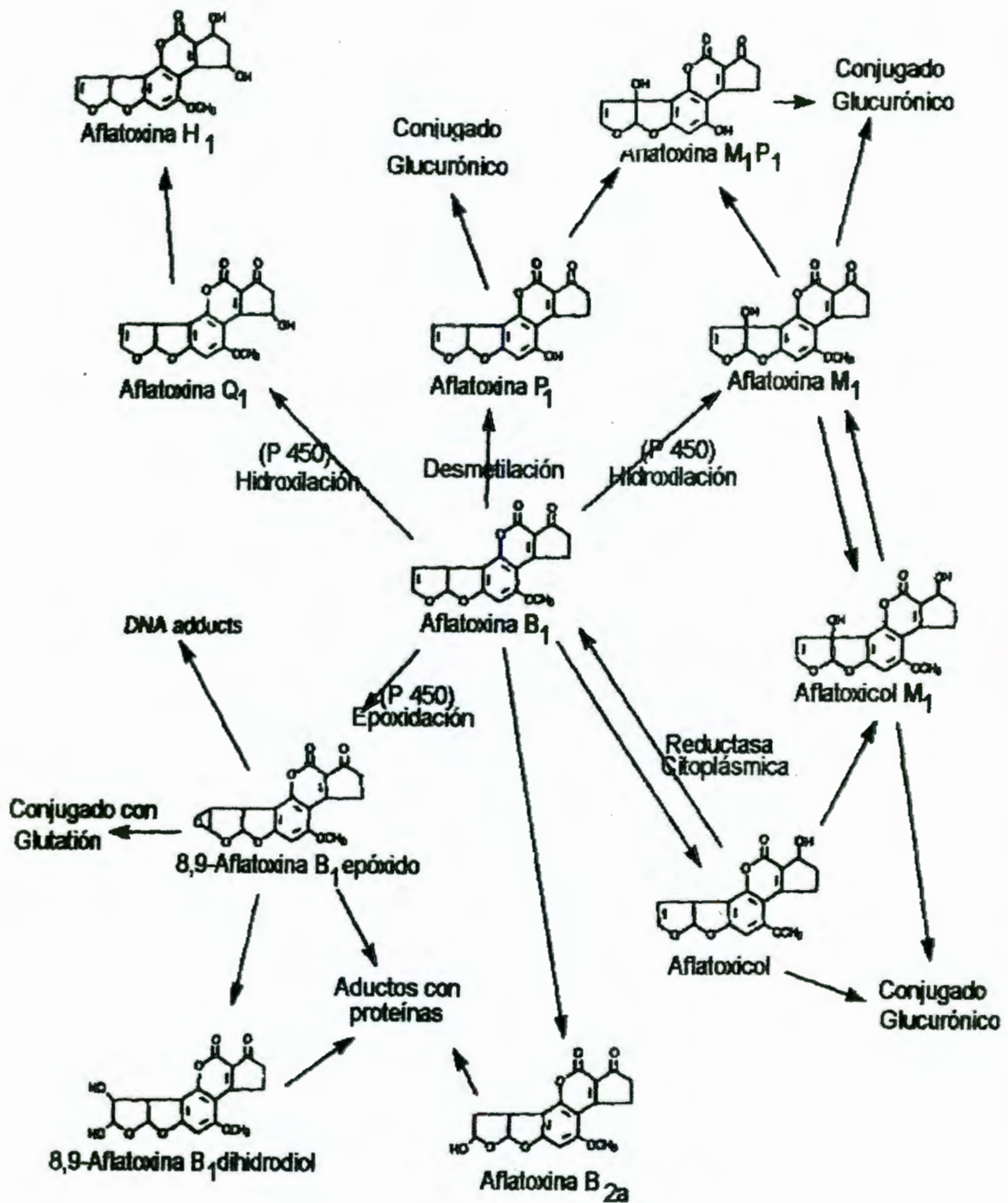


FIGURA 2. RUTAS DE BIOTRANSFORMACION DE AFB₁

cumarínica: la lactona es fácilmente hidrolizada, y esto la hace un sitio vulnerable a la degradación, perdiendo su capacidad de fluorescer bajo la luz UV (Samarajeewa y col, 1990).

El grado de toxicidad de las aflatoxinas en orden descendente es:



La AFB_1 es la más tóxica, y se le considera la precursora de otros tipos de aflatoxinas. Los metabolitos resultantes de la biotransformación se tienen por la presencia o ausencia de grupos sustituyentes o enlaces en el anillo de la ciclopentona de la AFB_1 ; modificándose así mismo su toxicidad, la cual tiende a disminuir (Samarajeewa y col, 1990; Carvajal y Arroyo, 1995; Scott, 1978).

3. AFLATOXINA M_1

a. Transformación

Esta aflatoxina es un contaminante que puede encontrarse durante el periodo de lactancia tanto en la leche humana como en la de los animales, cuando se han ingerido alimentos contaminados con AFB_1 (Zarba y col., 1992; Díaz y col., 1995).

Se ha estudiado además en ganado lechero, el efecto de las aflatoxinas en la motilidad del rumen, y se ha observado que este movimiento es dependiente de la dosis y que influye directamente sobre la amplitud y frecuencia del mismo (Honstead y Dreesen, 1992). Se ha observado que la AFM_1 se encuentra presente en el rumen del animal 2 horas después de la administración de AFB_1 vía oral, lo que sugiere que en el rumen se lleva a cabo el metabolismo de AFB_1 a AFM_1 . Además, tanto la AFB_1 como la AFM_1 pueden ser detectadas en sangre 30 minutos después de administrada la dosis de AFB_1 , lo que hace suponer que las toxinas son absorbidas en el rumen, por lo que atraviesan la mucosa rumial. Sin embargo, Honstead y Dreesen (1992) informaron, que no existía ningún efecto en la concentración de AFB_1 al ser incubada ésta con fluido

rumial intacto.

La biotransformación de AFB₁ a AFM₁ es dependiente de la concentración de la primera (Hsieh y Wong, 1994). Se ha informado que condiciones bajas de pH y presencia de metales traza como Mn²⁺, Mg²⁺ y Va²⁺, favorecen la formación de AFM₁ y AFM₂ (Carvajal y Arroyo, 1995). La AFM₁, también puede ser sintetizada por algunas cepas toxigénicas de *Aspergillus* y por tanto encontrarse en maíz (Hsieh y col., 1986).

b. Toxicidad

La AFM₁ es un metabolito hidroxilado que contiene un doble enlace en el vinil éter del anillo furo-furano, lo que la hace susceptible a una epoxidación y por lo tanto a formar especies mutagénicas (Hsieh y Atkinson, 1990).

Varios estudios se han llevado a cabo con el fin de observar los efectos tóxicos de la AFM₁ en animales de laboratorio. Se tienen algunos estudios realizados en patos, en donde se ha observado que esta aflatoxina causa lesiones en hígado similares a las de su paretal, así como necrosis en los túbulos del riñón (Van Egmon, 1994; Hsieh y Wong, 1994).

c. Estabilidad en alimentos

Se han realizado algunos estudios para conocer el efecto de algunos procesos en la leche sobre la concentración de AFM₁, tales como la pasteurización, esterilización, elaboración de yoghurt y queso, los que sugieren que el contenido de aflatoxina no se ve afectado por los tratamientos térmicos, es decir, que la aflatoxina presenta termoresistencia ante cualquier tratamiento que involucre calor, resistencia que puede deberse en cierta medida a que forma aductos con proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros, dándole mayor estabilidad a su estructura. Mientras que en la elaboración de queso madurado, la concentración de AFM₁ es de casi 4 veces más que la leche a partir de la cual fue preparado, lo que sugiere que dicho proceso implica una concentración de la AFM₁ enlazada a la caseína (Van Egmon, 1983).

d. Regulación

Una investigación realizada en 1987 por la FAO (Food and Agriculture Organization) mostró que 56 países no tenían una legislación en micotoxinas, algunos de ellos tenían límites solo para AFB₁, o bien para el conjunto de micotoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂); mientras que el resto (12) presentaron un límite aceptable de AFB₁ en los alimentos balanceados (10µg/kg) (Van Egmon, 1994).

A finales de 1991 en los países del Oeste de la Comunidad Europea (CE), establecen el límite para AFB₁ en alimentos balanceados a 5µg/kg, con el fin de tener una regulación más estricta para AFM₁ en leche (0.05 µg/L), en cambio en los Estados Unidos de Norteamérica, el límite permisible para AFM₁ en leche líquida es 0.5 µg/L de leche (Van Egmon, 1994; Saad y col., 1995; Trucksess M.W., 1996).

En nuestro país, la norma que rige el límite de AFM₁ en leche pasteurizada de vaca es la NOM 091 SSAI 1994, donde se establece que dicho límite no debe ser mayor de 0.05 µg/L. (Diario Oficial de la Federación)

C. LECHE

1. DEFINICIÓN

La leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias, de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad (Alais, 1988). Es considerado un sistema relativamente estable, debido a que todos sus constituyentes se encuentran en equilibrio formando tres estados físicos de dispersión: emulsión, suspensión y solución por lo que las modificaciones experimentadas en uno de ellos pueden influir sobre el estado del otro (Badui, 1981). Existe, por lo tanto un "estado de equilibrio" en la leche que puede romperse por diversas acciones, lo cual es un factor importante para tecnología lechera (Alais, 1988).

La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento; cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos; la gran complejidad de la leche corresponde precisamente a esta necesidad.

2. COMPOSICIÓN

En general la leche está compuesta por agua, proteínas, grasa, azúcares y minerales, además de otros constituyentes que se encuentran en menor concentración. La composición promedio de la leche se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2. COMPOSICION PROMEDIO DE LA LECHE

CONSTITUYENTES	PROMEDIO
AGUA	87.0 %
GRASA	4.0 %
CASEINA	2.8 %
ALBUMINA	0.5 %
LACTOSA	5.0 %
MINERALES	0.7 %

(Judkins, 1970)

La composición de la leche se ve influenciada directamente por varios factores, tales como: la raza de la vaca (Tabla 3), la alimentación proporcionada al animal, la estación del año; el periodo de lactancia, e incluso hay quienes consideran la hora de ordeño como un factor importante.

Dado que el mayor constituyente de la leche es agua, y debido a su estructura química, la AFM₁ es un metabolito hidrosoluble por lo que un medio acuoso favorece la presencia del tóxico en el alimento, además, el hecho de que la aflatoxina puede unirse

a proteínas como las de la leche, hace suponer que ésta pueda encontrarse unida no covalentemente a ellas, creándose mayor estabilidad y por lo tanto mayor resistencia a tratamientos térmicos y a la descontaminación.

TABLA 3. COMPOSICION DE LA LECHE: PRINCIPALES RAZAS BOVINAS PRODUCTORAS

RAZA	AGUA %	PROTEINAS %	GRASA %	LACTOSA %	CENIZAS Y OTRAS
AYSHIRE	87.11	3.28	4.03	4.91	0.67
P. SUIZA	86.79	3.51	3.95	5.01	0.74
GUERNESEY	85.76	3.66	4.91	4.95	0.72
HOLSTEIN	87.93	3.08	3.53	4.78	0.68
JERSEY	84.96	3.88	5.43	4.99	0.74°

(Claridades Agropecuarias, 1996)

3. LA LECHE EN MÉXICO

En México el sector lechero juega un papel importante dentro de la economía del país, junto con la industria procesadora de productos lácteos aporta el 1.3% del Producto Interno Bruto (PIB), generando con esto 15 millones de empleos. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un importante déficit en la producción de leche, el cual ha tenido que ser cubierto con importaciones equivalentes a 35% del consumo, situando a nuestro país como el principal importador en el mercado internacional. (Claridades Agropecuarias, 1996).

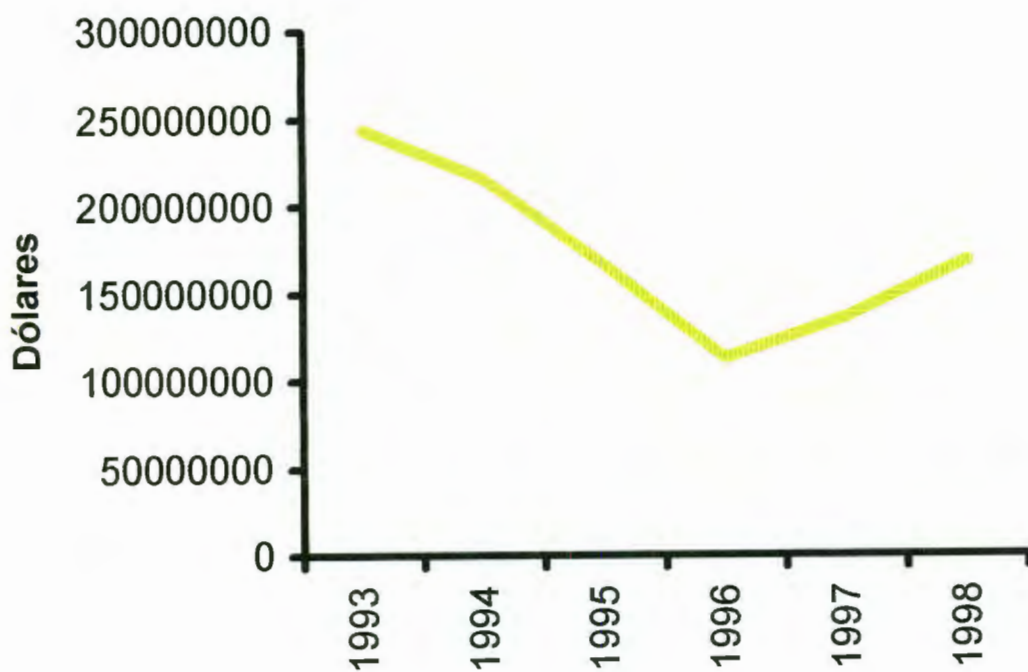
Antes del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), nuestras exportaciones de productos lecheros tales como yoghurt, lactosuero, mantequilla, queso fresco, requesón, leche y crema a Estados Unidos no rebasaban el millón de dólares por año: en 1993, la exportación fue de 593 mil dólares. El primer año del TLCAN, 1994, las ventas fueron de 1.3 millones de dólares y han crecido año con año

hasta casi 8 millones en 1998. Para 1999, se estima que las exportaciones serán de alrededor de 9 millones de dólares. Por el lado de las importaciones, se aprecia desde la entrada en vigor del TLCAN una disminución notable en las compras mexicanas de yogurth, grasa butírica, helados, queso de pasta blanda y las leches fluidas. En la Figura 3 se muestra las importaciones de productos lácteos hechas por nuestro país en los últimos 6 años (Lacticinios, 1999).

La industria lechera mexicana compite en el propio mercado nacional con los productos importados de Estados Unidos, por ello nuestras empresas han emprendido grandes esfuerzos para enfrentar a los productos estadounidenses, cuatro años de funcionamiento del TLCAN, sólo muestran resultados parciales (Lacticinios, 1999).

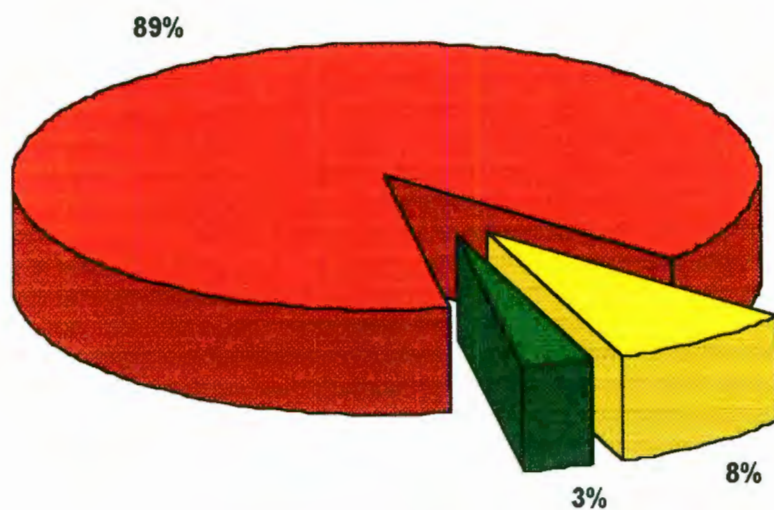
La leche se considera como uno de los alimentos de alto valor nutricional, dado su contenido de azúcares, minerales y la calidad de sus proteínas, no sin antes recordar que es uno de los principales productos alimenticios consumidos a nivel mundial, principalmente por los niños y ancianos. En México, el consumo principal se realiza en forma de leche fluída, quedando en término complementario las presentaciones en polvo, evaporada, condensada y sueros; y derivados lácteos tales como queso, yoghurt, crema, nata, etc. (Claridades Agropecuarias, 1996). La industrialización de la leche fluída en nuestro país, se muestra en la Figura 4.

En nuestro país, las principales cuencas lecheras se encuentran localizadas en zonas templadas y áridas, tales como las localizadas en el estado de Jalisco en la región de los Altos, la Laguna en Durango y Coahuila; Aguascalientes y San Luis Potosí; Delicias y Ciudad Juárez en Chihuahua; Mexicali y Tijuana en Baja California; Guanajuato y Querétaro; Valle de México e Hidalgo (Claridades Agropecuarias, 1996).



(Lacticios, 1999)

FIGURA 3. MÉXICO: IMPORTACIONES DE PRODUCTOS LÁCTEOS EN LOS ÚLTIMOS 6 AÑOS.



- Leche fluida
- Leche en polvo, condensada y evaporada
- Derivados de leche

(Claridades Agropecuarias, 1996)

FIGURA 4. USOS DE LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE LECHE EN MEXICO.

D. DESTOXIFICACION DE AFLATOXINAS

1. DEFINICION

Destoxificación es el método usado para la eliminación, destrucción o inactivación total de un tóxico en un alimento, ya sea mediante el uso de métodos físicos, químicos o biológicos (Ellis y col. 1991).

2. CARACTERISTICAS DE UN SISTEMA

Se dice que para que un sistema de destoxificación sea exitoso, debe satisfacer ciertos criterios importantes tales como:

- a. Ser económico, para que los productos sometidos a destoxificación puedan seguir teniendo precio competitivo y aceptable.
- b. Ser relativamente simple, es decir, que no requiera demasiado tiempo para lograr su objetivo.
- c. Ser capaz de eliminar todas las trazas de la toxina activa, y que los residuos formados en el producto final no constituyan un riesgo a la salud.
- d. Mantener la calidad nutricional del alimento.

(Ellis y col., 1991)

3. TRATAMIENTOS DE DESTOXIFICACIÓN

a. Tratamientos Físicos

Después de que las aflatoxinas absorben energía y llegan a un estado de mayor excitación, pueden sufrir transformaciones que minimicen o neutralicen su efecto tóxico. La energía usada en los tratamientos físicos de descontaminación puede ser dada en la forma de calor, radiación gamma, radiación ultravioleta (UV) o bien por luz visible. La sensibilidad de las aflatoxinas a los diferentes tipos de energía se ve influenciada por la concentración de radiaciones, el tiempo de exposición, así como, los enlaces o asociaciones entre la toxina y los constituyentes del alimento (Samarajeewa y col, 1990).

También se han empleado otro tipo de tratamientos físicos como la filtración y diafiltración en la destoxificación de AFB₁. Se sabe que la ultrafiltración es usada en plantas que destinan la leche a la elaboración de cierto tipo de quesos como: Cheddar, Cottage, Havarti, Feta, Brick, Colby y Domiati, por lo que este método está limitado a un cierto grupo de productos, que no son consumidos por la población infantil (Higuera y col., 1995).

b. Tratamientos Químicos

La utilización de agentes químicos es actualmente la práctica más usada para descontaminar especialmente alimentos balanceados y cuyo objetivo es eliminar o reducir el contenido inicial de AFB₁, tomando como medición indirecta de la eliminación de ésta, la cantidad de AFB₁ arrojada por el organismo, ya sea en leche o bien por orina. Dentro de los métodos químicos recomendados por Samarajeewa y col. (1990) se encuentran:

- i) La cloración, por diversos agentes tales como hipoclorito de sodio, dióxido de cloro y cloro gaseoso.
- ii) Agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, ozono y el bisulfito de sodio; agentes hidrolíticos como ácidos y álcalis.

Uno de los tratamientos químicos usados con mayor frecuencia, es el del aluminosilicato hidratado de sodio y calcio (HSCAS) administrado en el alimento para ganado lechero (Harvey y col., 1991), y para cabras lecheras (Smith y col., 1994). El uso del HSCAS ha conllevado a controversia, ya que por un lado se señala que no existen efectos adversos en cuanto a la ingesta del alimento y producción de leche (Trucksess, 1996); mientras que por otro lado aclaran que el HSCAS puede unirse a nutrientes esenciales en el tracto gastrointestinal ya que se ha visto, que altas concentraciones de este químico reducen la utilización de Zinc (Smith y col., 1994).

En otro estudio realizado por Maeba y col. (1988), se examinó la destoxificación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ con ozono (1.1 mg/l durante 5 minutos), confirmando su

posible reducción por cromatografía de capa fina (TLC) y por ensayo con embriones de pollo, en donde llegaron a la conclusión de que el ozono puede destoxificar aflatoxinas sin producir otro tipo de sustancias que sean tóxicas in vivo, aunque su aplicación aún debe de avalarse sobre todo en productos agrícolas ya que éstos son ingeridos por los animales y posteriormente llegan a nosotros debido al ciclo de la cadena alimenticia.

c. *Tratamientos Biológicos*

Ciegler y col. (1966), efectuaron un escrutinio de varios microorganismos potencialmente capaces de actuar contra la AFB₁, encontrando que *F. aurantiacum* la degradó y ello fue dependiente del tiempo de incubación. Cuando probaron al microorganismo en alimentos como leche, aceite vegetal y crema de cacahuate, obtuvieron que al cabo de tres horas sólo existían trazas de la AFB₁ agregada inicialmente. Años más tarde, Hao y Brackett (1988) confirmaron la capacidad de la *F. aurantiacum* para remover AFB₁ de una lechada de nuez no desgrasada, parcialmente desgrasada y en una solución de fosfatos, demostrando en esta ocasión que la AFB₁ interfiere con sobrevivencia del microorganismo, observando además que es dependiente del medio en el que se encontraba el tóxico. Karunaratne y col. (1990) estudiaron el comportamiento del *Aspergillus*, hongo productor de la toxina, en presencia de *Lactobacillus spp.*, e informaron que se presentaba una reducción en la producción de AFB₁ y AFG₁, así como en el peso del micelio, la cual no fue significativa. Avilés (1998), demostró que una cepa de *Streptococcus spp.* eliminaba la presencia de AFM₁ tanto de leche natural como artificialmente contaminada.

E. INMOVILIZACION DE MICROORGANISMOS

1. GENERALIDADES

Células de *S. cerevisiae*, de *K. marxianus*, inulasa, glucosa oxidasa, cloroplastos y mitocondrias han sido inmovilizados en geles de alginato de calcio con fines industriales para la producción de etanol cuando la *S. cerevisiae* ha sido inmovilizada (Kierstan y col., 1977).

2. ALGINATO DE SODIO

El alginato es un polisacárido de alto peso molecular que es aislado de algas marinas, está constituido por subunidades de ácido D-manurónico y L-gulurónico; componentes estructurales de las paredes celulares. El alginato de sodio y el alginato de propilenglicol son usados comúnmente como agentes espesantes en ciertos alimentos como helados y ciertas botanas; el alginato es también utilizado para impresión de materiales dentales, encapsulación de fármacos, materiales de curación y como componente de antiácidos (Waldman y col., 1998).

El ácido algínico y sus derivados están comercialmente disponibles en una gran variedad de presentaciones, las cuales tienen diferentes viscosidades y propiedades gelificantes. Los geles de alginato de calcio se forman rápidamente en condiciones templadas y proveen adecuados medios para inmovilizar células microbianas, organelos subcelulares y enzimas aisladas; en cuanto al alginato de sodio, éste presenta propiedades que son adecuadas para la exitosa inmovilización de cualquier material bioquímico activo a probar, debido a su enorme flexibilidad (Kierstan y col., 1977).

Con base a todos los antecedentes descritos, se plantearon los objetivos que a continuación se presentan.

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones óptimas de la eliminación de Aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche mediante *Streptococcus spp.* inmovilizado.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Cuantificar la presencia de AFM₁ en leche pasteurizada de dos marcas comerciales, en forma estacional.
2. Optimizar la eliminación de AFM₁ en leche natural e intencionalmente contaminada por el *Streptococcus spp.* inmovilizado en la columna variando la edad del cultivo.
3. Evaluar la dinámica de eliminación de AFM₁ en leche natural e intencionalmente contaminada en la columna empacada con *Streptococcus spp.*

V. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

1. MATERIAL QUIMICO.

Aflatoxina M₁ (AFM₁), alginato de Sodio y dimetil sulfóxido que fueron adquiridos a través de SIGMA Chemical Co.; Metanol, Acetonitrilo (Waters), Agua, Cloruro de Metileno grado HPLC. Acido acético, Hidróxido de amonio grado reactivo (AR), Cloruro de Calcio tetrahidratado grado reactivo. Cartuchos Sep-pak C₁₈ fueron adquiridos a través de Waters. Agar purificado y caldo de cultivo Manosa, Rogosa and Sharpe (M.R.S). adquiridos de Oxoid. La pureza de la AFM₁ se verificó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

2. MATERIAL BIOLÓGICO

Leche pasteurizada preferente marca "San Marcos" y "Querétaro".

Microorganismos lácticos: Cultivo de Streptococcus spp., denominado CESb, proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria en Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

B. METODOS

1. CURVA DE CALIBRACION

Para determinar la concentración de AFM₁, se realizó una curva de calibración a partir del compuesto puro obtenido en SIGMA. En la cuantificación de la aflatoxina, se empleó un HPLC Waters, equipado con dos bombas modelo 510, un inyector de 50µL de capacidad, una columna Waters C₁₈ fase reversa de 39 x 300 mm, un detector de fluorescencia modelo 410, y un software Millenium 2010. Utilizando como fase móvil ácido acético 0.0125N y acetonitrilo V/V (65%/35%), con un flujo de 1 ml/min en un programa isocrático.

a. Curva de AFM₁ en Metanol

Se prepararon 5 estándares de concentración: 3.9, 7.8, 15.6, 3.12 y 6.25 ng/ml de AFM₁ respectivamente, partiendo de una solución madre de 2 µg/ml de AFM₁, solución a la que se le verificó previamente su pureza. Se inyectó 4 veces cada concentración al HPLC aplicando un programa isocrático con las condiciones del punto 1.

2. INCIDENCIA DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA PREFERENTE CONSUMIDA EN QUERETARO Y AGUASCALIENTES.

a. Muestreo de Leche Pasteurizada Preferente

El muestreo de leche pasteurizada preferente "San Marcos" y leche "Querétaro", se llevó a cabo durante la mitad del tiempo de duración de cada estación en forma aleatoria. Se compró una muestra de cada una de ellas, buscando que coincidieran en la misma fecha de caducidad.

b. Extracción y cuantificación de AFM₁.

La extracción de AFM₁ en leche pasteurizada se realizó utilizando una modificación del método de extracción propuesto por Smith y Col. (1994). Brevemente: un cartucho Sep-pak se activó con 10 ml de acetonitrilo grado HPLC y con 10 ml de agua destilada; una alícuota de 30 ml de leche pasteurizada diluida con un volumen igual de agua (volumen total de 60 ml); se pasó por el cartucho a un flujo de 10 ml/min, desechando el líquido resultante. El cartucho que contenía la AFM₁ enlazada, se lavó con 10 ml de acetonitrilo básico al 10% (hidróxido de amonio:acetonitrilo:agua, 1:10:90) a una velocidad de flujo de 10 ml/min. El lavado se descartó. El cartucho se lavó por segunda ocasión con 10 ml de una solución de acetonitrilo ácido al 10% (ácido acético:acetonitrilo:agua, 1:10:90). El lavado se desechó. Cinco mililitros de acetonitrilo ácido al 30% (ácido acético:acetonitrilo:agua, 1:30:70) se adicionaron al cartucho y el líquido obtenido se colectó en un tubo de ensaye. La mitad del volumen del líquido obtenido se pasó a otro tubo de la misma capacidad y se le agregó a cada uno un volumen igual de cloruro de metileno. El tubo se agitó en un Vortex hasta homogeneizarlo y posteriormente se centrifugó para romper la emulsión, durante 4

minutos. La capa de cloruro de metileno se transfirió por medio de una pipeta Pasteur a un tubo limpio y el procedimiento de extracción se repitió dos veces más, usando 2 ml de cloruro de metileno la primera vez y 1 ml de cloruro de metileno la segunda vez. Los extractos se concentraron a un volumen menor o igual a 0.5 ml bajo una corriente suave de Nitrógeno y posteriormente se transfirieron a un vial (previamente lavado con metanol) en donde fueron completamente evaporados bajo nitrógeno y después reconstituidos en 1 ml de metanol grado HPLC y se almacenaron protegidos de la luz en congelación hasta su cuantificación por HPLC.

La concentración de AFM₁ en las muestras de leche fue determinada por el área del pico de cada cromatograma y comparada con los estándares de la curva de calibración de AFM₁.

3. CULTIVO DE LA BACTERIA LACTICA *Streptococcus spp.* (CESb)

a. Optimización de CESb

El cultivo de CESb se activó inoculándolo en tubos de ensaye con 5 ml de leche estéril, previamente preparados con 8 g de leche en polvo semidescremada disuelta en 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Esta solución se distribuyó en tubos de vidrio y se esterilizaron en autoclave por 10 minutos a 121°C, después de lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para inocularlos con 0.1 ml de CESb y se incubaron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Una vez desarrollado el microorganismo, se resembró en tubos de ensaye con 10 ml de caldo de cultivo Manosa, Rogosa y Sharpe (M.R.S.) marca Oxoid, a una relación del 10%. Esta transferencia se efectuó tres veces más cada 24 horas. El cultivo obtenido del cuarto día de resiembra, fue el inóculo completamente recuperado y listo para su uso en los ensayos biológicos de destoxificación de AFM₁.

b. Cuenta bacteriana de las colonias de CESb

Para conocer el inóculo necesario que diera aproximadamente 10^6 y 10^{10} unidades

formadoras de colonias (UFC) se siguió el método de Colins (1978): se tomó 1 ml del inóculo y se adicionó a un tubo de ensaye que contenía 9 ml de agua estéril (dilución 10^{-1}), a partir de esta solución se hicieron dos diluciones más (10^{-2} y 10^{-3}). Un mililitro de cada dilución se colocó en una caja Petri estéril, a la que se vertió aproximadamente 15 ml de agar MRS y se homogeneizó inmediatamente para posteriormente dejarlo solidificar; a continuación fueron incubadas a temperatura óptima por 48 hrs. Cada dilución se sembró por duplicado.

Al final de la incubación, se observó el tipo y el número de colonias y el ensayo de destoxificación de AFM_1 en leche se realizó de acuerdo a Line y Brackett (1995).

4. INMOVILIZACION DE CESb EN ESFERAS DE ALGINATO DE SODIO

a. Propagación de cultivo

Para llevar a cabo los ensayos de destoxificación de AFM_1 , el CESb fue propagado haciéndolo crecer en 10 ml. de caldo M.R.S. e incubándolo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

a.1 Cultivo de 48 horas

En 50 ml de caldo de cultivo M.R.S. estéril y tibio, se inocularon 5 ml de cultivo (CESb) propagado, se homogeneizaron con un Vortex y se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

a.2 Cultivo de 72 horas

Semejante al inciso a.1, solo que el cultivo se creció por 72 horas.

b. Inmovilización del microorganismo

El alginato de sodio al 2% y el cloruro de Calcio al 3.5%, se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121°C , dejando enfriar hasta temperatura ambiente.

En condiciones estériles (en una campana de flujo laminar), se hizo la mezcla del cultivo de CESb (paquete celular y sobrenadante) con el alginato de sodio, en una relación de un volumen de cultivo por cada dos de alginato; una vez homogeneizada la mezcla, con una bomba peristáltica a un flujo de 2 ml/min, ésta se goteó lentamente dentro de la solución de cloruro de calcio la cual se mantuvo en agitación constante y suave con ayuda de un agitador mecánico, para promover la formación de las esferas. Posteriormente las esferas se almacenaron en condiciones estériles y en refrigeración durante 24 horas; al término de este tiempo, las esferas se lavaron con PBS estéril de pH=6.4 por 3 ó 4 veces, posteriormente se dejaron en una nueva solución de PBS en el refrigerador hasta su posterior utilización.

5. ELIMINACION DE AFM₁ EN LECHE NATURAL Y ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA POR CESb INMOVILIZADA

a. Empaquetamiento de columna

En condiciones estériles, a una columna de 2.5 cm de diámetro se marcó una altura de 10 cm y las esferas se comenzaron a vaciar poco a poco dentro de ésta teniendo cuidado de no dejarlas secar para lo cual se ocupó una solución de PBS pH=6.4. Una vez empacada la columna, se comenzó a pasar leche con el objeto de eliminar el PBS de la columna, al mismo tiempo se estandarizó la velocidad de paso de la leche a través de la columna, para mantener un tiempo de paso constante durante todo el experimento de 12.45 minutos.

b. Eliminación de AFM₁

Tanto para leche natural como artificialmente contaminada (5 ng/ml), se pasó a través de la columna un volumen de leche pasteurizada (1 ml) y se continuó pasando leche hasta que se completó un volumen total de 10 ml de leche. A este volumen de 10 ml se le extrajo la AFM₁ residual por el método descrito en el inciso b del punto 2. Cabe mencionar que la leche se mantuvo en baño de hielo durante todo el experimento.

c. Reutilización de la columna

Con el propósito de sugerir este método biológico de destoxificación a la industria, se estudió el rehuso de la columna por lo que ésta se lavó con 100 ml de leche manteniendo el mismo flujo de 2 ml/min por medio de la bomba peristáltica, y al término de dicho lavado, se pasó otro mililitro de leche contaminada por la columna con la posterior adición de 9 ml de leche, para que del volumen final (10 ml). La extracción de AFM₁ residual se hizo como se indica en el inciso b del punto 2.

6. ANALISIS ESTADISTICO

Para conocer si el contenido de AFM₁ en leche pasteurizada preferente que se cuantificó en forma estacional tendría diferencia estadística significativa entre estaciones, se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando el método de comparación de medias de Tukey, para ello se empleó el programa Statistical Analysis System (SAS). Así mismo se realizó el ANOVA correspondiente de los datos obtenidos en los diferentes experimentos de eliminación de AFM₁ con la cepa CESb.

En cada uno de los experimentos, se realizó mínimo dos experimentos independientes por duplicado, obteniendo así al menos 4 puntos independientes y comparables.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CURVA DE CALIBRACION

a. Curva de AFM₁ en Metanol

En la figura 5 se muestra la curva de calibración para la AFM₁ en metanol, así como su coeficiente de correlación lineal ($R^2 = 0.9961$), el cual indica el grado de asociación entre las variables medidas y que toma un valor idóneo de 1, aunque en la práctica se toma como aceptable un valor mayor de 0.97 (Ostle, 1974). Esta curva se utilizó en la cuantificación de la toxina en leche pasteurizada, así como en las muestras de leche obtenidas después de su paso por la columna de esferas de alginato.

2. INCIDENCIA DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA PREFERENTE CONSUMIDA EN QUERETARO Y AGUASCALIENTES.

En un estudio previo realizado por Avilés (1998), se informó que indudablemente se tenía el problema de contaminación de AFM₁ en leche pasteurizada preferente consumida en nuestra entidad con respecto al límite de esta micotoxina establecido para la comunidad Europea de 0.05 µg de AFM₁/L y por lo tanto también el establecido en la NOM 091 SSAI 1994 que rige en nuestro país (Diario Oficial de la Federación). Sin embargo nunca se rebasó el establecido por los Estados Unidos de Norteamérica (USA) de 0.5 µg de AFM₁/L (Van Egmon, 1994; Sylos y col, 1996). Dado a que la presencia de esta micotoxina depende de si las vacas han consumido AFB₁ en su dieta y además se ha informado que la incidencia de AFB₁ en granos varía de región en región en un mismo país o diferentes países, por esto, se decidió hacer otro muestreo estacional durante un año, para observar si el problema persistía y si el comportamiento anteriormente encontrado permanecía constante; y comparar los resultados del muestreo de leche consumida en nuestra entidad con los reportados por Avilés (1998).

Por otro lado, debido a un proyecto Interinstitucional donde uno de los objetivos es estudiar la dinámica toxicológica de aflatoxinas en alimentos de origen animal en los estados de Aguascalientes y Querétaro se procedió a monitorear también leche

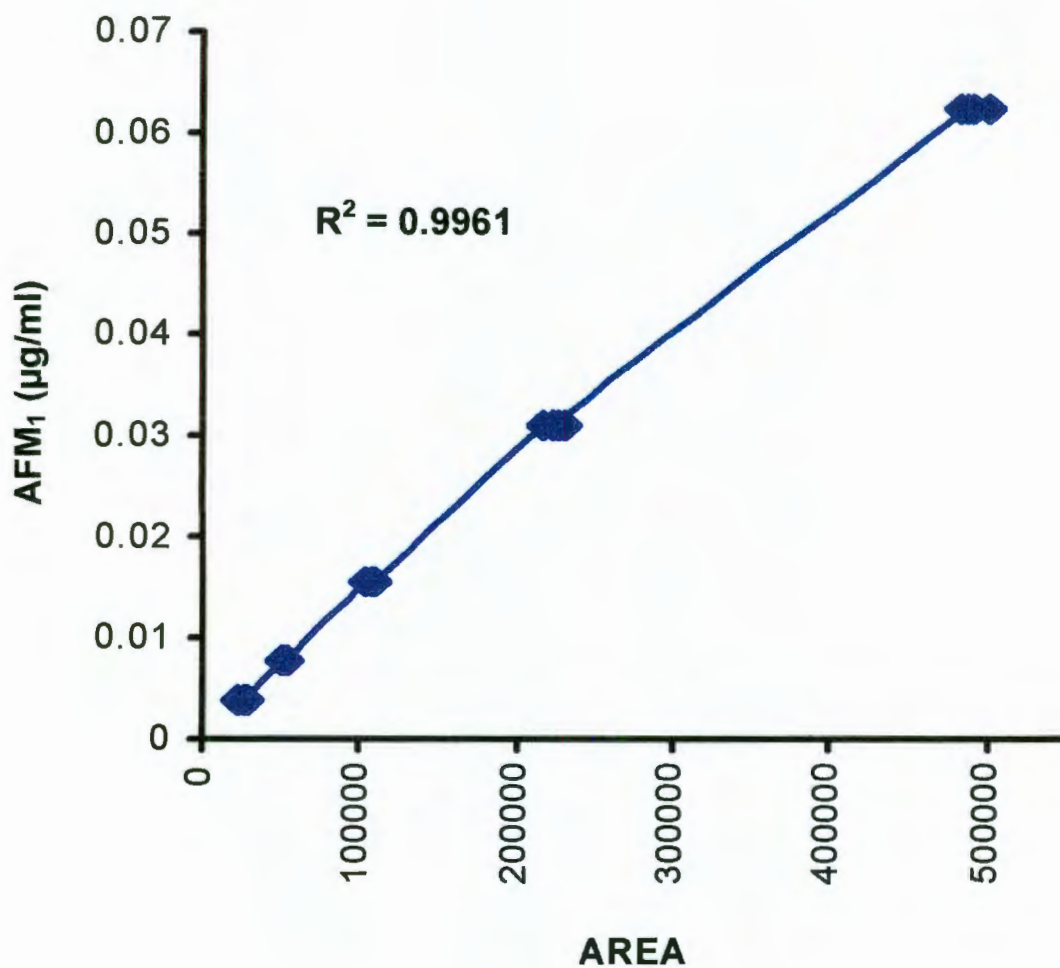


FIGURA 5. CURVA DE CALIBRACION DE AFM₁ EN METANOL.

El análisis se realizó por HPLC, utilizando una columna Nova Pak C₁₈ fase reversa en programa isocrático. Para mayor detalle ver Materiales y Métodos.

comercial producida en Aguascalientes y consumida en Querétaro.

En las tablas de la 4 a la 7, se muestran los resultados para cada estación, en el periodo comprendido entre Enero a Diciembre de 1998.

TABLA 4. CONCENTRACION DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA DURANTE EL PERIODO DE INVIERNO (1998)

MUESTRA ^a	AFM ₁ (µg/L)	MUESTRA ^b	AFM ₁ (µg/L)
1	0.236	1	ND
2	0.230	2	0.183
3	0.222	3	0.190
4	0.217	4	0.186
5	0.256	5	ND
6	0.248	6	0.203
7	0.229	7	0.205
8	0.190	8	0.198
9	0.202	9	0.180
10	0.199	10	0.191
11	0.211	11	0.188
12	0.178	12	0.167
13	0.203	13	0.181
14	0.225	14	0.179
15	0.219	15	0.169
16	0.179	16	0.168
17	0.251	17	0.199
18	0.264	18	0.225
19	0.249	19	0.208
20	0.251	20	0.201
21	0.258	21	0.208
22	0.228	22	0.176
23	ND	23	0.167
24	0.194	24	0.168

^a Leche pasteurizada preferente procesada en Aguascalientes

^b Leche pasteurizada preferente procesada en Querétaro

ND No detectable (por debajo del límite de detección de 0.005 µg/ml)

La extracción se llevó a cabo por el método modificado de Smith y col, 1994. Para mayor detalle ver Materiales y Métodos

TABLA 5. CONCENTRACION DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA DURANTE EL PERIODO DE PRIMAVERA (1998)

MUESTRA ^a	AFM ₁ (µg/L)	MUESTRA ^b	AFM ₁ (µg/L)
1	0.028	1	ND
2	0.084	2	0.050
3	0.073	3	0.061
4	0.035	4	0.065
5	0.085	5	0.063
6	0.082	6	ND
7	0.042	7	0.039
8	0.019	8	0.035
9	0.056	9	0.076
10	0.035	10	0.064
11	0.039	11	0.033
12	0.023	12	ND
13	0.059	13	0.061
14	0.056	14	0.033
15	0.037	15	0.058
16	0.032	16	0.023
17	0.076	17	0.038
18	0.030	18	0.033
19	0.047	19	0.039
20	0.027	20	0.033
21	0.039	21	0.036
22	0.034	22	0.016
23	0.029	23	ND
24	0.028	24	0.017

^a Leche pasteurizada preferente procesada en Aguascalientes

^b Leche pasteurizada preferente procesada en Querétaro

ND No detectable (por debajo del límite de detección de 0.005 µg/ml)

La extracción se llevó a cabo por el método modificado de Smith y col, 1994. Para mayor detalle ver Materiales y Métodos

TABLA 6. CONCENTRACION DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA DURANTE EL PERIODO DE VERANO (1998)

MUESTRA ^a	AFM ₁ (µg/L)	MUESTRA ^b	AFM ₁ (µg/L)
1	0.058	1	0.048
2	0.073	2	0.032
3	0.043	3	0.075
4	0.138	4	0.061
5	0.038	5	0.032
6	0.080	6	0.081
7	0.033	7	0.086
8	0.094	8	0.062
9	0.103	9	ND
10	0.048	10	0.044
11	0.086	11	0.054
12	0.295	12	0.029
13	0.221	13	0.070
14	0.148	14	0.049
15	0.060	15	0.071
16	0.154	16	ND
17	0.063	17	0.033
18	0.076	18	0.064
19	0.072	19	0.042
20	0.099	20	0.032
21	0.102	21	0.031
22	0.072	22	0.037
23	0.110	23	0.033
24	0.085	24	0.033

^a Leche pasteurizada preferente procesada en Aguascalientes

^b Leche pasteurizada preferente procesada en Querétaro

ND No detectable (por debajo del límite de detección de 0.005 µg/ml)

La extracción se llevó a cabo por el método modificado de Smith y col, 1994. Para mayor detalle ver Materiales y Métodos

TABLA 7. CONCENTRACION DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA DURANTE EL PERIODO DE OTOÑO (1998)

MUESTRA ^a	AFM ₁ (µg/L)	MUESTRA ^b	AFM ₁ (µg/L)
1	0.057	1	0.036
2	0.349	2	0.119
3	0.074	3	0.030
4	0.131	4	0.281
5	0.309	5	0.330
6	0.176	6	0.022
7	0.080	7	0.030
8	0.038	8	0.044
9	0.101	9	0.036
10	0.085	10	0.024
11	0.081	11	0.025
12	0.139	12	0.070
13	0.272	13	0.178
14	0.079	14	0.043
15	0.094	15	0.118
16	0.021	16	0.025
17	0.085	17	0.195
18	0.050	18	0.093
19	0.056	19	ND
20	0.098	20	0.094
21	0.033	21	0.024
22	ND	22	0.043
23	0.043	23	0.249
24	0.075	24	0.091

^a Leche pasteurizada preferente procesada en Aguascalientes

^b Leche pasteurizada preferente procesada en Querétaro

ND No detectable (por debajo del límite de detección de 0.005 µg/ml)

La extracción se llevó a cabo por el método modificado de Smith y col, 1994. Para mayor detalle ver Materiales y Métodos

El comportamiento que siguió la AFM_1 en leche pasteurizada preferente a través del año, puede verse con mayor claridad en la figura 6. Los resultados nos muestran que la concentración de AFM_1 varía estacionalmente, teniendo la mayor concentración en el periodo de invierno y la menor en el de primavera; al mismo tiempo, se puede apreciar que aunque ambas marcas de leche muestran la misma tendencia, la leche pasteurizada procesada en Querétaro (Leche 2) muestra valores menores que la procesada en Aguascalientes (Leche 1), y ambas marcas no rebasan el límite máximo permitido en los Estados Unidos, que es de $0.5 \mu\text{g/L}$ para este producto. Sin embargo rebasan el límite permitido por la comunidad Europea ($0.05 \mu\text{g/ml}$) (Van Egmon, 1983) y el establecido en la NOM 091 SSAI 1994 que se aplica en nuestro país ($0.05 \mu\text{g/ml}$) (Diario Oficial de la Federación).

En nuestro país, el periodo de cosecha de grano es durante el verano, por lo que el grano trae poca contaminación por hongos y por lo consecuente poca AFB_1 , no obstante al aumentar el tiempo de almacenamiento de granos, esta contaminación parece incrementar. Los resultados obtenidos durante este muestreo, no concuerdan con lo informado por Avilés (1998), donde la menor concentración se encontró en primavera y no en verano, esto puede deberse probablemente al uso de mezclas de granos como alimento para el ganado, o bien a la importación de granos en esa temporada.

Galvano y col. (1998) realizó un estudio de la contaminación de leche por AFM_1 en Italia y mostró que dicha contaminación variaba según la estación del año, encontrando las máximas concentraciones en las muestras recolectadas en el periodo de Noviembre a Abril.

Las diferencias encontradas entre lo descrito en la literatura y nuestros datos, sugieren que el problema de contaminación de leche con AFM_1 , además de ser estacional, es crucial la presencia de AFB_1 en el alimento que ingiere el ganado vacuno, y esto podría ser un problema regionalizado.

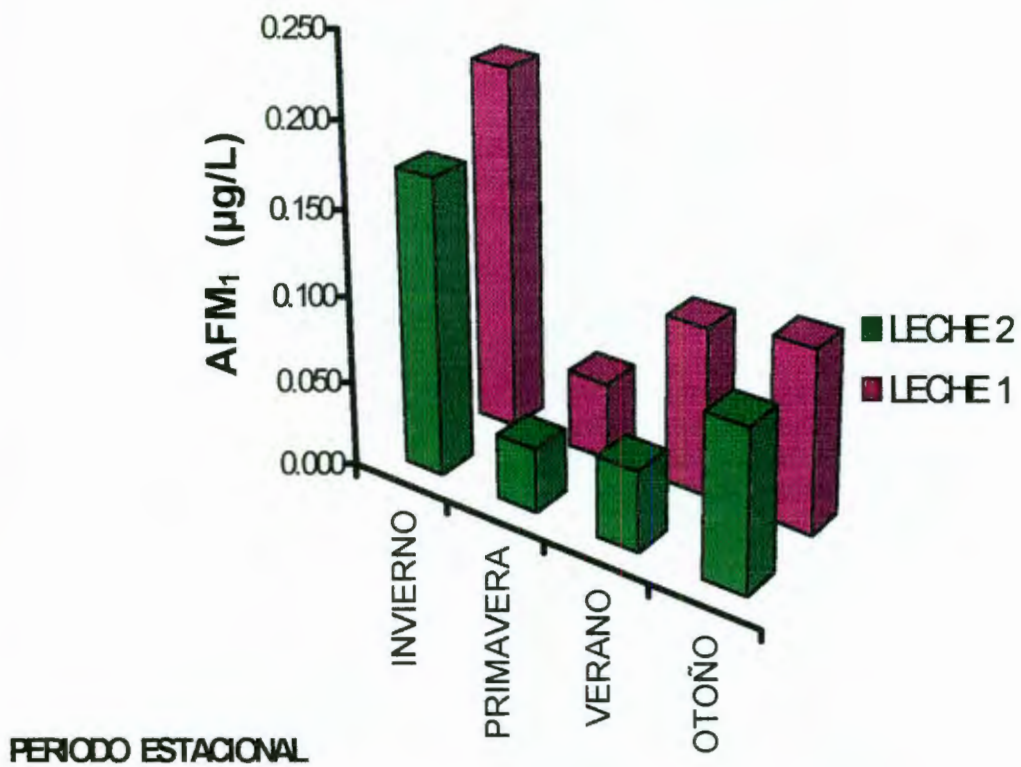


FIGURA 6. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACION DE AFM₁ EN LECHE PASTEURIZADA A TRAVES DEL AÑO

LECHE 1 = Leche Pasteurizada procesada en Aguascalientes
 LECHE 2 = Leche Pasteurizada procesada en Querétaro
 Cada punto representa un promedio de 24 muestras.

3. ELIMINACION DE AFM₁ EN LECHE NATURAL Y ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA POR CESb INMOBILIZADA

Avilés (1998) informó que el CESb de 24 horas de cultivo inmovilizado, eliminó en un 35% la concentración de AFM₁ en leche artificialmente contaminada en 25 ng/ml (valor 50 veces superior al límite establecido por USA). Con la finalidad de eficientizar la eliminación de AFM₁, por parte del microorganismo (CESb) se probaron cultivos de 48 y 72 horas.

En la tabla 8 se muestran los porcentajes de inhibición por CESb a las 24 hrs de inmovilizado.

TABLA 8. ELIMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE NATURAL E INTENCIONALMENTE CONTAMINADA POR CULTIVO DE 48 HRS. Y 24 HRS. DE INMOBILIZACION.

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	% AFM ₁ residual	% Eliminación
Leche naturalmente contaminada	3.3231 3.2599		
^a Leche + AFM ₁	8.4344 8.3703		
^b Leche + AFM ₁	4.3222 4.4761	52 54	48 46
^c Leche + AFM ₁	4.3728 4.1189	53 49	47 51

^a Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁

^b Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado.

^c Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado y pasada por columna reutilizada con CESb inmovilizado.

La columna se empacó con el microorganismo a las 24 horas de inmovilización, para mayor detalle ver Materiales y Métodos.

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción independiente.

Con la finalidad de conocer si la columna que contenía el CESb inmovilizado mantenía su capacidad de eliminación, se probó nuevamente a la semana de haber inmovilizado el microorganismo y con leche con una concentración de 5 ng/ml de AFM₁. Los porcentajes de eliminación obtenidos se muestran en la tabla 9.

TABLA 9. ELIMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE NATURAL E INTENCIONALMENTE CONTAMINADA POR CULTIVO DE 48 HRS. Y UNA SEMANA DE INMOBILIZACIÓN.

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	% AFM ₁ residual	% Eliminación
Leche naturalmente contaminada	3.3231 3.2599		
^a Leche + AFM ₁	8.4344 8.3703		
^b Leche + AFM ₁	3.2259 3.2201	39 39	61 61
^c Leche + AFM ₁	3.6608 3.6681	44 44	56 56

^a Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁

^b Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado.

^c Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado y pasada por columna reutilizada con CESb inmovilizado.

La columna se empacó con el microorganismo a la semana de inmovilización, para mayor detalle ver Materiales y Métodos.

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción Independiente.

Posteriormente, probamos la eficiencia de la columna, sólo que ocupando ahora el cultivo de 72 horas tanto a las 24 horas como a la semana de inmovilizado el microorganismo, y sin variar la concentración de AFM₁ en la leche (5 ng/ml). Los porcentajes de eliminación obtenidos se muestran en las tablas 10 y 11.

TABLA 10. ELIMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE NATURAL E INTENCIONALMENTE CONTAMINADA POR CULTIVO DE 72 HRS. Y 24 HRS. DE INMOBILIZACIÓN.

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	% AFM ₁ residual	% Eliminación
Leche naturalmente contaminada	3.3231 3.2599		
^a Leche + AFM ₁	7.8233 7.8531		
^b Leche + AFM ₁	3.9861 4.3812	51 56	49 44
^c Leche + AFM ₁	3.9762 4.4679	51 57	49 43

^a Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁

^b Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado.

^c Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado y pasada por columna reutilizada con CESb inmovilizado.

La columna se empacó con el microorganismo a las 24 hrs. de inmovilización, para mayor detalle ver Materiales y Métodos.

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción Independiente.

TABLA 11. ELIMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE NATURAL E INTENCIONALMENTE CONTAMINADA POR CULTIVO DE 72 HRS. Y UNA SEMANA DE INMOBILIZACIÓN.

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	% AFM ₁ residual	% Eliminación
Leche naturalmente contaminada	3.3231 3.2599		
^a Leche + AFM ₁	7.8233 7.8531		
^b Leche + AFM ₁	4.2103 4.2323	54 54	46 46
^c Leche + AFM ₁	4.0698 3.8451	49 49	51 51

^a Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁

^b Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado.

^c Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna con CESb inmovilizado y pasada por columna reutilizada con CESb inmovilizado.

La columna se empacó con el microorganismo a la semana de inmovilización, para mayor detalle ver Materiales y Métodos.

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción Independiente.

Los resultados de las tablas 8 a 11 muestran que el cultivo de 48 horas resultó ser aparentemente más eficiente en cuanto a la eliminación de AFM₁ en leche intencionalmente contaminada con una eliminación en el intervalo de 46% al 61%. Sin embargo, estadísticamente no hay diferencia. Estos resultados sugieren que la edad del cultivo a los tiempos ensayados de 24, 48 y 72 horas no parece influir en la destoxificación de la micotoxina en leche. Sin embargo el cultivo de 72 horas de crecimiento e inmovilizado por 24 horas y a la semana mostró una eliminación más o menos constante de aproximadamente un 50%, se decidió proseguir los experimentos subsecuentes con cultivos de 72 horas e inmovilizado en esferas de alginato de sodio en una relación 2:1 (Avilés, 1998).

Kierstan y col., (1977) utilizaron *S. cerevisiae* inmovilizado en alginato de sodio y encontraron que el tiempo de vida media de acción de la inmovilización era de 10 días, presentándose el descenso en su potencial de acción alrededor de los 23 días.

Con la finalidad de descartar que el efecto observado en cuanto a la eliminación de AFM₁ en leche intencionalmente contaminada con 5 y 25 ng de AFM₁/ ml de leche, se debiera a un simple atrapamiento de las esferas de alginato por parte de éstas y no por efecto del microorganismo, se procedió a pasar soluciones de 5 y 25ng de AFM₁/PBS (Buffer de fosfatos pH= 6.4) en columnas empacadas con las esferas sin contener el microorganismo inmovilizado; los resultados se muestran en las tablas 12 y 13.

TABLA 12. ELIMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE NATURAL Y ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA CON 5 ng/ml MEDIANTE ESFERAS DE ALGINATO

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	AFM ₁ en columna (ng/ml)	% Eliminación
Leche naturalmente Contaminada	ND		
^a Leche + AFM ₁	7.4423		
^b Leche + AFM ₁	5.7052	1.73	23.34
	5.8225	1.62	21.77

^a Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁

^b Leche naturalmente contaminada + 5 ng/ml AFM₁ pasada por columna conteniendo esferas de alginato.

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción independiente.

TABLA 13. ELIMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE NATURAL Y ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA CON 25 ng/ml MEDIANTE ESFERAS DE ALGINATO

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	AFM ₁ en columna (ng/ml)	% Eliminación
Leche naturalmente Contaminada	ND		
^a Leche + AFM ₁	22.8034		
^b Leche + AFM ₁	12.5553	10.24	44.91
	12.4239	10.38	45.52

^a Leche naturalmente contaminada + 25 ng/ml AFM₁

^b Leche naturalmente contaminada + 25 ng/ml AFM₁ pasada por columna conteniendo esferas de alginato.

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción independiente.

Los resultados demuestran que hay una relación directamente proporcional entre el porcentaje de eliminación y la concentración de AFM₁ en la leche y que las esferas por sí mismas son capaces de retener la AFM₁ presente en la leche; sobre todo la concentración de 25 ng AFM₁/ml leche (50 veces más del límite permitido por USA), lo cual indica que solo basta la presencia de las esferas de alginato de sodio para la descontaminación de leches con AFM₁. Aunque claramente puede observarse que las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron mucho más altas que las que idealmente se esperan encontrar en la leche, pero es importante recordar el reemplazo del empaquetamiento de las columnas cada vez que sea necesario para que su funcionamiento sea el adecuado y mantenga su eficiencia.

Así mismo, los resultados pueden mostrarnos que, efectivamente el alginato tiene cierta relación o es responsable del atrapamiento de aflatoxina cuando la leche pasa a través de la columna; esta relación crece a medida que la leche está mayormente contaminada. Cabe mencionar que aún cuando la AFM₁ es atrapada por las esferas de alginato, este atrapamiento es mayor en leche intencionalmente contaminada con concentraciones que nunca se presentaron en forma natural. El Nezami y col. (1998), demostraron que ciertas bacterias ácido lácticas como *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* LC-705, tienen la habilidad de remover la AFB₁ hasta en un 80% dependiendo de la concentración y de la temperatura de utilización, así mismo, dichas bacterias ácido lácticas aumentan su habilidad de descontaminar medios cuando se someten a tratamientos ácidos, pero factores como el etanol, radiaciones UV, sonicación, condiciones alcalinas o de pH, no afectan o reducen la habilidad de retención de la bacteria. Resultados que difieren de los nuestros, pero hay que tomar en cuenta que la micotoxina a descontaminar era AFB₁ y no AFM₁. Avilés (1998) también demostró que bacterias lácticas entre las que se encontraba *Streptococcus* spp., son capaces de eliminar AFB₁ hasta en un 90-95%. Lo anterior demuestra que la presencia del microorganismo es de gran importancia durante la descontaminación de aflatoxina en cualquier medio que se esté ocupando.

El hecho de que los experimentos hechos con el alginato mostraran que existe una retención de aflatoxina por parte de él, hizo pensar que probablemente, al ser la micotoxina una sustancia polar, algún solvente podría desprenderla de las esferas, por lo cual, se procedió a hacer un experimento de lavado de la columna con diferentes solventes, extrayendo de cada fracción la aflatoxina que presuntamente se recuperaría de cada uno de ellos. Los resultados se muestran en la tabla 14.

TABLA 14. ELIMINACION DE AFM₁ UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES

Muestra	AFM ₁ (ng/ml)	AFM ₁ en Columna (ng/ml)	% Eliminación
Leche Naturalmente contaminada	ND		
^a Leche	ND		
^b Leche + AFM ₁	27.2879 24.1596		
^c Leche + AFM ₁	11.6944 13.6185	42.8558 56.3689	57.14 43.63
^d Leche de lavado	8.3203 9.1235	53.36 86.55	46.64 13.45
^e Leche + PBS	ND		
PBS de lavado	ND		
MeOH de lavado	ND		

- ^a Leche naturalmente contaminada pasada a través de la columna con esferas de alginato de sodio
^b Leche naturalmente contaminada + 25 ng/ml de AFM₁
^c Leche naturalmente contaminada + 25 ng/ml de AFM₁ pasada a través de la columna con esferas de alginato de sodio
^d Leche naturalmente contaminada pasada a través de la columna con esferas de alginato de sodio
^e Leche naturalmente contaminada residual en la columna + PBS estéril pH= 6.4 pasado a través de la columna con esferas de alginato
^f PBS estéril pH= 6.4 pasado a través de la columna con esferas de alginato
^g Metanol grado HPLC pasado a través de la columna con esferas de alginato
ND No detectable

Cada valor representa la media de tres inyecciones de una extracción Independiente.

Los resultados presentados en la tabla 14, nos muestran que parte de la aflatoxina que se había quedado enlazada o atrapada en las esferas de alginato, fue arrastrada por solventes parcialmente polares, lo cual no sucedió con aquellos que tienen una polaridad superior como el metanol o el PBS, lo cual probablemente se deba a que la aflatoxina está fuertemente enlazada con el microorganismo, con el alginato o con ambos, y dicha fuerza no puede romperse a pesar del solvente que se utilice para extraer la aflatoxina.

VII. CONCLUSIONES

1. La presencia de AFM₁ en leche pasteurizada preferente, presenta un comportamiento que varía con la estación del año.
2. El problema de contaminación de leche con AFM₁, sugiere ser un problema regionalizado, dependiente del grado de contaminación del alimento proporcionado a los animales.
3. La eliminación de AFM₁ en leche artificialmente contaminada (5 ng/ml) por *Streptococcus spp.* en cultivos de 48 y 72 hrs. fue de aproximadamente 50%.
4. La columna conteniendo el microorganismo inmovilizado, mantiene su eficacia en cuanto a la eliminación de AFM₁ a la semana de inmovilización.
5. Las esferas de alginato de sodio son capaces de atrapar la AFM₁ en leche intencionalmente contaminada con 25 ng de AFM₁/ml.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Alais C., 1988. Secreción de la leche y Cuantificación de la Leche. Cap. 2 y 3. En: Ciencia de la Leche, principios de técnica lechera, Editorial Continental, México. pp:23-28; 31-37.
- ApSimon J.W., 1994. The Biosynthetic Diversity of Secondary Metabolites. Chapter 1 In: Mycotoxins In Grain., compounds other than aflatoxin. Miller J.D. y Trenholm H.L. (Eds), Eagan Press U.S.A: pp. 3.
- Avilés A. L. M. R., 1998. Estudio de la Eliminación de Aflatoxina M1 en leche líquida, mediante Métodos Biológicos. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC).
- Badui, S.D., 1981; Leche Cap.2, En: Química de los alimentos. Editorial Alhambra, Méx. pp 376.
- Carvajal M.M., Arroyo T.G.A., 1995. Las Aflatoxinas, Micotoxinas del Hongo *Aspergillus* spp. Sus características, propiedades Fisicoquímicas y Efectos sobre Plantas, animales y el Hombre. K. Bermúdez T. y A. Jiménez P. (Eds). Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición. COFAA-IPN, México, pp: 18-25.
- Ciegler A., Lillehoj E.B., Peterson R.E., and Hall H.H., 1966. Microbial Destoxification of Aflatoxin. *Applied Microbiology*. 14 (6) : 934-939.
- Claridades Agropecuarias. 1996. De Nuestra Cosecha. Revista de publicación mensual, México D.F. mayo, No. 33. pp: 3-40.

Chu, F.S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation Research*, 259 : 291-306.

Diario Oficial de la Federación. NOM 091 SSAI 1994.

Díaz S. Domínguez L., Prieta J., Blanco J.L., and Moreno M.A., 1995. Application of a Diphasic Dialysis Membrane Procedure for Surveying Occurrence of Aflatoxin M₁ in Commercial Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 2678-2680.

Edrington T.S., Sarr A.B., Kubena L.F., Harvey R.B., Phillips T.D. 1996. Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS and Activated Charcoal Reduce Urinary Excretion of Aflatoxin M₁ in Turkey Poults. Lack of Effect by Activated Charcoal on Aflatoxicosis. *Toxicology Letters*, No. 89. pp:115-122.

Ellis W.O., Smith J.P. and Simpson B.K., 1991. Aflatoxins in Food: Pcurrance, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and methods of Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30 (3). 403-439.

El-Nezami H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J., 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protein*, April; 61 (4): 466-468.

El-Nezami H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J., 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chemistry Toxicology*, April; 36 (4): 321-326.

Galvano F., Galofaro V., de Angelis A., Galvano M., Bognanno M., Galvano, G., 1998. Survey of the occurrence of Aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. *Journal of Food Protein*; June; 61 (6): 738-741.

Goodman T.K, 1994. Mycotoxins in Grain. In: Compounds other than Aflatoxin: Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment and risk management. Miller J.D. (Ed) pp: 446.

Hanigan H. M., and Laishes B.A., 1984. Toxicity of Aflatoxin B₁ in Rat and Mouse Hepatocytes in vivo and in vitro. *Toxicology*, 30: 185-193.

Hao, Y.Y. and Brackett, R.E., 1988. Removal of Aflatoxin B₁ from Peanut Milk Inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Science*. 53 (5). 1384.

Harvey R.B., DVM MS., 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. *Am. J. Vet. Res.* V.52. No. 9, 1556.

Higuera-Ciapara Y., Esqueda-Valle M. and Niebla J., 1995. Reduction of Aflatoxin M₁ from Artificially Contaminated Milk using Ultrafiltration and Diafiltration. *Journal of Food Science*. 60 (3) : 645.

Honstead J.P. and Dreesen D.W. 1992. Safety Aspects of Aflatoxins in Grain and in Edible Swine Tissues. In: *Natural Toxins: Toxicology, Chemistry and Safety*. R.F. Keeler, N.B. Mandava and A.T. Tu (Eds). U.S.A. pp: 346-363.

Hsieh D. and Wong J.J., 1994. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. Chapter 4. In: *The Toxicology of Aflatoxins: Human health, veterinary, and Agricultural significance*. David L. Eaton and John D. Groopman (Eds). pp: 73.

Hsieh D. P.H. and Atkinson D.N., 1990. Bisfuranoid Mycotoxins: their genotoxicity and Carcinogenicity. *Biological Reactive Intermediates IV.*; C.M. Witmer y Col. (Eds). Plenum Press, New York. pp: 525-532.

Hsieh D., 1989a. Cancer risks posed by micotoxins in foods. *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insects Pheromones and Allomones*. C.H. Chou and G.R. Waller (Eds). Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series, No. 9. pp:343-354.

Hsieh D., 1989b. Carcinogenic Potential of Mycotoxins in Foods, Chapter 2. *Food Toxicology: A Perspective on the relative risks*. S.L. Taylor and R.A. Scanlan (Eds). Dekker, New York. pp: 11-29.

Hsieh, D.P.H.; Beltrán, L.M.; Fukayama, M.Y.; Rice, D.W. and Wong, J.J.; 1986. Production and Isolation of Aflatoxin M₁ for Toxicological Studies. *Journal of the Association of Official analytical Chemists*. Vol. 69, # 3. 510-512.

Hsieh, D.P.H. 1985. The Role of Aflatoxin in Human Cancer. In: *Mycotoxins and P hycotoxins*. Steyn P.S. y Vleggaar R. (Eds). A colletion of invited papers presented at the sixth International IUPAC. 447-455.

Judkins, H.F. and Keener, H.A., 1970; *The composition and Properties of Milk and Factors Affecting Same*. Chapter 3. In: *Milk Production and Processing*. Wiley J. & Sons Inc. (Eds). New York. pp:28.

Karunaratne A., Wezenberg E. And Bullerman L.B., 1990. Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin Production by *Lactobacillus* spp. *Journal of Food Protection*, Vol. 53 (3), pp: 230-236.

Kierstan M., Bucke, C., 1977. The bilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate Gels. pp: 387-397.

Lacticinios, 1999. De El Comercio México-Estados Unidos Sector Lechero. *Revista bimestral*, México D.F., Mayo-Junio, Epoca 2, Vol. 7, No. 3, pp: 15-18

Maeba H., Takamoto Y., Kamimura M. And Miura T., 1988. Destruction and Detoxification of Aflatoxins with Ozono. *Journal of Food Science*. V. 53, No. 2, 667.

Ostle B., 1974. *Análisis de Correlación*, Cap. 9. *Estadística Aplicada*. Ed. Limusa, México. pp: 251-274.

Saad A.M., Abdelgadir A.M., and Moss M.O. 1995. Exposure of Infants to Aflatoxin M₁ from mothers' Breast Milk in Abu Dhabi, UAE. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 12 (2), pp: 255-261.

Samarajeewa U., Sen A.C., Cohen M.D., and Wei C. 1990. Detoxification of Aflatoxins in Food and Feeds by Physical and Chemical Methods. *Journal of Food Protection*, Vol. 53 (6), pp: 489-501.

Scott, P.M., 1978. Mycotoxins in Feeds and Ingredientes and Their Origin. *Journal of Food Protection*. Vol. 41 (5). pp: 385-398.

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 and effects on milk production and components. *J. Anim Sci.* 72:677-682.

Sylos C.M., Rodríguez-Maya D.B. and Carvalho P.R.N., 1996. Occurrence of aflatoxin M₁ in Milk and Dairy Products Commercialized in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. Vol. 13(2). pp; 169-172.

Trimbell J. 1991, Factors affecting toxic responses: metabolism. Cap. 4. In: *Principles of Biochemical Toxicology*. Taylor and Francis (Eds). pp. 156-201.

Trucksess M.W., 1996. Committe on Natural Toxins. General referee reports: Journal of AOAC International. Vol. 79 (1). pp: 200-205.

Van Egmon. 1994. Aflatoxins in Milk, Cap. 17, In: The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. David L. Eaton and John D. Groopman (Eds). pp: 365-381.

Van Egmon H.P. 1983. Mycotoxins in Dairy Products. Food Chemistry, Applied Science Publisher. No. 11, pp: 289-307.

Waldman, A.S., Schechinger, L., Govindarajoo, G., Nowick, J.S., 1998. The Alginate Demostration: Polymers, Food Science, and Ion Exchange. Journal of Chemical Education. Vol. 75, No. 11. pp: 1430-1431.

Zarba A., Wild C.P., Hall A., Montesano R., Hudson G.J. and Groopman J.D., 1992. Short comunication: Aflatoxin M₁ in Human Breast Milk from the Gambia West Africa, Quantified by combined monoclonal antibody Inmunoaffinity cromatography and HPLC. Carcinogenesis. V., 13, No. 5, 891-894.