

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Colegio de Ingeniería Ambiental



Adsorción de la aflatoxina B₁ mediante quitosano

TESIS

Para la obtención del título de:

INGENIERA AMBIENTAL

Presentada por

Dulce María Balseca López

Director de tesis

Dr. Heriberto Hernández Cocoltzi

Co-Directora de tesis

Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide

Puebla, Pue. Mayo de 2015



**C. DULCE MARÍA BALSECA LÓPEZ
PASANTE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE:**

**Oficio No. FIQ/AC/764/2014
Asunto: Registro de Tema de Tesis
Fecha: 11 de Julio de 2014**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

"ADSORCIÓN DE LA AFLATOXINA B₁ MEDIANTE QUITOSANO"

Con el siguiente contenido:

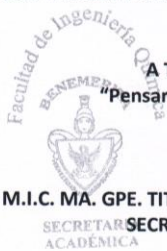
INTRODUCCIÓN

**CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: Dr. Heriberto Hernández Cocoltzi
Co- Directora de Tesis: Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**



ATENTAMENTE
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"

M.I.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARÍA ACADÉMICA

Director de Tesis: Dr. Heriberto Hernández Cocoltzi
Co- Directora de Tesis: Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

LIC. Ma. Cristina Laura Gómez Aguirre.
Directora de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Ambiental

BALSECA LÓPEZ DULCE MARÍA

Quién presenta como tema de tesis:

**ADSORCIÓN DE LA AFLATOXINA B₁ MEDIANTE
QUITOSANO**

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 14 de Mayo del 2015

Director de Tesis
Dr. Heriberto Hernández Cocoltzi

AGRADECIMIENTO

Mi sincero reconocimiento al Dr. Heriberto Hernández Cocolletzi, Investigador de la Facultad de Ingeniería Química y director de este trabajo, quien con su experiencia, paciencia y conocimiento supo guiar de manera acertada esta investigación.

A la Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide por darme la oportunidad de poder realizar una maravillosa investigación.

Un especial agradecimiento a la Mc. Eva Águila Almanza, quien a más de demostrar su gran vocación de maestra y su experiencia en la investigación científica, sobre todo fue la amiga y consejera incondicional.

Al Mc. Marco Marín por brindarme siempre su apoyo, conocimiento y tolerancia.

Al apoyo parcialmente financiado que otorgó la VIEP-BUAP y PRODEP, México.

Dulce María Balseca López

DEDICATORIA

El esfuerzo y la lucha constante por ser mejor, tanto en la parte profesional como en la humana, conllevan a la satisfacción personal y la tranquilidad de vivir cumpliendo con los roles que me corresponden como profesionista, hija y ciudadana. La estancia en la Universidad fue llena de muchos retos personales pero sobre todo me divertí, conocí grandes amigos y grandes seres humanos, lo disfrute.

Este trabajo va dedicado con mucho amor y cariño a mis padres Armando y Roció y a mis hermanos Sandy, Nando y magui, a mis abuelos Chacha y Florita, a mi tía Ale y a mi pequeña Sofí así como a toda mi familia quienes son el impulso para seguir siempre adelante y que de una u otra manera me acompañaron en esta etapa de mi vida, los amo.

A mis amigos, así como compañeros que me ayudaron en realizar esta investigación en especial a Edgar y profesores que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme y ayudarme.

A ellos y a todos, gracias.

Dulce María Balseca López.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1	4
ANTECEDENTES	4
<i>1.1 Aflatoxinas</i>	4
1.1.1 Hongos productores.....	5
1.1.2 Propiedades físicas, químicas y biológicas de la aflatoxina B ₁	5
1.1.3 Normatividad y regulación de las aflatoxinas en México y el mundo.....	6
1.1.4 Daños a la salud y al medio ambiente.....	7
1.1.5 Pérdidas económicas.....	8
1.1.6 Medidas de control y prevención.....	8
1.1.7 Degradación física.....	10
1.1.8 Degradación química.....	10
1.1.9 Degradación biológica.....	11
<i>1.2 Quitosano</i>	12
1.2.1 Proceso de adsorción.....	13
<i>1.3 Estado del arte</i>	16
CAPÍTULO 2	18
METODOLOGÍA	18
<i>2.1 Obtención del quitosano</i>	18
2.1.1 Acondicionamiento de la materia prima.....	18
2.1.2 Aislamiento de la quitina.....	19
2.1.3 Desacetilación parcial de la quitina.....	19
<i>2.2 Caracterización del quitosano</i>	20
2.2.1 Espectroscopía de infrarrojo.....	20
2.2.2 Valoración potenciométrica.....	21
2.2.3 Solubilidad.....	22
<i>2.3 Determinación de la capacidad de adsorción</i>	22
<i>2.4 Caracterización por infrarrojo de la muestra de la AfB₁ y quitosano</i>	24
CAPÍTULO 3	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
<i>3.1 Obtención de quitosano</i>	27
<i>3.2 Caracterización del quitosano</i>	28
3.2.1 Espectroscopía de infrarrojo.....	28
3.2.2 Valoración potenciométrica.....	29
3.2.2 Solubilidad.....	32
<i>3.3 Determinación de la capacidad de adsorción</i>	32
3.3.1 Calibración de equipo de espectroscopía UV- vis.....	32
3.3.2 Determinación del tiempo de máxima adsorción.....	32
3.3.3 Isotermas de adsorción.....	34
3.3.4 Espectroscopía de infrarrojo de AfB ₁ en quitosano.....	39
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

La contaminación de productos agrícolas debido a la presencia de micotoxinas causa efectos tóxicos en los seres vivos. En este estudio el quitosano, polímero no tóxico y biodegradable, ha demostrado ser una alternativa para el control de la aflatoxina B₁ (AfB₁). Se obtuvieron dos muestras de quitosano con tamaño de partícula de 38 µm a temperatura ambiente, a partir de la quitina previamente extraída de exoesqueletos de camarón crudo utilizando el método químico. Por valoración potenciométrica se obtuvo el grado de desacetilación el cual fue de 81.54 y 65.5 % NH₂, respectivamente. Las muestras de quitosano fueron caracterizadas mediante la técnica instrumental de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Estas muestras se utilizaron como material adsorbente de la AfB₁. Ambas sustancias se pusieron en contacto considerando diferentes tiempos, las soluciones fueron agitadas y centrifugadas. A la solución remanente se le determinó la concentración final de AfB₁ con ayuda de un espectrofotómetro UV-vis. La máxima adsorción se llevó a cabo durante las primeras 24 horas de contacto. La capacidad de adsorción se determinó realizando isotermas de adsorción utilizando los modelos de Langmuir y Freundlich. El primero de estos es el que da un mejor ajuste cuya isoterma es de tipo L. La capacidad de adsorción obtenida de 0.0067 molKg⁻¹ está en relación con la muestra de mayor grado de desacetilación, comparable con la capacidad de adsorción utilizando suelo de origen volcánico y bentonitas.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático se percibe generalmente como un impacto negativo en la seguridad alimentaria por lo que es imposible evaluar con certeza su repercusión real, sobre todo, en países en desarrollo, donde se ha identificado como un generador de nuevos riesgos en la seguridad de los alimentos. A pesar de los esfuerzos para controlar la contaminación por hongos, los mohos toxigénicos están en todas partes en la naturaleza y se producen con regularidad en el suministro de alimentos en todo el mundo debido a la infestación de moho de los productos agrícolas sensibles, como los granos de cereales, frutos secos y frutas (Murphy y col., 2006). La producción de micotoxinas está fuertemente ligada a factores ambientales, principalmente la temperatura, la humedad relativa, la sequía y la condición de estrés de las plantas causada por invasión de insectos (Miraglia y col., 2009). Además, un estudio de Simpson y colaboradores en 2004, reveló que la patogenicidad de diferentes variedades de mohos puede ser parcialmente aumentada y que la ventaja selectiva de uno sobre otro puede ser dependiente de la temperatura.

Actualmente se conocen más de 200 diferentes micotoxinas presentes en alimentos (Bogantes y col., 2004). Éstas se generan durante la producción, la elaboración y el almacenamiento de los granos tales como maní, semilla de algodón, trigo, maíz, frijol, arroz, cacao, nueces de Brasil, nueces, pistachos, almendras, avellanas, pasas, café, así como también en sus productos de proceso tales como valentina, chiles, mazapán, leche, queso, etcétera. Dentro de las de mayor incidencia se halla a las aflatoxinas, siendo la aflatoxina B₁ la más tóxica debido a sus efectos nocivos, es altamente cancerígena, hepatotóxica, teratogénica y es un metabolito secundario mutagenético (Kannevischer y col., 2006). La AfB₁ es producida principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y está creando una gran intranquilidad debido a que a nivel mundial la producción de cereales según la FAO se cifra en un volumen record de 2,515 millones de toneladas donde se estima que aproximadamente el 25% del total se contaminan con aflatoxinas (Cota y col., 2011).

Para reducir o resolver el problema de la contaminación debida a la AfB₁, existen varios enfoques diferentes que van desde la separación física de granos contaminados hasta los tratamientos químicos (fungicidas) para degradarla (Kannevischer y col., 2006). El uso de fungicidas ha propiciado que en algunos casos el hongo y/o la aflatoxina sean más resistentes

requiriendo cada vez de mayores cantidades o concentraciones para su eliminación, llegando a dañar al grano y por lo tanto, a quien lo consume, incluyendo al medio ambiente. Recientemente (Cota y col., 2011) se ha mostrado que el quitosano sintético es capaz de inhibir el crecimiento tanto de la AfB₁ como del hongo que la produce. El quitosano ha demostrado ser una alternativa para el control de algunos hongos fitopatógenos. Pero aún falta mitigar a la aflatoxina B₁ una vez que se ha desarrollado, sin utilizar agentes químicos que eventualmente complican aún más el problema.

Todos los alimentos destinados al ser humano particularmente aquellos cuya dieta básica incluye granos y la consignada a origen animal deben estar libres de contaminantes obteniendo así como resultado la eliminación de enfermedades, intoxicación e incluso la muerte. Estos beneficios se obtendrán controlando la AfB₁ en los granos de los cereales.

Así que la estrategia propuesta es el uso del quitosano natural proveniente de exoesqueletos de camarón, que tiene propiedades antifúngicas y representa una alternativa a la utilización de sustancias químicas. En la actualidad, la principal fuente de residuos de camarón proviene de los desechos de la industria camaronera, los cuales representan millones de toneladas de basura a nivel mundial. Además, se ha desarrollado la metodología para obtener quitosano a partir de exoesqueletos de camarón desechados de restaurantes de mariscos (Hernández y col., 2009). Este polímero natural no tóxico, biodegradable y biocompatible será utilizado para adsorber y eventualmente eliminar la AfB₁. Las ventajas son favorables ya que es sustentable, es de bajo costo por ser materia de desecho y de fácil manejo comparado con el carbón activado (Navarro y col., 2010), por ejemplo.

Objetivos

Objetivo general

- Adsorber la AfB₁ mediante quitosano.

Objetivos específicos

- Obtener quitosano a partir de exoesqueletos de camarón desechados en restaurantes de mariscos.
- Poner en contacto al quitosano con la AfB₁.
- Analizar la capacidad de adsorción del quitosano para adsorber la AfB₁.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Aflatoxinas

En 1960, en el oeste de Inglaterra, ocurrió la muerte de más de 100,000 pavos de una enfermedad desconocida (enfermedad X de los pavos). Aquí se vio que el hígado era el órgano principalmente afectado, pues presentaba necrosis de los hepatocitos, proliferación biliar y fibrosis, entre otros signos. Producto de investigaciones realizadas, se concluyó que la causa de esta enfermedad de origen desconocido fue la ingestión por las aves de un lote de maní importado de Brasil, que estaba contaminado con una toxina producida por *Aspergillus flavus*. Este episodio fue el que llevó al hombre a la identificación de toxinas producidas por hongos, que fueron denominadas genéricamente micotoxinas (Busby y Wogan, 1984; Turner y col., 2009).

La palabra "aflatoxina" viene de a = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno. Se sabe que las aflatoxinas son cristales sólidos de color que va del blanco al amarillo, sin olor, sin sabor e incoloros, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido); cuando las aflatoxinas están en cloroformo o benceno son estables por años en refrigeración y oscuridad, además su punto de fusión es superior a 250 °C y son estables en solución con pH de 3 a 10 (Carbajal, 2013, Phillips y col., 1995).

Se dispone de métodos analíticos para determinar a las aflatoxinas en todos los alimentos que son susceptibles a la contaminación. La mayoría de los métodos comprenden una extracción de las toxinas de los alimentos, una separación cromatográfica de las sustancias interferentes, una cuantificación y un análisis cualitativo de la comparación de la intensidad de la fluorescencia de las toxinas presentes en la muestra con la de las toxinas patrón en cromatoplasmas. Se dispone de métodos de identificación que deberían utilizarse siempre para afirmar que los compuestos cuantificados son realmente aflatoxinas (Carreón y Licona, 1999). La aflatoxina B₁ es altamente cancerígena para el hombre y es uno de los agentes causantes de cáncer de hígado más potentes que se conocen. La FAO señala que si la acción inmunodepresora de las aflatoxinas en el ganado se manifiesta de forma similar en las

personas, es posible que las aflatoxinas (y otras micotoxinas) desempeñen un papel importante en la etiología de las enfermedades que sufre la población en algunos países en desarrollo en los que se ha comunicado una alta exposición a estas toxinas.

1.1.1 Hongos productores

Las aflatoxinas se clasifican en B, G y M por lo que de acuerdo con Jiujiang y colaboradores (2002) los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus pseudotamarii* y *Aspergillus ochraceoroseus* producen sólo las aflatoxinas B y *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus parasiticus* producen además de la B, toxinas G. Otros miembros importantes de la familia de las aflatoxinas que son formas oxidativas de la aflatoxina B₁ son las M₁ y M₂, estas se modifican en el tracto digestivo de algunos animales y se aíslan de la leche, la orina y las heces.

Según Alberts (2007), las aflatoxinas más importantes y más estudiadas se han clasificado en los tipos: B (B₁, B₂) y G (G₁, G₂) basadas en su fluorescencia bajo radiación UV (azul o verde) y a la relativa movilidad cromatográfica durante la cromatografía en capa fina (TLC) (Turner y col., 2009).

1.1.2 Propiedades físicas, químicas y biológicas de la aflatoxina B₁

Dentro del grupo de las aflatoxinas, la aflatoxina B₁ (Afb₁) Figura 1.1 es la más tóxica y conocida por sus efectos nocivos sobre los seres humanos, aves de corral, ganado y otros animales. Es altamente cancerígena, hepatotóxica, teratogénica y mutagénica (Ke y col., 2012). No sólo hace daño a los animales cuando se ingiere con su alimento si no también plantea riesgos para la salud humana, por ejemplo, cuando los productos de los animales que se consumen. Aunado a esto, el Instituto Internacional de Investigación en Cáncer, ha clasificado a la Afb₁ como un carcinógeno Clase 1. En este grupo están considerados los agentes que son carcinogénicos para los seres humanos (Guzmán de peña, 2007).

Como menciona Desheng y colaboradores en 2005 la Afb₁ ha sido detectada como contaminante de cultivos antes de la cosecha, el secado, el almacenamiento y después de la elaboración y la fabricación de productos.

La Afb₁ es sintetizada durante el metabolismo secundario de algunas cepas. Esta micotoxina se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, llevando a la formación de

una molécula que consiste en un anillo cumárico unido a un furo-furano y a una ciclopentanona (Guzmán de Peña, 2007).

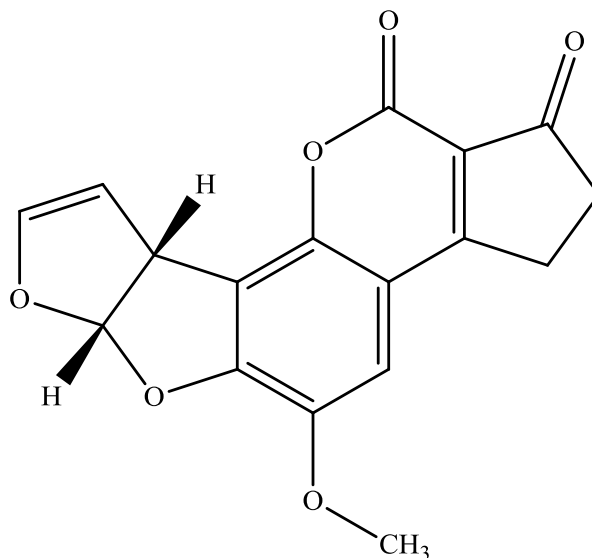


Figura 1.1. Estructura química de la aflatoxina B₁.

1.1.3 Normatividad y regulación de las aflatoxinas en México y el mundo

Para proteger la salud de los consumidores, muchos países han implementado reglamentos que imponen límites a la presencia de las principales micotoxinas como las aflatoxinas en diversos productos agroalimentarios. Estos límites varían dependiendo del país debido a las diferencias en la percepción de los límites considerados seguros para la salud, de su nivel de desarrollo o incluso debido a los intereses económicos locales relacionados con la cultura del país (Abrunhosa y col., 2012).

La contaminación de los alimentos y los piensos sigue siendo un problema grave en todo el mundo, pero no es una amenaza en los países más desarrollados, debido al cuidado de los productos básicos. La mayoría de los países, incluyendo los Estados Unidos de América, tienen un nivel de regulación de 20 ppb para el maíz y 0.5 mgkg⁻¹ en leche, mientras que los reglamentos para las aflatoxinas en Europa son más estrictos, 2 ppb para AfB₁ y 4 ppb para el total de aflatoxinas en granos y 0.05 mgkg⁻¹ en leche (Salud pública, 2014; Armijo y Calderón, 2009).

Respecto a la legislación en México, sólo existen tres normas en donde se establece el límite máximo de aflatoxinas en maíz para consumo humano de 20 µgKg⁻¹ y en animal de 21 a 300 µgKg⁻¹ (NOM-188-SSA1-2002). Así mismo, para masa, tortillas, harinas y tostadas de maíz

nixtamalizado el nivel máximo de aflatoxinas es de $12 \mu\text{gK}^{-1}$, mientras que para tortillas de trigo, tortillas integrales y harinas de trigo es de $20 \mu\text{gK}^{-1}$ (NOM-187-SSA1/ SCFI-2002). En cuanto a leche, productos y fórmulas lácteas, el nivel máximo permitido de AfM₁ es de $0.5 \mu\text{gL}^{-1}$ (NOM-184- SSA1-2002) (Robledo y col., 2012).

1.1.4 Daños a la salud y al medio ambiente

De acuerdo a Schmidt (2014), los centros para el control y prevención de enfermedades de Estados Unidos estiman que 4500 millones de personas en el mundo en vías de desarrollo pueden estar crónicamente expuestas a las aflatoxinas en su alimentación y entre 25,200 y 255,000 casos de cáncer de hígado al año se deben a estas exposiciones, particularmente en Asia y en África subsahariana. El hecho de que se esté prestando más atención a las aflatoxinas obedece a varios factores. En primer lugar, hay cada vez más evidencias de que las aflatoxinas provocan o exacerbaban deficiencias de crecimiento en los niños.

Por otra parte, la ingesta frecuente de aflatoxina causa la proliferación del conducto biliar, necrosis hepática, osteosclerosis de hueso, cirrosis infantil, supresión inmune y lesión veno-oclusiva hepática. El carcinoma hepatocelular (HCC) es uno de los tipos de cáncer más frecuentes en el mundo, muy potente y la mayoría de los pacientes sobrevive menos de un año después del diagnóstico. Se estima que 250,000 muertes ocurren cada año en China y África subsahariana debido a HCC. Los principales factores de riesgo de HCC son la infección con la hepatitis B (VHB) o hepatitis crónica por el virus C y la exposición alimentaria a las aflatoxinas (Alberts, 2007).

Además, Miraglia y colaboradores (2009) señalan que el cambio climático conduce a diferentes problemas en la alimentación, la seguridad de los piensos, el deterioro de los alimentos. Con respecto a los cultivos, se proyectan variaciones en los parámetros climáticos como temperatura, sequías, precipitaciones, viento y niveles de CO₂. Por lo que prevén riesgos químicos y microbiológicos que perjudiquen la seguridad de alimentos y piensos, como consecuencia del cambio climático. La mayoría de estos efectos pueden estar relacionados entre sí, por lo tanto, la producción de las toxinas se verá favorecida por el cambio climático previsto.

Todo lo anterior representa un riesgo para la calidad y seguridad de los alimentos y los piensos, que a su vez puede dar lugar a pérdidas económicas a los agricultores, productores

de proteína animal, comerciantes de granos y los procesadores de alimentos y piensos (Dai y col., 2013).

1.1.5 Pérdidas económicas

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de micotoxinas ocasiona importantes pérdidas económicas debido a sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Hay varios criterios para evaluar el impacto económico de las micotoxinas en los humanos y en la agricultura animal. Las consideraciones incluyen la pérdida de la vida humana y animal, el cuidado de la salud y los costos de atención veterinaria, la pérdida de la producción de ganado, la pérdida de cultivos de forraje y alimentos, los costos regulatorios, y el costo de la investigación se centra en aliviar el impacto y la gravedad del problema de las micotoxinas (Hussein y Brasel, 2001).

Por ejemplo, en los EE.UU., se estima que la presencia de micotoxinas, incluidas las aflatoxinas, en cultivos tales como maíz, trigo y cacahuate, pueden causar pérdidas directas de alrededor de 932 millones de dólares anuales e indirectas (costo de la regulación y su aplicación, análisis y aplicación de otras medidas de control) de más de 466 millones. En países subdesarrollados, extremadamente dependientes de cultivos locales (como en el caso del maíz en África) las micotoxinas provocan, además de perjuicios económicos, una elevada morbilidad y muerte prematura entre la población humana (Abrunhosa y col, 2012).

Borrell (1990) cita que los piensos contaminados por micotoxinas pueden generar rechazo en los animales de granja, lo que se traduce en una pobre conversión alimenticia y por lo tanto una disminución en la ganancia de peso, además de ser causa de inmunosupresión y un deterioro de las capacidades reproductivas. De gran importancia es el hecho de que las micotoxinas que se encuentran en los piensos pueden llegar hasta el producto final como carne, leche, huevos, etc.

1.1.6 Medidas de control y prevención

Los niveles de micotoxinas en el alimento pueden ser controlados utilizando métodos preventivos que eviten el crecimiento de hongos toxicogénicos o bien a través de sistemas de descontaminación, inactivación y detoxificación directamente en el alimento (Gimeno y Martin, 2003).

Detoxificación de aflatoxinas se refiere a los tratamientos posteriores a las cosechas para eliminar o disminuir sus efectos tóxicos. Esas estrategias se pueden dividir en tres grupos diferentes: métodos naturales, métodos físicos y métodos químicos, que se centran en la destrucción, modificación o adsorción de la aflatoxina. Hay una gran variedad de herramientas tales como el secado después de la cosecha (que es económicamente accesible), el almacenamiento adecuado, el descascarado, la selección de productos, la cosecha temprana, las fechas controladas de siembra a nivel regional, y el control de insectos. Sin embargo, incluso cuando las condiciones de almacenamiento son en general buenas, las aflatoxinas se forman con frecuencia antes de la cosecha, mientras que en la cosecha están madurando, lo cual puede dar resultado a pérdidas significativas (Razzaghi y col., 2013).

Tapia y colaboradores (2010) señalan que se han desarrollado estrategias para prevenir el crecimiento de hongos e inhibir la biosíntesis de micotoxinas antes de la cosecha (variedades resistentes, el manejo en el campo y el uso de agentes biológicos y químicos), durante la cosecha y en la post-cosecha (mejoras en el proceso de secado y almacenado), el uso de agentes naturales y químicos, la aplicación de irradiación, etcétera. Así mismo, se han desarrollado otras estrategias alimentarias con la finalidad de reducir la adsorción de micotoxinas en el tracto digestivo mediante el uso de “agentes detoxificantes”. Son sustancias que pueden suprimir o reducir la adsorción, promover su excreción o modificar su modo de acción. Esto depende de la forma en que estos aditivos pueden actuar ya sea reduciendo la biodisponibilidad de las micotoxinas o degradarlas o transformarlas en metabolitos menos tóxicos; de manera general se clasifican como agentes adsorbentes y agentes biotransformadores. Los agentes adsorbentes son aquellos compuestos que tienen la finalidad de quelar las micotoxinas, lo cual permite reducir su disponibilidad. Los agentes biotransformadores degradan las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos. Existen otros compuestos, los cuales tienen la finalidad de proteger contra el daño a nivel celular ocasionado por el consumo de micotoxinas, estos compuestos son clasificados como “protectores”, como se observa en la Figura 1.2.

Cada vez hay un incremento de reportes de la presencia de micotoxinas presentes en los alimentos con la exigencia de procesos de detoxificación económicos y prácticos. Idealmente los métodos podrían reducir la concentración de las toxinas para asegurar los límites

permisibles. El medio de degradación de estas toxinas se puede agrupar en tres categorías: físicas, químicas y biológicas y se podrían examinar en consecuencia (Doyle y col., 1982).

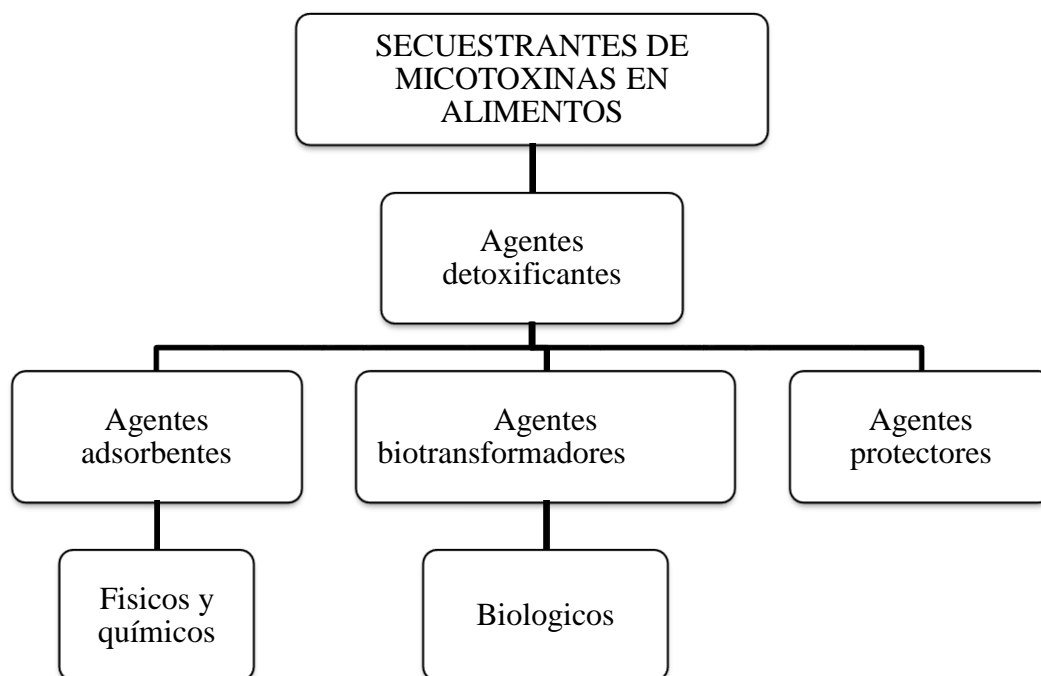


Figura 1.2. Diagrama de la clasificación de agentes detoxificantes (Tapia y col., 2010).

1.1.7 Degradación física

El uso de calor, irradiación y adsorción son tres factores físicos que se han estudiado para contrarrestar los efectos de las micotoxinas. Una aproximación relativamente reciente al problema ha venido desde el campo de la lucha preventiva contra la aflatoxicosis.

1.1.8 Degradación química

Como mencionan Razzaghi y colaboradores (2013) los métodos de control químico de aflatoxinas son principalmente aquellos que implican el uso de reactivos químicos para diferentes propósitos. Sin embargo, la aplicación de químicos ha conducido a una serie de problemas ambientales y de salud, ya que como se ha comentado anteriormente las micotoxinas y en particular la aflatoxina B₁ es carcinógena y altamente tóxica con períodos largos de degradación. Los insecticidas y fumigantes fueron los primeros químicos que se utilizaron para hacer frente a los hongos aflatoxigénicos.

Borrell y G. Gimeno (2002) hacen mención del uso de métodos químicos como los insecticidas, los solventes y los agentes químicos reactivos; además de agentes químicos inertes y aquellas sustancias capaces de adsorber las moléculas de micotoxinas en su estructura, por lo que se destacan 3 grupos:

- Carbón activo.
- Polímeros de polivinilpirrolidona.
- Arcillas.

Un amplio número de reactivos químicos se han ensayado como agentes de degradación de micotoxinas, que incluyen ácidos, álcalis, aldehídos, agentes oxidantes y algunos gases (Gallo y col., 1991).

1.1.9 Degradación biológica

Los procesos biológicos también han recibido una gran atención basada en la capacidad de los microorganismos para degradar, en conjunto con el estudio de los procesos de adsorción. Hay tres ramas crecientes de investigación en los métodos biológicos: el uso de agentes biológicos de control, enzimas biotransformadoras y plantas modificadas genéticamente. De acuerdo a estas clasificaciones, se podría añadir un grupo indirecto para degradar mediante agentes biológicos o provenientes de sistemas biológicos. Tal es el caso como el quitosano, un biopolímero presente naturalmente en la pared celular de hongos, en los exoesqueletos de crustáceos así como de las alas y cutículas de algunas especies de insectos que es procedente de fuentes naturales y que puede actuar como un agente biológico para la degradación de la AfB₁; mencionando algunas de sus características de este biopolímero como su actividad antimicrobiana, en donde inhibe y produce sensibilidad en los hongos patógenos, actividad antibiótica reduciendo las enfermedades mejorando la resistencia de la planta y actividad antiviral en las plantas inhibiendo el crecimiento de colonias de hongos y los cambios en ella. Reuniendo todas estas aplicaciones y características y cabe mencionar que el quitosano es un excelente adsorbente de metales pesados, haciendo referencia a lo antes mencionado y por lo tanto se puede considerar una alternativa para el control de algunos hongos fitopatógenos como la aflatoxina B₁ (Lárez, 2003; Gibbs y col., 2004; Palma y col., 2007; Cartaya y col., 2009; Martínez y col., 2013).

1.2 Quitosano

La quitina es el polímero natural más abundante después de la celulosa. Fue descubierta en 1811 por Braconot, al aislar un material nitrogenado en sus estudios sobre la química de los hongos. Rouget descubrió en 1859 que el tratamiento de la quitina con una solución concentrada de hidróxido potásico a ebullición la modificaba transformándola en un compuesto soluble en soluciones de ácidos diluidos, más tarde designado como quitosano por Hoppe-Seiler (Gacén y col., 1996). Se produce por biosíntesis en los organismos y está presente en los caparazones de crustáceos, y moluscos, las paredes celulares de los hongos y la cutícula de los insectos (Bocourt y col., 2008). Esta es obtenida, principalmente, por separación directa del caparazón de crustáceos marinos; particularmente, los exoesqueletos de camarón contienen una alta concentración de quitina, de la cual es posible obtener quitosano (Hernández y col., 2009). Estos residuos sólidos contienen componentes extraordinariamente valiosos que pueden ser utilizados como materia prima en diversas industrias por lo que se calcula que entre un 20-58 % del peso seco de estos desechos es quitina (Belandria y col., 2008).

Entre los diversos biopolímeros disponibles, la celulosa y el quitosano son bien conocidos por sus propiedades atractivas, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad química (Shuai y col., 2014).

El quitosano ha presentado muchas ventajas en el campo agrícola, especialmente en el manejo y control de plagas, debido a su elevada actividad antibacteriana y baja toxicidad, entre otras, por lo que constituye un importante recurso renovable. Es un polisacárido lineal, poli [β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas] como se muestra en la Figura 1.3, que se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos. Además es un compuesto insoluble en agua, pero soluble en medio ácido. Se obtiene del biopolímero quitina, mediante procesos secuenciales de desmineralización, desproteínización y desacetilación. Además, es considerado uno de los polisacáridos más versátiles y ampliamente consumido en la industria de cosméticos, farmacéutica, química de polímeros, vinícola, cervecera y medicina (Díaz de Apodaca y col., 2007; Porras y col., 2009; Hernández y col., 2009).

Su versatilidad ha trascendido estas áreas y ha incursionado en la biotecnología de remediación de aguas residuales contaminadas por metales pesados y otros contaminantes mediante la adsorción (Navarro y col., 2010).

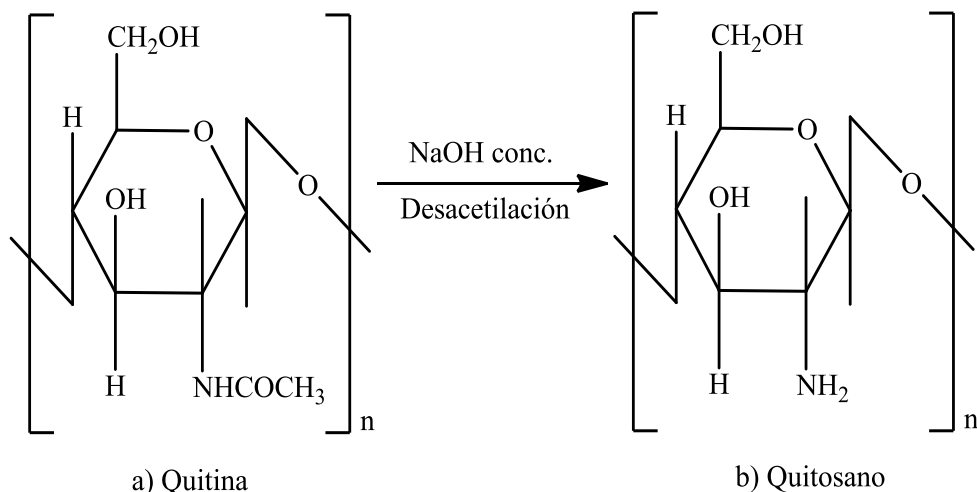


Figura 1.3. Estructura química de a) la Quitina y b) del Quitosano.

El quitosano es caracterizado por su alto contenido de nitrógeno, presente en la forma de grupos amino. Sin embargo, debido a su constante de acidez, que oscila entre 6,2 y 7,0 (dependiendo el grado desacetilación), está protonado en soluciones ácidas. Esto lo convierte en un poderoso adsorbente de iones negativamente cargados en solución a valores de pH menor que 6, mediante mecanismo de intercambio aniónico. La modificación química puede ser usada para incrementar la eficiencia y selectividad de adsorción.

1.2.1 Proceso de adsorción

A mediados del siglo XVIII se observó que las interfaces de un sistema, la concentración de la sustancia en la superficie es mayor que el volumen total. Sin considerar la magnitud y las características de las fuerzas que lo originan, a este fenómeno se le llamó sorción y a la sustancia en la que se efectúa dicho fenómeno sorbente. La sorción abarca un grupo de fenómenos, los más importantes son: absorción y adsorción. La absorción se refiere al proceso que tiene lugar en el volumen del sorbente, a la penetración de una sustancia dentro del material absorbente según sus propiedades polares, de manera que una sustancia polar será más afín a un absorbente polar y una sustancia apolar lo será a un absorbente apolar y la

adsorción se refiere al proceso que se lleva a cabo en la superficie del sorbente por lo que se basa en la retención del soluto a través de fuerzas físicas, normalmente de Van der Waals, asociadas con la superficie interna del sólido adsorbente. La adsorción se utiliza para eliminar de forma individual los componentes de una mezcla gaseosa o líquida, Figura 1.4. El componente a separar se liga de forma física o química a una superficie sólida, la cual recibe el nombre de adsorbente, y el componente que se adsorbe en él se denomina adsorbato. El fenómeno de adsorción fue estudiado por Langmuir quien consideraba que la superficie del adsorbente contiene un número fijo de lugares de adsorción y cada lugar puede adsorber una sola molécula (Aguilar, 1985; Margineda de Godos, 2004; Prieto y col., 2012).

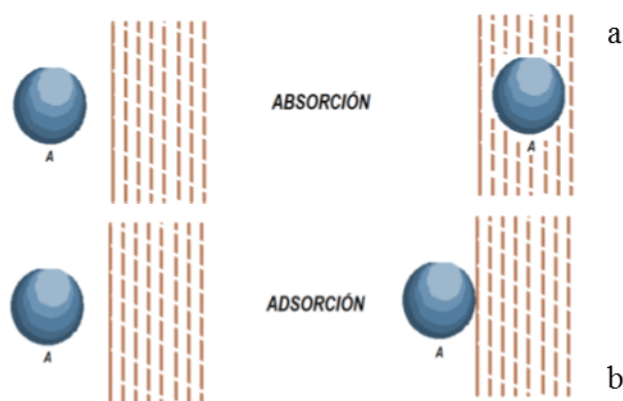


Figura 1.4. Descripción esquemática de los procesos de (a) absorción y (b) adsorción (Margineda de Godos, 2004).

Para entender los fenómenos de adsorción se han desarrollado diferentes modelos cuya validez se verifica por comparación con datos experimentales (Giles y col., 1973), generalmente se usan isotermas que son representaciones de la cantidad de componente retenido frente a la cantidad que permanece en disolución una vez alcanzado el equilibrio (Rodríguez, 2009). En función de su forma las isotermas de sorción pueden clasificarse en cuatro grupos (Figura 1.5) (Giles y col., 1960).

Las isotermas de adsorción son modelos matemáticos que describen la distribución de la especie adsorbato entre fases líquida y sólida, basada en un conjunto de supuestos que se relacionan con la heterogeneidad/homogeneidad de la superficie sólida, el tipo de cobertura, y la interacción adsorbato-adsorbente. La isoterma no solo proporciona información acerca de la afinidad de las moléculas de adsorbato para la adsorción, si no también refleja el modo posible para adsorber moléculas de adsorbato. La forma más común de obtener una isoterma

de adsorción, es determinar la concentración de la solución de adsorbato antes y después de los experimentos de adsorción que se han realizado para encontrar la cantidad adsorbida. En este estudio, los datos de equilibrio se analizaron usando el método de Freundlich y Langmuir Figura 1.6, (Foo y Hameed, 2010; Kalalagh y col., 2011).

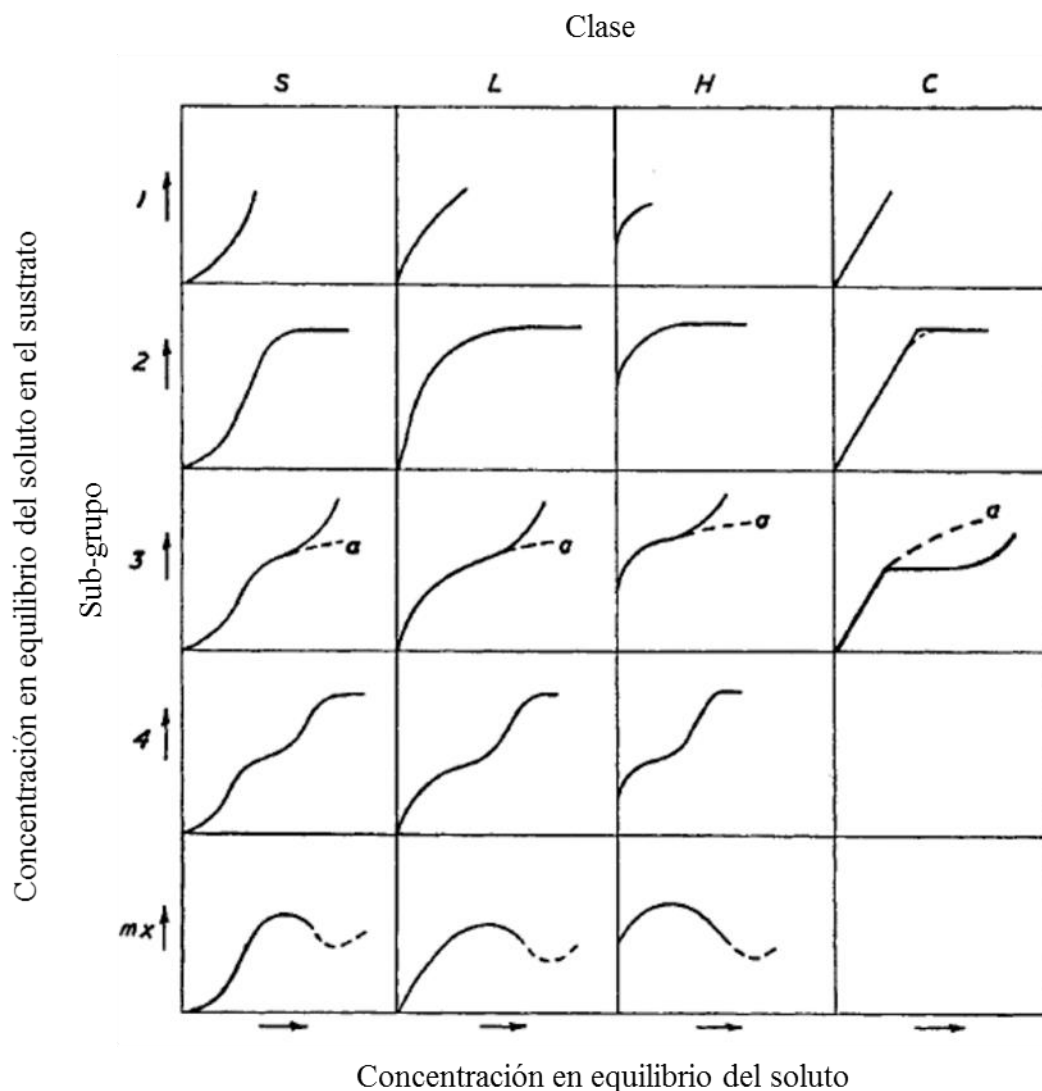


Figura 1.5. Sistema de clasificación de isotermas (Giles y col., 1960).

Teóricamente el modelo de Langmuir representa una interacción soluto-adsorbente de segundo orden y puede expresarse de la siguiente forma: toda la superficie tiene la misma actividad para la adsorción; no hay interacción entre las especies adsorbidas; toda la adsorción tiene lugar mediante el mismo mecanismo y el grado de adsorción es inferior a una capa mono molecular completa en la superficie (Limousin y col., 2007).

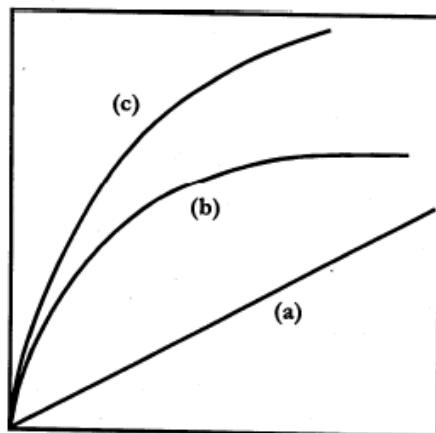


Figura 1.6. Isothermas de adsorción más comunes a) Lineal, b) Langmuir, c) Freundlich.

1.3 Estado del arte

Durante los últimos años hay bastante interés en la adsorción de contaminantes mediante adsorbentes de origen natural, en este caso el quitosano se presenta como una alternativa ambiental para adsorber la aflatoxina B₁. De acuerdo a investigaciones anteriores, la AfB₁ se ha podido remover mediante otro tipo de adsorbentes tanto de origen natural como químico o biológico, entre estos se encuentran las arcillas (bentonitas y mormorillonitas), suelos de origen volcánico, carbón activado, residuos orgánicos, entre otros.

Como presenta Silva (2014), utilizó como material adsorbente suelos de origen volcánico para adsorber la aflatoxina B₁, registrando la mayor cantidad de AfB₁ adsorbida de las siete muestras presentadas, de 0.0043 molKg⁻¹ (muestra P6).

Kong y colaboradores (2014), realizaron una serie de comparaciones entre varios tipos de adsorbentes para diversas micotoxinas, entre ellas la aflatoxina B₁, donde se encontró que el porcentaje mayor fue adsorbido por la muestra de bentonita D, dando un 99.2% de adsorción. Avantaggiato y colaboradores (2013), encontraron que el bagazo de uva (pulpa y cascara) funciona como un nuevo bioadsorbente para eliminar las micotoxinas de medios líquidos. Los valores experimentales para la máxima capacidad de adsorción registrado a pH 3 y 7 fueron, respectivamente, 1,53 ± 0,04 mgmg⁻¹ (4,89 ± 0,12 mmolKg⁻¹) y 1,54 ± 0,05 mgmg⁻¹ (4,94 ± 0,16 mmolKg⁻¹). Entre las ecuaciones de isothermas probadas, se obtuvo una mejor representación de los resultados experimentales de las isothermas de adsorción de AfB₁ utilizando los modelos Sips y Hill (R² > 0.998 y valores bajos de error). De acuerdo con los modelos Sips y Hill, la capacidad máxima de adsorción AfB₁ teórica fue 4,73 ± 0,77 mgmg⁻¹

¹ ($15,15 \pm 2,47 \text{ mmolKg}^{-1}$) y $4,69 \pm 0,55 \text{ mgmg}^{-1}$ ($15,02 \pm 1,76 \text{ mmolKg}^{-1}$) a pH 3 y 7, respectivamente.

Por otra parte Seifert y colaboradores (2010), utilizaron como materiales adsorbentes las bentonitas comerciales Astra-Ben 20A (AB20A) y Novasil Plus, y el Carbón activado, para secuestrar AfB₁ durante la extracción de proteína de la harina de maní contaminada. Los resultados de la capacidad relativa de los tres adsorbentes para eliminar AfB₁ de harina de cacahuate demuestran que Novasil Plus tiene una mayor capacidad de adsorción lo cual es de $0.0049 \text{ molKg}^{-1}$.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Obtención del quitosano

Los exoesqueletos de camarón crudo fueron conseguidos en restaurantes de mariscos de la ciudad de Puebla y el proceso de obtención fue en el laboratorio de materiales de la Facultad de Ingeniería Química mediante 3 etapas: desmineralización, desproteización y desacetilación.

2.1.1 Acondicionamiento de la materia prima

Se recolectaron exoesqueletos de camarón crudo. Posteriormente se procedió al lavado, secado, pulverizado y tamizado de estos como se muestra en la Figura 2.1. En el lavado se eliminaron patas, cola y restos de materia orgánica adherida. Se dejaron escurrir a temperatura ambiente durante 24 horas. Para eliminar el contenido de agua restante, se dejaron en una estufa a una temperatura de 90 °C durante 3 horas. Una vez secos, se pulverizaron en una licuadora convencional. La muestra pulverizada se pasó a través de un tamiz con un diámetro de 75 μm (malla N° 200).

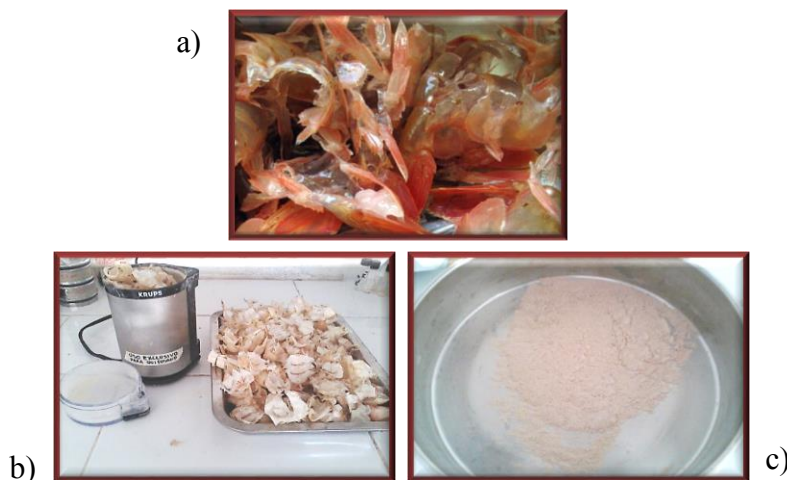


Figura 2.1. a) Recolección de exoesqueletos de camarón crudo, b) Lavado, secado y pulverizado y c) Tamizado.

De esta manera se logró tener 2 muestras de exoesqueletos de camarón crudo, procedentes del Pacífico (C_1) y del Golfo (C_2), respectivamente.

2.1.2 Aislamiento de la quitina

Para la etapa de la desmineralización, cada muestra se colocó en un vaso de precipitados con HCl a una concentración de 0.6 M, considerando una relación de 1:11 m/v y se hicieron reaccionar durante 3 horas a 30 °C con agitación constante de 300 rpm. Posteriormente se colectaron las muestras con ayuda de una malla de poliéster que se utilizó como filtro y se lavaron con agua destilada hasta llegar a un pH neutro, haciendo mediciones con ayuda de un potenciómetro Orión 4, para después ser secadas, primero a temperatura ambiente durante 24 horas para eliminar el exceso de agua y después de 90 °C durante 3 horas para eliminar la humedad remanente. Se continuó con la desproteínización de las dos muestras de polvo de los exoesqueletos de camarón crudo C₁ y C₂, con NaOH al 1% m/v a una relación 1:5 m/v a temperatura de 28 °C y con agitación constante de 300 rpm durante 24 horas (Figura 2.2) Al final se realizó el lavado hasta pH neutro y secado de la muestra, hasta esta etapa ya era quitina.

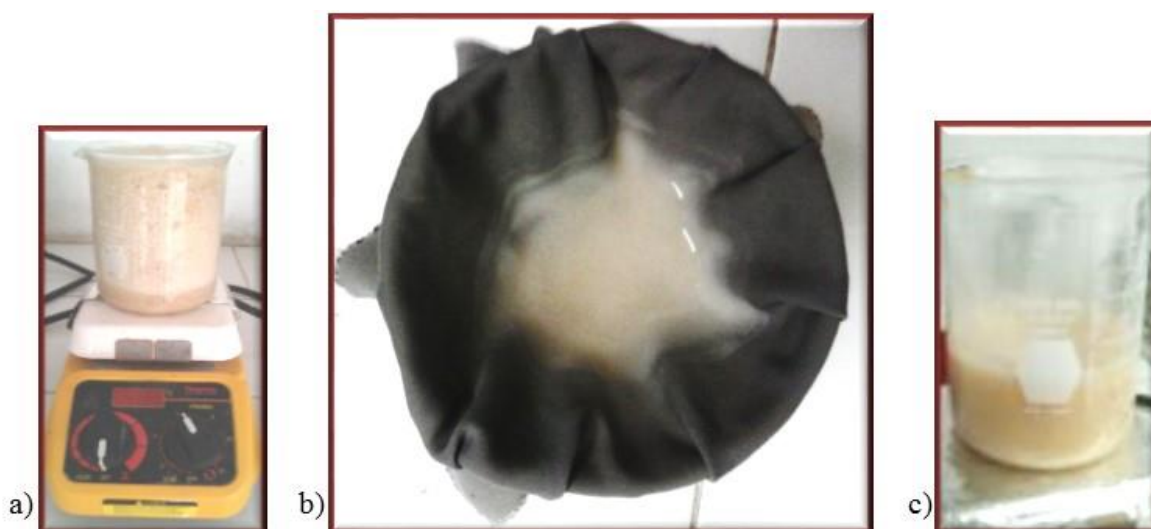


Figura 2.2. a) Desmineralización, b) lavado con agua destilada y c) desproteínización.

2.1.3 Desacetilación parcial de la quitina

A cada una de las muestras de quitina C₁ y C₂, se agregó un volumen de NaOH al 50% m/v manteniendo fija la cantidad de quitina, utilizando las proporciones m/v que se muestran en la Tabla 2.1; esto con la finalidad de obtener dos distintos grados de desacetilación. Las reacciones, con agitación constante de 700 rpm, se llevaron a cabo a una temperatura de 70 °C durante las primeras dos horas y a 115 °C durante las dos siguientes horas. Se utilizó un

sistema refrigerante para evitar la evaporación de la disolución de NaOH y favorecer el contacto entre el reactivo y la quitina durante toda la reacción. Por último, se realizó el lavado y el secado de cada muestra de la misma forma en que se realizó para la etapa de desproteínización. Al final se obtuvieron dos muestras desacetiladas de quitina, quitosano 1 y 2, respectivamente.

Tabla 2.1. Condiciones de cada etapa del proceso para la obtención de quitosano.

Materia prima	Desmineralización	Desproteínización	Muestra	Desacetilación	
					Proporción quitina (g)/NaOH (mL)
Exoesqueletos de camarón crudo	HCl 0.6 M 1:11 m/v 30 °C 3 h	NaOH 1% m/v 1:5 m/v 28 °C 24 h	1	NaOH 50% m/v 2 h 70 °C	1: 3.5
			2	115 °C	1 : 4.0

2.2 Caracterización del quitosano

2.2.1 Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de cada muestra de quitosano (1 y 2) fue obtenido utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer con transformada de Fourier y sistema ATR (Figura 2.3). Se secaron las muestras durante 4 horas a 105 °C y se utilizaron aproximadamente 0.05 g de cada una de ellas. El barrido se realizó en la región de 4000-600 cm^{-1} , que es donde se encuentran las vibraciones propias de los grupos funcionales orgánicos. Los grupos funcionales -OH, -NH₂, C=O, CH₂, N-H, C-O-C y C-H, son los característicos del quitosano.



Figura 2.3. Espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier y sistema ATR.

2.2.2 Valoración potenciométrica

Para determinar el grado de desacetilación se disolvieron 0.5 g de cada muestra de quitosano en HCl a concentración 0.3 M en una proporción 1:70 (g quitosano/ mL HCl); como solución titulante se utilizó NaOH 0.1018 M. La titulación se mantuvo a una agitación constante de 250 rpm. Por cada 0.5 mL de la solución titulante agregados se realizaron lecturas de pH mediante un potenciómetro Orión 4. Se eligió este método debido a su rapidez, bajo costo y exactitud. Con los datos graficados se generaron curvas donde se obtuvieron dos puntos de inflexión, para determinar el valor de los puntos, se aplicó el criterio de la primera derivada. El primero de ellos correspondió a la neutralización del HCl en exceso, mientras que el segundo indicó la desprotonación de los grupos funcionales amina, la diferencia entre ellos permitió calcular el porcentaje de estos grupos funcionales en la cadena polimérica del quitosano mediante la siguiente expresión:

$$\%NH_2 = \frac{16.1(y-x)}{w} \times f \quad (2.1)$$

Donde:

y = Punto de inflexión mayor (mL)

x = Punto de inflexión menor (mL)

f= Molaridad de la solución de NaOH (mol/L)

w= Masa de la muestra (g)

16.1= Valor relacionado con el peso equivalente del quitosano (NH_2)

2.2.3 Solubilidad

Una de las características más importantes que confirman que una muestra obtenida a partir de quitina sea quitosano es su solubilidad en medios ácidos. Por lo que se preparó una solución de ácido acético 1 M, en seguida se pesaron 0.2001 gramos de cada una muestra de quitosano y se agregó el ácido acético a una relación de 2% m/v. Se mezcló y agitó constantemente el quitosano en la solución de ácido acético 1M hasta lograr que la solución quedara lo más transparente posible. Al disolver la muestra de quitosano en el ácido acético se formó una solución con un aspecto similar a un gel.

2.3 Determinación de la capacidad de adsorción

La determinación de la capacidad de adsorción constó de 2 etapas, a) determinar el tiempo necesario para obtener una máxima adsorción y b) realizar isothermas.

Etapa a)

Como se observa en la Figura 2.4 para realizar la primera etapa se partió de la solución madre de 1000 ppm de AfB_1 y acetonitrilo como disolvente; en seguida se tomó una alícuota de esta solución para preparar la solución de trabajo a 8 ppm de AfB_1 de la solución madre aforando con agua destilada en un matraz a 50 mL. Posteriormente se pesaron 10 mg de quitosano en cada tubo para centrifuga previamente esterilizados donde también se agregaron alícuotas de solución de trabajo y agua destilada para obtener una concentración de 4 ppm de AfB_1 a un volumen de 5 mL por cada tubo. En consecuencia se prepararon tres controles con 10 mg de quitosano y 5 mL de agua y otro solamente con solución de AfB_1 a 4 ppm de AfB_1 como referencia. A continuación las muestras preparadas así como controles y referencia se agitaron a 200 rpm durante 2, 4 y 24 horas, seguido de una centrifugación a 2000 rpm por 20 min. Inmediatamente se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-vis a 364 nm (longitud característica de la AfB_1).

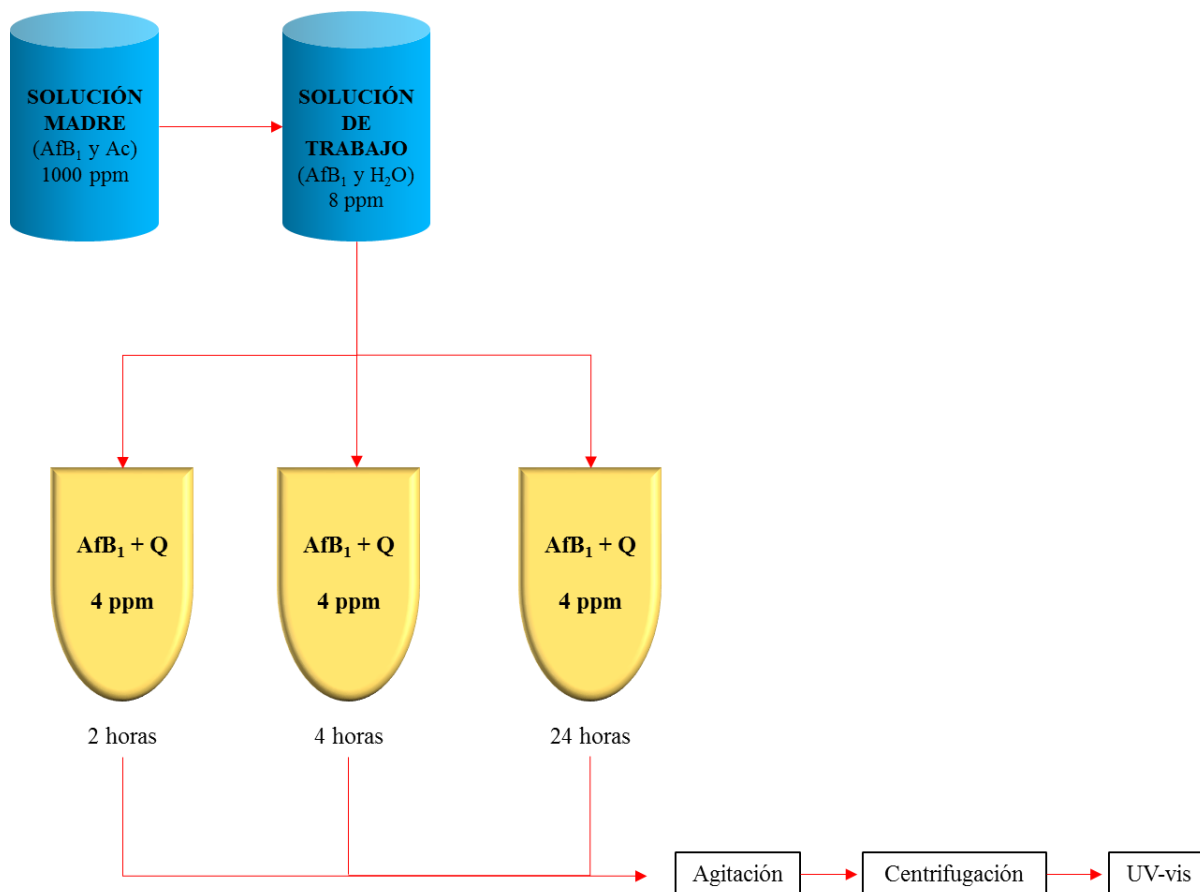


Figura 2.4. Diagrama para determinar el tiempo de máxima adsorción.

Etapas b)

Ya obtenido el tiempo necesario para obtener una máxima adsorción, se llevó a cabo la preparación de la curva de calibración y de las isothermas, donde se prepararon a partir de la solución de trabajo de 8 ppm de AfB₁, a concentraciones crecientes de 0.0, 0.4, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8 ppm y con un volumen total de 3 y 5 mL, respectivamente.

El procedimiento para determinar la capacidad de adsorción se ajustó a la metodología de Kannevischer y colaboradores (2006) como se muestra en la Figura 2.5, por lo que se hizo uso de la expresión lineal de la ecuación de Langmuir (2.2) y Freundlich (2.3).

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{k_d Q_{max}} + \frac{C_{eq}}{Q_{max}} \quad (2.2)$$

Donde:

C_{eq} : concentración en equilibrio

q : cantidad adsorbida AfB₁

K_d : coeficiente de distribución (Constante de equilibrio en el proceso de sorción)

Q_{max} : capacidad máxima de absorción

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{\ln C_e}{n} \quad (2.3)$$

Donde:

q_e : capacidad de adsorción en equilibrio

K_F : constante de energía de enlace

n : es el exponente Freundlich relacionada con la intensidad de adsorción

2.4 Caracterización por infrarrojo de la muestra de la AfB₁ y quitosano

El espectro IR de la muestra de la interacción de la AfB₁ y quitosano fue obtenido utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer con transformada de Fourier y sistema ATR donde se realizó en la región de 4000-600 cm⁻¹. Se pesaron 5 mg de quitosano 1 en un tubo para centrifuga agregando 2.5 mL de una solución de 25 ppm de AfB₁, posteriormente se agito a 200 rpm y centrifugo a 2000 rpm. La muestra resultante se secó durante 24 horas a temperatura ambiente. De esta manera se verificó si la muestra obtenida después de la interacción contiene a la AfB₁ adsorbida en el quitosano, por lo que se pudo conocer si existe un nuevo enlace o una nueva molécula. La Figura 2.5 muestra el espectro IF de la AfB₁ y sus grupos funcionales característicos (Tabla 2.2).

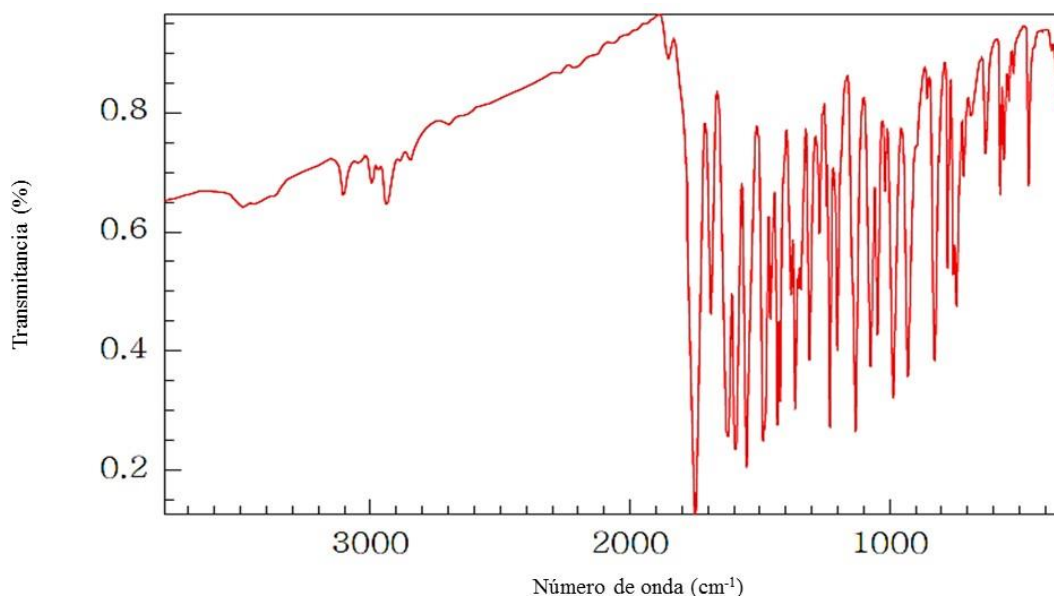


Figura 2.5. Espectro de absorción infrarroja de la aflatoxina B₁.

Tabla 2.2. Bandas características de la AfB₁ (Mirghani y col., 2001).

Intervalo	Grupo funcional
3004–2969	CH ₂
1744–1720	C=O
1364–1369	O-CH ₃
1217–1220	CH
1035–1037	C-O-C
900–902	H

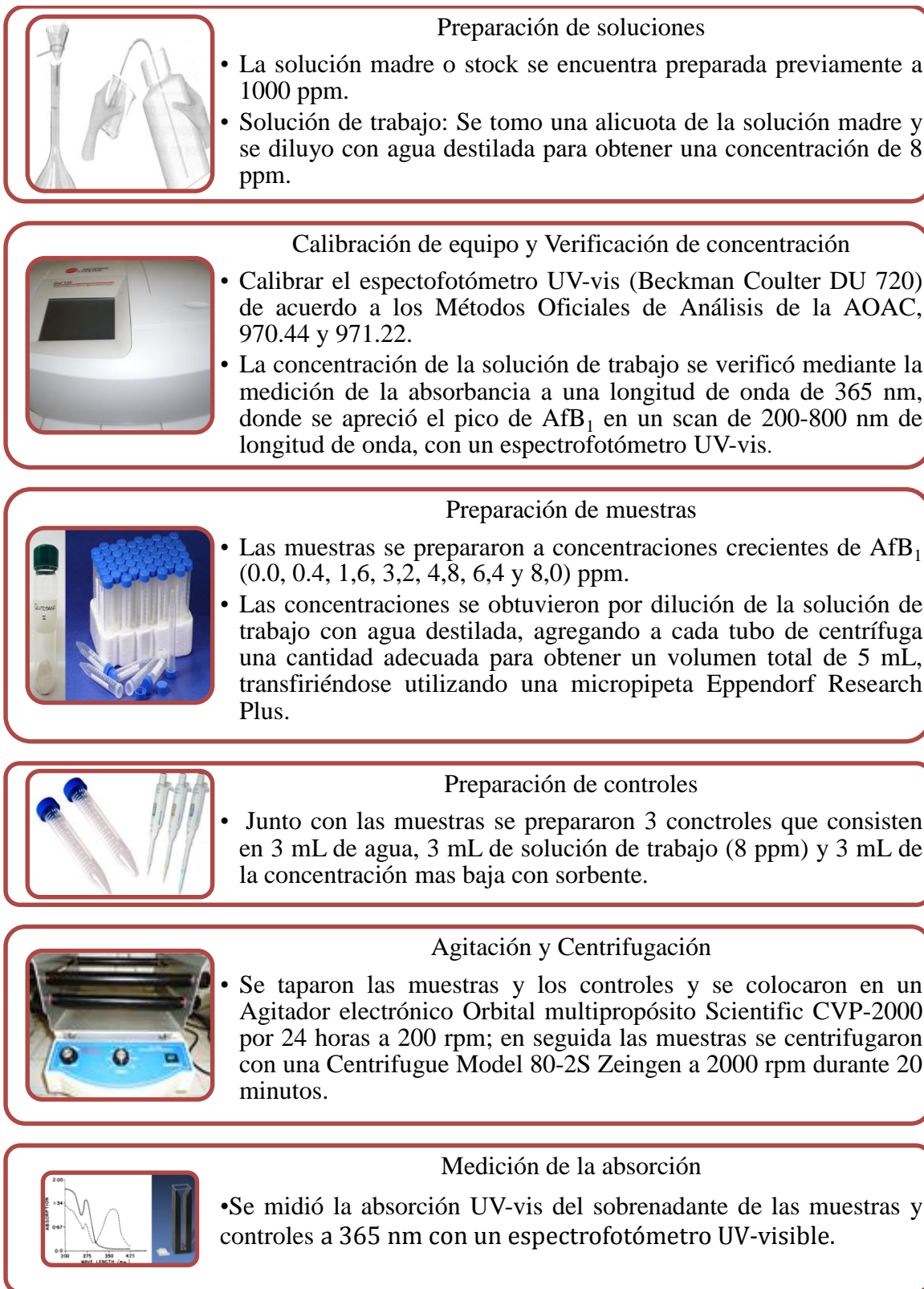


Figura 2.5. Procedimiento para determinar la capacidad de adsorción de una muestra sólida, mediante el uso de isotermas, adaptado de Kannevischer y col. (2006).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de quitosano

Se obtuvieron dos muestras de exoesqueletos de camarón crudo (C_1 y C_2) por lo que al pulverizar, se obtuvo un polvo de color beige y beige claro. Posteriormente se realizó la etapa de la desmineralización en la que fueron removidos pigmentos y sales inorgánicas, donde se observó que las muestras obtenidas comparadas con el polvo anterior disminuyó un poco el color. En la etapa de la desproteización donde en este proceso es eliminado la mayor cantidad de proteína y otros componentes traza remanentes de etapas anteriores, resultaron dos muestras de quitina mostrando características físicas como el color naranja pálido y hueso correspondientemente, hasta este momento con olor aun a camarón y las dos muestras presentaban una textura tipo limoso. Finalmente, en la desacetilación donde se llevó a cabo la conversión de quitina a quitosano (1 y 2), presentaron un cambio en su aspecto físico mostrando un color blanco sobresaliendo con más intensidad la muestra de quitosano 1, una textura semejante a la harina y sin olor a camarón.

En la Tabla 3.1 se muestra el rendimiento que se obtuvo y la cantidad resultante de cada etapa para la obtención de quitosano. Reflejando un rendimiento entre el 19 y 23% de las muestras tamizadas al inicio del proceso. Es decir que, por cada 5 g de exoesqueletos de camarón molido, se obtiene 1 g de quitosano aproximadamente.

Tabla 3.1. Cantidades obtenidas en cada etapa para la obtención de quitosano.

Muestra	Camarón crudo Muestra _i (g)	Cantidad de muestra obtenida en cada etapa (g)			Quitosano Muestra _f (g)
		Desmineralización	Desproteización	Desacetilación	
1	48.8745	21.6117	10.256	6.989	3.9876
2	104.7743	30.1463	17.697	10.124	7.5519

3.2 Caracterización del quitosano

3.2.1 Espectroscopía de infrarrojo

En la Figura 3.1 se observa el espectro de absorción de quitosano 1, se puede observar la aparición de la banda del grupo amino a 1618 cm^{-1} , al estiramiento de la banda del grupo O-H a 3437 cm^{-1} , el estiramiento del grupo N-H a 3262 cm^{-1} y al estiramiento de C-H de los alquenos a 2875 cm^{-1} . De igual manera se aprecia la banda del estiramiento de C=O (característica de la amida I) a 1662 cm^{-1} , en 1553 cm^{-1} la flexión NH_2 (deformación en el plano CONH), a 1418 cm^{-1} se presenta la deformación del grupo CH, a 1316 cm^{-1} se muestra la banda de la amida terciaria y la vibración del grupo $-\text{CH}_2$, a 1153 cm^{-1} donde se hace presente el estiramiento del puente C-O-C y por último se muestra el estiramiento del grupo C-O a 1027 cm^{-1} .

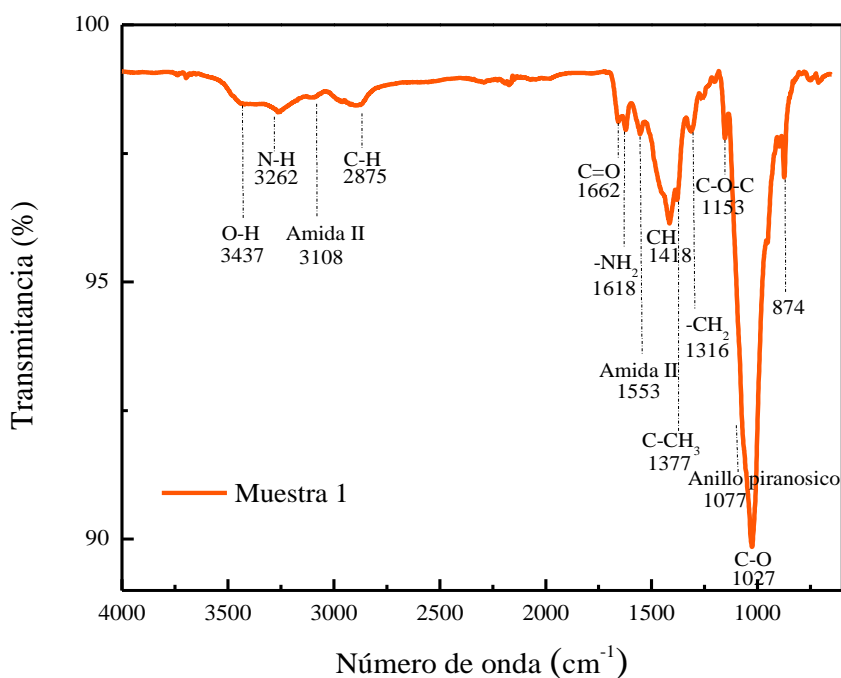


Figura 3.1. Espectro de absorción de la muestra desacetilada (Quitosano 1).

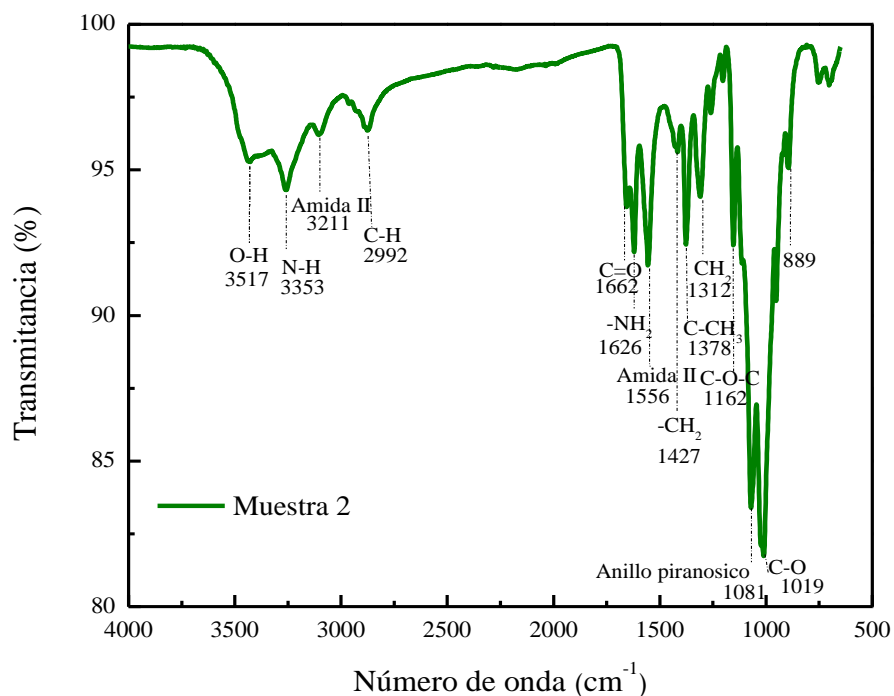


Figura 3.2. Espectro de absorción de la muestra desacetilada (Quitosano 2).

Por otro lado, en el espectro de quitosano 2 (Figura 3.2) se aprecian las bandas bien definidas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano, la única diferencia del espectro del quitosano 1 es una intensidad mayor, de tal manera se confirmó la identidad química del biopolímero. Por lo que estas diferencias pueden estar atribuidas a la procedencia de los exoesqueletos de camarón crudo y al grado de desacetilación obtenido (Cho y col., 2000; Hu y col., 2007; Rudall, 1963; Sikorski y col., 2009; Muzzarelli y col., 2007).

3.2.2 Valoración potenciométrica

Las Figuras 3.3 y 3.4 contienen la curva de titulación del quitosano de la muestra 1 y 2 respectivamente, en la que se observa dos puntos de inflexión. El primero (A) corresponde a la neutralización de los protones H^+ libres, mientras que el segundo (B) indica la neutralización de los grupos funcionales amina protonados; por lo tanto, la diferencia entre ellos corresponde a la cantidad de NaOH consumido en la desprotonación de los grupos amina de la muestra de quitosano.

Los puntos de inflexión se hallaron mediante la primera derivada Tabla 3.2 y 3.3, (a) primer punto de inflexión (menor) y (b) segundo punto de inflexión (mayor).

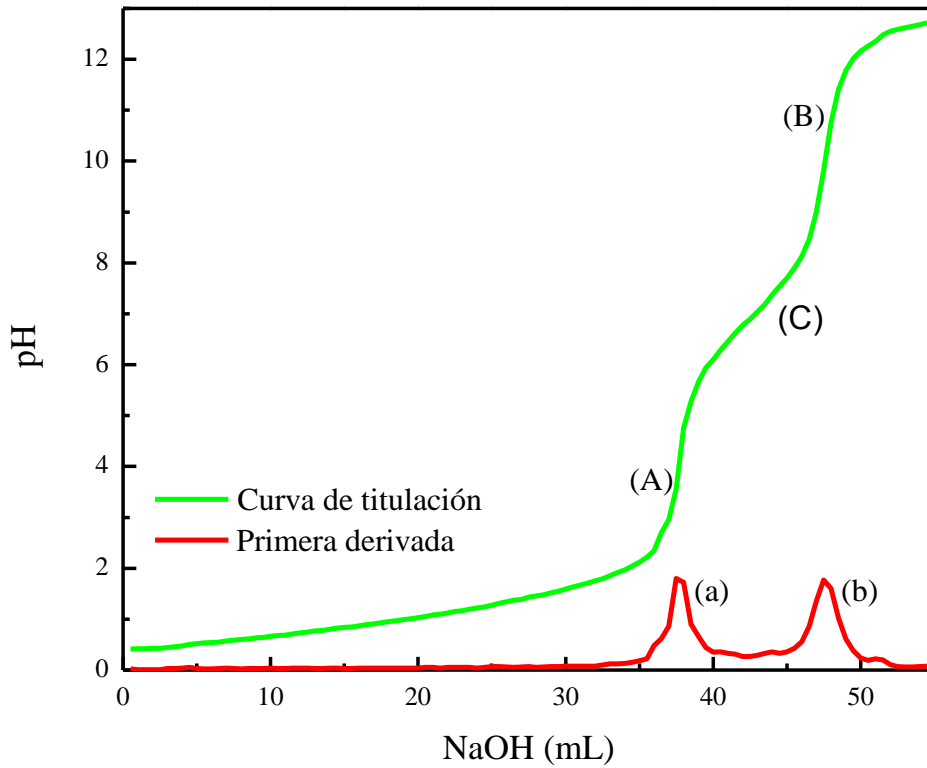


Figura 3.3. Curva de titulación de la muestra de quitosano 1 y la primera derivada mostrando los máximos (a) y (b) que corresponden a los puntos de inflexión.

Tabla 3.2. Puntos de inflexión.

Muestra		x	y
Quitosano 1	(a)	37.27	1.78
	(b)	47.42	1.75

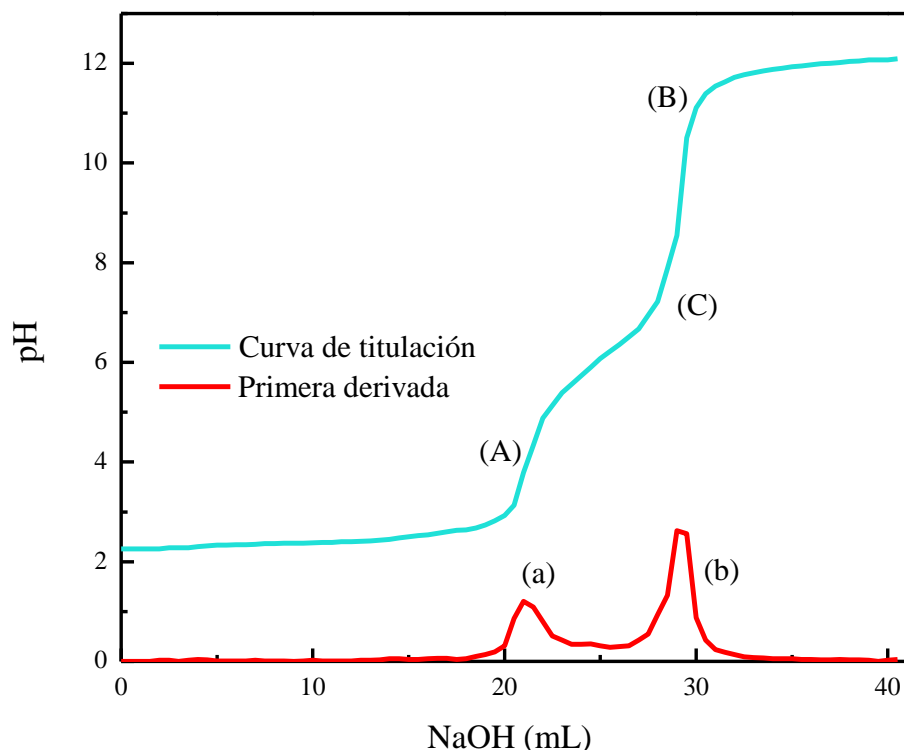


Figura 3.4. Curva de titulación de la muestra de quitosano 2 y la primera derivada mostrando los máximos (a) y (b) que corresponden a los puntos de inflexión.

Tabla 3.3. Puntos de inflexión.

Muestra		x	y
Quitosano 2	(a)	21.15	1.12
	(b)	29.26	2.58

La sal de quitosano formada durante la titulación comenzó a precipitar a un pH mayor a 6.5 aproximadamente (C). Estos valores de inflexión en la ecuación (2.1), considerando la molaridad de 0.1018 de la solución de NaOH; el porcentaje de desacetilación hallado para cada muestra fue de 81 y 65.5 %, respectivamente. Considerando que un grado mayor a 50% corresponde a quitosano (Cartaya y col., 2009).

3.2.2 Solubilidad

La muestra 1 al agregar el ácido acético presentó un olor característico del camarón y poca viscosidad, la muestra 2 exhibió una mayor viscosidad que la de la muestra 1 parecida a la glicerina como se muestra en la Figura 3.5. Cabe mencionar que ninguna de las dos muestras gelificaron, pero si hubo una disolución de las muestras de quitosano en el disolvente orgánico utilizado, por lo que se pueden considerar quitosano.

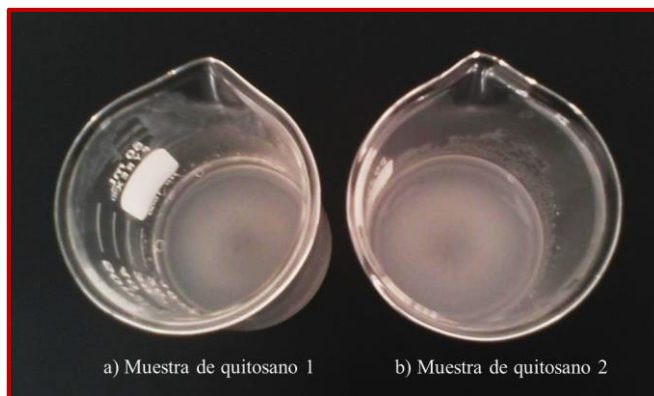


Figura 3.5. Prueba de solubilidad de la muestra de a) quitosano 1 y b) quitosano 2.

3.3 Determinación de la capacidad de adsorción

3.3.1 Calibración de equipo de espectroscopía UV- vis

Al realizar la calibración del equipo se obtuvo un factor de corrección (CF) < 1.05 , de acuerdo a los métodos Oficiales de Análisis de la AOAC.

3.3.2 Determinación del tiempo de máxima adsorción

Se realizaron pruebas tamizando las muestras primero a $75 \mu\text{m}$ y después a $38 \mu\text{m}$, debido a lo que mencionan Avantaggiato y colaboradores (2013), observaron que al disminuir el tamaño los valores en la adsorción aumentan. Las muestras presentan un tamaño menor o igual a las que se tamizaron. Siendo así, existen tamaños de partículas menores a estas, por lo que, se puede suponer que las partículas más pequeñas sean las que tengan una mayor adsorción y área de contacto. Es por eso que en las pruebas se reportaron concentraciones más bajas para el tamaño de partícula de $38 \mu\text{m}$ y con este tamaño se realizaron las isotermas de adsorción.

En la Figura 3.6 se presentan las concentraciones que se obtuvieron a partir de las absorbancias obtenidas de las muestras preparadas a 2, 4 y 24 horas de contacto utilizando el espectrofotómetro UV-vis. Se observa una disminución de la concentración de AfB₁ en comparación con la concentración inicial de 4 ppm, esto sucedió conforme se fue aumentando el tiempo, alcanzando una máxima adsorción a las 24 horas de contacto. La concentración de la solución remanente o final fue de 4.109E-06 ppm de AfB₁ con el quitosano 1 y 6.697E-06 ppm de AfB₁ con el quitosano 2.

Cabe mencionar que el contacto entre el sorbato y el sorbente también se realizó a 48 horas, donde se obtuvo una insignificante disminución en la concentración de AfB₁ comparada con el tiempo de 24 horas. De esta manera se considera que el adsorbato espontáneamente tiende a ocupar toda la superficie del adsorbente. Para cada concentración del adsorbato en la fase líquida existe un estado de equilibrio de la adsorción (Aguilar, 1985), por lo que referido a las 24 y 48 horas de contacto, se puede añadir que el sistema está creando un estado de equilibrio (Delesite, 2001) y ya no es posible adsorber más AfB₁. Algunos suelos de origen volcánico (P6, P9, Tete, P2M3, entre otras) requieren de 24 horas para lograr la máxima adsorción, mientras que la bentonita Astraben y el bagazo de uva requieren solamente de 1 y 2 horas, respectivamente. Los dos últimos no se utilizan directamente, sino que requieren de tratamientos adicionales.

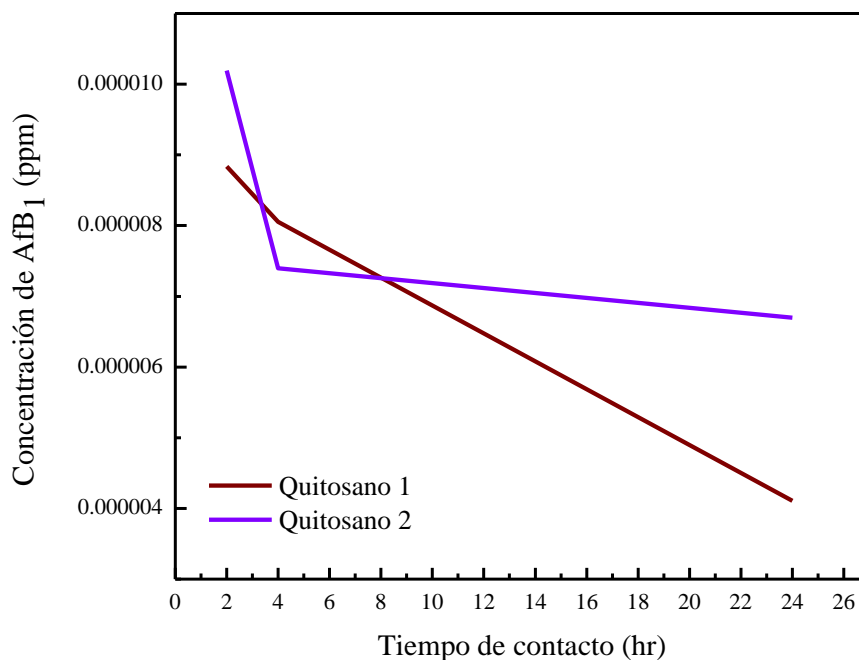


Figura 3.6. Concentración de AfB₁ como función del tiempo de contacto.

3.3.3 Isothermas de adsorción

En la Figura 3.7 se presenta la isoterma de adsorción empleando la muestra 1 por el modelo de Langmuir y la representación supuesta de la formación de monocapas, los valores se calcularon de acuerdo con la naturaleza de la pendiente de la parte inicial de la curva y posteriormente, en sub-grupos. La curva corresponde a la clase L sub-grupo 2, en la que se observa un incremento en la sorción de AfB₁ mediante el aumento de la concentración, por lo que se obtuvo una capacidad de adsorción de 0.0067 molKg⁻¹. Al linealizar los datos experimentales de acuerdo con el modelo de Langmuir, para los valores de las concentraciones, se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.96, lo cual sugiere un buen ajuste del proceso de adsorción de la AfB₁ a dicho modelo y por lo tanto presenta valores más cercanos a la linealidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede sugerir que la adsorción es específica y probablemente se haya formado una monocapa. La isoterma de forma L2, indica que las moléculas de AfB₁ deben estar fuertemente unidas al quitosano, teniendo una fuerte atracción intermolecular, donde se puede confirmar la teoría del método de Langmuir en donde asume que la cobertura de la monocapa del adsorbato sobre una superficie del adsorbente es

homogénea, por lo que la adsorción de cada molécula tiende a una energía de activación igual y por consiguiente tiene lugar en sitios específicos dentro del adsorbente. Una meseta caracteriza a la isoterma de Langmuir; además si la isoterma muestra una forma convexa entonces la adsorción es favorable (Delle, 2001; Margineda, 2004; Allen y col., 2004; Rodríguez, 2009).

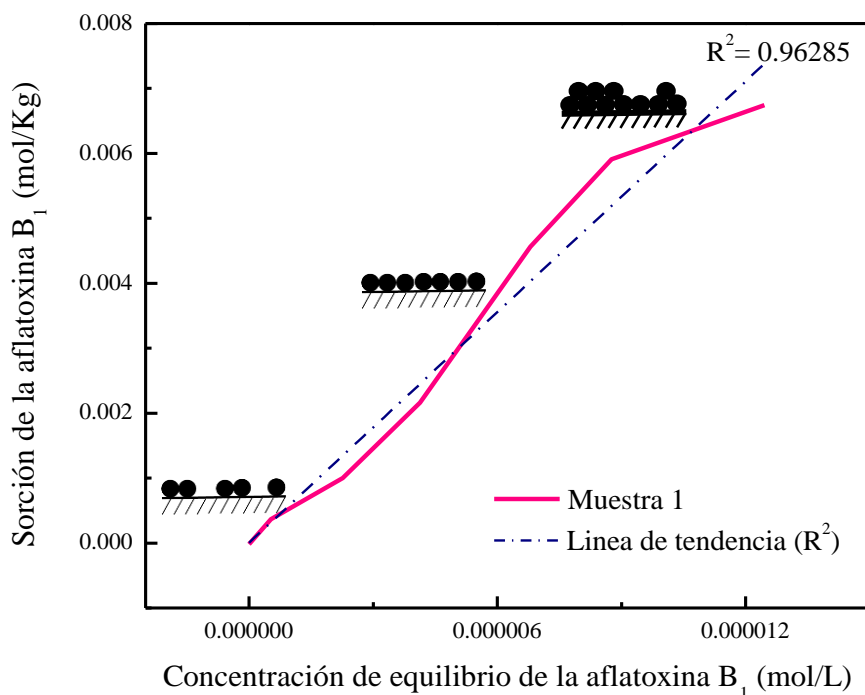


Figura 3.7. Isoterma de Langmuir: Adsorción de la AfB₁ mediante quitosano de la muestra 1 y representación de la formación de monocapas.

Por otra parte, en un estado de equilibrio se alcanza un punto de saturación, por lo que ya no puede ocurrir más la adsorción, es entonces donde se presenta la capacidad de adsorción o máxima adsorción del adsorbato en el adsorbente. El proceso de adsorción se lleva a cabo hasta que la energía libre alcanza un mínimo. El equilibrio existe cuando las fuerzas involucradas son del tipo van der Waals (incluyendo fuerzas tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, fuerzas de London y hasta posiblemente enlaces de hidrógeno) (Ponce de León, 2001).

La isoterma de adsorción en el modelo de Langmuir correspondiente a la muestra 2 (Figura 3.8) pertenece a la clase L del sub-grupo 4 la cual sugiere la formación de monocapas (Giles, 1960; Delle, 2001). En la curva se presentan cuatro puntos de inflexión, después de los tres

primeros hay un periodo de equilibrio, atribuido a que la isoterma tiende a una estabilización en la concentración al formarse otra capa. Se puede observar que en la parte final del cuarto punto de inflexión la curva se presenta cóncava o decreciente haciéndose notoria una desorción. En esta isoterma aunque se efectuó por el método de Langmuir no presenta una buena estabilidad en la adsorción. La capacidad de adsorción fue de $0.00203 \text{ molKg}^{-1}$ y R^2 de 0.57, mucho menor que la obtenida en la muestra 1.

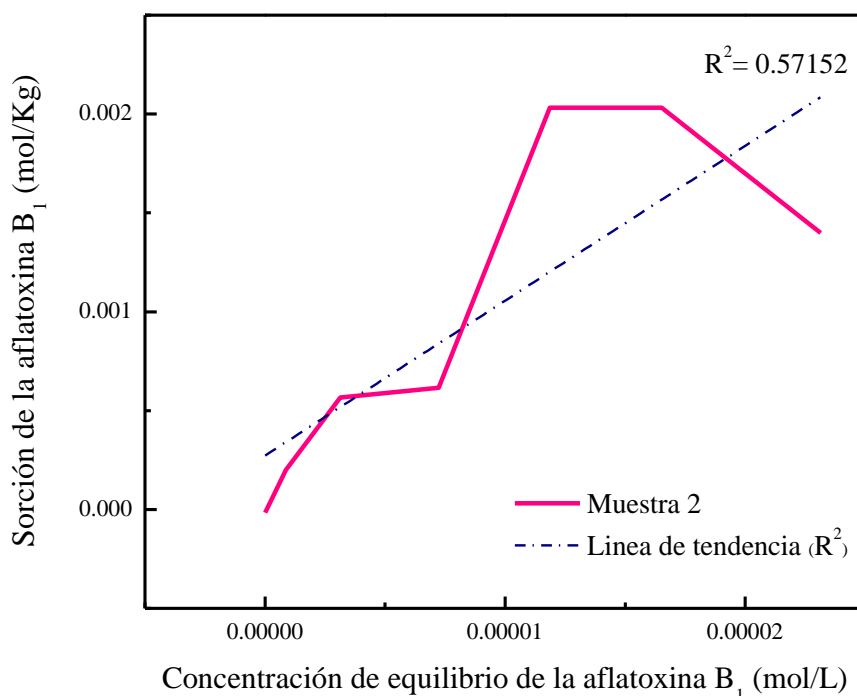


Figura 3.8. Isotherma de Langmuir: Adsorción de la AfB₁ mediante quitosano de la muestra 2.

Por otro lado, en la Figura 3.9 se presenta la isoterma realizada por el modelo de Freundlich de la muestra 1, con una capacidad de adsorción de 0.006 molKg^{-1} con un R^2 de 0.99, por lo que se aproxima más a la linealidad que por el modelo de Langmuir con la misma muestra y presenta un excelente ajuste. En la Figura 3.10 que presenta la isoterma con la muestra 2, se obtuvo una capacidad de adsorción de $0.0002 \text{ molKg}^{-1}$ con un R^2 de 0.44 muy por debajo de la isoterma que se realizó para el método de Langmuir.

Para poder determinar si el método es favorable a la adsorción, es preciso identificar el parámetro n . En la Tabla 3.4 se puede ver que en el caso de la muestra 2 es negativo (-0.7) dando una evaluación desfavorable, en comparación con la muestra 1, que presenta un

exponente n de 0.81. La constante n es el exponente de la ecuación de Freundlich, que representa el parámetro que caracteriza la heterogeneidad energética de la superficie de adsorción, teniendo valores comprendidos en el intervalo de 1 a 10 para su clasificación como adsorción favorable. Por los resultados obtenidos se observa que la n es menor que 1, por lo que la adsorción es desfavorable con la muestra de quitosano 2.

Tabla 3.4. Parámetros de las isotermas de Langmuir y Freundlich de la adsorción de AfB₁ en quitosano.

Muestra	Langmuir			Freundlich		
	q (molKg ⁻¹)	K_L	R^2	K_F (mol ¹⁻ⁿ L ⁿ kg ⁻¹)	n	R^2
1	0.0067	51204	0.9628	72.09	0.81	0.9916
2	0.0014	1.67E+05	0.5715	6.41E-06	-0.7	0.4489

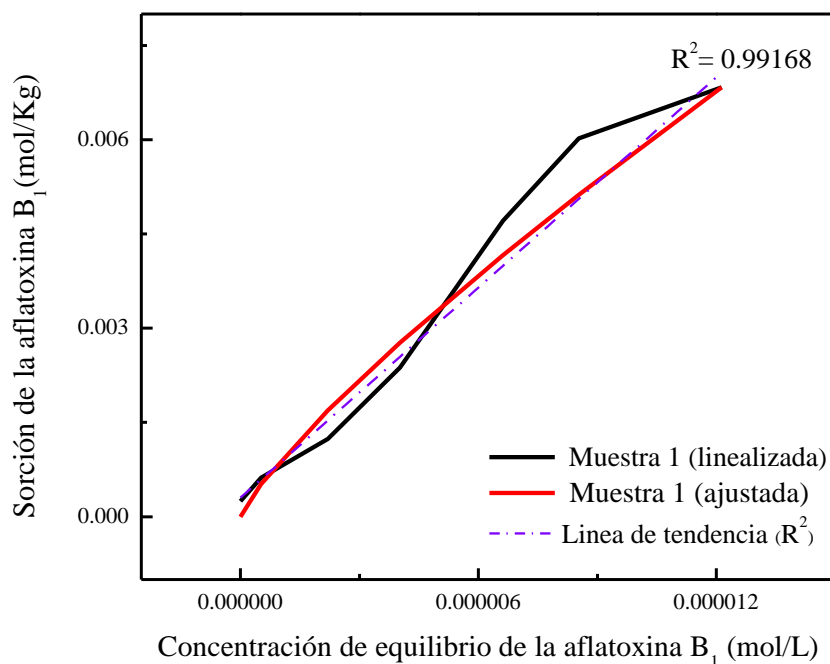


Figura 3.9. Isoterma de Freundlich: Adsorción de la AfB₁ mediante quitosano de la muestra 1.

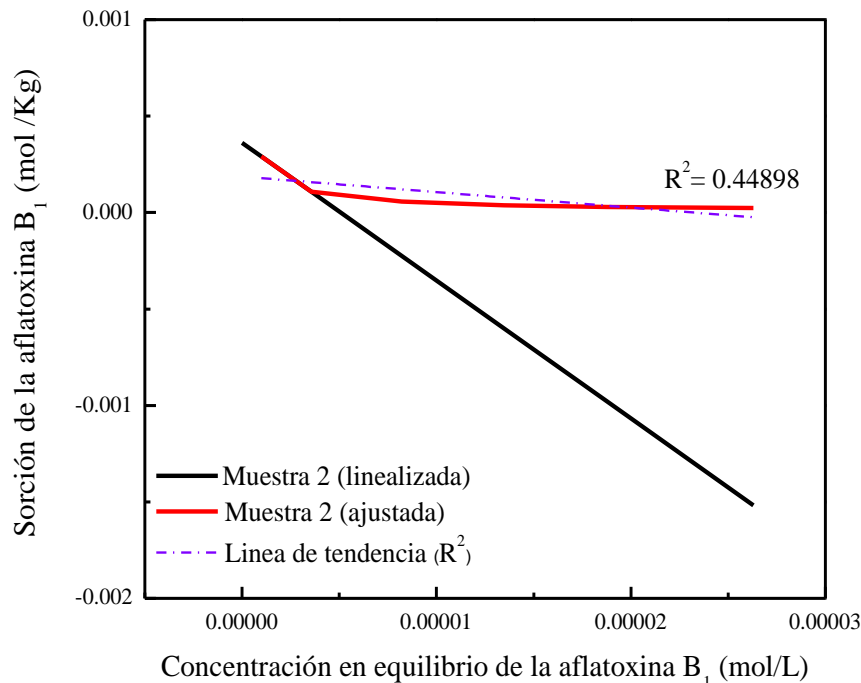


Figura 3.10. Isoterma de Freundlich: Adsorc3n de la AfB₁ mediante quitosano de la muestra 2.

Examinando las gráficas (Figura 3.9 y 3.10) se observan dos l3neas debido a que se realiz3 una comparaci3n con el m3todo de Langmuir, donde la l3nea color negra indica a la isoterma por el m3todo de Freundlich linealizada y la roja representa al modelo ajustado de Freundlich. Debido a que los datos de adsorc3n en la muestra 1 (Figura 3.9) son consistentes con el modelo de Freundlich, se asume que la superficie del adsorbente es energ3ticamente heterog3nea, conformada por grupos de sitios de adsorc3n de energ3as caracter3sticas. Tambi3n en esta isoterma se considera que no existen interacciones laterales entre las mol3culas adsorbidas y que s3lo se adsorbe una monocapa (Lazo y col., 2008), contrario para la muestra 2 (Figura 3.10).

Por otro lado, se puede apreciar claramente que la muestra 1 se ajusta en buena medida a ambos modelos. En el modelo de Langmuir el coeficiente de determinaci3n es menor que en el modelo de Freundlich, es decir, se tiene un mejor ajuste, por lo tanto este modelo es el que mejor describe la adsorc3n de AfB₁; la capacidad de adsorc3n es relativamente la misma en ambos modelos. Recientemente se utilizaron otros materiales como adsorbentes de AfB₁ con capacidad de adsorc3n inferior a la obtenida con el quitosano, tal es el caso de algunos suelos

de origen volcánico ($0.0043 \text{ molKg}^{-1}$), de la bentonita Astraben ($0.0049 \text{ molKg}^{-1}$) y del gabazo de uva (0.004 molKg^{-1}), colocando al quitosano como un nuevo material adsorbente de AfB₁. Por otra parte, las isothermas de la muestra 2, están muy alejadas de los dos modelos empleados, por lo tanto, la capacidad de adsorción obtenida no es confiable. La diferencia en la capacidad de adsorción entre la muestra 1 y la 2 se atribuye al grado de desacetilación, en la muestra 1 es de 81% mientras que en la segunda de 65.5%, es decir, a mayor grado de desacetilación mayor capacidad de adsorción. La diferencia en este parámetro es también consecuencia de la diferencia en el origen de los camarones utilizados, ya que se han reportado diferentes propiedades dependiendo de su origen. Cabe mencionar que las dos muestras se obtuvieron químicamente bajo las mismas condiciones.

Existen bases suficientes como para suponer que se atribuye a una fisorción, debido a que el fenómeno de la adsorción es originado por la existencia de un exceso de la energía libre de la superficie, a las características que presentó la muestra al ponerse en contacto con la AfB₁ y a las condiciones que se establecieron para su obtención. En la actualidad es muy difícil determinar el tipo de adsorción se está tratando; sin embargo, existe una serie de criterios que permiten, en forma aproximada, establecer las particularidades de la fisorción como: en las isothermas de adsorción existió más de una capa de adsorción, no fue necesario proporcionar calor ya que esta se efectuó a temperatura ambiente, por lo tanto no necesita una energía de activación debido a que es un proceso espontaneo y por último, la fisorción siempre es reversible, por lo que se establece un equilibrio adsorción-desorción (Aguilar, 1985).

Las características descritas anteriormente resultan ser muy atractivas para el uso de este material en adsorción física.

3.3.4 Espectroscopía de infrarrojo de AfB₁ en quitosano

A partir de la muestra seca que se presume ya contenía a la AfB₁ en el quitosano, en el espectro (Figura 3.11) se observaron las bandas características del quitosano así como de la AfB₁. Se pudieron apreciar algunas bandas que localizan a los grupos característicos de la Aflatoxina B₁ de acuerdo a la Figura 2.5 y la Tabla 2.2, notándose el grupo C-H que se encuentra a 3105 cm^{-1} , al grupo C-C-H a 2875 cm^{-1} , 824 cm^{-1} y a 666 cm^{-1} correspondientes al metoxibenceno que forma parte de la cumarina (Skoog y col., 2001), las demás bandas

características se asume que se localizan empalmadas con las del quitosano, debido a que se encuentran a un mismo número de onda. Al obtener la adsorción de la AfB₁ en el quitosano, comparado con el espectro de IF del quitosano de la muestra 1 (Figura 3.1) se pudo observar que en el espectro a proporcionando bandas más anchas y picos con mayor intensidad. Esto puede deberse a que la AfB₁ se encuentra adsorbido al quitosano y también que la muestra de la interacción contenga un poco de humedad, debido a que fue secada a temperatura ambiente.

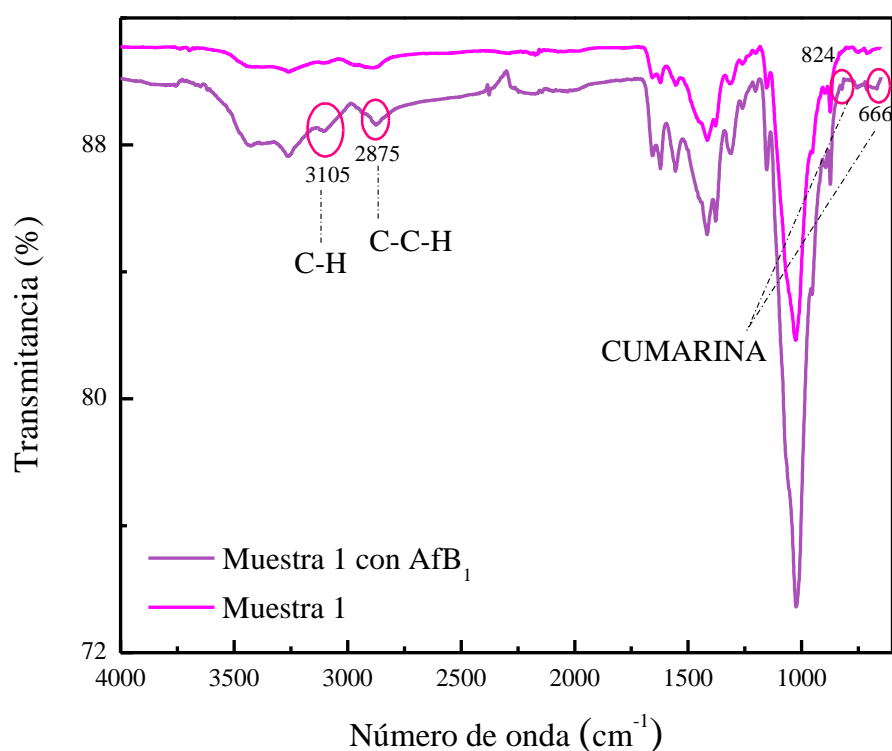


Figura 3.11. Espectro de absorción infrarroja de quitosano de la muestra 1 después de ser adsorbida la Aflatoxina B₁.

Se puede demostrar que la interacción física se obtuvo, debido a que no se formó ningún nuevo enlace o una nueva molécula, solo se presentó una fisisorción donde la interacción de las moléculas adsorbidas con los electrones del adsorbente (sólido) es muy débil y estas conservan su individualidad.

Por otro lado, la interacción molecular se puede intuir por medio de sus características particulares tanto de la molécula de AfB₁ así como de las del quitosano (Tabla 3.5), por lo que se pueden suponer dos hipótesis:

1. Fuerzas de dispersión: Debido a que si las moléculas difieren ampliamente en su peso molecular suelen ser las decisivas. En este caso, las diferencias en las magnitudes de las fuerzas de atracción casi siempre pueden asociarse a diferencias en los pesos moleculares y la molécula con mayor masa en este caso es el quitosano, tiene las atracciones más fuertes.
2. Puentes de Hidrogeno: Son un tipo especial de atracción intermolecular que existe entre el átomo de hidrogeno de un enlace polar (sobre todo un enlace H-F, H-O o H-N) que podría ser los O-H y N-H del quitosano y un par de electrones no compartido en un ion o átomo electronegativo pequeño cercano (usualmente un átomo F, O o N de otra molécula) que en este caso se podría referir a la molécula de la AfB₁ mediante sus seis oxígenos que contiene, especialmente el grupo carbonilo. En este sentido, se puede aportar que el grupo amino del quitosano podría formar un puente de hidrogeno junto con el grupo carbonilo de la aflatoxina B₁ (Brown y col., 2004).

Tabla 3.5. Características químicas de la AfB₁ y quitosano.

Aflatoxina B ₁	Quitosano
Polar	Polar
Hidrófila	Hidrófilo e Hidrofóbico
Aniónica	Policatiónico
C=O ⁻ , H ⁺ , anillo cumarico y furo-furano	NH ₂ ⁻ , OH ⁻ , H ⁺ , N-acetilamino
-	Copolímero lineal
Muy tóxica	No tóxico
PM bajo	PM alto
Hongos	Exoesqueletos de camarón
pH básico	pH básico
No degradable	Biodegradable y antifúngico

Diversos autores han propuesto varios modelos de enlace entre la AfB₁ con otros adsorbentes como las esmectitas, donde proponen el modelo de electrón donante-aceptor, la quelación de los dos grupos carbonilo con el lado descoordinado de aluminio, la unión del hidrógeno en el borde de la esmectita, y el enlace con el epoxidado C10 = C11. Hay varias posiciones

posibles de interacción, sugiriendo centros activos de la molécula de AfB₁ como posibles grupos adsorbentes con el material (Deng y col., 2011; Desheng y col., 2005; Phillips, 1999; Phillips y col., 2008; Tenorio y col., 2008).

Estas propuestas generan nuevas alternativas de la posible interacción con otro material adsorbente diferente a las esmectitas, como el quitosano.

CONCLUSIONES

- En este trabajo se ha mostrado que el quitosano es un buen adsorbente de AfB₁ comparable o incluso mejor que otros materiales comúnmente utilizados.
- Su capacidad de adsorción depende principalmente de su grado de desacetilación y de su origen, a mayor grado de desacetilación se obtiene una mayor adsorción.
- El tiempo de máxima adsorción es de 24 h con capacidad de adsorción de 0.0067 molKg⁻¹ y 0.006 molKg⁻¹, para los modelos de Langmuir y Freundlich, respectivamente; el segundo es al que mejor se ajustan los datos obtenidos.
- Se sugiere la interacción entre quitosano y AfB₁ a través de fuerzas de dispersión o puente de hidrogeno.
- Finalmente, parámetros como tamaño de partícula y peso molecular serán considerados en un trabajo futuro.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrunhosa L., Morales H., Soares C., Calado T., Vila-Chã AS., Pereira M., Venancio A. 2012. Screening of mycotoxins in food and feed in Portugal: a review. *Revista Bio Ciências*, Vol. II N° 1, 5-31.
- Aguilar G. 1985. *Adsorción y Catálisis*. Primera edición. Universidad Autónoma de Puebla.
- Alberts J. F. 2007. *Microbial Degradation of Mycotoxins*. Tesis Doctoral, University of Stellenbosch, 17-29.
- Allen S.J., McKay G. y Porter J.F. 2004. Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322-333.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 1995. *Official methods of analysis of AOAC International*. Vol. II (16° ed.). P. Cunniff (ed). Arlington, Va.: AOAC International.
- Armijo J. y Calderón J. 2009. Esquema de acciones para evitar, controlar y desinfectar productos de hongos y aflatoxinas. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. Vol. XII N° 2, 15-24.
- Avantaggiato G., Greco D., Damascelli A., Solfrizzo M. y Visconti A. 2013. Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace. *Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 62, 497-507.
- Barra A.A., Romero S. A., y Beltramino B. J. 2012. Obtención de quitosano. *Sitio argentino de Producción Animal*. 1-10.
- Belandria B. J. C., Morillo de M. N. J. 2008. Recuperación De Quitina A Partir De Los Residuos Sólidos Generados Del Procesamiento Industrial De Crustáceos. *Revista Cubana de Química*, Vol. XX N° 3, 17-26.
- Bocourt P. M., Cruz R. J., Bada R. N., y Peniche C. C. 2008. Síntesis y caracterización de hidrogeles biocompatibles interpenetrados de quitosana y poliacrilamida. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, Vol. XXXIX, N° 2, 70-74.
- Bogantes L. P., Bogantes L. D., Bogantes L. S. 2004. Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, Vol. XLVI N° 4, 174-178.
- Borrell J. 1990. Metabolitos fúngicos en los alimentos, descripción y principales medidas de prevención y detoxificación. *Discurso de ingreso en la real academia de ciencias veterinarias*.

- Borrell J. y Gimeno G. 2002. Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Selecciones Avícolas*. Vol. XLIV, N° 8, 567-57.
- Brown L. T., LeMay H. E., Bursten B. E., Burdge J. R. 2004. *Química la Ciencia Central*. Novena Edición. Pearson Educación, México.
- Busby W. F. Jr., Wogan G. N. 1984. Aflatoxins. En: Charles E. Searle, Editor. *Chemical Carcinogens, Second Edition, Revised and Expanded*. American Chemical Society. Vol. II. ACS Monograph 182. 945-969.
- Carreón R. N. A. y Licona R. M. 1999. Utilización de aluminosilicatos en la posible reducción de los niveles de aflatoxinas en muestras de maíz. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Carvajal M. 2013a. Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-ADN. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, Vol. XVI, N° 2, 109-120.
- Cho Y. W., Jang J., Park C. R., y Ko S. W. 2000. Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins. *Biomacromolecules*. Vol. I, 609 - 614.
- Cota A. O., Cortez R. M. O., Rosas B. E. C., Burgos H. A., López F. Y. L. y Plascencia J. M. 2010. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B₁. *Polymers International*. Vol. LX, 937-944.
- Dai S. Y., Lee K. M., Li W., Jim B., y Herrman T. J. 2013. Aflatoxin risk management in Texas: test kit approval for maize. *International Journal of Regulatory Science*, Vol. I, N°1, 15-22.
- Delle S. Alessandro. 2001. Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review. *Journal Physics Chemical*. Vol. XXX, N° 1, 187-253.
- Deng Y. y Szczerba M. 2011. Computational evaluation of bonding between aflatoxin B₁ and smectite. *Applied Clay Science*. Vol. LIV, 1-8.
- Desheng Q. Fan L., Yanhu Y., y Niya Z. 2005. Adsorption of Aflatoxin B₁ on Montmorillonite. *Poultry Science*. Vol. LXXXIV, 959-961.
- Díaz de Apodaca D. E., Villarán V. M. C., Río P. F., Ramírez L. C. A., Lorenzo I. L. 2007. Utilización de adsorbentes basados en quitosano y alginato sódico para la eliminación de

iones metálicos: Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} y Co^{2+} . *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Vol. VIII N° 1, 20-37.

Doyle M.P., Applebaum R.S., Brackett R.E. y Marth E.H. 1982. Physical, Chemical and Biological Degradation of Mycotoxins in Foods and Agricultural Commodities. *Journal of Food Protection*, Vol. XLV, N° 10, 964-971.

Foo K.Y. y Hameed B.H. 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*. Vol. CLVI, 2–10.

Gacén J. y Gacén I. 1996. Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter (U.P.C.)*. N° 110, 67-71.

Gallo V. A., Resnik S. L. y Pacin A. M. 1991. Métodos de detoxificación de alimentos y piensos. *La Alimentación Latinoamericana*. N° 188, 67-71.

García Z. T. y Roca O. J. M. 2008. Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*. Vol. XI, N° 2, 24-32.

Gibbs G., Tobin J.M. y Guibal E. 2004. Influence of Chitosan Preprotonation on Reactive Black 5 Sorption Isotherms and Kinetics. *Industrial and Engineering Chemistry*. Vol. XLIII, 1-11.

Giles C. H., D' Silva A. P., y Easton I. A. 1973. A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm Part II. Experimental Interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol. XLVII, N° 3, 766-778.

Giles H., Macewans T. H., Nakhwa N. y Smith D. 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal Chemical Society*. Vol LX, 3973–3993.

Gimeno A. y Martins M.L. 2003. *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos*. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres gráficos del SRL, Buenos Aires (Argentina). 1-160.

Guzmán de Peña D. 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud pública de México*. Vol. XLIX, N° 3, 227-235.

- Hernández C. H., Águila A. E., Flores A. O., Viveros N. E.L. y Ramos C. E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, Vol. XXII N° 3, 57-60.
- Hu X., Du Y., Tang Y., Wang Q., Feng T., Yang J., Kennedy J. F.. 2007. Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. Vol. LXX, 451–458.
- Hussein S. y Brasel J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. Vol. CLXVII, 101–134.
- IARC. International Agency for Reserch on Cancer. 2013. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. List of classifications by Group. Agents Classified by the IARC Monographs, Vol. 1-110.
- Jiujiang Yu, Deepak Bhatnagar y Kenneth C. Ehrlich. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, Vol. XIX, 191-200.
- Kalalagh S., Babazadeh H., Nazemi A. H., Manshoury M. 2011. Isotherm and Kinetic Studies on Adsorption of Pb, Zn and Cu by Kaolinite. *Caspian Journal Environmental Sciences*. Vol. IX, N° 2, 243-255.
- Kannewischer I., Tenorio Arvide M. G., White G. N. y Dixon J. B. 2006. Smectite Clays as Adsorbents of Aflatoxin B1: Initial Steps. *Clay Science*, Japan, Vol. XII, Supplement 2, 99-204.
- Ke Xiong, Hai jie Liu, and Li te Li. 2012. Product Identification and Safety Evaluation of Aflatoxin B1 Decontaminated by Electrolyzed Oxidizing Water. *J. Agricultural and Food Chemistry*, Vol. LX, 9770–9778.
- Kong C., Shin S. Y. y Kim B. G. 2014. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an in vitro approach. *SpringerPlus*, Vol. III, N° 346, 1-4.
- Lárez V. C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 4, N°2, 91-109.
- Lazo R. F. y Sierra G. 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*. Vol. XXV, 7-11.
- Limousin G., Gaudet J.P., Charlet L., Szenknect S., Barthe`s V., Krimissa M. 2007. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*. Vol. XXII, 249–275.

- Margineda de Godos J. 2004. Estudio de procesos de adsorción/desorción de iones en resinas encapsuladas. Aplicaciones a la remineralización de tejidos dentales. Tesis doctoral. Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- Martínez M. M. M., Vargas del Río L. M., Gómez Q. V. M. 2013. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*. Vol XII, N° 2, 89-109.
- Mikkelsen A., Engelsen S.B., Hansen H.C.B., Larsen O., Skibsted L.H. 1997. Calcium carbonate crystallization in the s-chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage. *Journal of Crystal Growth*. Vol. CLXXVII, 125-134.
- Miraglia M, Marvin H.J.P., Kleter G.A., Battilani P., Brera C., Coni E., Cubadda F., Croci L., De Santis B., Dekkers S., Filippi L., Hutjes R.W.A, Noordam M.Y., Pisante M., Piva G., Prandini A., Toti L., van den Born G.J., Vespermann A. 2009. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. XLVII, 1009–1021.
- Mirghani M.E.S., Che Man Y.B., Jinap S., Baharin B.S., y Bakar J. 2001. A New Method for Determining Aflatoxins in Groundnut and Groundnut Cake Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. LXXVIII, N°10, 985-992.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. 2006. Food mycotoxins: an update. *Journal Food Science*. Vol. LXXI, 51–65.
- Muzzarelli R.A.A., Morganti P., Morganti G., Palombo P., Palombo M., Biagini G., Belmonte M. M., Giantomassi F., Orlandi F., Muzzarelli C. 2007. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydrate Polymers*. Vol LXX, 274–284.
- Navarro A. E., Manrique Á., Iparraguirre E., Díaz C., Jacinto C., Cuizano N. y Llanos B. P. 2010. Synthesis and characterization of powdered native and cross-linked quaternary chitosan for their application on adsorption of anionic metals. *Revista Sociedad Química de Perú*, Vol. LXXVI N° 4, 313-321.
- Navarro A. E., Manrique Á., Iparraguirre E., Díaz C., Jacinto C., Cuizano N. y Llanos B. P. 2010. Synthesis and characterization of powdered native and cross-linked quaternary chitosan for their application on adsorption of anionic metals. *Revista Sociedad Química de Perú*, Vol. LXXVI N° 4, 313-321.

- Palma L. D. J. y Triano S. A. 2007. Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco. Vol. II. Colegio de Postgraduados-ISPROTAB-FUPROTAB. Villahermosa, Tabasco, México.
- Phillips T. D., Sarr A.B., y Grant P. G. 1995. Selective chemisorption and Detoxification of Aflatoxins by Phyllosilicate Clay. *Natural Toxins*. Vol. III, 204-213.
- Phillips T.D., Afriyie-Gyawu E., Williams J., Huebner H., Ankrah N.A., Ofori-Adjei D., Jolly P., Johnson N., Taylor J., Marroquin-Cardona A., Xu L., Tang L., Wang J.S. 2008. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food Additives & Contaminants, Part A-Chemical*. Vol. XXV, N° 2, 134–145.
- Phillips, T.D., 1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicology Science*. Vol. LII, N°2, 118–126.
- Ponce de León R. S., Lazcano P. E., Sigfrido R. M. F., Sosa L.L. A., Huerta J. M. A. 2001. Bioterrorismo: apuntes para una agenda de lo inesperado. *Salud Pública de México*. Vol XLIII, 589-603.
- Porras G., Esquivel M., Sibaja Ballesteros M. R., Madrigal Caballero S. y Calvo M. 2009. Quitosano n-acilado con cinamaldehído un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. X N° 3, 197-206.
- Prieto J., F. Prieto, A. D. Román, E. M. Otazo y M. A. Méndez. 2012. Correlation of mathematical models of adsorption of humidity in cereals for breakfast. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. Vol. III N° 1, 137-150.
- Razzaghi A. M., Chang P. K., Ghahfarokhi M. y Rai M.. 2013. Global health issues of aflatoxins in food and agriculture: challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology Food Microbiology*. Vol V N° 420, 1-3.
- Robledo M. M.L, Rojas G. AE, Medina D. I. M, Barrón V. B. S, Romero B. C.A., Rodríguez C. C. H., Girón P. M. I. 2012. Mycotoxins in Nayarit, Mexico: Case studies. *Revista Bio Ciencias*, Vol. II N° 1, 92-98.
- Rodríguez M. E. S. y Vizcarra B. M. I. 2012. Estudio de la Presencia de Aflatoxina B1 en Bocaditos a base de Maíz Comercializados en las Escuelas Fiscomisionales de las Zonas del Guasmos en la Ciudad de Guayaquil. Escuela superior politécnica del litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Ecuador.
- Rudall K.M. 1963. The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. *Advances in Insect Physiology*. Vol. I, 257–313.

Salud Ambiental. Productos y servicios. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación.

Salud Ambiental. Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1 2002. Diario Oficial de la Federación.

Salud Ambiental. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002. Diario Oficial de la Federación.

Salud pública de México. 2014. El cáncer en México: propuestas para su control. Vol. LVI, N° 5, 418- 420.

Schmidt C. W. MS. 2014. Para romper el molde del moho: Nuevas estrategias para combatir las aflatoxinas. Salud pública de México. Vol. LVI, N° 2, 227-234.

Seifert L. E., Davis J. P., Dorner J. W., Jaynes W. F., Zartman R. E. y Sanders T. H. 2010. Value-Added Processing of Peanut Meal: Aflatoxin Sequestration during Protein Extraction. Journal Agriculture Food Chemical. Vol. LVIII, 5625–5632.

Shuai P., Hecheng M., Yong O., y Jie C. 2014. Nanoporous Magnetic Cellulose–Chitosan Composite Microspheres: Preparation, Characterization, and Application for Cu(II) Adsorption Industrial and Engineering Chemistry. Vol. LIII, 2106–2113.

Sikorski P., Hori R., Wada M. 2009. Revisit of alpha-chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. Biomacromolecules. Vol. X, N° 5, 1100-1105.

Silva U. Y. P. 2014. Caracterización de suelos de origen volcánico como adsorbentes de aflatoxina B₁. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Puebla, México. 40-46.

Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P. 2004. Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. Environmental Microbiology. Vol. VI, 79–87.

Skoog, D.A., Holler F.J. y Nieman T.A. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. España: Mc Graw Hill, 409-434.

Susie Y. D., Kyung-Min L., Wei L., Jim B., y Timothy J. H. 2013. Aflatoxin risk management in Texas: test kit approval for maize. *International Journal of Regulatory Science*. Vol. I, N° 1, 15-22.

Tapia S. M., García P. O. D., Nieto L.M., Ricque M. D., Villarreal C. D., Cruz S. L. E. 2010. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola X. Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 514-546.

Tenorio A.M.G., Mulder I., Dixon J.B. 2008. Smectite clay adsorption of aflatoxin vs. octahedral composition as indicated by FTIR. *Clays Clay Minerals*. Vol. LVI, N° 5, 571–578.

Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 632, 168–180.