



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Unidad de Biotecnología y Prototipos
Laboratorio de Biogeoquímica

Modificación química y estructural de arcillas y zeolitas para la adsorción isoterma de ocratoxina A

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

Bióloga

P R E S E N T A:

Beatriz Moreno Ramírez

DIRECTOR DE TESIS: *César Mateo Flores Ortiz*
Tlalnepanitla, Estado de México. Enero 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Esta tesis representa una etapa muy importante y enriquecedora, en todo este tiempo ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo ni la planeación de los próximos, además que han dejado su huella en mi camino.

Agradezco a la vida que ha estado llena de dichas, bendiciones y de experiencias que me han ayudado a crecer y poder decir hoy que soy feliz.

A mis padres agradezco de todo corazón por su cariño y apoyo. Madre, gracias por no rendirte y por tu muy particular forma de ser.

Gracias Roberto por apoyarme profundamente, por toda la paciencia, la infinita comprensión, por nuestro gran amor, porque siempre me has hecho sentir que puedo lograr lo que me proponga. Gracias por escucharme y por tus consejos; por hacerme reír todo el tiempo, por hacerme sentir amada. Me es difícil imaginar cómo sería el andar cotidiano sin ti, gracias por ser parte de mi vida, te amo.

A César Flores, director de Tesis, quien me ha venido guiando desde hace dos años, gracias por permitirme ser parte del grupo de trabajo, por todo su apoyo, por su paciencia ante mis dudas de novata y por sus sabios consejos y opiniones.

Gracias a cada uno de los maestros que durante cuatro años de formación, fueron aportando grandes cosas a mi desarrollo profesional, sin sus conocimientos y ayuda no estaría en donde me encuentro ahora. A algunos de ellos gracias por su apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Gracias a México por que espera lo mejor de mí.

A todas y cada una de las personas, pasadas y presentes, que han vivido junto conmigo cada etapa de mi vida, y que con sus altos y bajos fueron partícipes en cincelar a esta Beatriz Moreno.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el patrocinio para la realización de este proyecto de tesis de licenciatura, dentro del proyecto IN219410-2, por la beca otorgada.

Contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Micotoxinas	2
1.1.1. Efectos Tóxicos de Micotoxinas	3
1.1.2. Impacto Económico.....	4
1.2. Ocratoxinas	6
1.2.1. Toxicidad.....	8
1.2.1.1. Toxicidad Aguda	9
1.2.1.2. Efectos crónicos.....	9
1.2.2. Mecanismos de las Ocratoxicosis.....	9
1.2.3. Exposición Humana a Ocratoxinas	10
1.3. Alternativas de manejo	11
1.3.1. Preventivas	11
1.3.1.1. Prevención de contaminación con Ocratoxina A	11
1.3.1.2. Gas dióxido de azufre	12
1.3.1.3. Conservadores para el control post-cosecha	13
1.3.2. Correctivas.....	13
1.3.2.1. Métodos Biológicos, Químicos y Físicos	14
1.3.2.1.1. Procesamiento de alimentos	14
1.3.2.1.2. Adsorbentes.....	15
1.3.2.1.2.1. Paredes celulares	15
1.3.2.1.2.2. Carbón Activado	15
1.3.2.1.2.3. Polímeros Orgánicos	16
1.3.2.1.2.4. Aluminosilicatos (arcillas y zeolitas).....	16
1.3.2.1.3. Isotermas	18
4. Antecedentes	21
5. Objetivo General	22
7. Metodología	23
7.1. Adsorbentes	23
7.2. Homoionización a Na ⁺	23
7.3. Preparación Órgano-arcilla y órgano-zeolita.....	23
7.4. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) por adsorción de Azul de Metileno.....	24
7.4.1. Mezcla de adsorción	24
7.5. Adsorción in vitro de Ocratoxina A.....	24

7.5.1 Mezcla de adsorción	24
7.6. Análisis cromatográfico	25
7.7. Aplicación del modelo de Langmuir.....	25
7.7.1. Isotermas de adsorción	25
7.8. Funciones de Error.....	27
8. Resultados y Discusión	28
8.1. Difracción de Rayos X.....	28
8.2. Capacidad de Intercambio Catiónico.....	29
8.3. Adsorción de OTA.....	32
8.3. Efecto de la concentración inicial del adsorbato.....	35
9. Conclusiones	38
Referencias	39

RESUMEN

Los mohos micotoxigénicos importantes en México son de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* que se desarrollan en climas frescos y húmedos y que producen ocratoxina A (OTA). Comparada con otras micotoxinas, OTA es el principal contaminante de alimentos balanceados en el almacenamiento. Se modificaron dos tipos de aluminosilicatos, arcillas y zeolitas (organoaluminosilicatos) con Octadecildimetil bencil amonio (ODMBA), mediante dos procesos, el húmedo por la activación en suspensión y el proceso seco por reacción en estado sólido, para la comparación de la capacidad de adsorción *in vitro* de OTA, por su mezcla con el organoaluminosilicato a 40°C. Los datos fueron evaluados por medio de una ecuación isoterma (modelo de Langmuir). Los datos obtenidos del análisis de la adsorción mostraron para arcillas un cambio de 2.47 $\mu\text{moles g}^{-1}$ del material original a 35.29 para el proceso húmedo y a 724.92 $\mu\text{moles g}^{-1}$ para el proceso seco. Para la zeolita se mostró un aumento de 49.31 $\mu\text{moles g}^{-1}$ del material inicial a 67.6 para el proceso húmedo y 1687.19 $\mu\text{moles g}^{-1}$ para el proceso seco. La zeolita modificada por el método seco fue el mejor adsorbente obtenido, aumentando por un factor de 34.21 veces su capacidad de adsorción.

Palabras clave: Ocratoxina A, organoaluminosilicatos, adsorbentes, adsorción isoterma.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, producidos principalmente por la estructura micelial de hongos filamentosos, más específicamente, mohos. Los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* comprenden un gran número de especies productoras de micotoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2001; Hussein *et al.*, 2001).

Las micotoxinas no son de importancia bioquímica para el crecimiento del hongo pero su producción está asociada con las etapas de desarrollo, esporulación y formación escleroidal. Probablemente jueguen algún papel en la ecología de estos organismos, pero su función aún no ha sido claramente definida (Bhatnagar *et al.*, 2001); desde el inicio de la agricultura, se presentan como contaminantes naturales de los cultivos y sólo recientemente está siendo estudiada su naturaleza química (Richard, 2007).

La investigación de las micotoxinas en los alimentos ha permitido la identificación de poco más de 100 hongos micotoxigénicos (Wang y Groopman, 1999) y más de 400 micotoxinas han sido caracterizadas mostrando una gran diversidad en sus estructuras químicas y actividad biológica. Existen múltiples familias de micotoxinas, incluyendo policétidos, derivados de aminoácidos y péptidos, y terpenoides (Bhatnagar *et al.*, 2001). En general, las micotoxinas se clasifican según la especie que las produce, su estructura química o su mecanismo de acción tóxica. Cabe señalar que, una sola especie fúngica puede producir una o varios tipos de micotoxinas, y una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies (Hussein *et al.*, 2001).

Las micotoxinas provocan respuestas tóxicas en vertebrados superiores y otros animales cuando son consumidas, incluso a bajas concentraciones, otras además pueden ser fitotóxicas o antimicrobianas, sin embargo, no están agrupadas junto con los antibióticos. Los metabolitos venenosos producidos por setas y levaduras no están incluidos en este grupo (Bhatnagar *et al.*, 2001). Cabe aclarar que, no todos los mohos son toxigénicos, ni todos los metabolitos secundarios producidos por mohos son tóxicos (Hussein *et al.*, 2001).

La contaminación con micotoxinas está asociada generalmente con productos alimenticios enmohecidos durante su almacenamiento o transporte, no obstante también pueden ser producidos en el campo (Moss, 2002) y al igual que otros microorganismos, los mohos pueden encontrarse casi en cualquier ecosistema y diseminarse transportados por aire, insectos, lluvia, equipos o por prácticas agronómicas y contaminar comunidades enteras de plantas o semillas almacenadas (Magan *et al.*, 2007).

La evaluación del riesgo de contaminación con micotoxinas resulta difícil, debido a que los factores que afectan su producción y presencia, en granos o materias primas son muy diversos (Tabla 1). La incidencia y extensión de la contaminación dependen principalmente de factores geográficos y estacionales, luego, de las condiciones del cultivo, la recolección, el almacenamiento y transporte. A lo largo de toda la cadena de procesamiento de los granos, las condiciones pueden variar y como cada especie fúngica se desarrolla dentro de ciertos límites de equilibrio entre temperatura y humedad, existe una sucesión ecológica de diferentes especies. Por ejemplo, las micotoxinas producidas durante el crecimiento de la planta en el

campo, son producidas por hongos endofíticos y durante el almacenamiento por hongos saprófagos. La producción de micotoxinas en granos depende del cuidado al manejar los productos, también de factores nutricionales o genéticos (Hussein *et al.*, 2001).

Las condiciones óptimas de temperatura y humedad para la producción de toxinas obedecen a intervalos bien definidos que difieren a los óptimos para el desarrollo del hongo. En general, la temperatura óptima para la producción de micotoxinas se encuentra entre 24 y 28 °C, con excepción de toxina T2 que es producida a un máximo de 15°C (Bhatnagar *et al.*, 2001). Estudios de la ecología de estas especies resultan en modelos de germinación, desarrollo y concentración de micotoxinas, que ayudan en la predicción y en la prevención de la contaminación con micotoxinas (Magan *et al.*, 2007).

Tabla 1. Clasificación de los factores que afectan la colonización y/o producción de micotoxinas.

<p>Físicos: Factores ambientales que lleven a una colonización y producción.</p>	<p>Temperatura Humedad relativa Daño mecánico Respiración del grano y del hongo contaminante</p>
<p>Químicos: Pueden alterar la colonización selectiva y el metabolismo del hongo y la producción de micotoxinas. Pueden hacer a los cultivos y forrajes susceptibles a su producción por los hongos.</p>	<p>Uso de fungicidas u otros fertilizantes Estrés por sequía Temporadas desfavorables Adición de conservadores para alimento animal</p>
<p>Biológicos: Se basa en la interacción entre la especie micotoxigénica y el sustrato.</p>	<p>Especificidad de la cepa micotoxigénica Variaciones en la cepa Inestabilidad de las propiedades toxigénicas Especies más susceptibles a la contaminación, factores ambientales pueden incrementar la vulnerabilidad de las más resistentes. Composición gaseosa intergranular</p>

En general, los mohos micotoxigénicos más importantes biológica y económicamente, son *Penicillium verrucosum* (ocratoxinas) en cereales de climas frescos y húmedos; o *Aspergillus flavus* (aflatoxinas), *A. ochraceus* (ocratoxinas) y algunas especies de *Fusarium* (fumonisinas, tricotecenos) para cereales de lugares templados y tropicales (Magan *et al.*, 2007; Bhatnagar *et al.*, 2001). De acuerdo con la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), un 25% de las cosechas a nivel mundial están contaminadas con uno o varios tipos de micotoxinas conocidas, mientras que un mayor porcentaje podría estar contaminado por toxinas que todavía no han sido plenamente identificadas; las más importantes desde el punto de vista agropecuario son las Aflatoxinas (AF), Ocratoxina A (OTA), Fumonisinas, Zearalenona, Citrinina, Tricotecenos como Toxina T2, Desoxinivalenol (DON, Vomitoxina), entre otras Tabla 2 (Ceballos *et al.*, 2007).

1.1.1. Efectos Tóxicos de Micotoxinas

Las micotoxinas son principalmente cancerígenas, mutagénicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas, teratogénicas, inmunosupresoras o causan rechazo de los alimentos, incluso la exposición a esporas de algunas especies micotoxigénicas causan enfermedades respiratorias peligrosas (Hussein *et al.*, 2001; Magan *et al.*, 2007). Las micotoxicosis difieren de las micosis, un término que se refiere a enfermedades producidas por la invasión

directa del patógeno, es decir, por el hongo (Bhatnagar *et al.*, 2001). Las micotoxicosis ocurren cuando las toxinas fúngicas son ingeridas, sin embargo, ésta no es la única ruta de exposición (Richard, 2007). No son contagiosas, no son transferibles, no son infecciosas y no pueden atribuirse a otros microorganismos que no sean hongos, ya que están directamente relacionadas con alimento enmohecido.

Es frecuente que tengan efectos inmediatos en varios órganos, los más comúnmente afectados son el hígado, riñón y pulmones además de los sistemas nervioso, endocrino e inmune (Hussein *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2001). El diagnóstico puede ser difícil, ya que los síntomas pueden ser similares a enfermedades causadas por otros agentes (Richard, 2007), además las micotoxinas se presentan usualmente acompañadas por otros metabolitos desconocidos, lo que puede causar efectos aditivos negativos (García *et al.*, 2003).

Las micotoxicosis están clasificadas como agudas o crónicas en base a las cantidades de toxina ingerida y el tiempo de exposición. Las agudas son causadas por la ingestión de altos niveles de toxinas en un periodo corto, resultando en importantes efectos fisiológicos adversos e incluso la muerte. Una exposición prolongada a niveles bajos de toxinas pueden conducir a micotoxicosis crónicas con consecuencias como poco crecimiento e incremento en la susceptibilidad a otras enfermedades y en algunas micotoxinas puede resultar en cáncer (Richard, 2007).

Los factores que afectan la magnitud de la toxicidad por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas son:

1. La especie afectada.
2. Susceptibilidad intraespecífica (dif. genéticas) dependiendo de la edad, sexo, estatus nutricional.
3. Metabolismo.
4. Condiciones del sistema inmune.
5. Mecanismos o formas de acción de la micotoxina (Hussein *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2001).

El metabolismo y los mecanismos de defensa son elementos de gran importancia para la comprensión de la toxicidad en ciertas especies o en individuos animales. La especificidad de tales mecanismos está bien demostrada, por ejemplo, en las diferencias significativas en el manejo de las toxinas entre rumiantes y no rumiantes. Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la microbiota rumiante para degradar las micotoxinas (Hussein *et al.*, 2001). De la gran cantidad y variedad de micotoxinas conocidas, sólo algunas implicadas en enfermedades humanas han sido estudiadas en detalle.

1.1.2. Impacto Económico

Existen muchos criterios por los que se pueden evaluar los impactos económicos, estos incluyen, los costos por daños en los cultivos y en las materias primas para el alimento humano o animal; costos para el cuidado de la salud humana o veterinaria, afectación en la producción y comercialización de animales de engorda; además de los costos en servicios regulatorios, procesos jurídicos y para la investigación enfocadas a aliviar el impacto y la severidad del problema (Hussein *et al.*, 2001). La relevancia de las micotoxinas en salud ha impulsado al mercado internacional, a las organizaciones en salud y a las autoridades gubernamentales, a regular los niveles de toxinas permitidas en productos para el comercio y en alimentos para consumo humano o animal.

Tabla 2. Especies y micotoxinas de importancia biológica y/o económica

Micotoxina	Efectos tóxicos	Especies fúngicas	Sustrato
Toxinas Alternaria (ácido tenuazónico, alternariol)	Apoptótico, mutagénico	<i>Alternaria alternata</i>	Granos de cereal, tomate, alimento animal.
Aflatoxinas	Apoptótico, mutágeno, hepatotóxico, carcinógeno, teratogénico	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Cacahuete, maíz, nueces, semillas de algodón
Ocratoxina A	Apoptótico, nefrotóxico, teratogénico	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Uvas, café, cacao
		<i>Aspergillus ochraceus</i> ,	Frutos secos, frijol, especias, café, higos, cereales, quesos. Carne procesada y pescado ahumado
		<i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sulfureus</i> <i>Penicillium commune</i>	
		<i>Penicillium cyclopium</i>	Cacahuates, maíz, quesos
		<i>Penicillium nordicum</i>	Productos cárnicos y queso
		<i>Penicillium viridicatum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Frijol, cultivos de cereales, café, alimento animal
		Deoxinivalenol	Apoptóticos, dermato-tóxicos, neurotóxicos, teratogénicos
<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo, maíz, Alimento animal, arroz		
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Maíz, alimento animal, forraje		
Tóxina T-2	<i>Fusarium poae</i>		
Diacetoxiscirpenol	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Maíz, alimento animal, forraje	
	<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo, maíz, Alimento animal, arroz	
	<i>Fusarium poae</i>		
Zearalenona	Génito-tóxico, efectos oestrogénicos, mutagénico	<i>Fusarium culmorum</i>	
		<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo, maíz, Alimento animal, arroz
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Maíz, alimento animal, forraje
Fumonisinias	Apoptosis, hepatotoxicidad, neutrotóxico, enfermedades respiratorias.	<i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium verticillioides</i>	
Alcaloides Ergopeptina	Neurotrofía	<i>Acremonium coenophialum</i> <i>Aspergillus. fumigatus</i>	
Alcaloides Lolitrem		<i>Acremonium lolii</i>	
Esterigmatocistina	Hepatotóxico y carcinógeno	<i>Aspergillus versicolor</i>	Cereales, frijol, café, alimento animal
		<i>Aspergillus nidulans</i>	Maíz, granos, quesos
Ácido penicílico		<i>P. puberulum</i>	Cebada, maíz
Rubratoxina	Apoptótica, hepatotóxica, teratogénica	<i>P. rubrum</i>	
Roquefortina	Neurotóxica	<i>P. purpurogenum</i>	Alimentos de engorda, maíz,
		<i>P. roqueforti</i>	Quesos

Cerca de 50 países en el mundo han desarrollado estas normas que resultan en severas pérdidas económicas para los campesinos, productores y vendedores de granos, ya que la mayoría de los productos contaminados son destruidos. Tan sólo en EU se han estimado pérdidas en varios millones de dólares a causa de cultivos contaminados por micotoxinas y mundialmente en los mercados de exportación de arroz,

maíz, cebada, algodón y cacahuate pérdidas de billones de dólares. La economía de países en desarrollo puede ser severamente afectada, incluso cuando se presentan toxinas en pequeñas cantidades en productos para la exportación que no son aceptados en países con normas reguladoras estrictas (Flores *et al.*, 2006). La India es el principal ejemplo de un país en el que la economía está siendo afectada gravemente a causa de las micotoxinas, en la región de Bihar de 1985 a 1987 se encontró que cerca del 51% de 387 muestras estaban contaminadas con mohos (Hussein *et al.*, 2001).

La actividad microbiana puede causar efectos indeseables en los granos incluyendo: decoloración, deterioro en la calidad nutricional de las semillas, contribuir al calentamiento y pérdida en materia seca (debido a la utilización de los carbohidratos como su fuente de energía), degradación de lípidos y proteínas o la alteración de su asimilación, producción de metabolitos volátiles inodoros, pérdidas en la germinación, en la calidad de cocción y molienda, afectando el uso como alimento o como semilla (Magan *et al.*, 2007).

La alimentación de animales de engorda representa entre el 60 y el 70% de los costos de producción, y la contaminación de este alimento resulta en pérdidas incalculables para la producción animal, ya sea por el desecho de las mismas, al reducir el valor nutritivo de las raciones, o al causar deterioro de la salud (Ceballos *et al.*, 2007).

En general, dependiendo de la especie, al darles alimentos contaminados se ocasionan severos trastornos en la producción reflejados en, la reducción en la tasa de nacimientos; decremento en la ganancia de peso o el incremento del período de crianza; disminución en la producción de carne, leche o huevo, en el caso de aves; incrementa la susceptibilidad a infecciones u otras enfermedades (coccidiosis, marek, gumboro, etc.) ya que afecta el sistema inmunológico; o pueden ocasionar la muerte de los animales (Bhatnagar *et al.*, 2001; Ceballos *et al.*, 2007).

Las micotoxinas son generalmente lipofílicas y por lo tanto tienden a acumularse en las fracciones lipídicas de plantas y animales (Hussein *et al.*, 2001), en el último caso disminuyendo la calidad sanitaria de los productos derivados; por ejemplo micotoxinas como aflatoxinas (*toxina de A-flavus*) y ocratoxinas (*toxina de A-ochraceus*), pueden ser consumidas por los animales y posteriormente aparecer en leche u otros productos, sin que hayan sido enmohecidos, es decir dañados directamente por el hongo (Moss, 2002).

Las ocratoxinas en los años recientes han recibido una considerable atención, a nivel mundial, el porcentaje de contaminación de alimentos por OTA destinados para animales y humanos tiene una incidencia del 1-30 %, lo que se considera una frecuencia de contaminación alta (Marquardt *et al.*, 1992).

Particularmente en México, se ha reportado la presencia natural de varias micotoxinas en diversos estudios, se ha observado que de las muestras analizadas más del 57% presentan alguna cantidad detectable de micotoxinas, para el caso particular de Ocratoxina A (OTA), es la micotoxina que presenta la mayor proporción de muestras contaminadas y el 60% presenta niveles por arriba de las normas, tanto en granos como en alimento balanceado se presentan concentraciones altas de la toxina (Flores *et al.*, 2006).

1.2. Ocratoxinas

Las ocratoxinas fueron descubiertas en Sudáfrica por Van der Merwe en 1965 (Ceballos *et al.*, 2007), integran una familia de compuestos que varían cada una en su toxicidad, están sus tres análogos naturales, ocratoxina B, C y α ; y sus análogos sintéticos, los ésteres de metilo y etilo, las hidroxiladas, otros análogos preparados por la sustitución de fenilalanina con otros aminoácidos como tirosina, valina, serina o alanina que son las más tóxicas; metionina, triptofano y ácido glutámico son intermediarios en los efectos tóxicos y los análogos de glutamato y prolina disminuyen su toxicidad (Xiao *et al.*, 1996; Marquardt *et al.*, 1992), en la Figura 1 se muestra la estructura base, y en la Tabla 3 los sustituyentes de algunos de los compuestos anteriormente mencionados.

Ocratoxina A es la más tóxica del grupo, químicamente contiene un núcleo isocumarínico clorado, unido por un enlace amida a la L-fenilalanina, a través del grupo 7 carbonilo, formando un pseudopeptido, Figura 2. OTA es soluble en solventes orgánicos polares y ligeramente en agua, tiene dos grupos ionizables, por lo que existen la forma ionizada y la no ionizada según las condiciones fisiológicas (Marquardt *et al.*, 1992). El pK_{a1} de su grupo carboxilo es 3.5, y para el grupo fenólico es $pK_{a2}=7$ (Daković *et al.*, 2005).

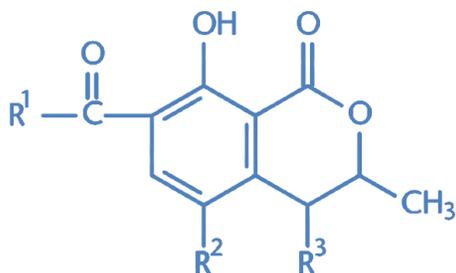


Figura 1. Estructura base de las ocratoxinas.

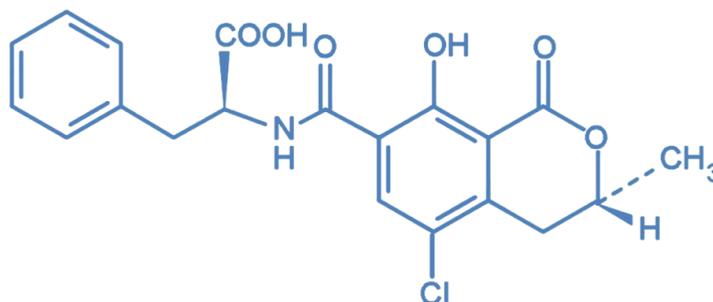


Figura 2. Ocratoxina A.

Tabla 3. Ocratoxinas Bhatnagar *et al.*, 2001

Ocratoxinas	R ₁	R ₂	R ₃
A	a	Cl	H
B	a	H	H
C	b	Cl	H
A Metil éster	c	Cl	H
B Metil éster	c	H	H
B Etil éster	b	H	H
4-Hidroxi-ocratoxina A	a	Cl	OH

α	OH	Cl	H
β	OH	H	H

a, $C_6H_5CH_2CH(COOH)NH-$.

b, $C_6H_5CH_2CH(COOEt)NH-$.

c, $C_6H_5CH_2CH(COOMe)NH-$.

Aunque numerosas especies son capaces de producir ocratoxinas, las especies que las metabolizan en grandes cantidades son *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium cyclopium* (Bhatnagar *et al.*, 2001). En regiones frías y templadas OTA es producida principalmente por *Penicillium verrucosum* o *P. nordicum*, en las regiones tropicales y semitropicales por *Aspergillus ochraceus* que ha sido reportada en una gran variedad de productos (Ringot *et al.*, 2006).

OTA contamina muchos tipos de productos destinados al consumo humano o animal; y a causa de que es termoestable es posible encontrarla en los productos derivados (Amézqueta *et al.*, 2008). Encontrándose en diversas cantidades, los productos conocidos son los siguientes: cereales como trigo, maíz, sorgo o cebada, sus derivados como la harina y pan; frutos como uvas (pudiendo encontrarse en jugos o vino), e higos; café (Magan *et al.*, 2007), té (Castella *et al.*, 2002), especias, cacao (Amézqueta *et al.*, 2008), en frijol, frutos secos como nueces y pasas, cerveza y derivados de soya; además la toxina puede acumularse en los tejidos y fluidos, ya que parece ser lentamente eliminada por el cuerpo (Schwartz, 2002) por lo que puede presentarse en los productos de origen animal como carne o embutidos, principalmente de ganado porcino; y leche de vacas expuestas a grandes cantidades de la toxina (Magan *et al.*, 2007).

1.2.1. Toxicidad

OTA es conocida principalmente como nefrotóxica, hepatotóxica, teratogénica y carcinógena (Xiao *et al.*, 1996).

Los órganos más afectados por el consumo de OTA en varias especies son el riñón, el hígado, el tracto gastrointestinal, órganos linfoides, el sistema óseo, tejidos hematopoyéticos y los órganos reproductores. Además, reduce la tasa de crecimiento, afecta la coagulación sanguínea, disminuye la integridad del tejido óseo, causa nefropatía, anemia, leucocitopenia, fragilidad del intestino, altera la glucogénesis y la fagocitosis, y altera las concentraciones de constituyentes del suero.

OTA al ser nefrotóxica, ocasiona altas incidencias de tumores renales, la degeneración del túbulo proximal, fibrosis intersticial e hialinización del glomérulo (Marquardt *et al.*, 1992). Es genotóxica, al formar aductos con ADN. En 1993, la Agencia Internacional de la Investigación en Cáncer la clasificó como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) (Valero *et al.*, 2006). Es un potente teratogénico en ratones, ratas, hamsters y pollos, pero no en cerdos, esto se atribuye a diferencias en la transferencia por medio de la placenta. El sistema nervioso central, los ojos, el esqueleto axial son los más afectados en la progenie (Marquardt *et al.*, 1992).

Neurotóxica e inmunosupresiva al producir atrofia de los órganos linfoides (timo, bolsa de Fabricio), al causar disfunción celular y regresión de linfocitos afectando significativamente la inmunidad celular.

Produce además, disminución de la inmunidad humoral, con reducción en la circulación de inmunoglobulinas (Ceballos *et al.*, 2007).

Las ocratoxicosis están mejor conocidas en cerdos y aves (Mantle, 2004); no se han reportado en rumiantes por la posible capacidad que tiene su microflora de hidrolizar OTA a O α no tóxica. En becerros 2 mg/Kg, parecen causar depresión clínica, y una dosis menor deshidratación (Xiao *et al.*, 1996; Marquardt *et al.*, 1992).

1.2.1.1. Toxicidad Aguda

Experimentalmente se ha encontrado que OTA causa toxicidad aguda en varias especies animales como: pollos, gallinas, patos jóvenes, ratas, ovejas, cerdos y trucha arcoíris. Valores de DL₅₀ para algunas especies se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Toxicidad aguda oral expresada en valores de DL₅₀

Grupo animal	DL ₅₀ (mg/Kg)
Perros	0.2
Cerdos	1 - 6
Polluelos	3 - 4
Pollos	3.3
Ratas recién nacidas	3.9
Ratas adultas	20 - 30
Ratones	46 - 58

Los patrones clínicos asociados con las ocratoxicosis agudas más frecuentes son: anorexia, pérdida de peso, émesis, seguidas por temperatura rectal elevada, conjuntivitis bilateral purulenta, amigdalitis, polidipsia, poliuria, coágulos en la mucosa del recto, deshidratación, daño en próstata y muerte después de dos semanas de la administración. Signos bioquímicos como disminución en los niveles de sodio, potasio, y altas cantidades de excreción de albúmina y proteínas en la orina. Rasgos como el peso del riñón, la concentración de varias proteínas y metabolitos, y la actividad de ciertas enzimas pueden ser utilizados como indicadores de ocratoxicosis.

1.2.1.2. Efectos crónicos

Los cerdos tienden a reducir el consumo de alimento, no aumentan de peso, incrementan su consumo de agua y presentan poliuria, a dosis altas pueden desarrollar neuropatía. La incorporación de OTA en la dieta de aves de corral, reduce la ganancia relativa de peso, con una reducción significativa de la producción de huevos, consumo de alimentos, inhibición del crecimiento, y se cree que es la micotoxina más tóxica para esta especie (Marquardt *et al.*, 1992).

1.2.2. Mecanismos de las Ocratoxicosis

El mecanismo preciso de la toxicodinámica de OTA, hasta la fecha no es muy claro, y se han propuesto diversas hipótesis para esclarecer los mecanismos de acción de OTA.

Ocratoxina A inhibe competitivamente la actividad de succinato deshidrogenasa y citocromo C oxidasa en mitocondria de rata; altera el sistema de transporte en la membrana mitocondrial e inhibe competitivamente la actividad de la ATPasa. Esto se ha atribuido a la apertura del anillo lactona lo que provoca que esta fracción sea estructuralmente análoga a los sitios activos de estas enzimas mitocondriales, uniéndose competitivamente al sustrato.

El daño celular está atribuido a que OTA favorece la peroxidación lipídica, por la formación de radicales hidroxilo (Hussein *et al.*, 2001); Rahimtula *et al.*, 1988 (citado por Xiao *et al.*, 1996) proponen que el grupo hidroxilo fenólico de OTA juega un importante rol en la formación del quelato OTA-Fe²⁺ y este complejo facilita la lanzadera de electrones de un sustrato al oxígeno formando especies reactivas de oxígeno en conjunto con el ciclo redox del sistema del citocromo P450 (Marquardt *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1996). La lipoperoxidación puede ser un evento temprano en la hepatotoxicidad, porque resulta en cambios estructurales en la membrana celular, suficiente para permitir un influjo de calcio dentro de la célula y causar cambios en la actividad metabólica y necrosis (Marquardt *et al.*, 1992).

Interrumpe la síntesis de proteínas por la inhibición competitiva de fenilalanil-ARNt sintasa, como resultado de la similitud con fenilalanina (Hussein *et al.*, 2001). Además inhibe competitivamente la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de fenilalanina, incluyendo a la fenilalanil transferasa y fenilalanil hidroxilasa (Marquardt *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1996).

La actividad de la gluconeogénesis y la PEPCK (fosfoenol piruvato carboxi kinas) citosólica (regulador de la ruta metabólica y transcripcional en riñón) puede ser completamente inhibida en ratas y cerdos (Marquardt *et al.*, 1992).

Otros autores sugieren que la genotoxicidad de ocratoxina A puede involucrar la formación de un radical OTA-fenóxido, y la citotoxicidad en la formación de derivados de OTA que contienen tioles. Estos datos sugieren que la biotransformación de OTA y las modificaciones covalentes a biomoléculas por OTA, pueden estar involucrados en su toxicidad (Xiao *et al.*, 1996).

Algunos autores proponen que la disociación del grupo hidroxilo influye de manera importante en la toxicidad, debido a las diferencias entre los análogos de OTA, encontrando por ejemplo que ocratoxina B es diez veces menos tóxica con un pK_a del grupo hidroxilo de 8, y Oα no es tóxica con un pK_a de 11 (Marquardt *et al.*, 1992). A diferencia de otros fenoles halogenados, OTA no actúa como un desacoplador de la fosforilación oxidativa en mitocondria (Xiao *et al.*, 1996).

Otros estudios han demostrado el efecto estimulante de OTA en proteínas extracelulares como cinasa y caspasa lo que conlleva a apoptosis (Hussein *et al.*, 2001).

1.2.3. Exposición Humana a Ocratoxinas

En Europa, particularmente en Alemania, OTA es la toxina de mayor concentración encontrada. Un estudio en este país mostró que de 306 muestras de suero sanguíneo evaluadas, el 57% dieron positivas para OTA en concentraciones de 0.1 – 14.4 ng/g, se demostró también que la concentración promedio en plasma de 3 diferentes áreas evaluadas fue de 0.02, 0.03 y 0.26 ng/ml; en muestras de leche humana, aproximadamente el 10% tenían trazas de OTA. La exposición a la toxina, se debió principalmente al

consumo de productos locales, alimentos basados en cereales, así como carne de cerdo o aves. Los resultados no fueron inesperados, ya que se conocía la contaminación del grano y se habían presentado casos de nefropatía en cerdos. En ciudadanos canadienses, de 159 muestras de sangre, el 40% fue encontrada OTA, siendo la concentración más alta de 35ng/ml (Marquardt *et al.*, 1992).

1.3. Alternativas de manejo

Con la finalidad de evitar las micotoxicosis, varias estrategias han sido investigadas las cuales se clasifican en varias categorías: tecnologías pre- o post-cosecha; biológicas, químicas o físicas. La mejor forma de prevenir el efecto de las micotoxinas es minimizar su producción (Huwig *et al.*, 2001).

1.3.1. Preventivas

La clave para el desarrollo de estrategias efectivas de prevención post-cosecha es el conocimiento y control en los puntos críticos de cosecha, secado y almacenado en la cadena de producción. Los tratamientos propios de cada grano y el conocimiento de los factores que prevalecen en el ambiente, son puntos determinantes para el impacto que los hongos tendrán en la calidad del grano incluyendo su germinabilidad (Magan *et al.*, 2007).

El mejor procedimiento para prevenir la producción de micotoxinas por los hongos es un adecuado manejo de los granos, una forma es cosechar el grano maduro y almacenarlo en condiciones de temperatura y humedad bajas (<14% de humedad), esto puede resultar difícil de realizar en regiones de clima cálido y húmedo, como lo es el caso de México.

Debido al poco control de las altas temperaturas en el almacenamiento de los granos de cereal, puede hacerse uso de técnicas alternativas que pueden ser más efectivas y menos costosas, por ejemplo, el desarrollo del hongo y la producción de toxinas pueden inhibirse por el uso de agentes químicos como ácido propiónico o isobutirato de amonio (Huwig *et al.*, 2001). Además, por muchos años se han probado métodos que consisten en modificar la composición gaseosa del sitio del almacenamiento. El uso de estos sistemas integrales post-cosecha consisten en la modificación simultánea de los niveles de O₂ y CO₂ y el uso de N₂ (O₂ libre). Modificar las atmósferas en los almacenes se utiliza para el control tanto de mohos como de insectos del grano humedecido.

En muchos casos se disminuye la cantidad de O₂ a menos del 0.14%, el mínimo requerido por los hongos para su crecimiento. Además puede incrementarse el nivel del CO₂ a más del 50% para la inhibición del crecimiento micelial. Sin embargo algunas especies, como por ejemplo *Penicillium roqueforti*, son capaces de desarrollarse e infectar el grano a niveles que pueden sobrepasar el 80% de CO₂ con un mínimo de 4% de O₂ presente. Esta tolerancia a un bajo O₂ y alto CO₂ está influenciada por las interacciones con el tipo de grano y la disponibilidad de agua.

En el caso de especies productoras de OTA como *P. verrucosum* y *A. ochraceus*, hay estudios que indican que con más del 50% de CO₂ la germinación de sus esporas no es afectada significativamente, sin embargo la extensión del tubo germinal y la colonización es totalmente inhibida de 50 – 75% de CO₂ (Magan *et al.*, 2007).

1.3.1.1. Prevención de contaminación con Ocratoxina A

Los factores abióticos más importantes que influyen en el crecimiento y producción de OTA por hongos incluyen: la disponibilidad de agua, la temperatura, la humedad del grano y la composición gaseosa (Magan *et al.*, 2007).

La contaminación con OTA se ha identificado predominantemente como un problema post-cosecha. Sin embargo no deben descartarse el llevar a cabo adecuadamente los lineamientos de higiene para los equipos o materiales utilizados para la recolección de los productos, si es que existen. En esta etapa es importante causar el mínimo daño mecánico a los granos. En este caso FAO/WHO/UNEP recomiendan además de un rápido secado posterior a la recolección, un nivel de humedad menor al 10%. Especies como *P. verrucosum* y *A. ochraceus* son muy competitivas. Trabajos recientes sugieren que una contaminación de más del 7% con *P. verrucosum*, significa una alta probabilidad de contaminación con OTA sin que estos dos factores presenten una relación lineal (Amézqueta *et al.*, 2008; Magan *et al.*, 2007).

Respecto a la relación que existe entre la disponibilidad de agua, temperatura, crecimiento del hongo y la producción de OTA para las especies *P. verrucosum* y *A. ochraceus*; se sabe que el crecimiento acelerado del hongo ocurre a >27 – 30 % de humedad sobre un intervalo de temperatura de 10 – 25° C, y que es completamente inhibido de 17.5 – 18% de humedad. La producción de otras ocratoxinas es a 19% y de 15 – 20° C. Además se ha demostrado en granos de trigo que se requieren de 7 a 14 días para una producción significativa y que sobrepase los niveles tolerables por las normas norteamericanas. En base a esta información, pueden elaborarse curvas de condiciones de humedad y temperatura, óptimas y marginales tanto para el crecimiento como para la producción de la toxina; pudiendo predecir que un contenido de humedad del 17 – 18% es el necesario para eliminar el riesgo potencial de crecimiento del hongo y por lo tanto producción de toxina.

Los puntos clave a tener en cuenta para un cuidado post-cosecha:

1. Regular y medir los niveles de humedad exactos ya determinados.
2. Un eficiente y rápido secado de los granos de cereal, directamente relacionado con el tiempo de almacenamiento y temperaturas reguladas, específicos para el tipo de grano que se maneje; por ejemplo trigo/cebada/avena de 14 – 14.5% de humedad; maíz 14%; arroz 13 – 14%; canola (para aceite) 7 – 8%.
3. Infraestructura para una rápida respuesta, que incluye prevención en la distribución y condiciones apropiadas de transportación.
4. Condiciones adecuadas de almacenamiento en todas las etapas de procesamiento, en términos de control de humedad y temperatura, el correcto mantenimiento en general e higiene, facilitará la prevención de pestes e infiltración de humedad.
5. Capacidad para una identificación eficiente y rechazo del material que esté por debajo de los estándares especificados en términos tanto de infestación por el hongo como de los niveles de micotoxinas, según la región.
6. Operación de un sistema de proveedor autorizado, con los ajustes en cuanto a las especificaciones de aceptación/rechazo de producto (Magan *et al.*, 2007).

1.3.1.2. Gas dióxido de azufre

El dióxido de azufre (SO₂) es uno de los aditivos para alimentos más antiguos y tiene una larga historia como desinfectante por lo corrosivo del elemento azufre y el uso de sus vapores. Luego del desarrollo de la química inorgánica, el SO₂ y sus sales comenzaron a ser frecuentemente utilizados como conservadores, particularmente en alimentos y bebidas, comúnmente como inhibidores fúngicos en uvas y pasas, además, necesario para el almacenamiento y preservación de vinos blancos. Esta sustancia puede ser altamente tóxica para los microorganismos por sus efectos mutagénicos, inactivando los ARNm y reacciona con los enlaces disulfuro de proteínas, cofactores enzimáticos, aldehídos y cetonas de estructuras de azúcares de cinco o seis carbonos, desamina a citosina y los componentes derivados de uracilo, y acarrea efectos deletéreos en la membrana. En contraste, pequeñas cantidades de SO₂ puede estimular el crecimiento, ya que el azufre es un elemento esencial para este.

Existe muy poca información detallada acerca de la actual tolerancia y sensibilidad de las especies micotoxigénicas a SO₂. Se ha examinado el efecto de varias concentraciones de SO₂ en relación con diferentes temperaturas (15, 25 °C) y porcentajes de humedad *in vitro* e *in situ*; el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. terreus* fue inhibida por 50mg/L de SO₂ disuelto en un extracto basado en malta. Diversos estudios han demostrado que la sensibilidad al SO₂ es dependiente de la especie. La tolerancia de las especies de *Penicillium* a tratamientos con elevadas concentraciones, puede ser a causa de su habilidad para activar el transporte de SO₂ en el micelio.

Las desventajas de la utilización de SO₂, son por ejemplo que existe una relación entre la concentración de SO₂ disponible y el efecto a los microorganismos, influenciada por la formulación del producto, también la solubilidad en agua varía según los valores de pH; así la toxicidad diferirá según la concentración, ácido sulfuroso (H₂SO₃) > bisulfito (HSO₃⁻) > sulfito (SO₃⁻²). Además, en el almacenamiento de cereales, se han observado problemas de corrosión de los materiales utilizados para su dispersión; y muchos estudios sugieren que a altas concentraciones, sufre adsorción y unión al grano de trigo reduciendo su actividad antifúngica (Magan *et al.*, 2007).

1.3.1.3. Conservadores para el control post-cosecha

El grano húmedo, especialmente el destinado a alimentación animal, es frecuentemente tratado con conservadores anfotéricos (ácido-básicos). Hay un gran número de productos comerciales de este tipo que principalmente están basados en sales propiónicas y ácidos sórbicos. Algunos estudios demuestran que el crecimiento de especies del género *Fusarium* y productoras de fumonisinas fueron, relativamente, no afectadas por diferentes mezclas de estos compuestos.

Otras investigaciones se han encaminado hacia aceites esenciales y antioxidantes; las cuales sugieren que un mínimo de aceites esenciales como el de canela y hoja de clavo son capaces de controlar especies de *Fusarium*, a *P. verrucosum*, *A. ochraceus* y la producción de DON y OTA, dependiendo de las condiciones ambientales. Sin embargo, existen muchos obstáculos económicos y tecnológicos asociados con este tipo de aprovechamiento. En pruebas sobre granos de trigo el butilhidroxianisol (BHA), el propil-parabeno (PP), el aceite de canela y el resveratrol causan enormes reducciones hasta en un 90% en la acumulación de DON

y nivalenol (NIV). El segundo ha demostrado que tiene un particular y amplio espectro de control de micotoxinas, sin embargo es un producto relativamente costoso (Magan *et al.*, 2007).

1.3.2. Correctivas

El método de destoxificación ideal deberá ser fácil de realizar y económico, no generar compuestos tóxicos o alterar otros parámetros de la calidad de los productos como el contenido de nutrientes (Amézqueta *et al.*, 2008).

1.3.2.1. Métodos Biológicos, Químicos y Físicos

1.3.2.1.1. Procesamiento de alimentos

Existen estudios que examinan el destino de las micotoxinas en la cadena alimenticia, brindando información útil sobre la distribución relativa de los diferentes tipos cuando los granos son procesados y utilizados para sus diferentes propósitos. Los datos obtenidos muestran claramente que las micotoxinas son estables durante muchos de los procesos a los que pueden estar expuestos, aunque estos impliquen pH alto o temperatura elevada, permaneciendo en los productos derivados, dependiendo de la micotoxina, en alrededor de un 50%, y si la técnica implica sólo molienda seca hasta en un 80 – 90 % (Magan *et al.*, 2007).

Los métodos biológicos no están siendo utilizados en la práctica, aunque el número de patentes se incrementa continuamente; en estos se incluyen procesos de fermentación con microorganismos. Un ejemplo sería la conversión de AFB₁ (particularmente por *Flavobacterium auranticum*) en productos de degradación menos dañinos; esta conversión, sin embargo es generalmente tardada e incompleta (Huwig *et al.*, 2001).

En las técnicas microbiológicas para la destoxificación de OTA es utilizada la carboxipeptidasa A que es una enzima capaz de destruirla y se utilizan variedades no toxigénicas de *A. niger* para producirla, otras enzimas que se pueden obtener son las lipasas, un crudo enzimático y una metaloenzima. La carboxipeptidasa presente en *Phaffia rhodozyma* puede degradar OTA en un 90%.

Ciertas bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyrivibrio*, *Phenylbacterium*, *Pleurotus*, *Saccharomyces*, *Bacillus* y *Acinetobacter*, junto con hongos de los géneros *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. versicolor*, *A. wentii* y *A. ochraceus*), *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Phaffia*, *Penicillium* y *Rhizopus* (*R. stolonifer* y *R. oryzae*), son capaces de degradar OTA *in vitro* en poco más del 95%. Y algunos presentan estas mismas características *in vivo* (Amézqueta *et al.*, 2008).

Muchos químicos han sido probados por su habilidad de degradar estructuralmente y/o inactivar micotoxinas, incluyendo numerosos ácidos, bases, aldehídos, bisulfatos, agentes oxidantes, y varios gases (Marquardt *et al.*, 1992). Químicamente, algunas micotoxinas pueden ser destruidas con hidróxido de calcio monoetilamina, ozono o amonio. Particularmente la amoniatización de granos almacenados ha mostrado una reducción substancial (>99%) de los niveles de AF por la hidrólisis de el anillo lactona, también ha resultado efectivo para reducir la toxicidad de OTA (Amézqueta *et al.*, 2008; Hussein *et al.*, 2001); este procedimiento está aprobado para la destoxificación de alimentos contaminados con aflatoxinas en

algunos estados de la Unión Americana, así como en Senegal, Francia y el Reino Unido. Los costos de este procedimiento pueden ir de un 5 – 20% del costo total de los productos (Huwig *et al.*, 2001).

Otra forma de sobrellevar las micotoxicosis es con la utilización de aditivos para alimentos como antioxidantes, aminoácidos que contienen azufre, vitaminas y elementos traza que pueden ser utilizados como destoxicantes (Huwig *et al.*, 2001).

Muchas de las técnicas propuestas anteriormente para remover micotoxinas regularmente se consideran imprácticas, inefectivas y/o potencialmente inseguras si son utilizadas por mucho tiempo (Marquardt *et al.*, 1992).

Los métodos físicos se enfocan en remover las micotoxinas con diferentes adsorbentes añadidos a los alimentos contaminados esperando que sean efectivos en el tracto gastro-intestinal de un modo profiláctico y no terapéutico. Y en la actualidad la utilización de adsorbentes que atrapan micotoxinas es el método más aplicado para proteger a los animales en contra de los efectos tóxicos del alimento contaminado (Huwig *et al.*, 2001).

1.3.2.1.2. Adsorbentes

En los últimos años los adsorbentes se evalúan particularmente con respecto a su eficacia, especificidad y a los mecanismos del proceso de adsorción. Esto último se refiere a la reacción química y por lo tanto el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) que es la fuerza que dirige cada adsorción. Para describir los procesos de adsorción debe tomarse en cuenta la estructura física del adsorbente, la carga total y la distribución de la carga, el tamaño de los poros y el área superficial accesible. Por otro lado, las propiedades de las moléculas a adsorber, la o las micotoxinas, la polaridad, la solubilidad, el tamaño, la forma y, en el caso de compuestos ionizables, la distribución de la carga y las constantes de disociación que de igual forma juegan un papel fundamental. Por lo tanto la eficacia de cada proceso de adsorción tiene que ser investigado en cuanto a las propiedades particulares de cada adsorbente y adsorbato (Huwig *et al.*, 2001).

1.3.2.1.2.1. Paredes celulares

Además de su excelente valor nutricional, las levaduras o sus paredes celulares, también pueden utilizarse como adsorbentes para micotoxinas. La adsorción *in vitro* de ocratoxina por levadura (consiste en 40% de levadura esterilizada y 60% del residuo de la fermentación de la producción de cerveza) depende del pH, y es máxima en soluciones ácidas (a pH 3: 8.6 mg/g, a pH 8: 1.2 mg/g). Sin embargo, en ensayos con cerdos agregando un suplemento alimenticio de un 5% de levadura, sólo se tuvo una ligera reducción en la concentración de ocratoxina A en el plasma sanguíneo, la bilis y los tejidos.

Por el uso exclusivo de las paredes celulares de levadura en lugar de la célula completa, la adsorción de micotoxinas puede ser mejorada. Las paredes celulares están compuestas de polisacáridos (glucano, manano), proteínas y lípidos; presentan numerosos centros de adsorción, diferentes y fácilmente accesibles que incluyen distintos mecanismos, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, iónicos o interacciones hidrofóbicas. Por ejemplo, se tiene la adsorción de 2.7 mg de zearalenona por gramo de paredes celulares. La unión es rápida y el equilibrio alcanzado después de tan sólo 10 minutos es aceptable.

1.3.2.1.2.2. Carbón Activado

El carbón activado es producido por la pirólisis de materiales orgánicos, en un polvo insoluble, de superficie muy porosa con una elevada superficie de contacto ($500 - 3\ 500\ \text{m}^2/\text{g}$). Desde el siglo XIX este material ha sido utilizado como un antídoto en contra de intoxicaciones, por lo que también se ha implementado para inactivar micotoxinas. En soluciones acuosas, pueden adsorberlas eficientemente pero a pesar de esto los carbonos activados presentan pocos o ningún efecto en contra de las micotoxicosis, lo que puede deberse a que algún factor del carbón activado lo haga relativamente inespecífico en la adsorción *in vivo*, y se ha visto que si los nutrientes esenciales se encuentran a muy elevadas concentraciones en el alimento son adsorbidos. Sin embargo, para el caso de las aflatoxinas en ensayos con cabras, se demostró que altas dosis de carbón activado son benéficas en una intoxicación aguda (Huwig *et al.*, 2001).

1.3.2.1.2.3. Polímeros Orgánicos

La colestiramina es una resina con un intercambio de aniones que es usada para atrapar ácidos biliares en el tracto gastro-intestinal y para la reducción de lipoproteínas de baja densidad y colesterol. La capacidad de unión *in vitro* para ocratoxina A y zearalenona es de 9.6 mg/g y más de 0.3 mg/g respectivamente; pero *in vivo*, la colestiramina tiene una pobre reducción en la concentración de ocratoxina, en sangre, bilis y tejidos.

Otro adsorbente la crosprovidona (polivinil-pirrolidona), es un polímero anfotérico, altamente polar con una capacidad de adsorción *in vitro* medida para zearalenona de 0.3 mg/g. Hasta ahora no ha sido probado *in vivo*. Una mejora de los enlaces cruzados de polivinil-pirrolidona por criogel ha mostrado un incremento en estos valores (Huwig *et al.*, 2001).

1.3.2.1.2.4. Aluminosilicatos (arcillas y zeolitas)

Los silicatos formados por oxígeno y silicio son los principales componentes minerales de la corteza terrestre. El silicio se encuentra en coordinación tetraédrica con el oxígeno, por lo que el $(\text{SiO}_4)^{4-}$ es la unidad fundamental de empaquetamiento de los silicatos, las diversas formas en las que el grupo $(\text{SiO}_4)^{4-}$ puede enlazarse con otros grupos $(\text{SiO}_4)^{4-}$ compartiendo uno, dos, tres o todos los oxígenos de los vértices del tetraedro son fundamentales en la clasificación de los silicatos (Klein y Hurlbut, 1998).

Muchos estudios relacionados con el alivio de las micotoxicosis por el uso de adsorbentes se enfocan principalmente a aluminosilicatos, los contenidos en arcillas (montmorilonitas), zeolitas (clinoptilolita) y aluminosilicatos sódico cálcico hidratados (HSCAS), todos consisten en aluminios, silicatos y en algunos iones intercambiables, principalmente metales alcalinos e iones metálicos (Huwig *et al.*, 2001) Figura 3.

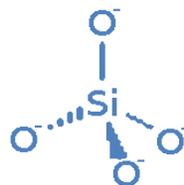


Figura 3. Tetraedro elemental de silicato $(\text{SiO}_4)^{4-}$.

Las arcillas son minerales compuestos principalmente por silicatos laminados con una fórmula química en común $[\text{Si}_2\text{O}]_{xy}$. Las montmorilonitas son filosilicatos laminados, caracterizados por capas alternantes de

tetraedros de silicio y octaedros de aluminio conectados en un arreglo 2:1, coordinados por los átomos de oxígeno.

Entre sus características principales podemos destacar las siguientes:

- a) Formadas por cristales muy pequeños.
- b) Capacidad de intercambiar iones.
- c) Capacidad de intercambiar su composición química interna.
- d) Pueden alojar moléculas en el interior de su espacio interlaminar.
- e) La superficie de las láminas presenta una actividad química considerable.
- f) Los cambios físicos de la estructura laminar, son reversibles (Domínguez y Schifter, 2003).

Las zeolitas son tectoaluminosilicatos que poseen una estructura tridimensional parecida a una cesta, se componen de tetraedros de SiO_4 y AlO_4 como dos bloques fundamentales de un edificio y con un átomo metálico en el centro de cada tetraedro. La fórmula química común es $[\text{AlSi}_3\text{O}_8]_{xyz}$, por ejemplo las ortoclasas KAlSi_3O_8 , zeolita A $\{\text{Na}_{12}[\text{Al}_{12}\text{Si}_{12}\text{O}_{48}] \cdot 27 \text{H}_2\text{O}\}_8$.

En ambos materiales, arcillas y zeolitas, algunos Si^{4+} son remplazados por Al^{3+} dando a una deficiencia de carga positiva en la estructura, que comúnmente son compensadas por cationes inorgánicos (ej. Na^+ y Ca^+) los cuales son fuertemente hidratados en la presencia de agua Figura 4 (Daković *et al.*, 2003).

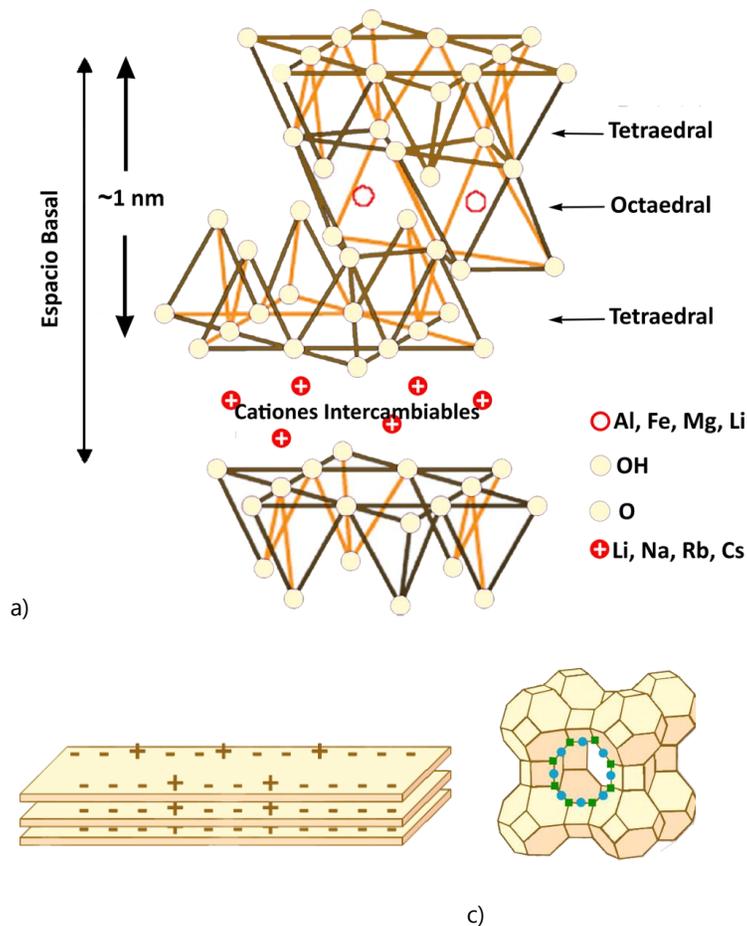


Figura 4. Estructuras de los aluminosilicatos a) y b) En láminas en Arcilla y c) Forma de red en Zeolita clinoptilolita.

En cuanto a la aplicabilidad de los aluminosilicatos para atrapar micotoxinas, se puede concluir que son muy eficaces para prevenir aflatoxicosis, pero su eficacia contra ocratoxina, zearalenona y tricotecenos, es limitada.

Además, de su estrecha capacidad para atrapar diferentes micotoxinas, los aluminosilicatos tienen la desventaja de presentar una alta tasa de adsorción de las vitaminas y minerales de los alimentos (Huwig *et al.*, 2001), por lo que ha surgido como una necesidad el diseño de organoaluminosilicatos, materiales modificados por la intercalación de moléculas orgánicas en el espacio interlaminar.

La investigación de las arcillas modificadas comenzó en 1920, luego de la introducción de la difracción de rayos X en 1913. La síntesis de organoarcillas está basada en el mecanismo intercambiador de cationes inorgánicos de los minerales que son progresivamente remplazados por los cationes orgánicos, las propiedades de la superficie de los aluminosilicatos cambian considerablemente de hidrófila a cada vez más organófila, ya que los cationes orgánicos se hidratan débilmente. Los grupos silanol y aluminol son los que reaccionan con estos compuestos orgánicos. En el caso de las esmectitas la adsorción de las moléculas neutras se da por medio por varias interacciones químicas: enlaces de hidrogeno, interacciones ion dipolo, enlaces coordinados, reacciones ácido base, transferencia de carga y fuerzas de van der Waals. Las organoarcillas son generalmente preparadas en soluciones por reacciones de intercambio de cationes o por reacciones en estado sólido (Betega de Paiva *et al.*, 2008).

1.3.2.1.3. Isotermas

Una de las más eficientes formas de investigar las superficies de adsorción es a través del uso de isotermas. La isoterma es una curva que describe la retención de una sustancia en un sólido a varias concentraciones, a temperatura constante, siendo la mejor herramienta para describir y predecir como las moléculas de adsorbato se distribuyen entre la fase líquida y la fase sólida cuando el proceso de adsorción alcanza el estado de equilibrio (Dogğan *et al.*, 2006; Limousin *et al.*, 2007).

Diversas teorías de adsorción están disponibles en la literatura con las diferentes ecuaciones para isotermas, que han sido propuestas para el modelo de adsorción de solutos en soluciones acuosas a superficies sólidas. Estas ecuaciones contienen variables similares y difieren principalmente en el ordenamiento de estas.

Cuando es investigada la retención de un soluto en partículas sólidas, la concentración del compuesto no retenido C (mol L^{-1} o kg L^{-1}) puede ser comparada con la concentración de este compuesto retenido en las partículas sólidas Q (mol kg^{-1} o kg kg^{-1}) como se muestra en la Figura 5. La relación $Q=f(C)$ es a lo que se llama "isoterma de adsorción".

Los modelos isotérmicos se clasifican en cuatro tipos de curvas, denominadas C, L, H, y S, las cuales representan diferentes mecanismos de adsorción (Grant y Phillips, 1998) esto basándose en la configuración de la primera parte de la isoterma Figura 6, los subgrupos se relacionan con el comportamiento a altas concentraciones de adsorbato.

Con la finalidad de optimizar el diseño de los sistemas de adsorción es importante establecer la correlación apropiada para la curva de equilibrio. Una descripción matemática precisa de la capacidad de adsorción en

el equilibrio es indispensable para una predicción confiable de los parámetros y la comparación cuantitativa del comportamiento de la adsorción para cualquier sistema. El modelo matemático es una herramienta muy útil para el análisis, el diseño, la evaluación teórica y además para la interpretación de los parámetros termodinámicos.

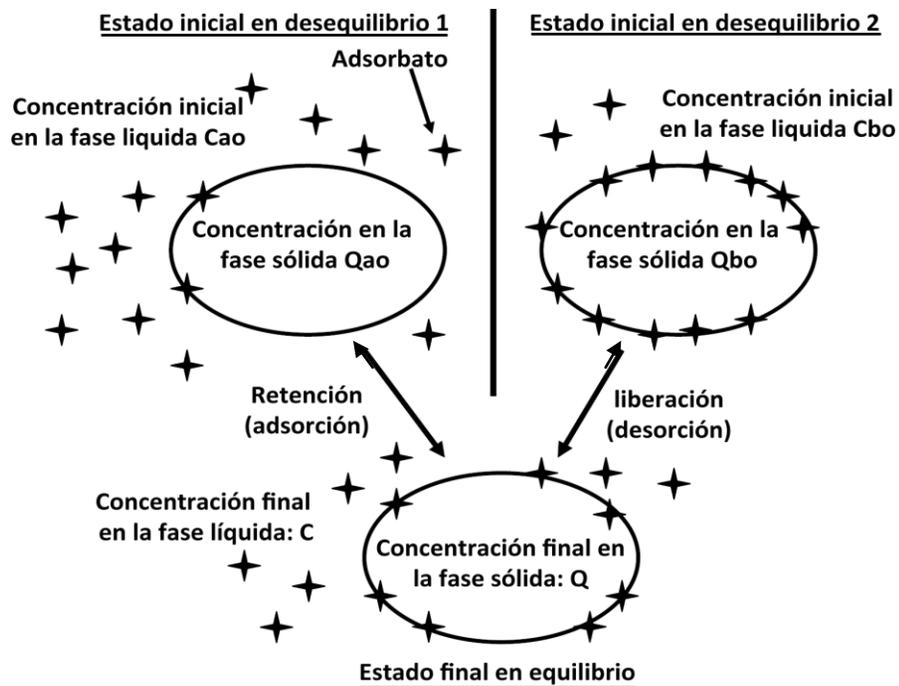


Figura 5. Esquema del fenómeno de adsorción y desorción.

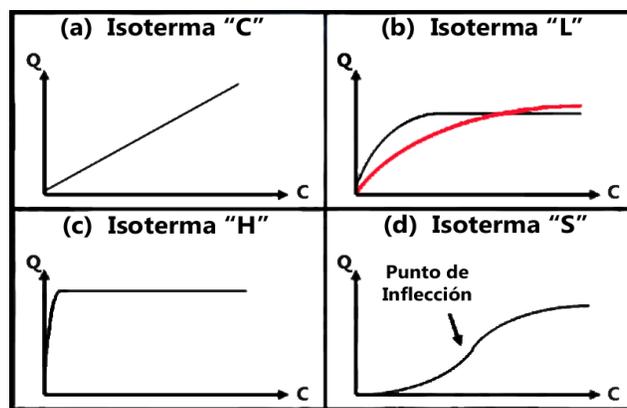


Figura 6. Los 4 tipos de isotermas Según Giles et al., 1974.

La ecuación de Langmuir es la más aplicada a ligandos de adsorción sencillos, para un tipo de sitio sencillo para un adsorbente en particular. Con esta ecuación se pueden obtener los parámetros, tanto de capacidad (Q_{max}), como de la afinidad (K_d) constante de distribución, dadas las siguientes hipótesis:

1. Adsorción en monocapa (una capa adsorbida es del espesor de una molécula);
2. la adsorción tiene lugar en sitios homogéneos específicos dentro del adsorbente;
3. un sitio es ocupado una vez por adsorbato, y no se puede llevar a cabo otra adsorción por este sitio;

4. la energía de adsorción es constante y no depende del grado de ocupación de los centros activos del adsorbente;
5. la intensidad de las fuerzas de atracción moleculares se cree, que disminuyen rápidamente con la distancia;
6. el adsorbente tiene una capacidad finita para el adsorbato (en el equilibrio, el punto de saturación es alcanzado cuando ninguna otra adsorción puede ocurrir);
7. todos los sitios son idénticos y energéticamente equivalentes;
8. el adsorbente es estructuralmente homogéneo;
9. no hay interacción entre las moléculas adsorbidas en los sitios vecinos. (Gimbert *et al.*, 2008)

El cambio de energía libre Gibbs estándar de adsorción (ΔG°_{ads}) y de la entalpía de adsorción (ΔH_{ads}), pueden ser calculadas a partir de los valores de K_d , dan información acerca de los mecanismos de adsorción. En particular, la adsorción de compuestos en una superficie, puede ser clasificada como fisio-adsorción o quimioadsorción en la base del valor de ΔH_{ads} . La fisio-adsorción implica asociaciones débiles que pueden incluir fuerzas de van der Waals, dipolo-dipolo, dipolo inducido y enlaces de hidrógeno; con una entalpía de $<20\text{kJ/mol}$. Por otro lado, la quimioadsorción implica una reacción química o que se compartan electrones entre el adsorbente y el adsorbato; y con una entalpía de $>20\text{kJ/mol}$.

4. Antecedentes

La aplicación, en las dietas animales, de materiales adsorbentes no nutritivos como los aluminosilicatos en contra de las micotoxicosis ha sido estudiada por más de 20 años por innumerables autores (Huwig *et al.*, 2001). Los aluminosilicatos arcillas o zeolitas, son los más frecuentemente utilizados, ya que no causan problemas digestivos al mezclarse con el alimento contaminado y no dejan residuos en el animal porque no se absorben (Cevallos *et al.*, 2007).

García *et al.* 2003 compararon 10 distintos adsorbentes no modificados, para Ocratoxina A, midiendo su composición de Ca, Na, K, Al, Si, por espectrofotometría de absorción atómica. Así mismo, los estudios de adsorción, no mostraron evidencias estadísticamente significativas entre los productos, y en la mayoría de los casos no coincide con lo mencionado para cada uno por parte de sus fabricantes.

Ya que las formas naturales de estos minerales solo son efectivas para la adsorción de Aflatoxinas *in vitro* o *in vivo*, las modificaciones químicas con cationes orgánicos de cadena larga, como por ejemplo: iones cuaternarios de amonio de cetilperidimina (CP), hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), incrementan la hidrofobicidad de las superficies por lo que les provee una alta afinidad por moléculas orgánicas hidrofóbicas, como la mayoría de las micotoxinas (Daković *et al.*, 2005), además resulta en un incremento en el espacio interlamilar y una exposición de nuevos sitios de adsorción en el material; lo que produce un adsorbente que se une a compuestos orgánicos no polares en solución.

En las montmorillonitas todos los sitios de intercambio de cationes son igualmente disponibles para el intercambio iónico, mientras en las clinoptilolitas los cationes orgánicos son muy largos para entrar a los canales de la zeolita, y solo ocupan las posiciones externas de intercambio catiónico, así que la superficie de las clinoptilolitas pueden ser modificadas con muy bajas cantidades de fase orgánica. Esta característica es muy importante para la aplicación práctica de estos minerales modificados.

Previamente, en la adsorción de OTA por organozeolitas se ha demostrado que la presencia de cationes orgánicos en los sitios activos de las superficies de zeolitas son los responsables de su adsorción, altamente influenciada por los valores de pH o por la forma en la que se encuentre la toxina en la solución. Se ha reportado que la adsorción de OTA por zeolitas no modificadas es mayor a pHs de 3 en la que se encuentra de forma neutra (Daković *et al.*, 2005).

5. Objetivo General

Modificar química y estructuralmente dos tipos de aluminosilicatos con ODMBA (octadecildimetil bencil amonio) para incrementar la capacidad de adsorción de Ocratoxina A.

Objetivos Particulares

- *Caracterizar la composición elemental y la capacidad de adsorción de los aluminosilicatos.*
- *Comparar el efecto sobre la capacidad de adsorción de Ocratoxina A, del proceso húmedo y seco de modificación de aluminosilicatos.*
- *Utilizar el modelo de equilibrio de adsorción en sólidos de Langmuir para determinar los parámetros de constante de adsorción y el número de sitios independientes disponibles para Ocratoxina A.*

7. Metodología

7.1. Adsorbentes

Dos tipos distintos de aluminosilicatos (arcilla y zeolita) originarios del Altiplano Mexicano fueron utilizados para las pruebas de adsorción con OTA. Para comprobar cuantitativamente cada paso de la modificación, se definen las siguientes etapas Tabla 5:

Tabla 5: Materiales experimentales

Modificación Húmeda	Modificación Seca
1. Natural Pulverizada	1. Natural Roca
2. Tamizada <75µm	2. Modificada Reacción en estado sólido
3. Homoionizada	
4. Modificada Suspensión Acuosa	

Los análisis químicos se realizaron con las fracciones obtenidas de cada mineral en cada etapa. La morfología y la composición de la superficie se determinaron mediante imágenes tomadas por un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6380LV modelo 7582 con accesorio de rayos X EDS InCA x-sight Oxford Instruments. Con barridos de 3 campos distintos de la muestra bajo los siguientes parámetros: voltaje mínimo 15 kV, aumento de 30 a 6500 X y distancia de trabajo 10 mm.

7.2. Homoionización a Na⁺

Antes del tratamiento con ODMBA, sólo para la modificación húmeda, los aluminosilicatos fueron convertidos a su forma sódica suspendiendo 30g en 500ml de solución 1M de NaCl y someterlo a agitación orbital. Posterior a la agitación durante 24 hrs, la suspensión fue centrifugada a 2600 x g, la pastilla fue resuspendida en esta nueva solución de NaCl 1M, este procedimiento se realizó tres veces seguido de 3 lavados con 500 ml de agua destilada para retirar el exceso de Cl. Los aluminosilicatos sódicos obtenidos fueron secados a 60°C durante toda la noche y posteriormente almacenados para los futuros experimentos.

7.3. Preparación Órgano-arcilla y órgano-zeolita

Se realizaron dos procesos diferentes para la modificación de los materiales. *Proceso Húmedo*. Se tomaron 10 g de arcilla y zeolita por separado y se agregaron a 100 ml de agua destilada que contenía el catión orgánico (CO) octadecildimetil bencil amonio (ODMBA) disuelto, en una cantidad menor a la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) (sección 7.4). El proceso se realizó en condiciones controladas: a una temperatura de 25 °C, a una velocidad de mezcla de 5 000 rpm, y durante un tiempo de 10 min. Cuando la reacción se completo, la suspensión se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se secó a 60°C. *Proceso Seco*. De igual manera se tomaron 10 g del material en forma de roca y junto con el catión orgánico en estado sólido, fueron molidas en un mortero durante 10 min.

Octadecil dimetil bencil amonio (ODMBA) con fórmula química C₂₇H₅₀ClN fue obtenido de una donación de la Empresa Organosíntesis. El surfactante catiónico es soluble en agua con peso molecular de 424.14 g mol⁻¹, tiene un grupo amonio en la cabeza cargado positivamente, unido a una cadena de 18 carbonos.

7.4. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) por adsorción de Azul de Metileno

En cada una de las etapas se obtendrán los valores de CIC por la adsorción de azul de metileno B con fórmula química $C_{16}H_{18}ClN_3S$ con peso molecular de 284g mol^{-1} . La estructura química se muestra en la Figura 9, la cual presenta la carga positiva de la estructura. Tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 665nm . Se preparó una solución stock disolviendo el azul de metileno en agua destilada para lograr una concentración de 25mg L^{-1} para diluirla subsecuentemente a las concentraciones requeridas.

7.4.1. Mezcla de adsorción

Para esto se preparó una suspensión de aluminosilicato a 0.25g L^{-1} . Las soluciones de azul de metileno fueron preparadas a partir de la solución stock $88.02\ \mu\text{M}$ (25mg L^{-1}) para lograr concentraciones de ($1.76, 3.52, 5.28, 7.04, 8.80, 12.32, 15.840, 19.36$ y $22.88\ \mu\text{M}$) para cada tubo.

La concentración de azul de metileno fue estimada espectrofotométricamente utilizando un Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer y una celda analítica de cuarzo de 1cm de diámetro, a una absorbancia de λ_{max} de $665\ \text{nm}$, utilizando como blanco una solución sin azul de metileno. Se realizó la medición antes de aplicar el adsorbente para realizar la curva patrón estableciendo la relación entre la concentración de azul de metileno y la absorbancia. Una vez aplicado 0.1ml de la suspensión con el adsorbente (0.25g L^{-1}) se agitó vigorosamente y se dejó en reposo $15\ \text{min}$. Posteriormente, las mezclas se centrifugaron a $3000\ \text{rpm}$ durante $10\ \text{min}$ y se midió el sobrenadante a la longitud de onda antes mencionada. Para el análisis de los datos se aplicó la ecuación isotermal.

7.5. Adsorción in vitro de Ocratoxina A

La ocratoxina A para los ensayos *in vitro*, se preparó en una solución stock a $12\ \mu\text{M}$ (5.12mg L^{-1}) en metanol (concentración comprobada con un espectrofotómetro UV-Vis).

7.5.1 Mezcla de adsorción

En términos generales se pone en contacto el material adsorbente y la toxina, en concentraciones que reflejan las proporciones habituales de la composición de la dieta y las condiciones fisicoquímicas de la digestión y posteriormente se determina la concentración de la micotoxina residual.

Se tomaron seis tubos de polipropileno para cada una de las seis concentraciones y se les colocó $5\ \text{mg}$ de cada una de las muestras de adsorbente, la mezcla tiene un volumen final de 1ml con una concentración en suspensión del adsorbente de 0.5% . Las seis concentraciones de OTA utilizadas para la realización del experimento fueron $0.247, 0.495, 0.742, 0.990, 1.238$ y $1.485\ \mu\text{M}$ ($100\text{-}600\ \mu\text{g L}^{-1}$), estas fueron preparadas por la disolución del stock metanólico con buffer de fosfatos $25\ \text{mM}$ a $\text{pH } 7$. La mezcla de adsorción se incubó durante $60\ \text{min}$ a $41\pm 1\ ^\circ\text{C}$ en una incubadora con agitación mecánica horizontal. Posteriormente al periodo de incubación, las partículas sólidas se separaron por centrifugación en microfuga a $14,000\ \text{rpm}$ durante 2 minutos. Se preparó un control sin adsorbente, para determinar las variaciones en concentración debidas a la precipitación o adsorción inespecífica del material utilizado.

7.6. Análisis cromatográfico

Una alícuota de $25\ \mu\text{l}$ del sobrenadante fue tomada para su análisis en HPLC. El sistema cromatográfico consistió en cromatógrafo HP serie 1100 con una bomba cuaternaria tipo isocrática equipada con una válvula de inyección, y un detector de fluorescencia Perkin Elmer Modelo LS50B equipada con una lámpara

($\lambda_{\text{excitación}}=345\text{nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}}= 465\text{nm}$). Los análisis se realizaron en sistema de fase reversa con una columna C-18 (25 cm x 4.6 mm x 5 μm). La fase móvil empleada es H₃PO₄ 0.25 N/Acetonitrilo (50:50), con flujo de 1.5 ml por minuto. Las muestras se comparan con un estándar de referencia integrando el área para estimar su concentración. Todos los reactivos y sustancias utilizados fueron grado cromatográfico.

7.7. Aplicación del modelo de Langmuir

Los datos de concentración de Azul de Metileno y de ocratoxina A residual, fueron utilizados para determinar la cantidad adsorbida y se analizaron con la ecuación de isoterma de Langmuir. Se estimaron los diferentes tipos de sitios que se encuentran en el adsorbente y la fuerza de atracción.

7.7.1. Isotermas de adsorción

Para el análisis fisicoquímico de la adsorción sobre aluminosilicatos, se parte de la ecuación general del Equilibrio Químico expresada en la ecuación 1

$$K_c = \frac{P^{\frac{c}{a}} D^{\frac{a}{b}}}{A^{\frac{c}{a}} B^{\frac{a}{b}}} \quad (1)$$

Que para el caso de la adsorción de compuestos orgánicos (C₀) en aluminosilicatos (Al) se puede expresar en términos de equilibrio, en la ecuación 2



Donde C₀Al es la fracción de compuesto orgánico adsorbida en el aluminosilicato. La constante de Equilibrio Químico para este fenómeno de adsorción se muestra en la ecuación (3).

$$K = \frac{[C_0Al]}{[C_0][Al]} \quad (3)$$

Reordenando tenemos que la concentración total de compuesto orgánico unida al polímero en equilibrio es

$$K[C_0] = \frac{[C_0Al]}{[Al]} \quad (4)$$

Lo cual nos permite definir q_e como la concentración máxima de adsorción de compuesto orgánico sobre el aluminosilicato

$$q_e = K[C_0] \quad (5)$$

Y considerando que los sitios de unión son idénticos e independientes, para un número máximo Q_{max} de sitios, se puede demostrar lo siguiente:

$$q_e = \frac{Q_{max}K [C_0]}{1 + K[C_0]} \quad (6)$$

Donde q_e es la concentración de compuesto orgánico adsorbida en el aluminosilicato, K es constante de Equilibrio químico de adsorción y Q_{max} es el número total de sitios de unión.

La ecuación anterior fue derivada por primera vez por Langmuir, para la adsorción de gases en sólidos (Tinoco, 1988), sin embargo, experimentalmente se ha demostrado que describe adecuadamente el fenómeno de adsorción de compuestos orgánicos (Grant y Phillips, 1998; Flores *et al.*, 1999)

Una de las soluciones gráficas que se han dado para este equilibrio de adsorción es la linearización de Lineweaver-Burk, la cual consiste en obtener los recíprocos de ambos lados de la ecuación

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1 + K[C_0]}{Q_{max}K [C_0]} \quad (7)$$

Reordenando la ecuación tenemos que:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_{max}K} \frac{1}{C_0} + \frac{1}{Q_{max}} \quad (8)$$

La cual es una de las formas lineares del equilibrio de adsorción. Gráficamente, se pueden resolver los parámetros de adsorción para este equilibrio graficando

$$\frac{1}{q_e} \text{ vs } \frac{1}{C_0} \quad (9)$$

La relación anterior nos da una gráfica del siguiente tipo

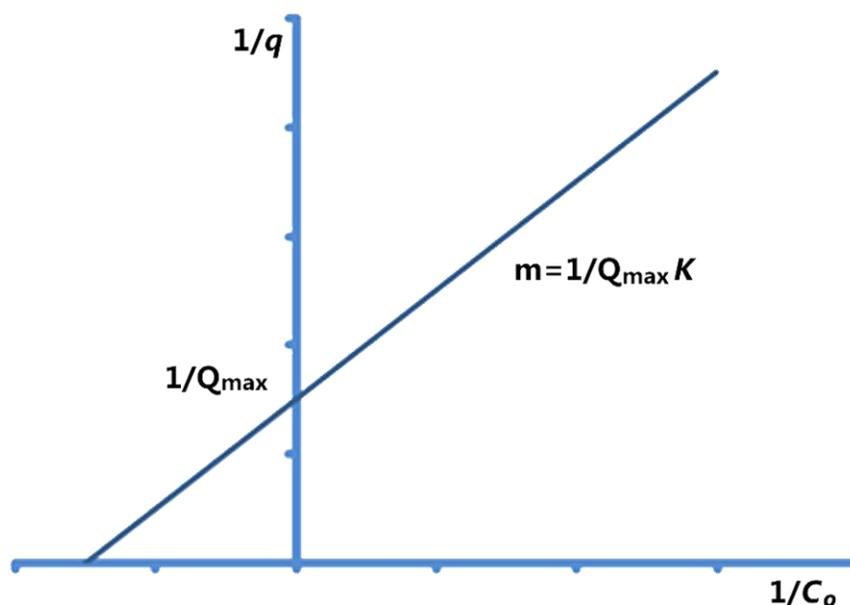


Figura 7. Linealización de Lineweaver-Burk.

Donde la ordenada al origen ($1/Q_{\max}$) es el inverso del número total de sitios de unión y la pendiente es ($m=1/Q_{\max}K$) es el inverso del producto del número total de sitios de unión y la constante de adsorción.

Las características fisicoquímicas tanto de los materiales como de ocratoxina A fueron consideradas para el análisis del proceso de adsorción.

7.8. Funciones de Error

Una evaluación típica de la calidad del gráfico de los datos experimentales está basado en la magnitud del coeficiente de correlación, por lo que si la isoterma da un valor de R^2 cercano a la unidad se considera que el gráfico se ajusta al modelo isoterma utilizado.

Suma de cuadrados del error (SCE)

$$\sum_{i=1}^n (q_{e, calc} - q_{e, meas})^2$$

(10)

8. Resultados y Discusión

8.1. Difracción de Rayos X

Las muestras de material adsorbente obtenidas fueron caracterizadas por análisis de fluorescencia de Rayos X, arrojando los resultados de su composición química mostrados en la Tabla 6, donde se puede observar que SiO_2 y Al_2O_3 son los principales constituyentes de los aluminosilicatos junto con otros óxidos presentes en pequeñas cantidades.

Tabla 6. Composición química de los aluminosilicatos en todas las etapas de Modificación (wt%)

	Material	SiO_2	Al_2O_3	Na_2O	CaO	MgO	FeO	CO_2
Arcilla	Natural	66.86	19.64	1.30	0.77	1.61	1.17	8.65
	Homoionizada Na	68.46	21.78	1.38	0.47	2.20	1.26	1.46
	Modificada Húmeda	70.66	19.40	1.89	1.17	1.61	0.00	4.41
	Modificada Seca	68.37	21.98	1.81	0.72	2.88	1.89	2.36
Zeolita	Natural	68.22	18.94	0.36	2.04	0.57	1.06	5.94
	Homoionizada Na	66.88	20.16	1.64	0.64	1.18	4.11	3.12
	Modificada Húmeda	67.18	18.51	1.29	1.57	0.64	1.96	8.12
	Modificada Se	69.01	18.58	0.36	1.53	0.58	1.18	5.89

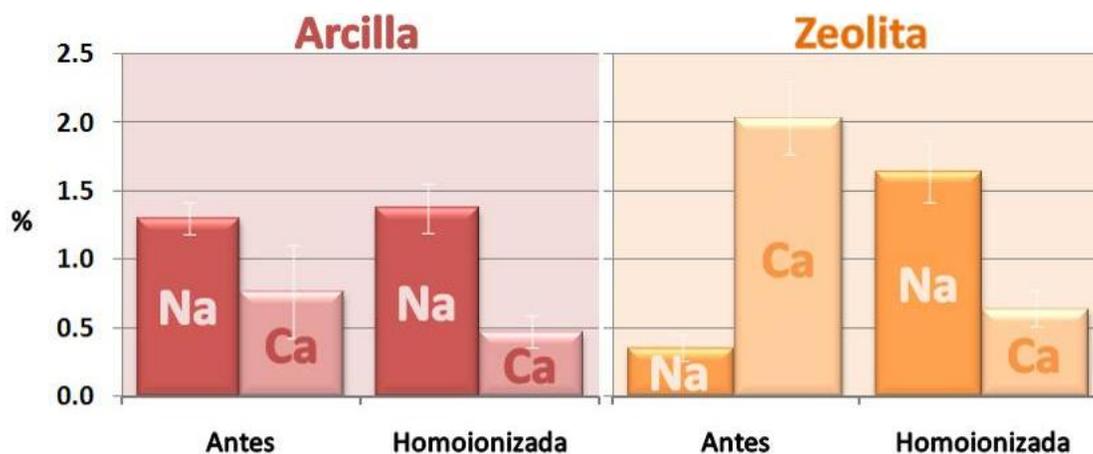


Gráfico 1. Diferencias de composición de Na^+ y Ca^{2+} antes y después del tratamiento de homoionización a Na^+ .

En el gráfico 1 se muestra la comparación de la cantidad de Na^+ y Ca^{2+} en los materiales arcilla y zeolita, antes y después del tratamiento de homoionización, demostrando que el tratamiento resulta efectivo para aumentar la cantidad de iones intercambiables de Na^+ y disminuyendo los de Ca^{2+} .

En la Figura 8 se observan dos microfotografías en MEB de las muestras de arcilla de forma sódica en a) antes de ser modificada, con hojas más cerradas y estructura más compacta y en la b) posterior a la modificación se observa a la arcilla más dilatada.

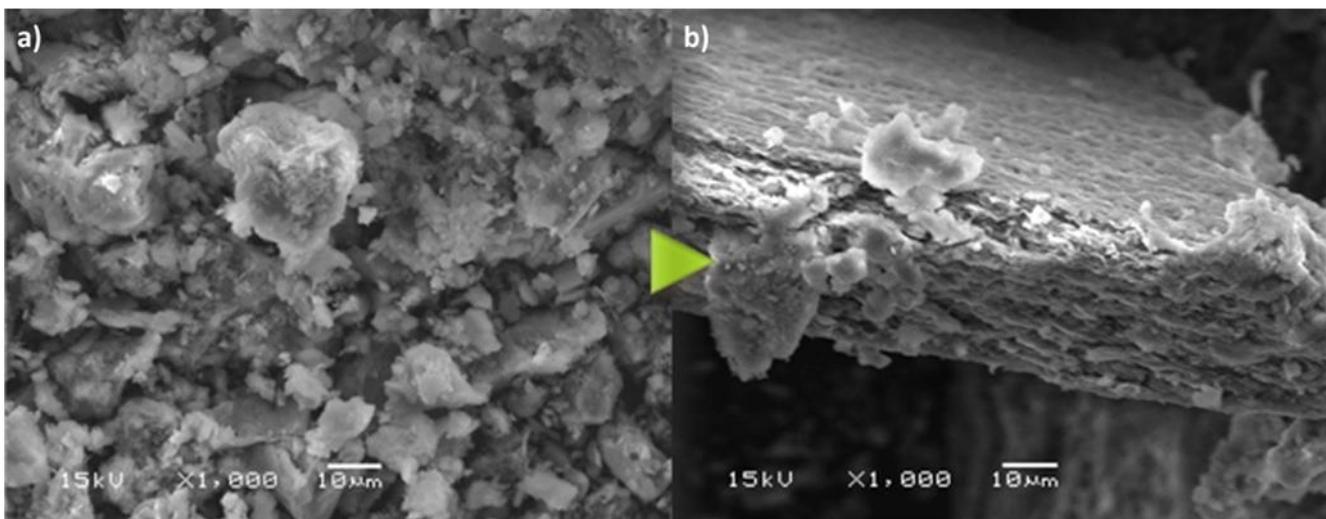


Figura 8. Muestras de arcilla a) forma sódica (Na^+) y b) Arcilla modificada con ODMBA.

8.2. Capacidad de Intercambio Catiónico

La diferencia en el comportamiento de la adsorción y en los valores de CIC demuestran cuantitativamente que los procedimientos realizados para la homoionización y modificación se llevaron a cabo.

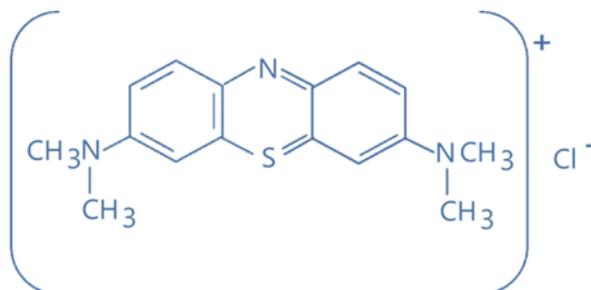


Figura 9. Estructura química del azul de metileno.

La isoterma fue aplicada para el análisis de todos los datos obtenidos tanto para la adsorción de azul de metileno como de OTA, con la finalidad de discernir las diferencias y la influencia de los tratamientos en la adsorción para cada etapa. La isoterma de equilibrio obtenida de cada experimento fue graficada empleando la linealización de Lineweaver-Burk del modelo de Langmuir, mostrados en los gráficos 4 y 5.

Los parámetros obtenidos de los análisis por isotermas (Gráficos 4 y 5) se muestran en la Tabla 7 para la adsorción de azul de metileno y Tabla 8 para adsorción de OTA. El valor estadístico de la R^2 testifica que los datos experimentales se ajustan bien a la ecuación del modelo.

La molécula de azul de metileno es de estructura orgánica y presenta una carga positiva en solución acuosa, por lo que su adsorción por los aluminosilicatos está influenciada principalmente por la carga negativa de su superficie dada por los grupos Silanol.

Tabla 7. Parámetros de Adsorción de azul de metileno

	Material	Pendiente	Ordenada	Q_{max}	K	% adsorción	R^2	SCE
Arcilla	Natural	2.067	0.0823	12.1491	0.040	43.52	0.958	0.0089
	Tamizada	1.038	0.0352	28.4167	0.034	44.11	0.993	0.0017
	Homoionizada	0.998	0.0195	51.2576	0.020	90.86	0.973	0.0062
	Modificada H	0.952	0.0562	17.8035	0.059	79.77	0.969	0.0065
	Modificada S	0.664	0.1551	6.4494	0.234	94.06	0.972	0.0022
Zeolita	Natural	3.676	0.3903	2.5622	0.106	26.53	0.901	0.2776
	Tamizada	3.005	0.4677	2.1383	0.156	29.53	0.787	0.4839
	Homoionizada	1.285	0.2757	3.6276	0.215	51.92	0.938	0.0247
	Modificada H	1.669	0.3156	3.1681	0.189	46.10	0.870	0.0925
	Modificada S	1.091	0.6939	1.4410	0.636	44.65	0.582	0.6870

Tabla 8. Parámetros de Adsorción de OTA

	Material	Pendiente	Ordenada	Q_{max}	K	% adsorción	R^2	SCE
Arcilla	Natural	100.779	-80.8810	-0.0124	-0.803	4.43	0.950	4286.61
	Tamizada	20.380	-7.0059	-0.1427	-0.344	8.76	0.942	204.76
	Homoionizada	4.874	8.3358	0.1200	1.710	13.89	0.534	165.69
	Modificada H	3.646	5.6667	0.1765	1.554	24.25	0.471	119.36
	Modificada S	2.421	0.2759	3.6246	0.114	48.05	0.974	1.26
Zeolita	Natural	24.721	4.0557	0.2466	0.164	4.43	0.749	1641.01
	Tamizada	19.174	1.3584	0.7361	0.071	5.92	0.736	1057.76
	Homoionizada	12.871	2.4754	0.4040	0.192	7.65	0.932	97.35
	Modificada H	10.107	2.9582	0.3380	0.293	10.64	0.912	79.08
	Modificada S	1.299	0.1185	8.4359	0.091	85.85	0.988	0.17

Los estudios de equilibrio de adsorción se realizan para determinar la capacidad de un adsorbente, el equilibrio se establece cuando la concentración del adsorbato en la solución está en un balance dinámico con la superficie, es decir que la cantidad del colorante o la toxina adsorbida (q_e) es igual a la cantidad que es desorbida (Almeida *et al.*, 2009). Lo anterior puede representarse graficando la concentración del adsorbato en la fase sólida (q_e) contra su concentración en la fase líquida (C_e) a temperatura fija (Gráficos 2 y 3). La forma del gráfico provee información cualitativa sobre la naturaleza de la interacción soluto-superficie. La distribución de las moléculas mostrada por este gráfico, es una medida de la posición del equilibrio en el proceso de adsorción, este puede ser expresado por una o más series de ecuaciones isotermas. Además, la forma de la isoterma resultante y los parámetros obtenidos pueden considerarse con el fin de predecir si el sistema de adsorción es favorable o desfavorable. Finalmente, las isotermas ayudan a evaluar la capacidad del material adsorbente para un compuesto específico, y posteriormente discriminar entre diferentes materiales y escoger el más apropiado para alguna aplicación con ciertas condiciones en particular. Según la clasificación de isotermas de adsorción de solutos en soluciones

acuosa propuesta por Giles *et al.*, 1974 (citado por Gimbert *et al.*, 2008), las de tipo "L" de Langmuir, la más comúnmente usada, se caracteriza por una región inicial cóncava al eje de la concentración X, lo que sugiere que no hay una competencia fuerte entre el adsorbato y el solvente por ocupar los sitios de adsorción. La clase "H" de alta afinidad, resulta de una afinidad muy grande entre el adsorbente y el adsorbato a bajas concentraciones donde los puntos del gráfico se localizan muy cercanos a la ordenada; este tipo de isoterma sugiere que la captación del adsorbato por el material está asociada con fuerzas químicas en lugar de atracciones físicas (Gimbert *et al.*, 2008).

En los Gráficos 2 y 3, para el caso de las arcillas, el cambio en cuanto a la afinidad por azul de metileno es marcado para el material homoionizado a Na^+ , con un aumento de 4.22 veces de la Q_{max} de 12.14 a 51.25 (Tabla 7) y pasando de un comportamiento de tipo L por los materiales parentales a uno de tipo H por el material homoionizado donde la isoterma aumenta rápidamente a concentraciones bajas lo que indica que existen muchos sitios de fácil acceso y gran afinidad por las moléculas de azul de metileno. El adsorbente se satura cuando el gráfico muestra un tipo de asíntota. El cambio en la pendiente y del punto de saturación para las isotermas de los materiales modificados por el proceso húmedo y seco, puede deberse a la formación de una monocapa, lo que causa que el azul de metileno sobrante en solución sea mayor y la cantidad retenida aumente muy lentamente, debido a que menos sitios activos se encuentran disponibles en el proceso de adsorción.

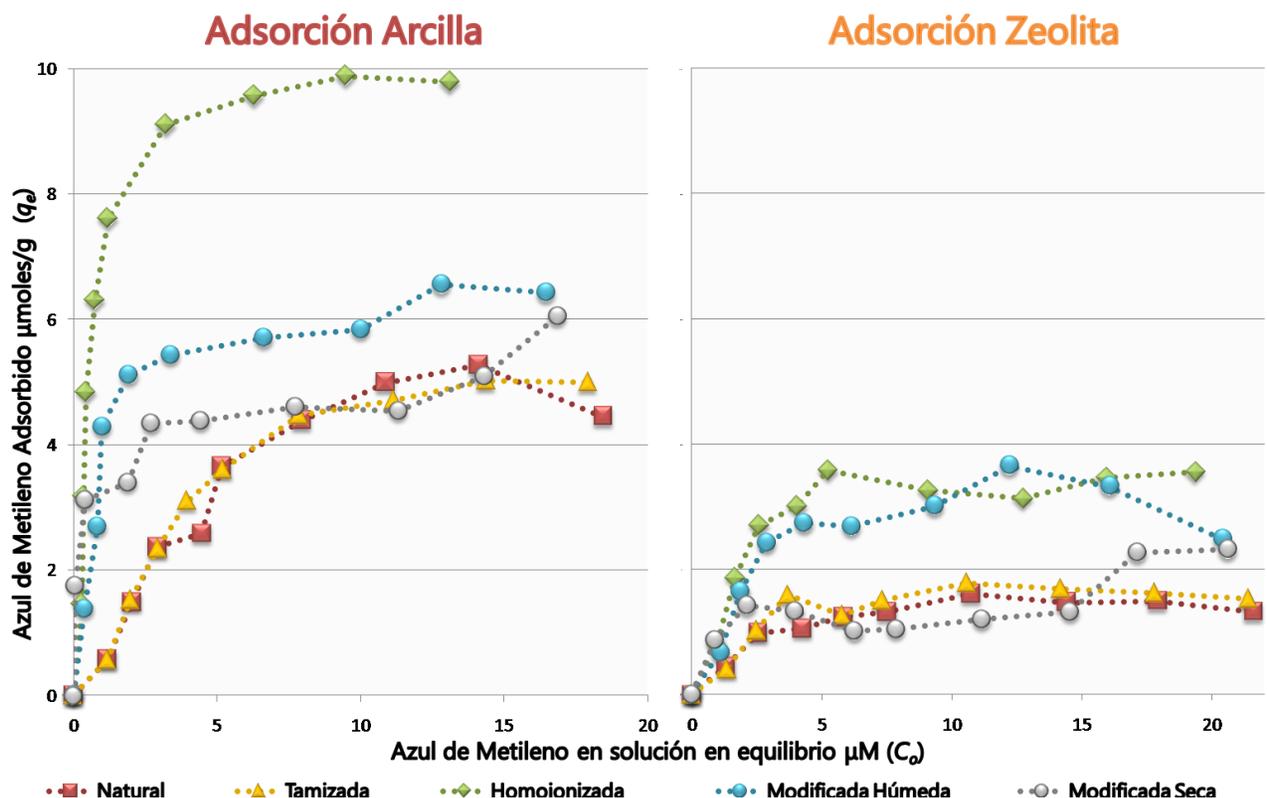


Gráfico 2. Isotermas de adsorción experimental de azul de metileno de las 5 etapas de arcillas y zeolitas.

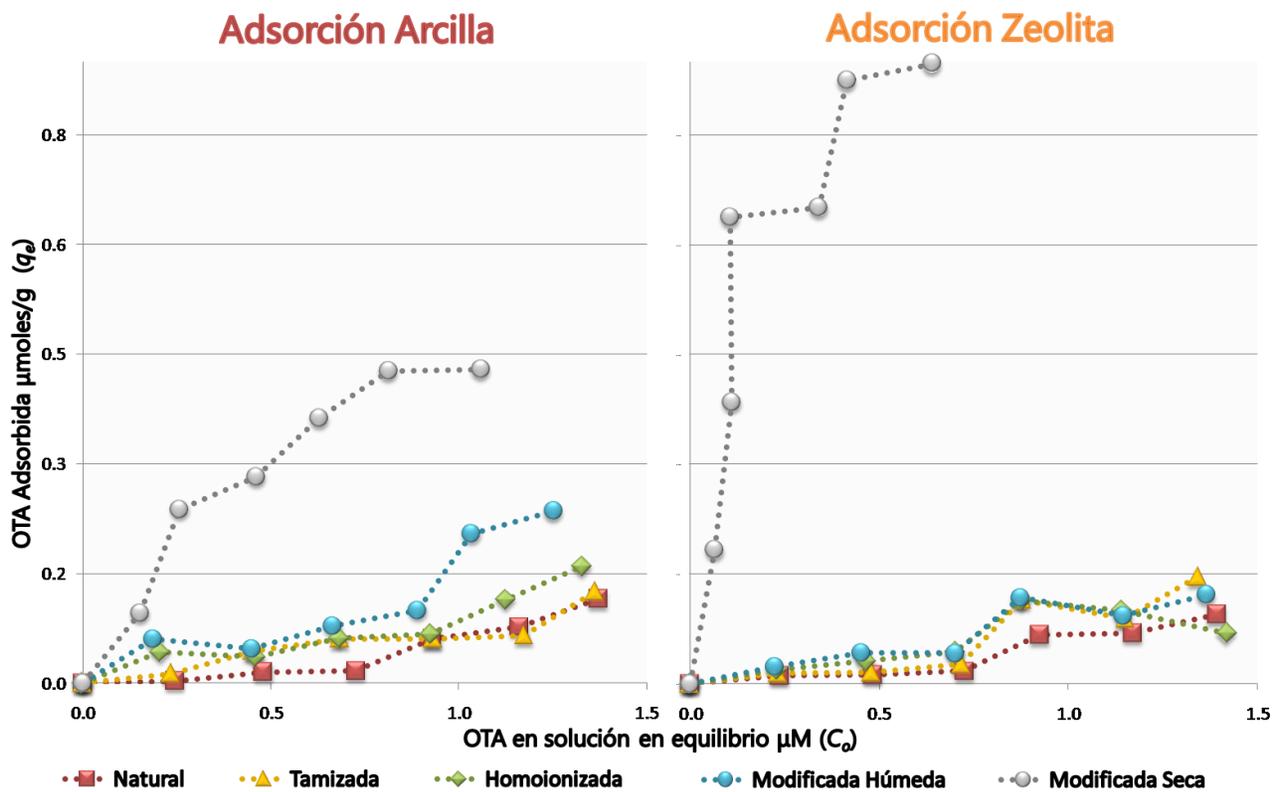


Gráfico 3. Isotermas de adsorción experimental de azul de metileno de las 5 etapas de arcillas y zeolitas.

8.3. Adsorción de OTA

En base a la estructura química de OTA que es una molécula no polar que posee un grupo carboxilo y fenólico, su adsorción por un organoaluminosilicato puede variar según el pH; debido al valor de pK_a de su grupo fenólico de 7, OTA en este experimento se encuentra de forma aniónica.

La adsorción por los materiales probados fue: Arcilla Natural: 4.43 y Zeolita Natural 4.66 %, estos resultados pueden interpretarse de acuerdo a lo reportado por Daković *et al.*, 2003, quienes indican que en los aluminosilicatos no cubiertos por ODMBA predomina una cobertura de cargas negativas, por tanto, la forma aniónica de OTA es repelida. El pequeño porcentaje adsorbido puede deberse a que OTA puede interactuar con los cationes metálicos de la superficie por dos tipos de interacciones: el anillo aromático puede hacer una interacción pi-catión, el oxígeno del grupo carboxilo y el N pueden coordinar al catión metálico y hacer un anillo quelato de 5 miembros que puede adicionalmente estabilizar la adsorción.

Los resultados para la segunda etapa fueron de Arcilla Tamizada 6.94 y Zeolita Tamizada 6.85%. El material tamizado es ligeramente más eficiente debido tal vez, a la eliminación de cristales de cuarzo que no ayudan en la adsorción, además de que al limitar a los cristales del adsorbente a un tamaño menor o igual a $75\mu\text{m}$, el área expuesta aumenta.

A diferencia de lo reportado por Tomašević-Čanović *et al.*, 2003, en este experimento sí se presentaron diferencias en la adsorción, entre los procedimientos húmedo y seco.

La modificación química por medio de la ocupación por ODBMA en los sitios de intercambio de los aluminosilicatos produce un cambio en las propiedades de su superficie de hidrofílica a hidrofóbica, los resultados de la adsorción por los materiales modificados por el proceso húmedo es de 24.25 y 10.64 %, para arcilla y zeolita respectivamente, los cuales no concuerdan con lo reportado por Tomašević-Čanović *et al.*, 2003, y la forma S de la isoterma indica que existen dos mecanismos de adsorción, esto puede deberse a que estos materiales no están cubiertos por completo y en una proporción muy baja por ODMBA, pudiendo presentar más de una forma de adsorción.

Al modificar los aluminosilicatos con cationes orgánicos como ODMBA, su capacidad de adsorción mejora según sea la cobertura de su superficie proporcionándole más o menos propiedades hidrofóbicas y la adsorción es independiente de la forma en solución de OTA (Daković *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos para la modificación en seco: 48.05 y 85.85 % para arcilla y zeolita respectivamente sugieren que la modificación por este método es mucho más eficiente, ya que al no realizarse la modificación en una solución no puede perderse nada del ODMBA aplicado.

La capacidad de adsorción de los materiales arcillosos aumentó de 2.47 a 35.29 $\mu\text{moles g}^{-1}$ para el proceso húmedo y 724.92 $\mu\text{moles g}^{-1}$ para el seco. Para zeolita paso de 49.31 a 67.6 $\mu\text{moles g}^{-1}$ para el proceso húmedo y 1687.19 $\mu\text{moles g}^{-1}$ para el seco. La zeolita modificada por el método seco fue el mejor adsorbente obtenido, aumentando por un factor de 34.21 veces su capacidad de adsorción.

Los gráficos isotermiales (Gráfico 3) de la adsorción de OTA por los materiales modificados por el método seco ilustran que la concentración más alta utilizada (1.48583 μM) no fue suficiente para que la capacidad de adsorción de estos materiales llegara a la saturación.

En estudios previos sobre modificación química y adsorción de OTA entre menos fuera la cobertura de la superficie de los aluminosilicatos por ODMBA, la adsorción se volvía más pH dependiente, es decir a la forma en que OTA se encuentra en la solución (iónica o neutra). Mejorando a pH 3 donde OTA esta de forma parcialmente aniónica; y siendo más baja a pH 7 y 9 donde está en forma totalmente aniónica.

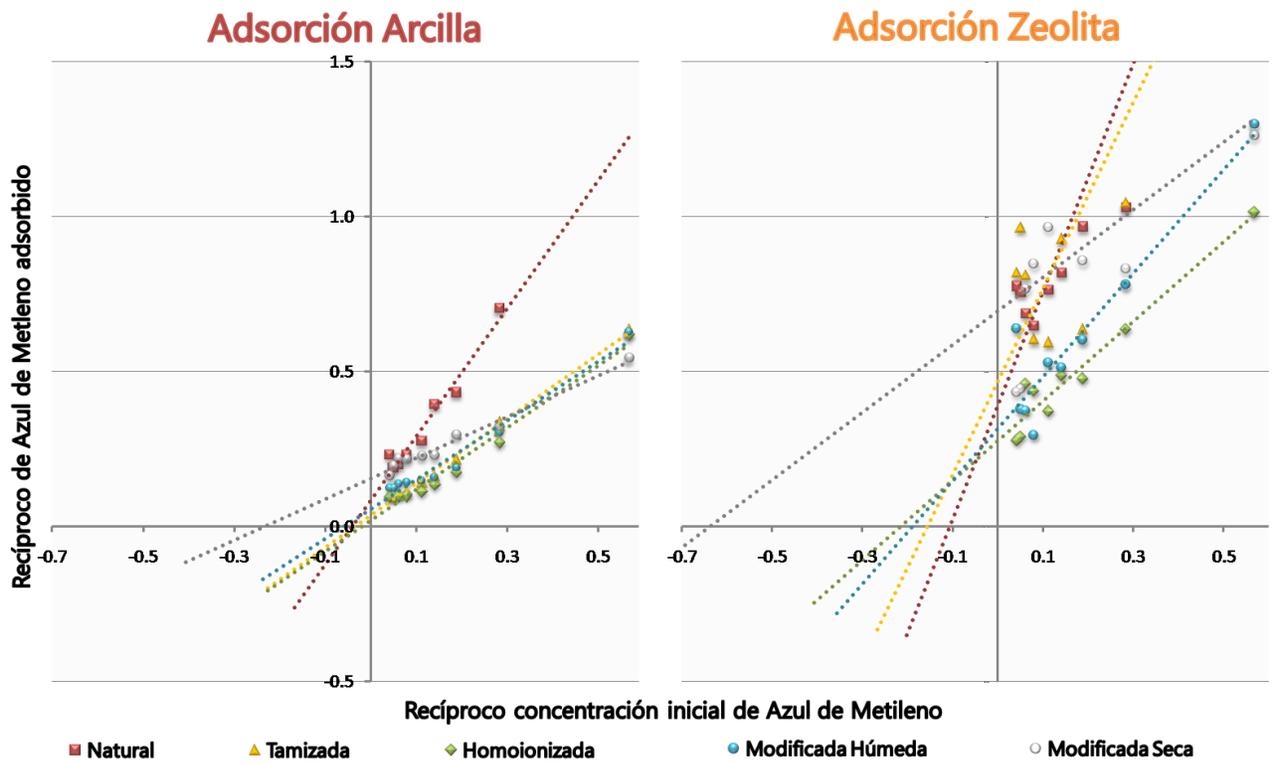


Gráfico 4. Isotermas lineales de la adsorción experimental de Azul de metileno por arcillas y zeolitas.

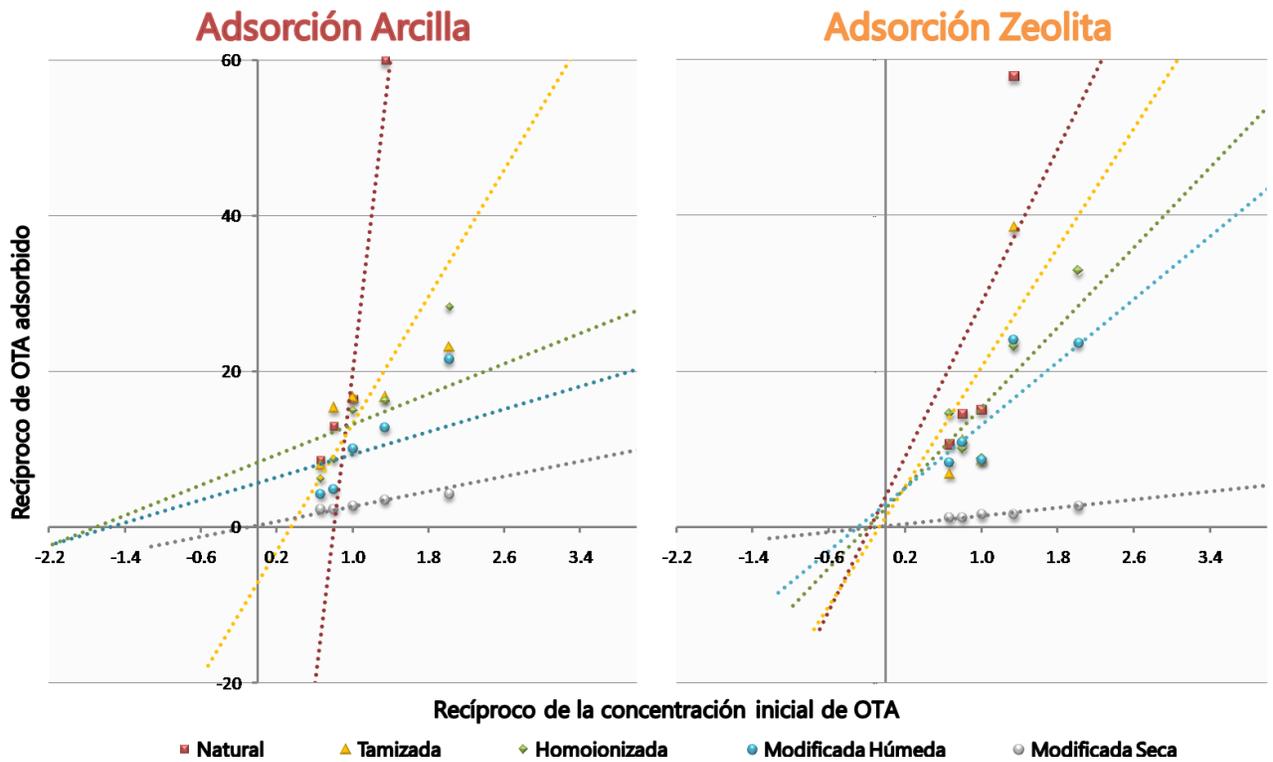


Gráfico 5. Isotermas lineales de la adsorción experimental de OTA por arcillas y zeolitas.

8.3. Efecto de la concentración inicial del adsorbato

En los gráficos 6 para azul de metileno y 7 para OTA, se muestra el comportamiento de la adsorción, comparando el comportamiento de la curva al aumentar la concentración inicial del adsorbato y, el porcentaje de azul de metileno y OTA adsorbidos.

En ambos casos, tanto para azul de metileno y OTA, al aumentar la concentración del adsorbato inicial, el comportamiento de la curva muestra que la retención del adsorbato aumenta conforme aumenta su concentración inicial, hasta llegar a al punto de saturación del adsorbente. Sin embargo, en términos de porcentaje retenido, la curva presenta un pico de adsorción máxima, mostrando que las concentraciones más adecuadas (tanto de adsorbente como de adsorbato) para una adsorción eficiente son particulares de cada adsorbente, esto es importante para definir la cantidad de adsorbente que deberá de utilizarse en la práctica.

Estas diferencias se presentan debido a que la concentración inicial de adsorbato en solución es un factor importante en la superación de la resistencia de la transferencia de masa entre las fases acuosa y sólida (Almeida *et al.*, 2009).

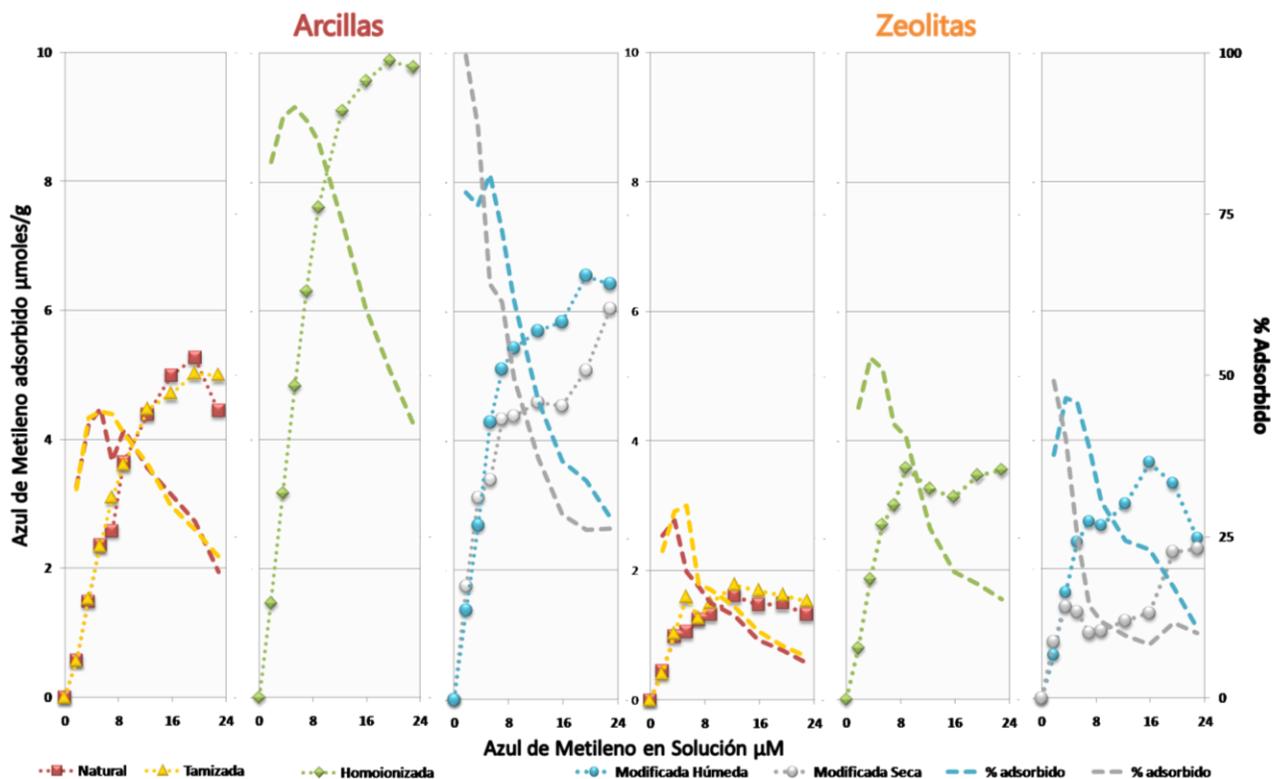


Gráfico 6. Comparación de la cantidad y % adsorbido a diferentes concentraciones probadas para azul de metileno.

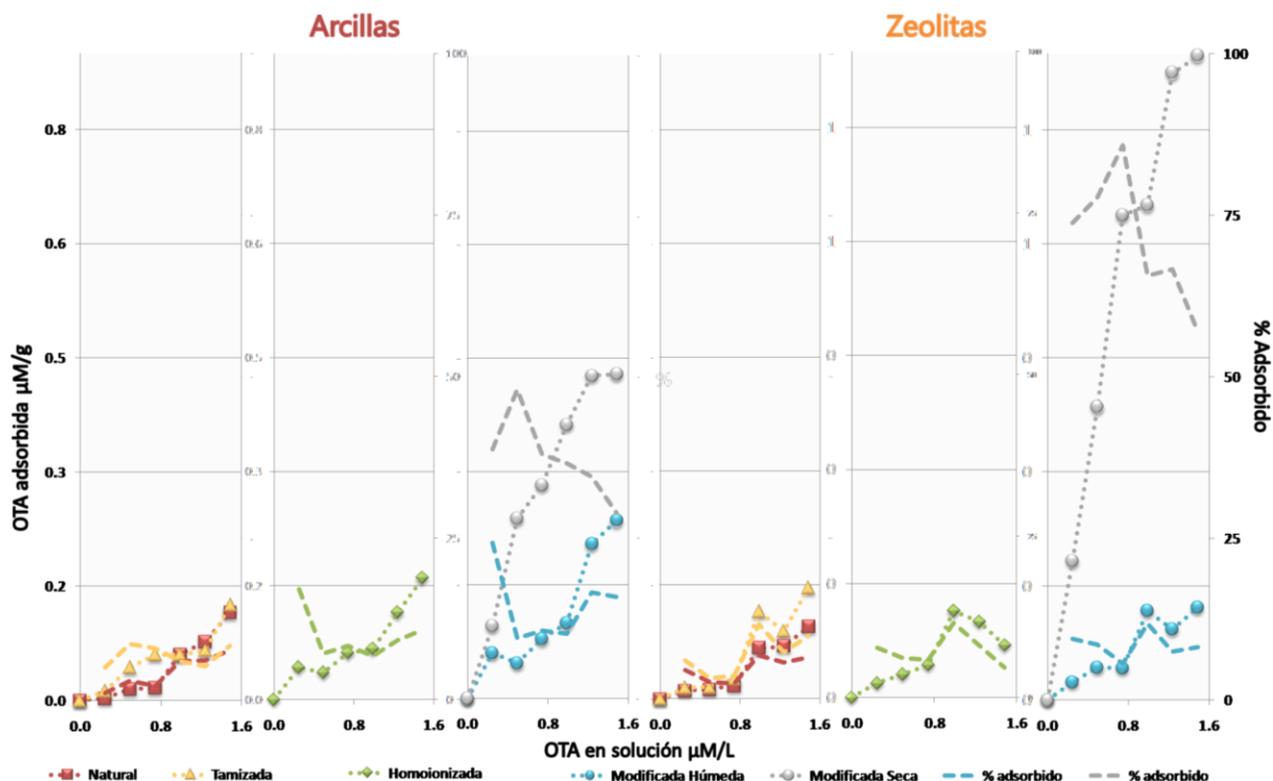


Gráfico 7. Comparación de la cantidad adsorbida con el % adsorbido a las diferentes concentraciones probadas para OTA.

Tabla 9.

Cantidad de ODMBA aplicada con respecto al valor de CIC		Capacidad de adsorción OTA	
Materiales	% Ocupado	# Sitios Qmax	% Adsorbido
Arcillas	Natural	0.000	4.43
	Modificada Húmeda	0.184	24.25
	Modificada Seca	0.776	48.05
Zeolitas	Natural	0.000	4.43
	Modificada Húmeda	2.600	10.64
	Modificada Seca	3.681	85.85

En la tabla 9 se comparan a los materiales modificados con los materiales originales, destacando que el porcentaje de adsorción mejora significativamente tanto para arcillas y zeolitas, intercambiando a los cationes inorgánicos con pocas cantidades de ODMBA .

Desventajas del Intercambio Iónico en fase acuosa

Está bien demostrado que las arcillas poseen una alta capacidad de hinchamiento en agua debido a su naturaleza hidrofílica, consecuentemente la expansión de las láminas permiten un mejor proceso de difusión de moléculas entre ellas, debido a esto y a la alta capacidad de intercambio catiónico presente en el material homoionizado, era de esperarse que la modificación química por el método húmedo presentara de los resultados más eficientes en cuanto a la adsorción de OTA, lo que significaría que el aumento en la

hidrofobicidad del material fue exitoso. Los datos presentados en el estudio, contrarios a esta suposición pueden deberse, a que los aluminosilicatos están típicamente de la forma H^+ , si esta es lavada antes o después de los experimentos de intercambio iónico el intercambio de NH_4^+/Na^+ está acompañada por una importante intercambio por iones hidronio H_3O^+/Na^+ .

Varios autores recomiendan que para asegurar el intercambio iónico por el catión orgánico deseado, el procedimiento de modificación en fase acuosa sea realizado varias veces, lo que implica que se consuma gran cantidad de agua, producción de agua residual que deberá ser regenerada o desechada al ambiente, además de consumir exceso de tiempo.

Por el contrario en el intercambio por reacción en estado sólido, las partículas secas de los aluminosilicatos y sales u óxidos que contienen los cationes orgánicos de interés, se intercambian en un solo paso y sin pérdidas como en el caso anterior (Karge y Weitkamp, 2002).

9. Conclusiones

Los resultados presentados confirman que los aluminosilicatos arcilla y zeolita en su forma natural no son buenos adsorbentes *in vitro* de la forma aniónica de OTA que se presenta a pH 7.

El tamizado de los materiales aumenta la superficie expuesta por estos para la adsorción, mejorándola ligeramente para el caso de OTA.

El procedimiento de homoionización a Na^+ es efectivo para aumentar los niveles de iones Na^+ intercambiables en los aluminosilicatos arcilla y zeolita, por lo que se vio una notable mejoría en su capacidad de intercambio catiónico duplicándose éste en ambos casos, lo que hace más eficiente su intercambio por los cationes de ODMBA.

Sin embargo, debido a las desventajas del procedimiento de intercambio en suspensión acuosa, la capacidad de adsorción de OTA por los materiales modificados por el proceso húmedo mejoran poco en comparación con los resultados obtenidos de los materiales modificados por el método seco, pasando en el caso de las arcillas de un 4.43 a 48.05% y en el caso de zeolitas de 4.43% a 85.85%, sin necesidad de cubrir al 100% los sitios intercambiables en los materiales.

Referencias:

- Almeida, C.A.P., Debacher, N.A., Downsc, A.J., Cotteta, L., Mello, C.A.D. 2009. Removal of methylene blue from colored effluents by adsorption on montmorillonite clay. *Journal of Colloid and Interface Science* **332**:46–53
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A., 2008. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* **20**:326-333.
- Betega de Paiva, L., Morales, A. R., Valenzuela, D. F. R. 2008. Organoclays: Properties, preparation and applications. *Applied Clay Science* **42**:8-24.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Chang, P., 2001. Mycotoxins. Encyclopedia of life sciences © John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net
- Castella, G., Larsen, T. O., Cabañes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P., Geisen R. 2002. Molecular Characterization of Ochratoxin A Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology* **25**:74–83.
- Cevallos, G. A. L., Ávila, G. E., Rosiles, M. R., Flores C., 2007. Evaluación de cuatro adsorbentes y/o inactivadores de micotoxinas en dietas de pollos de engorda contaminados con ocratoxinas. Memorias del XXXII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 25 al 28 de abril de 2007, Acapulco Guerrero.
- Klein, C., Hurlbut, C. S. 1998. Manual de Mineralogía. 4ª Edición. Editorial Reverté, España.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Dondur, V., Rottinghaus, G. E., Medaković, V., Zarić, S. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **46**:20–25.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Rottinghaus, G., Dondur, V., Mašić, Z. 2003. Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **30**:157-165.
- Dogãn, M., Alkan, M., Demirbas, Ö., Özdemir, Y., Özmetin C. 2006. Adsorption kinetics of maxilon blue GRL onto sepiolite from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal* **124**:89–101.
- Domínguez, J. M. y Schifter I. 2003. Las Arcillas: El Barro Noble. Colección: La ciencia Para Todos # 109. Fondo de cultura Económica, México.
- Flores C. M.; Dominguez J. M.; Diaz de León J. 1999. Modelling and experimental comparison of the differential adsorption of B1 and G1 aflatoxins on mineral aluminosilicates surfaces. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* **18(3)**:213-220.
- Flores, O. C., Hernández, P. L., Vázquez, M. J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tecnología Pecuaria México* **44(2)**: 247-256.
- García, A. R., Avila, E., Rosiles, R., Petrone, V. M. 2003. Evaluation of Two Mycotoxin Binders to Reduce Toxicity of Broiler Diets Containing Ochratoxin A and T-2 Toxin Contaminated Grain. *Avian Diseases* **47**:691–699.

- Gimbert, F., Morin-Crini, N., Renault, F. Badot, P., Crini, G. 2008. Adsorption isotherm models for dye removal by cationized starch-based material in a single component system: Error analysis. *Journal of Hazardous Materials* **157**: 34–46.
- Grant, P. G., Phillips, T. D. 1998. Isothermal Adsorption of Aflatoxin B₁ on HSCAS Clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:599-605.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**:101–134.
- Huwig, A., Freimund, S. Käppeli, O., Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* **122**:179–188.
- Karge, H. G., Weitkamp, J. 2002. Post-Synthesis Modification I. Series: Molecular Sieves, Vol. 3. Elsevier, New York.
- Limousin, G., Gaudet, J.-P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., Krimissa M. 2007. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry* **22**:249–275.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* **119**:131–139.
- Mantle, P. G. 2004. Refining risk assessment of Ochratoxin A through applicable toxicologic experimentation. *Revista Mexicana De Micología* **19**:81-86.
- Marquardt, R. R. y Frohlich, A. A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* **70**:3968-3988.
- Moss M. O., 2002, Fungal metabolites. Encyclopedia of life sciences © John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
- Richard J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses — An overview. *International Journal of Food Microbiology* **119**:3–10.
- Ringot, D., Chango, A. Schneider, Y., Larondelle, Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* **159**:18–46.
- Schwartz G. G. 2002. Does Ochratoxin A Cause Testicular Cancer? *Cancer Causes and Control* **13**:91-100.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G., Matijašević, S., Đuričić, M. 2003. Surfactant modified zeolites—new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials* **61**:173–180.
- Valero, A., Farré, J. R., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marín, S. 2006. Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. *Food Microbiology* **23**:753–756.
- Wang, J. y Groopman, J. D. 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* **424**:167–181.
- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R. R., Li, S., Vodela, J. K., Frohlich, A. A., Kemppainen B. W. 1996. Toxicity of Ochratoxin A, Its Opened Lactone Form and Several of Its Analogs: Structure–Activity Relationships. *Toxicology And Applied Pharmacology* **137**:182–192.