



Escola Politècnica Superior
d'Enginyeria de Vilanova i la Geltrú

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

PROYECTO FINAL DE CARRERA

TÍTULO:	DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE FUMONISINAS EN ALIMENTOS
AUTORAS:	MARTA PÉREZ MADUEÑO IBTISSAM RIFI ZAITOUNI
TITULACIÓN:	INGENIERÍA TÉCNICA INDUSTRIAL, ESPECIALIDAD QUÍMICA INDUSTRIAL
DIRECTORES:	Dr. VICENTE RODILLA I ALAMÀ Dra. MONTSERRAT RUIZ PLANAS
DEPARTAMENTO:	INGENIERÍA QUÍMICA (713)
FECHA:	27 DE JUNIO DE 2011

- Este proyecto tiene en cuenta aspectos medioambientales: SÍ NO

PROYECTO FINAL DE CARRERA

RESUMEN (máximo 50 líneas)

La realización de este proyecto plantea la posibilidad de ofrecer una alternativa eficaz y sostenible para la detoxificación de fumonisinas en alimentos.

El paso previo a la aplicación del método de detoxificación ha sido la detección de fumonisina, proceso para el cual se ha puesto en marcha el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, más conocido como método ELISA.

Para llevar a cabo el proceso de detoxificación hemos evaluado el uso de perlas de alginato de calcio como adsorbente en sustitución de las arcillas que son los adsorbentes más utilizados en la actualidad con este fin dentro de la alimentación animal (piensos).

Los motivos que existen para la detoxificación de fumonisinas son debidos tanto a sus efectos negativos sobre la salud animal y humana, como a sus efectos devastadores sobre los cultivos, destacando su gran afectación a los cereales.

Palabras clave (máximo 10):

Fumonisinias	Adsorción	Alginato de calcio	Micotoxinas
Liofilización	Perlas	Micotoxicosis	Detoxificación
Toxicidad	Isotermas		

ÍNDICE

1.	OBJETIVO	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	1
3.	MICOTOXINAS DEL GÉNERO <i>FUSARIUM</i>	3
	3.1. Introducción	3
	3.2. Fumonisinias.....	4
	3.2.1. Estructura química de las fumonisinias.....	4
	3.2.2. Efectos tóxicos de las fumonisinias en animales de granja y de compañía.....	5
	3.2.3. Límites máximos de fumonisinias en alimentos y piensos	6
	3.3. Tricotecenos	7
	3.3.1. Efectos tóxicos en los animales de compañía:	7
	3.3.2. T-2.....	7
	3.3.3. Deoxinivalenol.....	8
	3.4. Zearalenona.....	9
	3.4.1. Efectos en animales.....	9
	3.4.2. Efectos tóxicos en animales de compañía	9
	3.4.3. Efectos tóxicos en humanos	9
4.	MÉTODOS ACTUALES PARA LA PREVENCIÓN, DESTOXIFICACIÓN Y MINIMIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS EN ALIMENTOS...10	
	4.1. Prevención de plantas contaminadas por especies <i>Fusarium</i> y sus micotoxinas asociadas en el campo de cultivo.....	10
	4.1.1. Rotación de cultivos.....	11
	4.1.2. Siembra	12
	4.1.3. Fertilizantes del suelo.....	12
	4.1.4. Fecha de siembra.....	12
	4.1.5. El enfoque transgénico de resistencia de las plantas.....	13
	4.1.6. Control químico de la infección por <i>Fusarium</i>	13
	4.1.7. El control biológico de la infección por <i>Fusarium</i>	14
	4.1.8. Control de insectos.....	14
	4.1.9. Control de malezas	15
	4.1.10. La agricultura ecológica.....	15
	4.1.11. Modelización del riesgo de micotoxinas en el terreno	15
	4.2. La cosecha y el control posterior a la cosecha de las micotoxinas	16
	4.2.1. Estado fisiológico de las plantas	16
	4.2.2. Ajuste de la cosechadora.....	16
	4.2.3. Nivel de humedad antes y durante el almacenamiento	16
	4.2.4. La temperatura durante el almacenamiento	17

4.2.5.	Medidas cautelares para las prácticas de ensilaje.....	17
4.2.6.	Tratamiento físico de los granos contaminados	17
4.2.6.1.	Clasificación.....	17
4.2.6.2.	Lavado	18
4.2.6.3.	Descascarillado.....	18
4.2.6.4.	Tratamiento térmico	18
4.2.6.5.	Molienda de granos	18
4.2.6.6.	Irradiación.....	19
4.2.7.	Tratamiento químico de los granos contaminados	19
4.2.7.1.	La reacción de las fumonisinas con azúcares reductores.....	20
4.2.8.	Tratamientos biológicos	20
4.2.8.1.	Biotransformación de tricotecenos, ocratoxinas y zearalenona.....	20
4.2.9.	Tratamientos con adsorbentes	21
4.2.9.1.	Arcillas	21
4.2.9.2.	Carbón activado.....	22
5.	ADSORCIÓN.....	23
5.1.	Introducción	23
5.2.	Tipos de adsorción.....	24
5.2.1.	Atracción eléctrica entre el soluto y el adsorbente.....	24
5.2.2.	Atracción tipo Van der Waals.....	24
5.2.3.	Atracción de naturaleza química o quimisorción.....	25
5.3.	Factores que influyen en la adsorción.....	25
5.3.1.	Concentración	25
5.3.2.	Temperatura	25
5.4.	Mecanismo de adsorción	26
5.5.	Isotermas de adsorción	27
5.5.1.	Isoterma de Langmuir:	27
5.5.2.	Isoterma de Freundlich.....	28
6.	ADSORBENTE ALGINATO DE CALCIO	30
6.1.	Introducción	30
6.2.	Estructura química	30
6.3.	Propiedades.....	33
6.3.1.	Estabilidad.....	33
6.3.2.	Solubilidad	33
6.3.3.	Viscosidad.....	34
6.4.	Producción.....	35
6.5.	Aplicaciones.....	36
6.6.	Geles de calcio	37

6.6.1.	Interacción de la fumonisina con las perlas de alginato cálcico.....	38
7.	LIOFILIZACIÓN	39
7.1.	Definición.....	39
7.1.1.	Ventajas de la liofilización.....	39
7.1.2.	Desventajas de la liofilización	40
7.2.	Descripción del proceso	40
7.3.	Aplicaciones.....	41
7.4.	Partes generales de un liofilizador	42
7.4.1.	Cámara del liofilizador.....	43
7.4.2.	Condensador.....	43
7.4.3.	Sistema de vacío.....	43
8.	TECNICA ELISA.....	44
8.1.	Introducción	44
8.2.	Tipos de ensayo ELISA	45
8.2.1.	ELISA Directo	45
8.2.2.	ELISA Indirecto.....	45
8.2.3.	ELISA Sandwich “DAS”	46
8.2.4.	ELISA Sandwich “HADAS”	46
8.2.5.	ELISA competitivo	47
8.3.	Técnica ELISA para micotoxinas	47
8.4.	Pasos generales de un ELISA	48
8.5.	Interpretación de resultados.....	50
8.6.	Dispositivos empleados.....	50
9.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	51
9.1.	Fabricación de perlas de alginato.....	51
9.2.	Liofilización de las perlas de alginato	54
9.3.	Método analítico de detección y adsorción de la fumonisina por el proceso ELISA.....	57
9.4.	Resultados	61
9.4.1.	Calibración.....	61
9.4.2.	Determinación de la concentración inicial de las muestras analizadas	62
9.4.3.	Adsorción: muestras de Fumonisina	62
9.4.4.	Adsorción: cereal	65
10.	CONCLUSIONES	68
11.	AMBIENTALIZACIÓN.....	69
12.	BIBLIOGRAFÍA	70

1. OBJETIVO

La finalidad de este proyecto es presentar una alternativa eficaz y sostenible para la eliminación de fumonisina contenida en los alimentos mediante un biopolímero (alginato de calcio). El método de detección utilizado ha sido mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, conocido como método ELISA.

2. INTRODUCCIÓN

El nombre de micotoxina deriva de la palabra griega “mikos” y de la latina “toxicum” que significan hongo y tóxico, respectivamente. Las micotoxinas están definidas como los metabolitos tóxicos¹ producidos por diversos hongos que crecen en los granos de los cereales, leguminosas y en alimentos derivados de los mismos como los piensos destinados a la alimentación animal.

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios que se asocian con la fase de crecimiento rápido. Los metabolitos secundarios son compuestos no esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro. Dentro de este grupo, están los antibióticos y las micotoxinas, y estas últimas pueden afectar negativamente a la salud de animales y humanos al ser ingeridas, inhaladas o absorbidas por la piel. Estas enfermedades se denominan micotoxicosis.

La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde la muerte a efectos nocivos en el sistema nervioso central, cardiovascular y respiratorio y en el aparato digestivo. Las micotoxinas pueden ser también agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos² e inmunodepresores, pero el efecto más importante de las micotoxinas es la capacidad de algunas de ellas de obstaculizar la respuesta inmunitaria y, por consiguiente, de reducir la resistencia a enfermedades infecciosas.

La contaminación por micotoxinas puede producirse en cualquier momento (en el campo, en el momento de la cosecha, en los procesos posteriores de elaboración...), y son varias las posibles vías de contaminación y varios los factores que afectan a la proliferación de hongos:

Los hongos pueden proliferar en un amplio intervalo de temperaturas y, por lo general, la tasa de crecimiento de los hongos será menor cuanto menor sea la temperatura y la cantidad de agua disponible.

Los insectos y los ácaros (artrópodos) pueden también contribuir notablemente al deterioro biológico de los cereales, debido a los daños físicos y a la pérdida de nutrientes que ocasiona su actividad, y también a causa de su interacción compleja con hongos y micotoxinas. La actividad metabólica de los insectos y ácaros genera un aumento del contenido de humedad y la temperatura de los cereales infestados. Los artrópodos actúan también como portadores de las esporas de los hongos y éstos pueden utilizar los residuos fecales de los artrópodos como fuente de alimento. Por otra parte, los hongos pueden proporcionar alimento a los insectos y ácaros pero, en algunos casos, pueden también actuar como patógenos.

Otro factor importante que puede afectar a la proliferación de hongos es la proporción de granos quebrados en una partida de cereales. El endospermo expuesto de los granos quebrados como

¹ Un metabolito es cualquier molécula utilizada o producida durante las reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo.

² Un teratógeno es un agente capaz de causar un defecto congénito.

consecuencia de la manipulación general y/o de los daños ocasionados por insectos es propenso a la invasión de hongos.

La proliferación de hongos está también regulada por las proporciones de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono de la atmósfera intergranular. Las interacciones entre los gases y la actividad de agua (a_w)³ imperante también influyen en la proliferación de hongos.

En el campo, los cereales se contaminan principalmente con mohos que requieren actividades acuosas altas (al menos 0,88) para proliferar, mientras que en los granos almacenados pueden proliferar hongos que requieren contenidos de humedad más bajos.

Se reconoce generalmente que los principales factores que influyen en la producción de micotoxinas son la actividad de agua y la temperatura. No obstante, no se han definido aún con precisión las condiciones necesarias para que los hongos toxicógenos produzcan micotoxinas; recientemente se ha realizado un extenso examen de estas condiciones.

El pienso de los animales es una de las vías de contaminación más importantes hacia los humanos, ya que el animal metaboliza las micotoxinas y su carne o leche pueden convertirse en una fuente de micotoxinas. Otra posible fuente son los daños que producen las máquinas cosechadoras.

En la actualidad se conocen unas 300 variedades distintas de micotoxinas, pero son en torno a una decena las más importantes, las que aparecen con mayor frecuencia y las más tóxicas. Los hongos de las familias *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son responsables de la mayoría de las micotoxinas: Aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos, patulinas, zearalenonas.

En la siguiente tabla se pueden observar las principales familias de hongos, anteriormente citados y las micotoxinas derivadas de los mismos, así como sus efectos tóxicos y el tipo de alimento donde se encuentran:

Tabla 1. Principales familias de hongos productores de micotoxinas.

Toxina	Hongo productor	Efectos tóxicos	Alimentos donde se encuentra
Aflatoxina	<i>Aspergillus</i> (<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. versicolor</i>)	Aflatoxicosis aguda, cáncer de hígado, síndrome de Reye, encefalopatía, inmunotoxicidad.	Maíz, cacahuets, arroz, judías, uva, vino, productos de alimentación animal.
Ocratoxina	<i>Aspergillus</i> (<i>A. ochraceus</i>), <i>P. Verrucosum</i> .	Nefropatía balcánica aguda, tumores renales, inmunotoxicidad.	Maíz, cacahuets, arroz, judías, uva, vino, productos de alimentación animal.
Fumonisina	Varias especies de <i>Fusarium</i>	Inmunotoxicidad, neurotoxicidad, alteraciones del sistema digestivo.	Maíz, trigo, arroz, cebada, centeno, avena, productos de alimentación animal.
Tricotecenos (DON, T2)	Varias especies de <i>Fusarium</i>	Aleukia tóxica alimentaria, inmunotoxicidad, hematotoxicidad, alteraciones del sistema digestivo.	Maíz, trigo, arroz, cebada, centeno, avena, productos de alimentación animal.
Patulina	Varias especies de <i>Penicillium</i>	Enfermedades renales, alteraciones del sistema digestivo.	Frutas (sobre todo en la manzana), sidra, arroz, trigo, zumos.
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>	Efectos estrogénicos, abortos, esterilidad.	Maíz y otros cereales.

³ La actividad del agua (a_w) se define como la cantidad de agua libre en el alimento, es decir, el agua disponible para el crecimiento de microorganismos y para que se puedan llevar a cabo diferentes reacciones químicas. Tiene un valor máximo de 1 y un mínimo de 0.

La Organización Mundial de la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que más de un 25% de la producción mundial de alimentos está contaminada en un cierto grado con micotoxinas. La mayoría de los hongos crecen en los cereales, produciendo micotoxinas en condiciones favorables. Entre el 25% y el 40% de los cereales pueden estar contaminados con alguna o varias micotoxinas, los cuales cobran una mayor atención entre todos los alimentos ya que tienen un elevado consumo por parte de animales y humanos.

En este proyecto se experimenta exclusivamente con las fumonisinas, dejando de lado el resto de micotoxinas.

3. MICOTOXINAS DEL GÉNERO *FUSARIUM*

3.1. Introducción

El género *Fusarium* pertenece al phylum Ascomycota, orden Hypocreales y es el productor de micotoxinas de mayor relevancia en las regiones templadas del hemisferio norte. La característica fundamental del género es la presencia de conidios⁴ filamentosos llamados macroconidios que se forman a partir de estructuras llamadas esporodocios. Algunas especies pueden producir conidios más pequeños llamados microconidios.

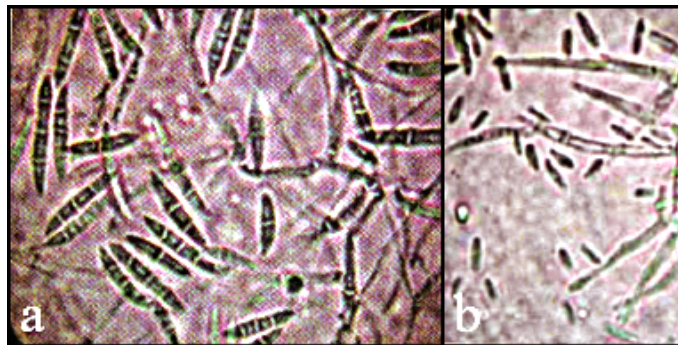


Figura. 1: Conidios típicos del género *Fusarium* (en este caso *F. verticillioides*) presentes en la caña de azúcar: a) microconidios; b) macroconidios

Los hongos del género *Fusarium*, y en particular *Fusarium graminearum* (teleomorfo⁵ de *Giberella zeae*), muy comunes en la tierra de los cultivos, producen dos tipos de toxinas, las estrogénicas⁶, como la zearalenona y el zearalenol, y las no estrogénicas, los tricotecenos, de las cuales la más importante es el deoxinivalenol (DON). En este segundo grupo se encuentran también el nivalenol, la toxina T-2 y el diacetoxiscirpenol. Las fumonisinas son producidas por especies pertenecientes al antes desconocido complejo de especies *Gibberella fujikuroi*, como *F. verticillioides* (antes conocido por *F. moniliforme*) y *F. proliferatum*, que se consideran los principales patógenos del maíz y los principales productores de fumonisinas.

⁴ Un conidio es una célula reproductora asexual típica de los hongos.

⁵ Teleomorfo es un estadio reproductivo sexual (*morfo*), que desarrolla un cuerpo de fructificación.

⁶ Las toxinas estrogénicas afectan a la reproducción porque su comportamiento se asemeja al de los estrógenos naturales.

Las micotoxinas que provienen del género *Fusarium* se encuentran habitualmente en los cereales como el maíz, el trigo, la cebada y los productos elaborados con estos granos. Una característica importante del género es que una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies *Fusarium* y que una misma especie puede producir diferentes micotoxinas a la vez, razón por la cual podemos encontrar más de un metabolito en el mismo sustrato.

La identificación de las especies del género es por varias razones, muy complejas. A pesar de esto, los medios de cultivo recomendados para la identificación de las especies *Fusarium* son el medio agar patata glucosa (Potato Dextrose Agar: PDA) para el estudio de las características macroscópicas de las colonias, y los medios agar sintético pobre en nutrientes (Synthetic Nutriente-poor agar: SNA) o agar hojas de clavel (Carnation Leaf agar: CLA), para el estudio de las características microscópicas.

3.2. Fumonisinias

La incidencia de las fumonisinias en maíz y otros productos básicos de la dieta o en productos derivados de ellas se ha convertido en una importante inquietud para la salud de animales y humanos en todo el mundo, ya que son responsables de enfermedades graves agudas y crónicas. Son el agente causal de la leucoencefalomalacia (ELEM) en caballos, edema pulmonar en cerdos, y son hepatotóxicas y hepatocarcinogénicas en ratas. Aunque no existe una evidencia directa de las consecuencias de las fumonisinias sobre la salud humana, no se descarta su asociación con una lata incidencia de cáncer de esófago en ciertas regiones de Sudáfrica, China, Italia e Irán.

3.2.1. Estructura química de las fumonisinias

Las fumonisinias son aminopolioles cuya estructura principal consiste en una cadena lineal de 20 átomos de carbono, la cual tiene un grupo amino en el carbono 2, junto con grupos metilo, hidroxilo y ácido tricarbóxico en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado (figura 2). Según los grupos químicos presentes a lo largo de la cadena lineal, las fumonisinias se pueden clasificar en cuatro series: fumonisinias A, B, C y P. Las fumonisinias de la serie B son ésteres de 2-amino-12, 16-dimetil-14, 15-dihidroiecosan y propanol-1, 2, 3-ácido tricarbóxico y son las más abundantes en maíz contaminado de manera natural. En función de la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 10 se distinguen los cuatro tipos (fumonisina B1 (FB1), fumonisina B2 (FB2), fumonisina B3 (FB3) y fumonisina B4 (FB4). FB1 tiene grupos hidroxilo en C-3, C-5, C-10. FB2 y FB3 son isómeros con grupos hidroxilo en C-3, C-5 y C-3, C-10. FB4 presenta un grupo hidroxilo menos que FB2 y FB3.

La fumonisina más importante es la FB1, ya que puede constituir hasta un 70 % de todas las fumonisinias presentes en los alimentos. Las otras fumonisinias de la serie B, aparecen en niveles más bajos, suponiendo que la FB2, y la FB3 constituyen un 10 y un 20 % del contenido total de fumonisinias, respectivamente.

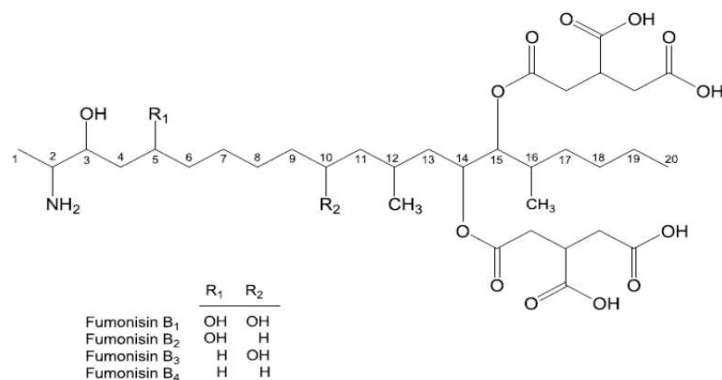


Figura 2: Estructura química de las fumonisinas de la serie B. R1 y R2 indican los diferentes radicales que pueden ocupar los carbonos 5 y 10 en los cuatro tipos de fumonisinas de la serie B.

3.2.2. Efectos tóxicos de las fumonisinas en animales de granja y de compañía

Las fumonisinas pueden causar enfermedades neurológicas en caballos. Los signos clínicos iniciales incluyen la depresión, inapetencia después un período de comer alimentos contaminados. Dentro de los efectos neurológicos en estos animales, el más importante y el que merece mención es la falta de coordinación (se tambalea ciego). Los équidos pueden morir 7 horas o incluso unos años después de que ocurran los primeros síntomas clínicos. El hígado también es afectado, a menudo muestra una leve inflamación con un cambio de color a amarillo-marrón y blanco con focos irregulares y nódulos dispersos.

En estos animales también han sido detectadas las lesiones renales, nefrosis, nefropatía o necrosis de células individuales causadas por estas micotoxinas. Un estudio de Schumacher et al. (1995) relacionó *F. verticilloides* con duodenitis y yeyunitis en caballos, y observó un abundante reflujo del jugo gástrico, que puede estar relacionado con la ingesta de FB1.

En cuanto a los cerdos, se realizaron estudios en EE.UU que determinaron que la FB1 produjo en los cerdos edema pulmonar e hidrotórax, (la cavidad torácica se llena de líquido amarillo). Las muestras de alimento fueron tomadas de los brotes y analizadas para las fumonisinas; FB1 fue encontrado en un rango de 20-330 mg / kg de masa corporal (mc). Los animales alimentados con altos niveles de FB1 murieron de edema pulmonar, mientras que los alimentados con menores niveles de FB1 desarrollaron hepatotoxicosis subaguda. Los animales que recibieron la toxina pura eran más propensos a desarrollar edema pulmonar, mientras que los alimentados con piensos contaminados naturalmente tenían ambas lesiones. Riñón, páncreas, corazón y esófago también pueden ser los órganos diana del ataque de fumonisinas. La ingesta de FB1 (20 mg / kg mc) por parte de estos animales produce una disminución de la eficiencia mecánica del ventrículo izquierdo, y da lugar a la insuficiencia cardíaca aguda.

Referente a las aves de corral, dada su dependencia de los alimentos a base de maíz, se han intensificado las investigaciones de los efectos de las fumonisinas en estos animales. En dos estudios, pollos de 2 días de vida y pollos de engorde alimentados con FB1 (de 0 a 400 mg / kg) durante 21 días y de 300 mg / kg durante 2 semanas se observó que la masa corporal se redujo considerablemente y se produjo necrosis hepática e hiperplasia biliar.

Los embriones de pollo expuestos a FB1 mostraron una mortalidad del 100%, a concentraciones de 0.1 M. Los cambios patológicos se encuentran en el hígado, riñón, corazón, pulmones, sistema músculo-esquelético, los intestinos, los testículos y el cerebro.

Respecto a los experimentos realizados en muestras de alimentos para animales domésticos, la FB1 junto con la zearalenona se encuentra en el 84 y el 100% con niveles elevados entre 299,5 y 1410 mg / kg de pienso, respectivamente. Las fumonisinas, se encuentran principalmente en el maíz y la FB1 es la micotoxina mayoritaria y representa hasta un 70% de las intoxicaciones por la ingesta de alimentos mediante fumonisinas las cuales inhiben la síntesis de los esfingolípidos y el metabolismo y causan daño a distintos órganos de los animales.

3.2.3. Límites máximos de fumonisinas en alimentos y piensos

Para proteger la salud pública y evitar que entren en la cadena alimentaria el maíz y los productos a base de maíz con un grado inaceptable de contaminación por fumonisinas, la Unión Europea ha establecido unos contenidos máximos de esta toxina (Tabla 2). Primero se han establecido contenidos máximos en relación con el maíz no elaborado, para fomentar y garantizar que se tomen todas las medidas necesarias durante las fases de cultivo, recolección y almacenamiento dentro de la cadena de producción. Estos contenidos máximos no se aplican al maíz no transformado destinado a su molienda por vía húmeda (producción de almidón), ya que existen datos científicos de que estas toxinas no se detectan en el almidón de maíz, o solo a niveles despreciables.

Con la molienda en seco, del mismo lote de maíz no transformado se producen fragmentos de diferentes tamaños de partícula. Hay datos científicos que demuestran que las fracciones de menor tamaño de partícula contienen un nivel más elevado de toxinas de *Fusarium* que las fracciones de mayor tamaño de partícula. Estas fracciones se clasifican según su tamaño de acuerdo con el porcentaje que pasa por un tamiz con abertura de malla de 500 micras, con lo cual se han establecido diferentes límites máximos para las fracciones de molienda mayores y menores de 500 micras para reflejar los niveles de contaminación de las diferentes fracciones.

Tabla 2. Contenidos máximos de fumonisinas en los cereales para el consumo humano (µg/kg) (Reglamento CE nº 1126/2007)

Tipo de cereal	Contenido máximo de fumonisinas permitido (µg/kg) Suma de FB1 y FB2
Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda	4000
Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.6.3 y 2.6.4 del Reglamento CE nº 1126/2007	1000
Cereales para el desayuno a base de maíz y aperitivos de maíz	800
Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
Fracciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula	1400
Fracciones de la molienda de maíz con un tamaño de partícula < 500 micras, clasificadas en el código NC 1102 20, y otros productos de la molienda del maíz con un tamaño de partícula < 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	2000

Igualmente, para proteger la sanidad animal, se debe ejercer un control con la diferencia de que no existe normativa estricta sino recomendación de valores orientativos sobre la presencia de fumonisinas en los productos destinados a la alimentación animal (Tabla 3).

Tabla 3. Valores orientativos de fumonisinas en los productos destinados a la alimentación animal (mg/kg) (Recomendación 2006/576/CE de la Comisión)

Micotoxina	Productos destinados a la alimentación animal	Valor orientativo en mg/kg (ppm) para piensos con un contenido de humedad del 12%
Fumonisin B1 + B2	a) Materias primas para piensos: - Maíz y productos a base de maíz	60
	b) Piensos complementarios y completos para:	
	- Cerdos, caballos, conejos y animales de compañía	5
	- Peces	10
	- Aves de corral, terneros (menores a cuatro meses), corderos y cabritos.	20
	- Rumiantes mayores de cuatro meses.	50

3.3. Tricotecenos

Se han descrito más de 45 tipos de tricotecenos, la mayoría de los cuales se clasifican en cuatro tipos, según su estructura química. Los dos tipos más importantes son los tricotecenos tipo A, como las toxinas T-2 y HT-2 y los de tipo B, como el DON, sus derivados y el nivalenol.

3.3.1. Efectos tóxicos en los animales de compañía:

En general, los tricotecenos causan efectos negativos en el sistema inmune de los animales y conducen a trastornos de la digestión (vómitos, diarrea o rechazo del alimento) y hemorragias. En un estudio, se alimentó a gatos y perros con niveles bajos de DON: 4,5 mg / kg de peso en alimentos para perros y 7.5 mg / kg de peso en la comida para gatos y se observó que los animales sufrieron vómitos.

Los tricotecenos producen que los animales rechacen el alimento, pierdan el apetito, disminuyan el rendimiento, pierdan peso y que tengan un aspecto poco saludable.

3.3.2. T-2

La micotoxina T-2 es un tricoteceno de tipo A que se metaboliza rápidamente a HT-2. Está asociada con la especie *F. Sporotrichioides*. Presenta un anillo sesquiterpeno y presenta en el C8 un grupo diferente al carbonilo. Su fórmula molecular es $C_{24}H_{34}O_9$.

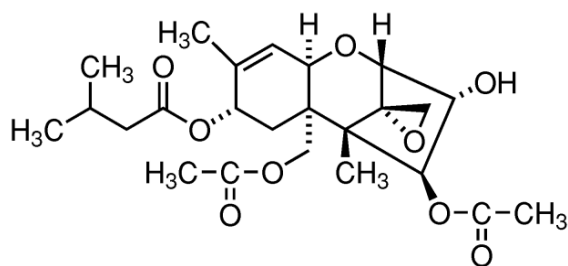


Figura 3: estructura química de la toxina T-2

Se presenta sobre todo en los cereales como el trigo, maíz, avena, arroz y soja. En cuanto a su toxicología enumeraremos a continuación los efectos más comunes de esta toxina en el entorno bioquímico y celular:

- Una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas para que se unen a los ribosomas.
- El efecto inhibitorio de la síntesis del ADN ARN.
- El efecto tóxico sobre la membrana de las células.
- La inducción de apoptosis en tejidos linfáticos y del hígado.

3.3.3. Deoxinivalenol

El DON también conocido como "vomitoxina" (por sus efectos secundarios en el sistema digestivo) está asociado con la especie *Fusarium graminearum* en las áreas templadas y húmedas de cultivo y con la especie *Fusarium culmorum* donde dominan los ambientes fríos. Es un tricoteceno de tipo B, el cual tiene una función carbonilo en la posición del carbono 8. Además tiene tres grupos OH y un grupo ceto insaturado en la posición α , β . Su fórmula molecular es $C_{15}H_{20}O_6$.

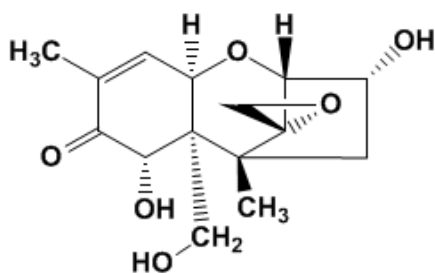


Figura 4: estructura del DON

El DON pertenece al grupo de micotoxinas sesquiterpenoides con actividad citóxica, fitotóxicos y antifúngica. Principalmente se detecta como contaminante del trigo, la avena, la avena y el maíz y con menor frecuencia se encuentra arroz. De hecho, el DON es el agente etiológico de la enfermedad llamada 'fusariosis de la espiga del maíz' y de la 'podridumbre de la espiga del maíz'.

3.4. Zearalenona

La zearalenona (ZEA) y el zearalenol (ZOL) son micotoxinas sintetizadas por *F. Graminearum*, *F. Culmorum*, *F.cerealis* y *F. Semitectum*. Tienen estructura de lactonas y actividad estrogénica, a pesar de su escasa semejanza estructural aparente con los estrógenos fisiológicos. Sin embargo, la estructura tridimensional del anillo de lactona sitúa un grupo OH en una posición tal que puede interactuar con los receptores de estrógenos.

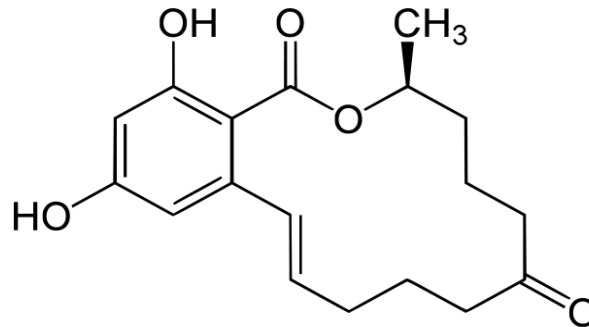


Figura 5: estructura química de la zearalenona

3.4.1. Efectos en animales

Se ha demostrado que la ZEA produce efectos estrogénicos en los animales, especialmente en los mamíferos, encontrándose además casos de un síndrome estrogénico específico en los cerdos y de infertilidad en el ganado vacuno en asociación con niveles de consumo de ZEA de 0.1-6.8 mg/kg pc y 14 mg/kg pc respectivamente. Este compuesto también ha producido malformaciones congénitas en el esqueleto de las ratas.

3.4.2. Efectos tóxicos en animales de compañía

La ZEA causa problemas en la reproducción del sistema de todas las especies animales. Una exposición de 7 días de la dieta de 200 mg ZEA / kg pc y día en hembras caninas mostraron daño celular en los ovarios, edema e hiperplasia y se produjo un cambio general patológico en el sistema reproductivo.

3.4.3. Efectos tóxicos en humanos

No se conocen casos de afecciones a la salud humana producidas por la ZEA, y dada la concentración encontrada en alimentos de uso humano, es muy improbable que se produzcan. De todos modos, la Unión Europea ha fijado temporalmente la ingestión diaria tolerable de esta sustancia en 0,5µg/kg de peso.

4. MÉTODOS ACTUALES PARA LA PREVENCIÓN, DESTOXIFICACIÓN Y MINIMIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS EN ALIMENTOS

Los hongos y sus micotoxinas asociadas son factores importantes que afectan negativamente a los alimentos producidos utilizando productos vegetales contaminados o productos animales derivados de animales alimentados con piensos contaminados. Las micotoxinas son tóxicas para los seres humanos y animales, lo que explica la mayor preocupación de las industrias de alimentos y piensos en la prevención de que entren en la cadena alimentaria. La prevención es esencial, ya que hay pocas formas de superar por completo los problemas una vez que las micotoxinas están presentes.

Los hongos que producen la toxina pueden invadir material vegetal en el campo antes de la cosecha, durante la manipulación, en la post-cosecha y almacenamiento y durante su transformación en alimentos y piensos. Así, los hongos toxigénicos han sido más o menos clasificados en dos grupos (i) los hongos de campo, (ii) los hongos de almacenamiento. El género *Fusarium*, por ejemplo, *F. verticillioides* *F. roseus*, *F. tricinctum* y *F. nivale*, son organismos presentes en el suelo, que pueden infectar los cereales directamente en el campo, y aumentar así los niveles de fumonisinas, tricotecenos y zearalenonas (en función de la especie) durante el crecimiento, la maduración del grano y en la cosecha.

El género *Fusarium* puede tener efectos perjudiciales sobre las plantas y provocar su disminución de productividad. Muchas especies pueden infectar las espigas de trigo y de otros cereales de grano pequeño en los campos que causan la enfermedad conocida como fusariosis de la espiga (FHB)⁷. Este deterioro también puede ser causado por el desarrollo cada vez mayor de especies *Fusarium* en el maíz. Por otra parte, los hongos pueden crecer en otro lugar diferente al grano de las plantas produciendo grandes cantidades de micelio⁸ en el tallo donde coloniza los paquetes vasculares, lo que inhibe la transferencia de nutrientes hacia la parte superior de la planta. Por el contrario, las especies *Fusarium* no contribuyen significativamente a la producción de los hongos de almacenamiento o a los contaminantes de hongos que se encuentran sólo en los granos dañados.

Debido a los múltiples orígenes posibles de la infección por hongos, cualquier estrategia de prevención de la contaminación por hongos y micotoxinas debe llevarse a cabo a un nivel de integración a lo largo de la cadena de producción de alimentos, y por ello se han identificado tres pasos para la prevención de contaminación por micotoxinas. El primer paso en la prevención debe realizarse antes de la infestación por hongos; El segundo paso es durante el periodo de la invasión fúngica de material vegetal y la producción de micotoxinas, la tercera etapa se inicia cuando el producto agrícola ha sido identificado como contaminado. La mayor parte de los esfuerzos deben concentrarse en los dos primeros pasos, ya que, una vez que las micotoxinas están presentes, es difícil eliminarlas de una manera práctica.

4.1. Prevención de plantas contaminadas por especies *Fusarium* y sus micotoxinas asociadas en el campo de cultivo.

Las medidas de prevención más eficaces son las llevadas a cabo antes de la plaga por hongos y antes de la producción de micotoxinas en el material vegetal. Varias prácticas agrícolas pueden influir en la contaminación de los cultivos, pero incluso las mejores estrategias de gestión agrícola no pueden erradicar totalmente la contaminación por micotoxinas.

⁷ FHB: *Fusarium Head Blight*.

⁸ El micelio es la masa de hifas (elementos filamentosos cilíndricos) que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

4.1.1. Rotación de cultivos

El maíz es la planta más susceptible a la contaminación por especies *Fusarium*. Las esporas liberadas de los esporangios maduros de especies *Fusarium* se extienden a lo largo y ancho por el viento, y luego se asientan en el suelo (Figura 6). Pueden permanecer en el suelo durante un largo periodo de tiempo o crecer en los residuos de plantas muertas como la paja o los rastrojos, que aumentan el nivel de contaminación del suelo. Después las conidioesporas y ascosporas pueden infectar espigas y hojas de la próxima cosecha tras haber sido propagadas por el viento o las gotas de lluvia. Las ascosporas que se encuentran en las ascas⁹ de los hongos son importantes para la infección de espigas de maíz por *F. graminearum*. Pueden desarrollarse en cuerpos fructíferos llamados peritecios que se forman en materia orgánica infectada que permanecen en la superficie del suelo y se liberan al aire libre cuando maduran los peritecios. A medida que las ascosporas son generalmente dispersadas en una corta distancia, las infecciones en un campo particular, se inicia generalmente por esporas dentro de ese campo.

Esto explica por qué los monocultivos de maíz repetidos en el mismo campo enriquecerán el suelo con esporas de hongos, lo que aumenta el riesgo de contaminación. Los residuos de cultivos son claramente la principal fuente de inóculos¹⁰ de *F. graminearum*, lo que provoca la putrefacción de espigas de *Gibberella* y la contaminación por DON del maíz. Por lo tanto, la rotación de cultivos y la labranza se recomiendan para controlar la contaminación de plantas por la especie *Fusarium*, pero estas prácticas agrícolas no siempre se reconocen como eficientes.

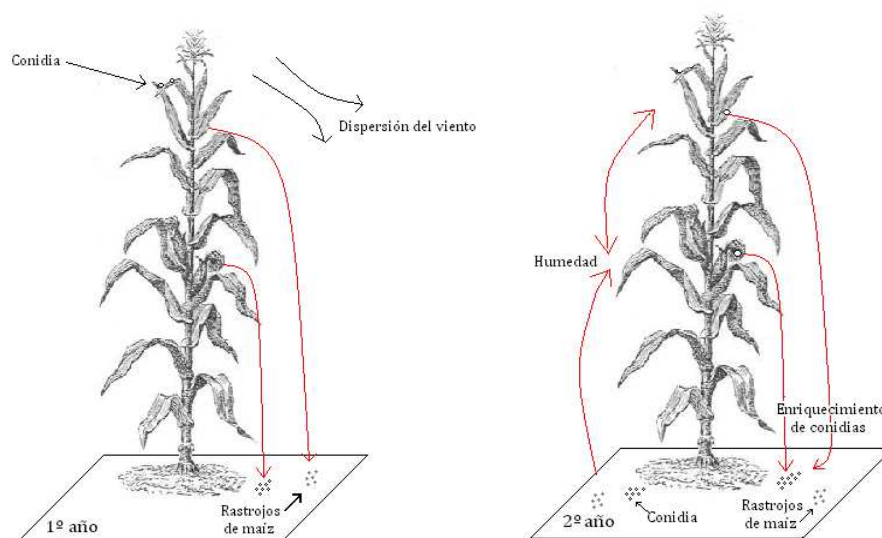


Figura 6. Enriquecimiento del suelo en conidias¹¹ de *Fusarium*. En resumen, en el primer año, esporas de hongos transportadas por el viento colonizan algunas plantas. Entonces, los hongos producen esporas de conidias y su liberación hace que colonicen otras plantas y se asienten en el suelo. Después de la cosecha, los rastrojos del maíz se depositan sobre el suelo de forma activa colonizados por hongos, lo que aumenta la contaminación de conidias en la tierra. En el segundo año, las plantas estarán más contaminadas y comunicarán más conidias con el medio ambiente. Un ciclo iniciado por lo tanto, que persiste mientras los rastrojos del maíz estén plantados en el campo.

⁹ Un asca, o asco (del latín ascus, asci en plural) es la célula sexual productora de esporas de los hongos de ascomicetos

¹⁰ Inóculo: Diáspora de los hongos que forman simbiosis mutualística con las raíces de las plantas

¹¹ Una conidia es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.

En un estudio de 4 años, Schaafsma et al. (2001) observó que la plantación de un cultivo distinto al de trigo, 2 años anteriores a la plantación de un cultivo de trigo disminuyó significativamente el nivel de DON en grano de trigo en un año de cada cuatro. La presencia de residuos de maíz parece ser un factor importante que contribuye a la contaminación por DON. Sin embargo, no hay pruebas de que el cultivo de trigo siguiente a otro cultivo del mismo cereal sea un riesgo mayor que el cultivo de trigo después de un cultivo sin cereales, ya que algunas especies patógenas de *Fusarium* aisladas a partir de cereales también pueden derivar patógenos hacia los cultivos que no son de cereales. La incidencia de *F. avenaceum* que es la especie de *Fusarium* más comúnmente aislada de espigas de trigo infectadas de FHB en Saskatchewan (Canadá), fue menor en crecimiento anual en comparación con trigo cultivado en los campos sólo en años alternados.

4.1.2. Siembra

Son varias las técnicas utilizadas para trabajar la tierra. Una de ellas es el arado, donde la parte superior de 10-30 cm de conidios en la tierra se invierten, y la otra usa la siembra mínima, donde se mezclan la restos de cultivos con 10-20 cm de suelo. En la técnica de siembra directa, las semillas se introducen en los rastrojos de cultivos anteriores con cambios imperceptibles de la estructura del suelo. La eliminación, incineración o enterramiento de los residuos de cosecha podrían reducir inóculos de *Fusarium* para el siguiente cultivo. Varios estudios demostraron que la siembra mínima en lugar del arado resultó en un aumento de 10 veces el contenido de DON en la cosecha siguiente al trigo. De la misma manera, la siembra más profunda tenía la menor concentración de especie *Fusarium* en el suelo. Se demostró que la siembra directa siguiente al trigo o a los rastrojos del maíz aumentó los niveles de DON en comparación con la siembra, pero el efecto del cultivo de conidios en la tierra desapareció cuando el cultivo anterior fue soja. La técnica de cultivo afectó al contenido anterior a la producción de micotoxinas de los rastrojos del maíz del cultivo siguiente al de trigo.

Tanto el arado como el doble de potencia desgarradora (15 cm de profundidad), redujeron la infección de *Fusarium* del trigo, mientras que la siembra directa produjo un alto contenido de micotoxinas en granos de trigo.

4.1.3. Fertilizantes del suelo

Los fertilizantes pueden afectar a la contaminación por la especie *Fusarium* de los cultivos mediante la alteración de la tasa en descomposición de residuos, actuando en la tasa de crecimiento de las plantas, y cambiando la estructura del suelo y su actividad microbiana. El suministro de nitrógeno resultó en una mayor incidencia en granos infectados por *Fusarium*. Menores síntomas de contaminación se observaron cuando la urea fue utilizada en lugar en nitrato de amonio. La cianamida de calcio comparada con el nitrato cálcico de amonio redujo entre un 31 y un 59% la incidencia de *Fusarium* en trigo, pero no se observó ningún efecto significativo en el nivel de contaminación por DON.

4.1.4. Fecha de siembra

La contaminación por *Fusarium* en los rastrojos del maíz depende de la susceptibilidad de la variedad a la infección y la aparición de condiciones ambientales favorables para la infección. La contaminación es

más probable cuando la etapa de cosecha de la floración se produce en el momento de su liberación de esporas. Desde el momento de los hechos un factor decisivo para la infección, cualquier cambio en fecha de siembra o en la maduración de la variedad puede afectar significativamente la infección de hongos y la contaminación por micotoxinas. En los rastrojos del maíz, las fechas de siembra tempranas en las zonas templadas a menudo resultan un nivel de contaminación más bajo, pero los cambios anuales del tiempo pueden impugnar esta ventaja potencial. Para el trigo y la cebada, lo mejor es evitar la siembra de variedades que maduran tarde en la estación de crecimiento. Las variedades de invierno se desarrollan y maduran antes que las variedades de primavera y por lo tanto tienen un menor riesgo de infección por *Fusarium*.

4.1.5. El enfoque transgénico de resistencia de las plantas

La mejora genética puede ser considerada como la mejor solución para el control de *Fusarium* en cultivos susceptibles. Las líneas producidas ofrecen buena resistencia a las especies *Fusarium* pero la calidad y las propiedades agrónomas fueron afectadas negativamente. Algunas variedades actuales ya disponibles proporcionan más resistencia a *Fusarium* que otras. Loci de rasgos cuantitativos (QTLs)¹² para la resistencia a *Fusarium* se han identificado en el trigo. A menudo son coincidentes con los genes que controlan las características morfológicas de las plantas.

La resistencia genética a la fusariosis de la espiga consta de dos componentes: la resistencia a la penetración inicial de hifas (tipo I) y la resistencia a la difusión en el tejido del huésped (Tipo II).

Las proteínas que actúan contra las especies *Fusarium* pueden existir y si se identifican podrían ser utilizadas con un enfoque transgénico para limitar el riesgo de infección por hongos. La ingeniería genética utilizada para reducir el riesgo de micotoxinas tiene tres métodos: aumentar la resistencia al ataque de insectos, aumentar la resistencia de plantas a la infección, e inducir procesos de desintoxicación o procesos que inhiben la producción de micotoxinas en los granos. El maíz transgénico que expresa la toxina Bt dirigido al taladro del maíz europeo es un ejemplo del primer método, pero no soluciona la entrada de otros insectos que transporten hongos, aunque el maíz Bt reduce los niveles de fumonisinas en los granos. A pesar de que nunca se ha hecho en el maíz, una sobre-expresión de proteínas específicas y metabolitos antifúngicos o la mejora de los sistemas de defensa de la planta pueden ser considerados en el segundo método. La prevención de la biosíntesis de micotoxinas o detoxificación de micotoxinas en las plantaciones es otro método muy interesante y factible. Por ejemplo, las enzimas capaces de degradar las fumonisinas han sido aisladas de hongos y bacterias que crecen en los tejidos del tallo y el grano de maíz, y la clonación de los genes correspondientes en curso.

4.1.6. Control químico de la infección por *Fusarium*

Muchos productos químicos han sido probados contra especies *Fusarium* ya sea in vitro, en invernadero o bajo condiciones de campo. Para ser eficaces, estos fungicidas deben ser totalmente letales a especies *Fusarium*. Los fungicidas triazoles, metconazol y tebuconazol son eficaces contra especies *Fusarium*. Reducen de manera significativa tanto la contaminación FHB como la de DON. Por el contrario, los fungicidas azoxistrobina y estrobilurinas, que actúan contra *Microdochium nivale*, resultaron en una

¹² QTL: *Quantitative Trait Loci*, los *loci* son los responsables de los caracteres cuantitativos. Un QTL es una región o fragmento de un cromosoma que explica un porcentaje de la varianza aditiva de un carácter productivo.

reducción de FHB pero el nivel de contaminación por DON en ocasiones aumentó. La Azoxistrobina parece no tener efecto directo sobre la producción de DON pero podría aumentar el nivel de infección por *Fusarium* mediante la eliminación de otros microorganismos competitivos situados en el entorno de la espiga. En un ensayo llevado a cabo en el norte de Italia con tres fungicidas comerciales diferentes, Haidukowsky et al., (2005) observaron que procloraz juntamente con ciproconazol y una mezcla de tebuconazol más azoxistrobina redujeron significativamente la gravedad la enfermedad de FHB (25% y de 77%, respectivamente) y de contenido de DON (32% y de 89%, respectivamente) en los granos de cinco cultivos diferentes de trigo blando y duro. Tetraconazol mostró una eficacia más baja en comparación con los otros tratamientos.

Los fungicidas también se han probado en micoflora del suelo para reducir el tamaño de los patógenos transmitidos por la tierra. Sin embargo, el posible impacto negativo de los fungicidas en la biomasa microbiana de saprofitos del suelo y de contaminación de las aguas subterráneas con residuos químicos son serias limitaciones de dichas aplicaciones. También ha sido recomendado quemar los desechos de cultivos antes de la siembra para prevenir la infección por *Fusarium*.

Muchos aceites esenciales de plantas aromáticas han sido probados por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas y algunos en particular por sus efectos contra las especies *Fusarium* y sus micotoxinas asociadas. El efecto natural de protección de los aceites esenciales contra patógenos de las plantas puede ser aprovechado para el control de infecciones por hongos en la planta de y en su asociada producción de micotoxinas, pero se deben realizar más estudios para identificar los componentes de los aceites esenciales con actividad moduladora sobre el crecimiento y la producción de toxinas de especies *Fusarium*.

4.1.7. El control biológico de la infección por *Fusarium*

Dado que el control químico de la infección por hongos y la contaminación por micotoxinas es sólo parcialmente eficaz, existe una posibilidad para el control biológico de participar en la estrategia integrada de la lucha contra toxigénicos de especies *Fusarium*. Los antagonistas microbianos o los competidores pueden ser rociados sobre las plantas en la etapa de floración para erradicar o limitar el crecimiento de los productores de la toxina.

4.1.8. Control de insectos

Los insectos están implicados en la infección por *Fusarium* en las plantas a través de dos mecanismos: el primero pone en peligro la protección exterior de granos y tejidos de la planta, permitiendo así que las hifas de los hongos penetren y tengan acceso a los nutrientes y en el segundo mecanismo los insectos se llevan consigo las esporas de los hongos. Por eso se está llevando a cabo el uso de cereales modificados genéticamente, que son resistentes a los insectos, para reducir el nivel de infección, aunque los resultados preliminares no son del todo significativos. Los transgénicos híbridos de maíz Bt disminuyeron significativamente la pudrición de las espigas de *Fusarium* y la consiguiente contaminación de fumonisinas, mientras que (Schaafsma et al, 2002) han descubierto que el gen Bt, sólo tuvo un efecto leve en la pudrición de la mazorca de *Gibberella* y la posterior contaminación por DON. Las diferencias en la eficiencia del maíz Bt pueden ser explicadas por la vía de la infección. La pudrición de la mazorca por patógenos *Fusarium*, que infectan a través de los daños físicos causados por los insectos en los granos, son más susceptibles a la toxina producidas por el maíz Bt de la pudrición de la mazorca de patógenos

Gibberella, que infectan principalmente a través de la ruta de la seda. Por el momento, no hay pruebas de que los cereales transgénicos sean más seguros con respecto al contenido de micotoxinas.

4.1.9. Control de malezas

Las malas hierbas pueden albergar una amplia gama de especies de *Fusarium*, y esto explica por qué una alta densidad de las malezas tiende a incrementar el contagio en los cultivos de trigo. Sin embargo, el uso de glifosato para eliminar las malas hierbas ha demostrado que aumenta la FHB en el trigo y también sirve para extender la contaminación por el suelo y a través de las raíces, así como la densidad de propágulos¹³, probablemente por el aumento de la cantidad de residuos vegetales en los suelos.

4.1.10. La agricultura ecológica

Debido a que la agricultura orgánica no utiliza pesticidas químicos, por lo general se especula que los productos ecológicos tienen más riesgo que los convencionales en relación con micotoxinas. De hecho, la comparación de los dos sistemas de cultivo no proporcionó una respuesta clara, ya que la infección fúngica y la formación de micotoxinas en los alimentos depende de una multitud de factores tal como se refiere anteriormente. Según los múltiples estudios realizados tanto la incidencia y el contenido promedio de DON en los alimentos de base de cereales fueron menores en comparación con la producción de cultivos orgánicos convencionales. Sin embargo, estudios posteriores indicaron niveles muy elevados de DON detectados en trigo orgánico. Se observó que FB1 contaminó más muestras de alimentos convencionales (0,31) que los orgánicos (0,20). Las mayores concentraciones promedio se obtuvieron en los productos convencionales de DON y FB1 y en productos ecológicos para FB2. *F. culmorum* asociado a la plaga de plántulas, la pudrición de raíces y FHB, fue más abundante en los suelos de los cultivos orgánicos que en los suelos de los cultivos convencionales.

4.1.11. Modelización del riesgo de micotoxinas en el terreno

Se han desarrollado modelos de integración de algunos de estos parámetros de campo para evaluar el riesgo de contaminación por micotoxinas de los cereales antes de la cosecha, sobre todo en los Estados Unidos y Canadá y Ontario. Por ejemplo, se han desarrollado modelos de simulación matemática de la aparición de pudriciones de mazorca después de la inoculación con diferentes especies de *Fusarium*. Estos modelos se utilizan para proporcionar alerta temprana para un nivel de riesgo inaceptable de micotoxinas. Los modelos estocásticos, incluyendo información del tiempo a largo plazo y los datos históricos sobre la presencia de micotoxinas será el siguiente paso.

¹³ Los propágulos son una modalidad de reproducción asexual en vegetales, por la que se obtienen nuevas plantas y órganos individualizados.

4.2. La cosecha y el control posterior a la cosecha de las micotoxinas

4.2.1. Estado fisiológico de las plantas

El momento de la cosecha puede tener consecuencias para el nivel definitivo de contaminación de micotoxinas. En general, los resultados antes de la recolección presentan una muy baja concentración de micotoxinas. El riesgo de contaminación por fumonisinas puede comenzar muy temprano, durante el desarrollo de la espiga y aumenta la producción en todo el desarrollo y la maduración fisiológica de la mazorca de maíz infestado. Los mayores niveles de FB1 se produjeron en granos de maíz en la fase de mella, y los niveles más bajos en los granos en la fase de ampolla (Warfield y Gilchrist, 1999). La producción de FB1 por *F. verticilloides* en granos de maíz puede continuar después de la cosecha, antes del secado, especialmente durante el periodo de prealmacenamiento de granos cosechados y húmedos.

4.2.2. Ajuste de la cosechadora

Como consecuencia de la existencia omnipresente de las esporas de *Fusarium* en el suelo, la altura de corte de la máquina cosechadora será un factor importante para reducir el contacto del suelo con los granos sanos. La velocidad del ventilador de la cosechadora también debe ser resuelta para optimizar un paso de la primera limpieza directamente en el terreno. Los granos dañados físicamente por lo tanto, pueden ser eliminados, lo que limita el riesgo de contaminación. Plantas en mal estado debido a las enfermedades de podredumbre del tallo no deben ser cosechadas, especialmente si están mojadas y sobretodo si los signos de germinación son visibles.

4.2.3. Nivel de humedad antes y durante el almacenamiento

La cantidad de contenido total de agua o agua disponible¹⁴ es el principal factor limitante para el crecimiento de hongos. Para un metabolismo activo de hongos se requiere a_w superior a 0,65. Una humedad o unos niveles totales de contenido de agua superiores a 150g/kg en los cereales suelen ser necesarios para mantener vivos los hongos, aunque existen grandes discrepancias entre los diferentes hongos. La especie *Aspergillus* que es el hongo menos exigente, puede crecer a niveles bajos de agua (13,5 a 18%), mientras que la especie *Fusarium* necesita entre 170-190g humedad / kg de sustrato. Las concentraciones de DON aumentan de forma significativa con la presencia de esporas de *Fusarium* si el nivel de humedad excede de 170-200g de agua/ kg a 20 ° C. Un factor de 10 o más puede llegar en períodos de tiempo tan cortos de almacenamiento de 6 semanas.

La humedad atmosférica puede variar mucho entre el rocío de la mañana y la tarde soleada e influir en el contenido de agua de los granos. Esto significa que el tiempo de la cosecha durante el día es otro factor esencial para la evolución de las especies de *Fusarium* en los cereales en el período posterior a la recolección. En el caso de nivel de humedad más alto que el nivel "seguro" por debajo de 140g/kg en la fase post-recolección, el secado es un paso absolutamente necesario antes de la etapa de almacenamiento. Como resultado de su estabilidad química, ninguna reducción de los tricotecenos, fumonisinas y zearalenona se produce durante una operación normal de secado.

¹⁴ Parte activa del contenido de agua en comparación con el contenido total de agua que incluye el "el agua no disponible".

En un estudio se controló cada dos meses el efecto de dos contenidos de humedad, 110 y 140g/kg, en micoflora y la contaminación de la toxina en 36 muestras de maíz durante un período de almacenamiento de 12 meses. Las fumonisinas y demás especies *Fusarium* se detectaron en todo el maíz recién cosechado y su contenido no cambió en el maíz que llevaba 12 meses almacenado. En definitiva, la importancia del contenido de humedad en la fase de recolección / pre secado de los cultivos determina el hongo final y el nivel de fumonisinas en el maíz.

4.2.4. La temperatura durante el almacenamiento

Además de la humedad, la temperatura predominante durante el almacenamiento tendrá un efecto en el crecimiento de hongos y la actividad de hongos. La acumulación de granos en un silo inmoviliza grandes volúmenes “muertos” de aire, lo que provoca un buen aislante térmico. La temperatura en el centro del silo se mantiene próxima a la temperatura de recolección, mientras que los granos de cereales en contacto con las paredes del silo se enfrían más rápidamente cuando la temperatura exterior disminuye durante el otoño. Las manchas de humedad pueden aparecer en las condiciones de microclima en el silo y favorecer el crecimiento de hongos. Como resultado de las actividades fúngicas, la temperatura dentro del terreno contaminado se elevará rápidamente y registradores de temperatura distribuidos a diferentes alturas en el silo es una forma eficaz para detectar cualquier actividad microbiana. Así que, es necesaria la combinación de operaciones de refrigeración y secado asociadas a los sistemas de ventilación para evitar el empeoramiento de la contaminación durante el almacenamiento. Además, la rotación de los granos de almacenamiento prolongado puede reducir la presencia de manchas de humedad en el interior del silo.

4.2.5. Medidas cautelares para las prácticas de ensilaje

Las plantas deben ser cosechadas a la humedad de 650-700g/kg para el adecuado ensilaje y 500-550g/kg para el embalado. El ensilaje debe ser prensado y el silo debe sellarse completamente para preservar las condiciones anaerobias.

Todos los aditivos biológicos y / o químicos que aumentan y disminuyen el pH de fermentación en el silo pueden utilizarse para reducir el crecimiento de hongo. Aquellos que tienen un efecto antimicótico pueden ser añadidos a la superficie externa cuando se corone el silo.

4.2.6. Tratamiento físico de los granos contaminados

4.2.6.1. Clasificación

Los granos de maíz quebrados por lo general contienen niveles 10 veces mayores de fumonisinas que los granos de maíz intactos. Minimizar o evitar el contenido de material con esporas limpiando la superficie externa de los granos y eliminar los granos dañados físicamente es, pues, una manera complementaria para reducir la infección de los granos sanos por los contaminados. Esta forma de prevención es particularmente eficaz con respecto a especies *Fusarium* y las micotoxinas asociadas. La eliminación de los granos dañados por la segregación de densidad es una manera eficaz para disminuir el DON y ZEN en el maíz y el trigo. La asociación de recogida a mano y las técnicas de la densidad de la segregación dieron

como resultado una disminución del 70-90% de las fumonisinas. Además, la combinación de técnicas de lavado y flotación han sido eficaces contra la toxicidad de DON y de ZEN del maíz de alimentación para cerdos. Una disminución del 60% de FB1 y FB2 se obtuvo cuando las técnicas de detección y clasificación de la gravedad se aplicaron al grano de maíz descargado de un silo de almacenamiento (Malone et al., 1998).

4.2.6.2. *Lavado*

El lavado de los granos con agua del grifo a presión reduce significativamente el contenido de micotoxinas en la contaminación de hongos de origen. Este tratamiento se puede aplicar en alimentos y piensos antes de la molienda húmeda o fermentación de etanol, de lo contrario el coste del secado es muy elevado.

4.2.6.3. *Descascarillado*

Las micotoxinas están generalmente ubicadas en la fracción de salvado del grano. Por lo tanto, la eliminación de la parte externa del núcleo en un descascarillador induce una reducción del 34% de los niveles de DON y ZEN. La eficacia del proceso de descascarillado depende de la penetración de los hongos en el núcleo.

4.2.6.4. *Tratamiento térmico*

La mayoría de las micotoxinas se consideran estables al calor. No obstante, FB1 sigue una cinética de descomposición de primer orden con un aumento elevado de la temperatura. Varios experimentos realizados en los alimentos contaminados confirmaron la posible pérdida parcial de las fumonisinas, ZEN y moniliformina durante el proceso industrial que incluye su calentamiento. Las pérdidas de contenido de FB1 y FB2 superan el 70% en la harina de maíz contaminado a nivel de 2,5 mg / kg después de calentar a 190 ° C durante 60 minutos y llegó a 100% cuando se calentó a 220 ° C durante 25 min (Scott y Lawrence, 1994). Los mismos autores informaron una reducción aproximada del 60% en las fumonisinas cuando los bollos de maíz se cuecen al horno a 220 ° C durante 25 min.

Sin embargo, el destino químico de fumonisinas y ZEN en los alimentos horneados, fritos o extruidos no se entiende bien. Una degradación real de las fumonisinas o ZEN durante el calentamiento es cuestionable. La disminución observada en estas micotoxinas puede ser debido a una interacción con la matriz del alimento que resulta difícil de analizar. La unión de las micotoxinas con alimentos y piensos componentes de la matriz, como las proteínas o azúcares podría reducir su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal, al explicar la inactivación parcial de su toxicidad biológica potencial.

4.2.6.5. *Molienda de granos*

La molienda no tiene ningún efecto directo sobre el contenido de micotoxinas en los granos, pero cambia la distribución de la toxina entre las diferentes fracciones. La molienda húmeda de maíz está casi libre de

ZEN, fumonisinas, DON y NIV. DON y NIV, que son altamente solubles en agua, son cuantitativamente recuperados en el agua escarpada. ZEN o las fumonisinas, que son insolubles, se encuentran principalmente en la fracción sólida hecha de germen, fibra y gluten. En la comercialización de productos alimenticios de molienda seca, la distribución de las micotoxinas entre las fracciones de molienda depende en la penetración de hongos en el endospermo. Por lo tanto, la molienda de cereales con nivel de contaminación en la superficie de micotoxinas son más bajos en la harina y el nivel de contaminación es mayor en el germen y el salvado. Las fumonisinas se encuentran generalmente en los subproductos del proceso que se utiliza como alimento para animales.

4.2.6.6. Irradiación

La radiación gamma ha sido probada para reducir el contenido de esporas de la contaminación por hongos de las semillas, los alimentos o piensos o para degradar micotoxinas ya formadas. La radiación gamma a una dosis de 5kGray inactiva el crecimiento de especies *Fusarium* y la formación de micotoxinas en las semillas. La irradiación por haz de electrones de *Fusarium* infectados apenas reduce la infección por hongos a dosis superiores a 4kGray. Las dosis altas (> 10kGray) disminuyen significativamente la capacidad de germinación de semillas. Sin embargo, la radiación UV no tuvo efecto en fusaproliferin, una micotoxina producida por algunas especies de *Fusarium* fitopatógenas. La misma ineficacia de la radiación UV se ha observado en roquefortine C, presente en el queso azul. Por lo tanto, la irradiación puede utilizarse para eliminar el contenido de la contaminación de esporas de hongos, pero no para la limpieza de alimentos ya contaminados con micotoxinas.

4.2.7. Tratamiento químico de los granos contaminados

El proceso de amonificación, utilizando hidróxido de amonio o amoniaco gaseoso es reconocido como un procedimiento eficaz para reducir las aflatoxinas en alimentos para animales. Cuando se aplica al maíz contaminado con fumonisinas, la amonificación durante 4 días a 50 ° C y bajo presión atmosférica disminuye el contenido de FB1 de 30 a 45%. La nixtamalización, que es el proceso de descomposición del pericarpio del maíz por remojo de los granos en agua con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, no es realmente eficaz ya que produce un contenido de FB1 hidrolizado que es tóxico. La combinación de tratamiento térmico con NaHCO_3 y H_2O_2 sólo o con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ resulta un 100% de reducción de contenido de FB1 en maíz contaminado (100 mg / kg). El tratamiento de maíz contaminado (4,4 mg / kg) con soluciones de bisulfito de sodio a 80 ° C durante 18 horas puede convertir el 85% de DON en DON conjugado sulfonato que no es tóxico para los cerdos. Otros tratamientos químicos con ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, ácido ascórbico y carbonato de amonio, no han demostrado ninguna eficacia contra el DON. La concentración de ozono se ha utilizado para degradar y detoxificar micotoxinas in vitro, pero la toxicidad de los productos generados no ha sido probada.

4.2.7.1. La reacción de las fumonisinas con azúcares reductores

El grupo amina primario en la molécula de FB1 es el responsable de su toxicidad. La transformación de FB1 en un aducto¹⁵ de FB1-azúcar reducido a través de una reacción no enzimática (65 °C durante 48 horas) reduce significativamente la toxicidad de FB1 en cultivos de tejido celular, en ratones, en ratas y cerdos. Los productos de FB1-de azúcares reductores se caracterizaron como N-(carboximetil) FB1, N-(1-desoxi-D-Fructos-1-il) FB1, N-metil-FB1, N - (hydroxyacetyl) FB1, y N-(2-hidroxi-2-carboxietil) FB1.

4.2.8. Tratamientos biológicos

4.2.8.1. Biotransformación de tricotecenos, ocratoxinas y zearalenona.

La biotransformación de tricotecenos (deoxynivalenol, toxina T-2, diacetoxyscirpenol, etc.), ocratoxina y zearalenona consiste en la transformación de cada una de las micotoxinas a un metabolito no-tóxico por medio de enzimas específicas. Hasta ahora a nivel mundial solo hay dos microorganismos patentados que tienen la capacidad de biotransformar micotoxinas específicas en el tracto intestinal de los animales: En el año 1997 en los laboratorios de Biomin se aisló una cepa bacteriana del rumen de bovinos, que más tarde se denominó, *Eubacterium* BBSH 797 y que produce enzimas específicas, llamadas de-epoxidasas, que cambian la estructura principal tóxica de los tricotecenos, el anillo epóxido, a un metabolito no-tóxico (figura 7). En el caso del DON, el metabolito se llama de-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1). Como todas las micotoxinas del grupo de tricotecenos tienen este anillo epóxido, todas son detoxificadas por el BBSH 797.



Figura 7: Detoxificación de tricotecenos (DON, DAS, T-2, etc.) a metabolitos no-tóxicos en el tracto intestinal de los animales, por de-epoxidasas producidas por *Eubacterium* BBSH 797.

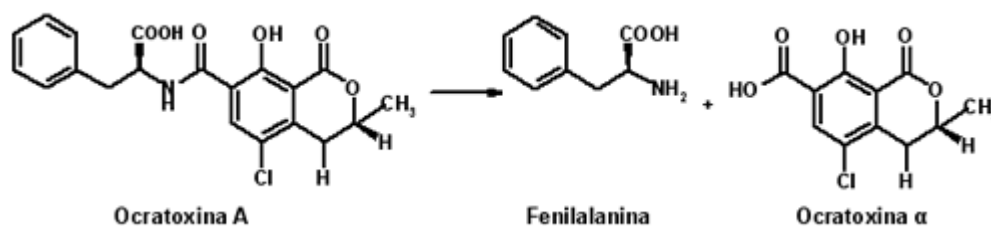


Figura 8: Mecanismo de detoxificación de OTA (separando las uniones amidas) por *Trichsporion mycotxinivorans* (MTV). El metabolito ocratoxina α es 500 veces menos tóxico que ocratoxina A.

¹⁵ Un aducto es un producto AB formado por la unión directa de dos moléculas A y B, sin que se produzcan cambios estructurales.

Después de un intenso proceso de selección, se escogió una levadura por sus excelentes propiedades para biotransformar OTA y ZEN llamada *Trichosporon mycotoxinivorans* (MTV) biotransforma la OTA a ocratoxina alpha (figura 8) un metabolito que tiene 500 veces menos toxicidad que la OTA inicial. Esta levadura también tiene la capacidad de biotransformar ZEN a un metabolito no-tóxico, sin efectos estrogénicos. Es importante que además de la eficacia para detoxificar las micotoxinas, los microorganismos seleccionados cumplan con algunos requisitos mínimos con el fin de ser utilizados como aditivo alimenticio para animales:

- Los microorganismos tienen que probar su eficacia en experimentos in vitro.
- Para cada especie donde serán utilizados, los metabolitos formados tienen que ser atóxicos.
- La desactivación enzimática tiene que acontecer rápidamente en el tracto digestivo.
- Los microorganismos utilizados tienen que ser generalmente reconocidos como seguros.
- Los aditivos microbianos tienen que ser estables durante el almacenamiento, producción del alimento y durante los procesos fisiológicos internos del tracto gastrointestinal (pH ácido) de los animales.

Cuando se respetan estos requisitos mínimos los microorganismos son la forma más factible para contrarrestar el espectro más amplio de micotoxinas. Utilizando el *Eubacterium* BBSH 797 y *Trichosporon mycotoxinivorans* (MTV) se puede detoxificar enzimáticamente 170 tricotecenos (DON, DAS, T-2, etc.) OTA y ZEN.

4.2.9. Tratamientos con adsorbentes

Muchos estudios se han llevado a cabo durante los últimos 15 años sobre aglutinantes inorgánicos y, más recientemente, sobre aglutinantes orgánicos. Se pudieron recomendar cuando todas las normas de prevención fracasaron y, en consecuencia, los agricultores sospecharon que alimentos estaban contaminados con micotoxinas. Sin embargo, debe señalarse que, en Europa, estos aditivos no están autorizados en la actualidad.

Los adsorbentes utilizados en la actualidad para la detoxificación de alimentos son básicamente dos: las arcillas y el carbón activado.

4.2.9.1. Arcillas

El uso de arcillas para solucionar la contaminación en alimentos (especialmente en piensos) es una medida ineficaz contra las micotoxinas, a excepción de las aflatoxinas, como veremos a continuación, y además este tipo de adsorbentes sugieren una serie de problemáticas tanto para la salud de las mascotas como para el medio ambiente.

Las arcillas son adsorbentes naturales químicamente compuestos de silicatos y aluminosilicatos. Incluyen una amplia gama de productos tales como aluminosilicatos hidratados de sodio calcio (HSCAS), filosilicatos de los cuales la montmorillonita (magnesio hidratado HSCAS) es uno de los representantes más importantes, y la bentonita y la zeolita, que son arcillas especiales de origen volcánico.

Se trata de material inorgánico poroso que alberga anillos de tetraedros de silicato, cada uno compuesto de una molécula de sílice con una carga positiva rodeada por cuatro átomos de oxígeno con carga negativa, que produce una estructura similar a una hoja.

Las micotoxinas pueden ser adsorbidas en la estructura porosa y ser atrapadas por cargas eléctricas elementales. La tasa de adsorción dependerá del tamaño y la carga de la toxina, con lo que se refiere a la estructura de la arcilla. La mayoría de ellas han sido reconocidas como aglutinantes eficaces de las aflatoxinas cuando se añade a una concentración de 10 g / kg (rango 5-20 g / kg) a la dieta. Sin embargo, su eficacia contra fusariotoxinas como la ZEA, las fumonisinas y los tricotecenos es muy limitada o casi nula.

La bentonita puede absorber toxina T-2, pero su nivel de incorporación en la dieta debe ser aproximadamente 10 veces más (100g/kg) que los niveles eficaces para las aflatoxinas. Como la mayoría de las arcillas, filosilicatos como el caolín y la sepiolita no son eficaces contra las micotoxinas, a excepción de las aflatoxinas.

Dentro de los inconvenientes de las arcillas en cuanto a la salud de los animales cabe destacar que la bentonita, un ingrediente natural de la arcilla que se expande en una masa dura cuando entra en contacto con la humedad, es inhalada por los animales mientras ingieren el pienso y al llegar ésta a los pulmones se expande causando asma y otros problemas pulmonares.

Por otra parte, cabe señalar que las arcillas pueden absorber micronutrientes y tener efectos negativos sobre la biodisponibilidad de minerales y oligoelementos. Además, el riesgo de arcillas naturales de estar contaminadas con dioxinas tiene que ser considerado. Las arcillas modificadas han sido preparadas por intercambio de cationes con compuestos de alquilamonio para dar organoarcillas, que son muy eficaces con la ZEN estrogénica. Las resinas sintéticas con una estructura laminar como colestiramina¹⁶ y resinas de intercambio iónico como el estireno-divinilbenceno o la polivinilpirrolidona se han probado como adsorbentes de micotoxinas en las fumonisinas o ZEN pero su coste es un factor limitante para un uso habitual.

El uso de arcillas, también causa una problemática medioambiental, ya que se producen por el método destructivo de la minería, afectando al paisaje y reduciendo los recursos naturales. Además la arcilla y la arena de sílice no se pueden descomponer más allá, porque ya están en su estado natural, no siendo, por tanto, biodegradables.

4.2.9.2. *Carbón activado*

El carbón activado se fabrica a partir de diversas sustancias carbonosas de origen animal, vegetal o mineral. Es muy poroso y su capacidad de adsorción se ve condicionada por los parámetros físico-químicos, la distribución de tamaño de poro y la superficie de adsorción. Por sus propiedades de adsorción, puede limitar la biodisponibilidad de la T-2 y de DON cuando se añade a una concentración de la dieta de 5-20g/kg. Frente a la ineficacia relativa de los aglutinantes de arcilla para micotoxinas exceptuando las aflatoxinas, se propusieron los aglutinantes naturales orgánicos.

A continuación se resumen en una tabla, los diferentes métodos de detoxificación de fumonisinas, explicados en los puntos anteriores y se muestran sus respectivos porcentajes de reducción.

¹⁶ Polímero usado para uso farmacéutico.

Tabla 4. Métodos y porcentajes de reducción de fumonisinas en alimentos.

Método	Reducción (%)
Método físico:	
Extracción de maíz en envíos a granel	26-70
Calentamiento de maíz húmedo (190°C/60')*	80
Calentamiento de maíz seco (190°C/60') o (220°C/25')	60-100
Hornear bollos de maíz (175°C/20') o (200°C/20')	16-27
Hornear pan de maíz (232°C/20')	48
Extrusión de sémola de maíz (160°C)	>50
15kGy de γ -irradiación en maíz	20
Adición de adsorbentes (colestiramina)	85
Método químico:	
Adición de amonio	79
Nixtamalización	>50
Nixtamalización modificada (sólo CaOH) ₂ o con NaHCO ₃ + H ₂ O	100
Nixtamalización + altas temperaturas	79
Adición de fructosa caliente (80°C/48h)	95
Adición de D-glucosa caliente (65°C/48h)	95
Método biológico:	
Fermentación con <i>Exophiala spinifer</i>	20
Adición de aceite de clavo (eugenol)	>70
Adición de compuestos fenólicos	94

*Entre paréntesis (temperatura/tiempo)

5. ADSORCIÓN

5.1. Introducción

La adsorción es un proceso que implica la acumulación de materia o la concentración de sustancias en una superficie o interfase. El proceso puede tener lugar en una interfase que separa dos fases, y estos pueden ser, líquido-líquido, gas-líquido, gas-sólido o sólido-líquido.

La fase que adsorbe se llama *adsorbente*, y la sustancia adsorbida *adsorbato*. La adsorción con adsorbentes sólidos tiene una gran importancia en el medio ambiente, se utiliza en la eliminación de contaminantes de disoluciones o de vapores acuosos. Los adsorbentes más utilizados son: carbón activado, resinas de intercambio iónico, óxidos metálicos, hidróxidos, carbonatos, alúmina activada y arenas.

En la adsorción las moléculas están mezcladas uniformemente a escala molecular y normalmente están localizadas a la superficie de los microporos de la fase sólida. En cambio, la absorción es un proceso en el cual las moléculas o los átomos de una fase interpenetran casi uniformemente con los de una otra fase, dando lugar a una mezcla con esta segunda.



Figura 9: Proceso de adsorción y absorción

El proceso de cambio iónico supone un intercambio de una sustancia o ión por otra sobre la superficie del sólido.

El término sorción incluye la adsorción y la absorción conjuntamente, siendo una expresión general para un proceso en el cual un componente se mueve desde una fase para acumularse en otra, principalmente en los casos en que la segunda fase es sólida.

La principal distinción entre sorción (adsorción y absorción) (Figura 9) y cambio iónico es que las ecuaciones que describen la sorción consideran solamente una especie química, de manera que la distribución del soluto entre la disolución y el sólido responde a una relación simple, lineal o no. Las ecuaciones para el cambio iónico tienen en cuenta todos los iones que compiten por los lugares de intercambio.

5.2. Tipos de adsorción

5.2.1. Atracción eléctrica entre el soluto y el adsorbente.

La adsorción por intercambio iónico es un proceso mediante el cual los iones de una sustancia se concentran en una superficie como resultado de la atracción electrostática en los lugares cargados de la superficie. Para dos adsorbatos iónicos posibles, a igualdad de otros factores, la carga del ión es el factor determinante en la adsorción de intercambio. Para iones de igual carga, el tamaño molecular (radio de solvatación) determina el orden de preferencia para la adsorción.

5.2.2. Atracción tipo Van der Waals.

La adsorción de Van der Waals se debe a que la molécula adsorbida no está fija en un lugar específico de la superficie, sino más bien está libre de trasladarse dentro de la interfase. Esta adsorción, en general, predomina a temperaturas bajas. Es rápida, reversible y tiende a la formación de multicapas, ocurre en todos los sólidos y en toda su superficie, tiene poca selectividad. La adsorción de la mayoría de las sustancias orgánicas en el agua con carbón activado se considera de naturaleza física.

5.2.3. Atracción de naturaleza química o quimisorción.

El adsorbato sufre una interacción química con el adsorbente. Las energías de adsorción son elevadas, del orden de las de un enlace químico, debido a que el adsorbato forma unos enlaces fuertes localizados en los centros activos del adsorbente. Esta adsorción suele estar favorecida a una temperatura elevada. Es lenta, Irreversible tiende a formar solo un capa adsorbida, ocurre en ciertos sólidos y en determinados puntos y tiene gran selectividad.

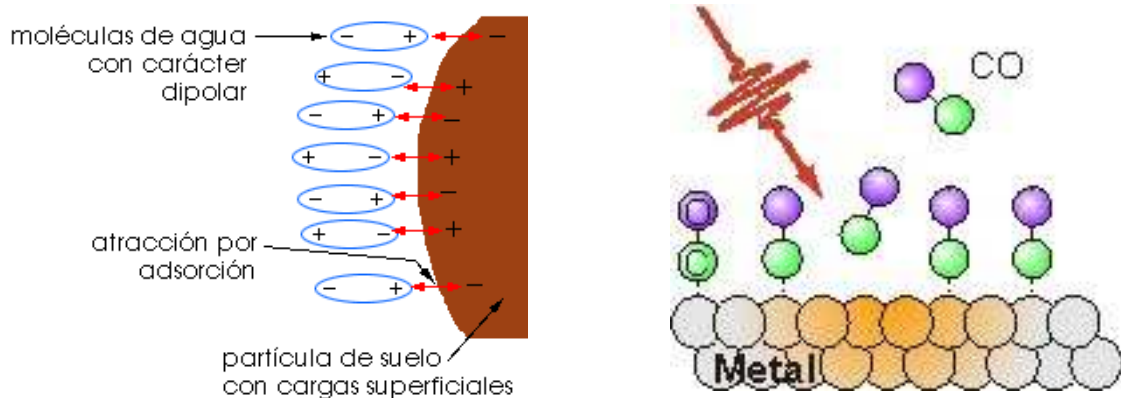


Figura10: Adsorción física y adsorción química respectivamente

No obstante, la mayoría de los fenómenos de adsorción son una combinación de las tres formas de adsorción indicadas anteriormente.

5.3. Factores que influyen en la adsorción

5.3.1. Concentración

La adsorción depende de las concentraciones respectivas del catión en el adsorbente y el líquido. Por consiguiente, la superficie potencial variará en función de la concentración de electrolito y del tipo de carga de la superficie de las partículas (constante o dependiente del pH). Para una superficie pH dependiente, un incremento en la concentración de electrolito generará un descenso de potencial al producirse un aumento de la distancia a la partícula.

5.3.2. Temperatura

La temperatura influye en la medida que las reacciones de adsorción son normalmente exotérmicas y por tanto, el grado de adsorción será presumiblemente mayor, al disminuir la temperatura, aunque las variaciones normales de temperatura sólo tienen pequeños efectos sobre el proceso de adsorción.

La fuerza de enlace con que los iones son retenidos o adsorbidos en los lugares de cambio depende, así mismo, de otros factores, entre los cuales cabe citar los siguientes:

- Valencia y tamaño del ión

- Densidad de carga
- Estructura y superficie específica del material de intercambio
- Concentración relativa de los cationes presentes
- Contenido de agua en el sistema (efecto dilución)
- Distribución y porosidad del sólido

5.4. Mecanismo de adsorción

El modelo de mecanismo de adsorción sólido-liquido se describe mediante tres fases.

1. Transporte del soluto desde la fase líquida a la superficie exterior de la partícula a través de la capa límite que envuelve a la partícula (resistencia de la película externa o de difusión externa).
2. Transporte del sólido dentro de la partícula (difusión intraparticular o interna).
3. Adsorción física o química del soluto encima de la superficie interna de la partícula.

La velocidad del proceso depende de la etapa lenta ya que todas las fases se efectúan en serie. El transporte intraparticular se puede realizar por difusión porosa, por difusión superficial o por difusión combinada.

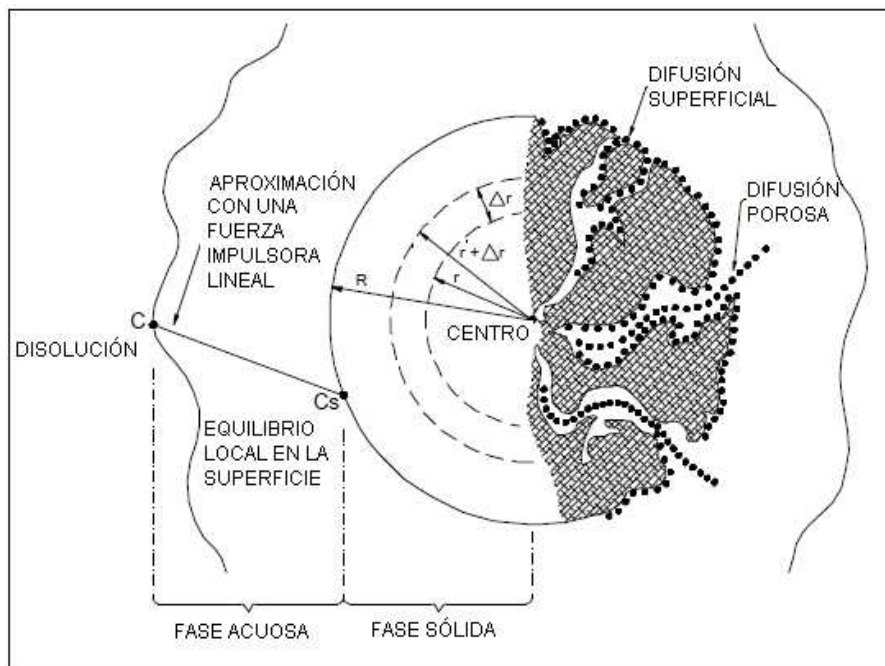


Figura11: Esquema de los mecanismos de adsorción de un material poroso

5.5. Isotermas de adsorción

La capacidad de adsorción está definida en base a las isotermas de adsorción en disolución. La isoterma de adsorción es la relación de dependencia, a una temperatura constante, de la cantidad de adsorbato adsorbido por peso unitario de adsorbente con respecto a la concentración del adsorbato en equilibrio.

Para determinar la capacidad de adsorción de forma experimental se utiliza la ecuación:

$$q = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad (\text{ec. 1})$$

Dónde:

C_i : concentración inicial de la solución ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

C_f : concentración después del proceso de adsorción ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

V : volumen de la solución (l)

m : masa del adsorbente (g)

5.5.1. Isotherma de Langmuir:

El modelo de Langmuir ha sido originalmente desarrollado para representar la quimiosorción. Este modelo está basado en las interacciones soporte-soluto y no tiene en cuenta las agrupaciones moleculares ni las variaciones de energía de interacción según el recubrimiento.

La aplicación de la isoterma de adsorción de Langmuir implica tener en cuenta las siguientes hipótesis:

- La adsorción del soluto esta confinando en una capa monomolecular.
- La energía de adsorción es constante.
- La superficie es homogénea, es decir, la afinidad de cada lugar de enlace por las moléculas del soluto es la misma.
- No se tienen en cuenta las interacciones entre las moléculas adsorbidas.
- Las moléculas de soluto adsorbidas están localizadas, esto significa,, que no se mueven sobre la superficie.

La expresión matemática de la ecuación de Langmuir es la siguiente:

$$q = \frac{q_m K_L C_{eq}}{1 + K_L C_{eq}} \quad (\text{ec. 2})$$

Donde:

q : capacidad de intercambio en el equilibrio

C_{eq} : concentración de equilibrio del soluto en el líquido

q_m : cantidad máxima de micotoxina por unidad de peso de alginato para formar una monocapa completa en la superficie ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Representa la capacidad máxima de adsorción de la superficie del adsorbente

K_L : es una constante relacionada con la afinidad de los sitios de unión con las micotoxinas

Se puede linealizar la ecuación C_{eq}/q en función de C_{eq}

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{1}{q_m} C_{eq} \quad (\text{ec. 3})$$

La representación gráfica de estas expresiones nos permitirá determinar los parámetros q_m y K_L . Por ejemplo:

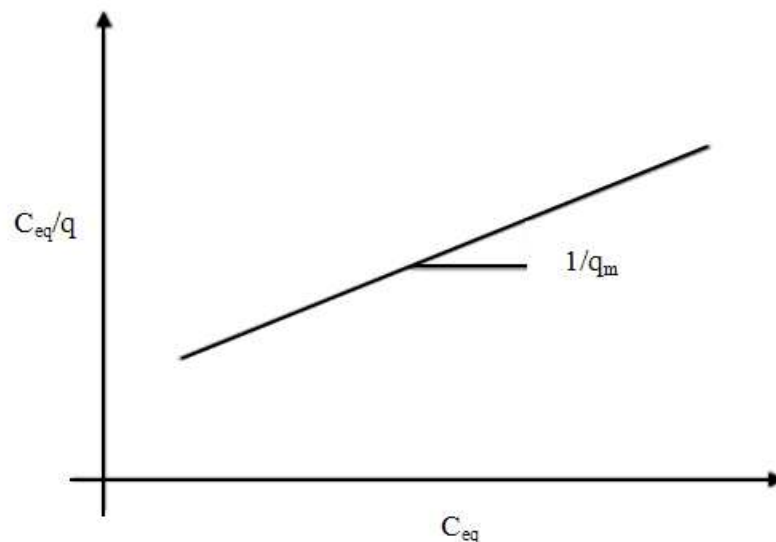


Figura12: representación gráfica de la isoterma de Langmuir

5.5.2. Isoterma de Freundlich

La ecuación de Freundlich es un caso especial para energías superficiales heterogéneas en la que el término energético, K , de la ecuación de Langmuir varía en función de la superficie cubierta, debido estrictamente a variaciones de calor de adsorción. Este modelo empírico de adsorción isotérmica ha sido empleado por varios autores para describir el proceso de equilibrio en sus trabajos.

Para describir las relaciones de equilibrio se puede aplicar esta isoterma siempre y cuando:

- No haya asociación o disociación de moléculas después de ser adsorbidas a la superficie.
- No haya quimisorción.

Es decir, porque la isoterma de Freundlich sea válida, el proceso de adsorción tiene que ser puramente físico sin cambios de configuración de las moléculas en el estado adsorbido.

La ecuación propuesta por Freundlich es:

$$q = K_F C_{eq}^{1/n} \quad (\text{ec. 4})$$

Dónde:

q : capacidad de intercambio en el equilibrio

C_{eq} : concentración de equilibrio del soluto en el líquido

K_F : constante. Es un indicador de la capacidad de absorción

n : constante adimensional. Indica el efecto de la concentración en la capacidad de adsorción y representa la intensidad de adsorción

La linealización y la representación gráfica de la ecuación de Freundlich $\log q$ en función de $\log C_{eq}$, nos permitirá determinar las constantes K_F y n .

$$\log q = \log K_F + (1/n) \log C_{eq} \quad (\text{ec. 5})$$

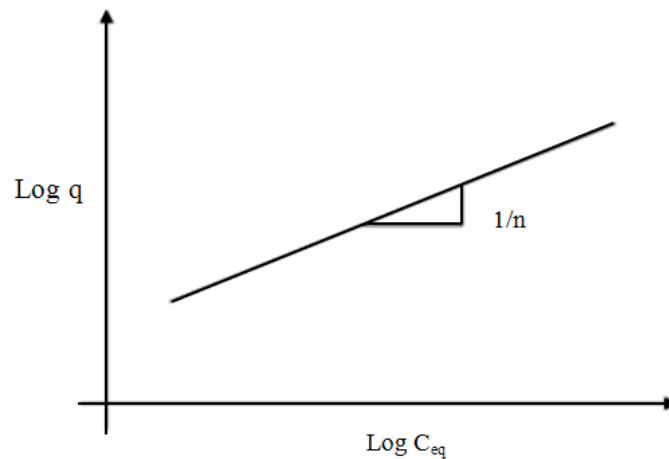


Figura13: representación gráfica de la isoterma de Freundlich

La ordenada en el origen es una indicación aproximada de la capacidad de adsorción y la pendiente, $1/n$, de la intensidad de adsorción. La ecuación de Freundlich concuerda bastante bien con la ecuación de Langmuir para datos experimentales dentro de un intervalo de concentraciones moderado. No obstante, al contrario de la ecuación de Langmuir, para pequeñas concentraciones, no se obtiene una expresión lineal para la adsorción.

6. ADSORBENTE ALGINATO DE CALCIO

6.1. Introducción

Las algas pardas son de la familia de las "feofíceas" y constituyen la materia prima principal en la producción de alginato, el cual es un componente de la pared celular de tales organismos y se encuentra formando un complejo insoluble de ácido algínico, de sus sales cálcica y magnésica, y de metales alcalinos en varias proporciones.

Las algas pardas crecen en todas las regiones de aguas frías del mundo. Tal y como ocurre con las plantas y árboles terrestres, entre ellas existe una enorme variedad de especies que varían en tamaño y forma, así como en el porcentaje y calidad del alginato que producen. Los géneros y especies de algas pardas que suscitan un mayor interés de aplicación industrial son: *Lessonia* (*Nigrescens*, *Flavicans*, *Trabeculata*), *Macrocystis Pyrifera*, *Durvillea Antártica*, *Laminaria* (*Digitata*, *Saccharina* y *Cloustoni*), *Ascophyllum*, *Fucus*, etc. Corresponden a organismos de grandes tamaños, conocidas también como Macroalgas o Kelp, que alcanzan de 1 a 2,5 metros de longitud (especies de los géneros *Lessonia*, *Laminaria*, etc.) y algunas del género *Macrocystis* llegan a alcanzar hasta 8 metros o más. Dichas algas marinas, viven y crecen constantemente en la zona costera ínter y submareal hasta los 20 o 30 metros de profundidad. Son organismos fotosintéticos que, sin embargo, no están catalogados como vegetales verdaderos y tienen altas tasas de crecimiento y renovación anual, lo que les hace un recurso natural renovable de gran importancia.



Figura14: fotografía de alga parda.

6.2. Estructura química

Los alginatos son las sales del ácido algínico, un polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas: el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G). Estos se agrupan en bloques

de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4).

Las fórmulas clásicas de Haworth para los dos monómeros se muestran en la figura 15, mientras que la figura 16 ilustra las llamadas “fórmulas de silla” que permiten ver en forma más clara la orientación tridimensional de las moléculas:

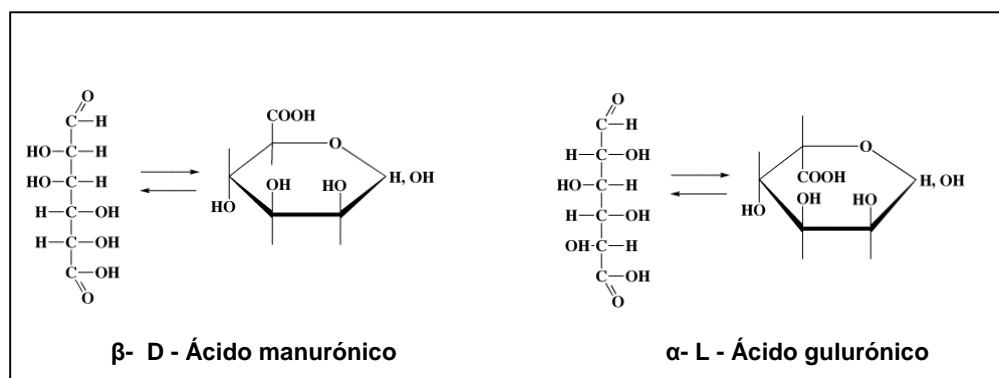


Figura 15: Fórmulas clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico

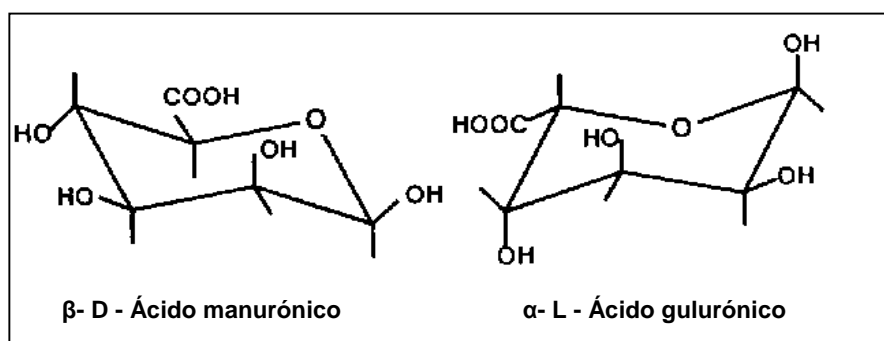


Figura 16: Fórmulas en formas de silla del ácido algínico

La gran variedad de aplicaciones de estos productos se basa en la habilidad natural que poseen en el control del comportamiento del agua, lo que científicamente se conoce como propiedad hidrocoloide, y en su reactividad frente al calcio; ambas son consecuencia de la geometría molecular. Ha sido demostrado que la cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques: Los bloques G contienen solo unidades derivadas del ácido L-gulurónico, los M se basan enteramente en ácido D-manurónico y las regiones MG, que consisten en unidades alternadas de ambos ácidos.

En las figuras 17 y 18 se muestran las configuraciones espaciales que adoptan los bloques M y G debido a los diferentes enlaces glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las unidades monoméricas. Las regiones de bloques M corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle.

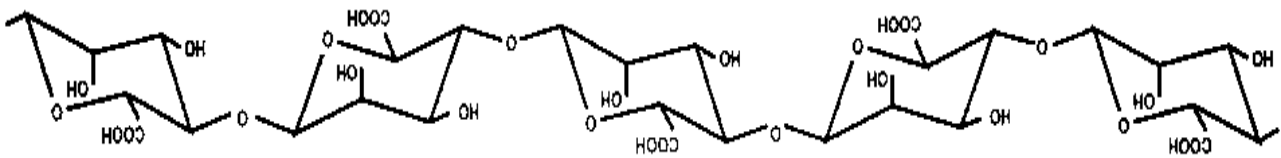


Figura 17: Bloques MM

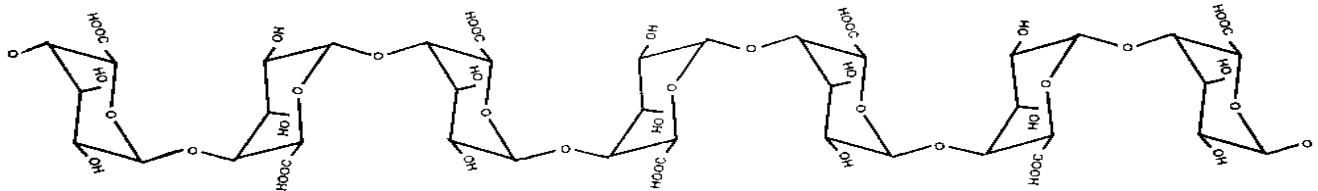


Figura 18: Bloques GG

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica. Éste modelo fue propuesto por Grant en 1973 ("egg-box model")¹⁷ para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas. Según los porcentajes de regiones de bloques G y M, que varían en las distintas especies de algas, serán las características de los geles de alginatos. Por ejemplo, el alginato obtenido de *Laminaria hyperborea*, con un alto porcentaje de segmentos poligulurónicos forma geles rígidos, con baja capacidad de unión de agua y tendencia a la sinéresis¹⁸ Por el contrario, el alginato de *Macrocystis pyrifera* o *Ascophyllum*, forma geles elásticos, con baja tendencia a la sinéresis y capacidad de sufrir deformación.

Tabla 5: Porcentajes de ácido manurónico y ácido gulurónico, relaciones M/G y contenido de alginato para varias especies comerciales de algas pardas

Especie	%M	%G	M:G	Contenido de alginato de sodio (%sobre algas secas)
<i>Laminaria hyperborea</i>	30	70	0.45	25-27
<i>Laminaria digitata</i>	55	45	1.20	20-26
<i>Macrocystis pyrifera</i>	60	40	1.50	26
<i>Ascophyllum nodosum</i>	65	35	1.85	26-28
<i>Lessonia nigrescens</i>	60	40	1.50	35
<i>Ecklonia maxima</i>	55	45	1.20	40

¹⁷ Modelo "caja de huevos".

¹⁸ Pérdida de agua por proceso de exudación del gel, que produce su contracción.

6.3. Propiedades

6.3.1. Estabilidad

Las sales de cationes monovalentes [Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{NH}^+$] del ácido algínico y su éster de propilenglicol son solubles en agua; no así el ácido algínico y la sal cálcica. Las soluciones neutras de alginatos de baja a media viscosidad pueden ser mantenidas a 25°C durante varios años sin apreciable pérdida de viscosidad y además con muy baja susceptibilidad al ataque microbiano.

Las soluciones de alginatos altamente polimerizados son poco estables a temperatura ambiente y tienen tendencia a sufrir depolimerización a medida que se incrementa la temperatura.

En cuanto a la compatibilidad con otros compuestos, como las soluciones de alginatos contienen un anión polisacárido, pueden dar productos insolubles al mezclarse con ciertos cationes. Tales soluciones resultan incompatibles con la mayoría de los cationes di y trivalentes, con las sales de amonio cuaternarias usadas generalmente como bactericidas, con ácidos lo suficientemente fuertes como para producir la precipitación del ácido algínico y con álcalis fuertes, los cuales producen una ruptura gradual de las cadenas polisacáridas.

6.3.2. Solubilidad

Esta propiedad se ve afectada tanto por factores físicos como químicos.

La cantidad de alginato que se disolverá en agua está limitada por la naturaleza física de las soluciones, más que por la solubilidad del compuesto en sí. Al incrementarse la concentración de alginato, la solución pasa de un estado de líquido viscoso a una pasta espesa, punto en el cual se vuelve muy difícil de dispersar el alginato residual.

- **Factores físicos:** La solubilización de los compuestos de alginato se ve afectada tanto por el tamaño como por la forma de las partículas. Usualmente se prefiere un material basto, cuyas partículas resultan más fáciles de dispersar y suspender, aunque tienen una baja velocidad de hidratación. Las partículas finas se disolverán más rápidamente, pero existe mayor riesgo de que se aglomeren; este efecto puede disminuirse diluyendo el alginato en presencia de otro polvo, por ejemplo, azúcar.
- **Factores químicos:** La solubilización de estos productos en agua resulta difícil si se realiza en presencia de compuestos que compiten con las moléculas de alginato por el agua necesaria para su hidratación. Así, la presencia de azúcares, almidón o proteínas en el agua reducirá la proporción de hidratación y se requerirán mayores tiempos de mezcla. Las sales de cationes monovalentes (como el NaCl) tienen un efecto similar a concentraciones cercanas al 0.5%. Lo mejor es agregar todas estas sustancias después de que el alginato sea hidratado y disuelto.

La presencia de pequeñas cantidades de cationes polivalentes inhibe la hidratación de los alginatos y proporciones elevadas de los mismos causan su precipitación. El alginato sódico resulta de difícil disolución en aguas duras y leche debido a que ambas contienen iones calcio; éstos deben ser primero secuestrados con un agente complejante, como por ejemplo hexametáfosfato de sodio o ácido etilenediamino tetraacético (EDTA).

Los alginatos en general son insolubles en solventes miscibles con el agua como pueden ser alcoholes y cetonas. Las soluciones acuosas (1%) de la mayoría de los alginatos toleran la adición de 10-20% de tales solventes; pero proporciones mayores impiden una correcta hidratación de las moléculas.

6.3.3. Viscosidad

La viscosidad es la propiedad fundamental de las soluciones de alginato y junto a su reactividad frente al calcio, es la que genera las características únicas de tales compuestos como espesantes, estabilizantes, gelificantes, etc.

A las concentraciones empleadas en la mayoría de las aplicaciones, las soluciones de alginato tienen un comportamiento pseudoplástico, es decir que la viscosidad decrece al aumentar el grado de cizallamiento (por agitación o bombeo). Este efecto es reversible, excepto a niveles de cizalla muy elevados, y es más marcado en las soluciones de alginatos de alto peso molecular y las de alginato sódico que contienen iones calcio. Algunas de estas soluciones pueden presentar incluso un comportamiento tixotrópico, en el cual la viscosidad varía con el tiempo a una velocidad de agitación constante.

- **Peso molecular:** cuanto mayor es el peso molecular (PM) del alginato, más viscosas resultan sus soluciones. Los productores pueden controlar el PM de los compuestos de alginato (grado de polimerización) variando las condiciones de extracción y manufactura. Se ofrecen generalmente productos con GP comprendidos entre 100 y 1000 unidades, que dan viscosidades en el rango de 10-1000 mPa.s (soluciones al 1%).
- **Concentración:** los alginatos comerciales puede obtenerse en diferentes grados de viscosidad (alto, medio y bajo), la que puede controlarse variando las concentraciones empleadas dentro de un rango más o menos estrecho
- **pH:** la viscosidad de las soluciones de alginato de sodio es casi independiente del pH en el rango entre 5 y 10, presentando un valor ligeramente mayor cerca de la neutralidad (pH 6-8) debido a efectos repulsivos de los grupos carboxilos cargados negativamente (COO^-), los que mantienen extendidas las cadenas del polímero e incrementan su capacidad de unión de moléculas de agua. Por debajo de pH 4,5 la viscosidad tiende a incrementarse por la disminución de la solubilidad del ácido algínico libre, el cual precipita en forma de gel a un pH de 3-3,5.
- **Temperatura:** las soluciones de alginatos se comportan igual que otros fluidos en la dependencia de la viscosidad con la temperatura: dentro de cierto rango, la viscosidad de tales soluciones decrece aproximadamente 2,5% por cada grado de incremento en la temperatura. El proceso es reversible, pudiendo la solución volver a su viscosidad inicial por enfriamiento. Sin embargo, si las soluciones de alginatos se mantienen a temperaturas elevadas (50°C) durante periodos extensos, la viscosidad decrece irreversiblemente debido a un proceso de despolimerización; comportamiento que deberá tenerse muy en cuenta durante el almacenamiento de los productos obtenidos industrialmente.
- **Fuerza iónica:** la viscosidad de las soluciones de alginato de sodio decrece levemente por la adición de sales de cationes monovalentes. Como es frecuente con otros polielectrolitos, el polímero en solución tiende a contraerse al aumentar la fuerza iónica de la misma. Este efecto se hace máximo a concentraciones salinas cercanas a 0,1 N.

6.4. Producción

La producción de compuestos algínicos, entendiéndose como tales al ácido algínico y sus sales de sodio, calcio, magnesio, etc; presentan dos alternativas de manufactura que se diferencian principalmente en los intermediarios de reacción; estos son:

- Proceso del alginato de calcio
- Proceso del ácido algínico

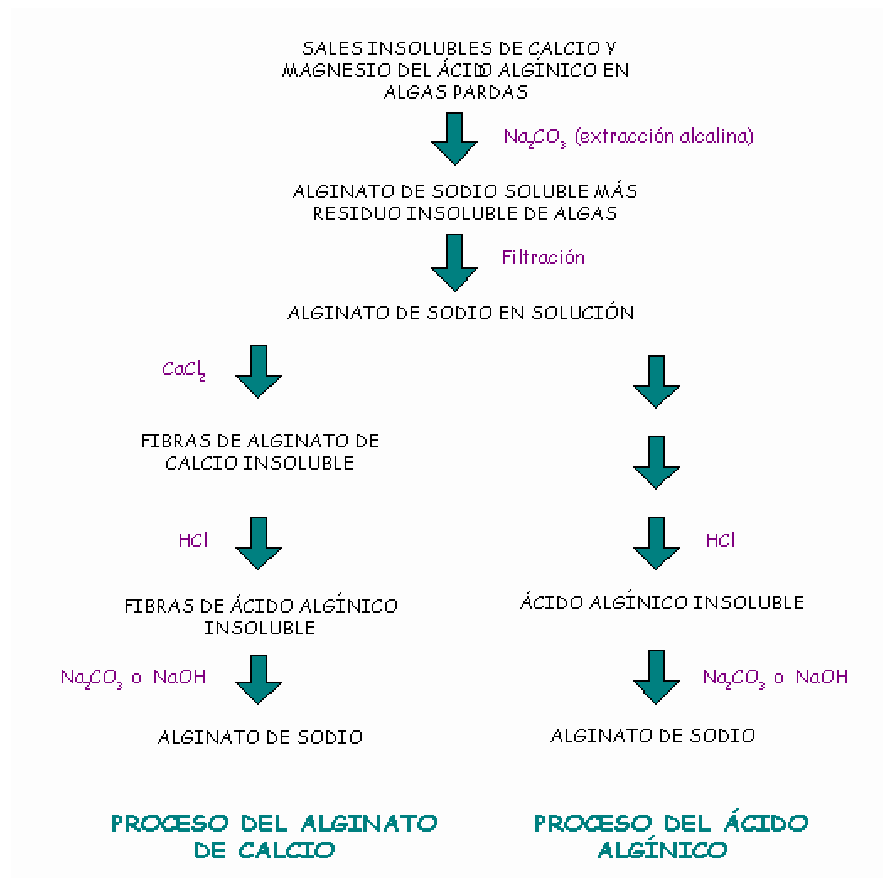


Figura 19: Producción de alginato de sodio a partir del proceso del alginato de calcio y del ácido algínico

El proceso del ácido algínico parece ser el de mayor simplicidad pero presenta ciertas desventajas en detalles de operación:

- Cuando el ácido precipita, lo hace en forma de una masa gelatinosa que resulta sumamente difícil de separar, pudiendo producirse una considerable pérdida del producto.
- El gel retiene en su estructura una elevada proporción de líquido, lo que dificulta los procesos de escurrido y deshidratación, haciéndose necesario el uso de alcohol como solvente para la conversión a alginato sódico. Esto usualmente encarece el proceso, a menos que se logre un buen grado de recuperación del solvente, lo cual suele no resultar fácil.

El primer proceso, en cambio, presenta las siguientes ventajas:

- La posibilidad de precipitar el alginato de calcio en forma de fibras que pueden ser fácilmente separadas y blanqueadas.

- Ese alginato cálcico se convierte posteriormente a ácido algínico que aún mantiene la estructura fibrosa, permitiendo su separación.
- Puede permitirse la presencia de restos de alginato de calcio en el producto final (alginato de sodio), puesto que es una manera de controlar la viscosidad de sus soluciones y sus propiedades gelificantes.

6.5. Aplicaciones

La importancia de los alginatos como materia prima para las industrias alimenticias, farmacéuticas y químicas en general, está dada por su propiedad hidrocoloide; esto es, su capacidad de hidratarse en agua caliente o fría para formar soluciones viscosas, dispersiones o geles. Los alginatos son, de esta manera, únicos en cuanto a sus propiedades como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadores de películas; resultando en una infinidad de aplicaciones, que se detallan en la tabla siguiente.

Tabla 6: Aplicaciones industriales del alginato

APLICACIONES ALIMENTICIAS	
Espesante, estabilizante o propiedades de suspensión en:	Zumos de frutas, salsas, cremas, cerveza
Propiedades gelificantes en:	Alimento para animales, gelatinas, relleno de aceitunas
Propiedades de control en :	Fabricación de quesos, helados, coberturas de frutas en pastelería
APLICACIONES FARMACÉUTICAS	
Propiedades espesantes en:	Jarabes, emulsiones, lociones, cremas
Características de rápida hidratación en :	Desintegración de tabletas, Control de irrigación de drogas
Propiedades gelificantes en:	Polvos de impresión dental
APLICACIONES TEXTILES	
Propiedades espesantes en:	Gomas de impresión , baños de tinta
Propiedades de limpieza en:	Sistemas reactivos de tinta, sistemas de dispersión de tinta
OTRAS APLICACIONES INDUSTRIALES	
Propiedades de formación de película en:	Industria de papeles calco, sellado de conservas
Interacción de silicatos en:	Electrodos de soldadura
Propiedades espesantes y estabilizantes en:	Barnices para cerámicas, pinturas cremosas

6.6. Geles de calcio

El calcio es el ión divalente de mayor empleo en la formación de geles de alginato debido a que sus sales son económicas, de fácil disponibilidad y no tóxicas. Las más usadas son el carbonato de calcio, sulfato, cloruro, fosfato o tartrato.

Para obtener un gel de características apropiadas, los iones calcio deben ser liberados lentamente en la solución del alginato; lo cual se logra empleando una sal de calcio de baja solubilidad, por ejemplo el citrato de calcio.

Un método alternativo consiste en usar una sal de calcio que sea prácticamente insoluble en soluciones neutras, pero que se disuelva a medida que baja el pH; es el caso del fosfato dicálcico. Este tipo de sales se emplea con el agregado de un ácido de baja solubilidad (por ejemplo, ácido adípico) que gradualmente baja el pH de la solución, permitiendo la liberación de los iones calcio y la formación del gel.

El tiempo requerido para formar el gel puede ser controlado por la solubilidad de las sales cálcicas y ácidos empleados, el tamaño de las partículas y la temperatura de operación. También resulta ventajoso el empleo de agentes secuestrantes o complejantes, los que permiten retardar el proceso de gelificación retrasando la disponibilidad de iones calcio hasta que el alginato está completamente dispersado e hidratado.

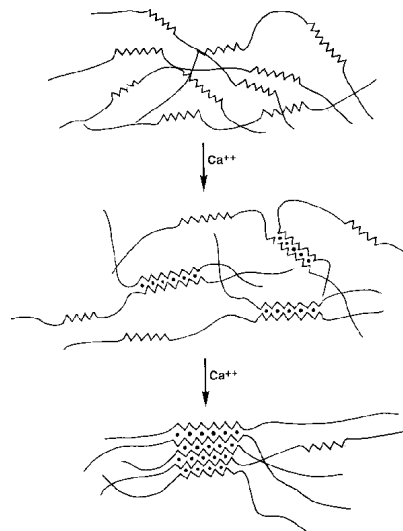


Figura 20: Egg box model

El modelo que explica la formación de los geles de alginato con sales cálcicas se denomina "egg-box model" y se basa en la formación de una unidad dimérica entre los iones calcio y las cadenas del polímero en forma de bucles (regiones de bloques GG). La estructura tridimensional de las cadenas ricas en ácidos gulurónicos generan distancias entre los grupos carboxilos e hidroxilos que permiten un alto grado de coordinación de iones calcio, formándose la estructura mostrada en la figura 20. Gracias a esta propiedad se pueden fabricar las perlas de alginato de calcio.

6.6.1. Interacción de la fumonisina con las perlas de alginato cálcico

La capacidad reactiva de los grupos hidroxilo hidratados de las micotoxinas interactúan con los adsorbentes hidratados. Estos grupos hidroxilo hidratados pueden proceder de las micotoxinas propiamente o bien puede proceder de ciertos adsorbentes hidratados (por ejemplo, los silicatos). En este caso se produce la interacción a partir de los grupos hidroxilos hidratados del alginato

Este tipo de unión, con enlace puentes de hidrógeno entre la fumonisina y el adsorbente (alginato de calcio), se produce tal y como se describe en las siguientes figuras:

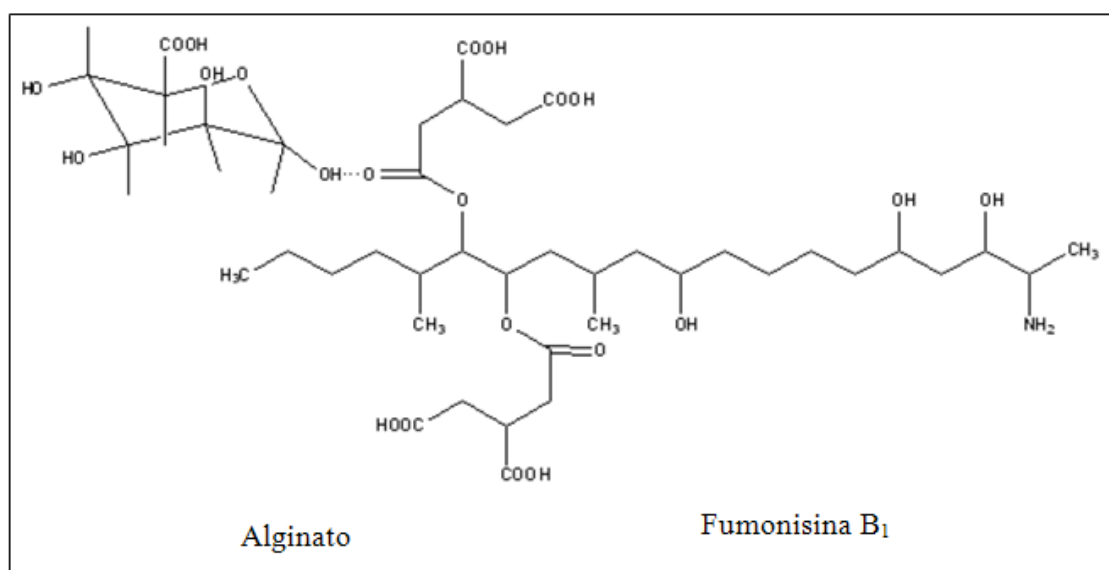


Figura 21: Interacción del alginato cálcico con la FB₁

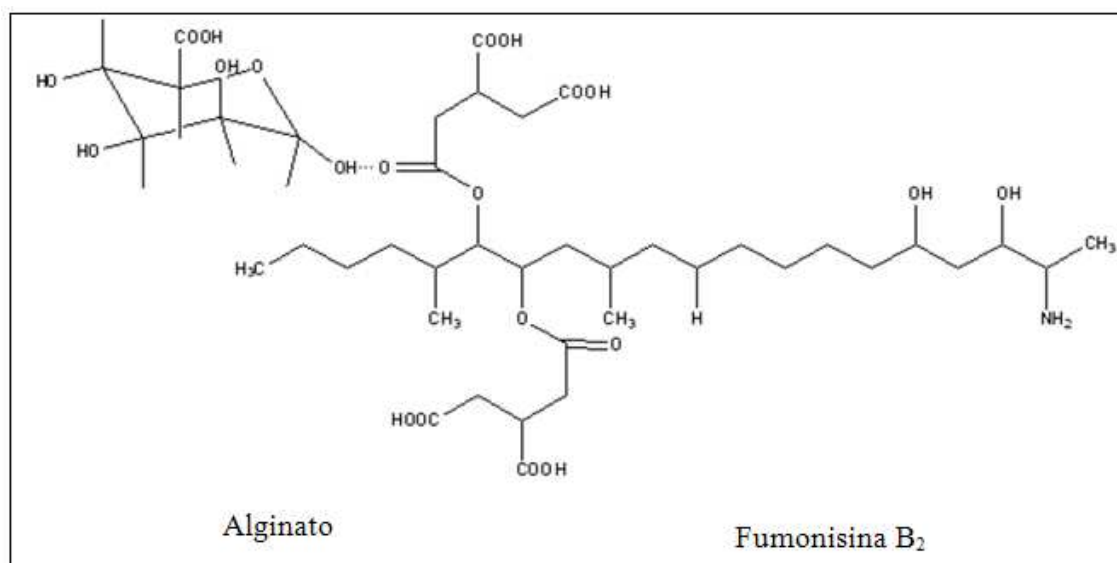


Figura 22: Interacción entre el alginato cálcico con la FB₂

En el caso de la adsorción de la fumonisina utilizando perlas de alginato de calcio liofilizadas, no se consiguieron resultados favorables, debido a que la liofilización deshidrata el adsorbente, impidiendo así las uniones mediante puentes de hidrógeno, típicas de los productos hidratados.

7. LIOFILIZACIÓN

7.1. Definición

La liofilización es un proceso de deshidratación de productos bajo baja presión (vacío) y temperatura moderada. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido - normal en procesos de secados - sino la sublimación del hielo. Por este motivo los productos deben permanecer obligatoriamente solidificados (congelados) durante el secado.

La liofilización es un conjunto de procesos – *no solo el secado* – que consiguen que el material resultante se presente seco, pero con todas las características del producto original - forma, color, aroma, sabor y textura, que estarán preservados en el producto seco. Eso diferencia y destaca el proceso de liofilización de los otros utilizados en deshidrataciones.

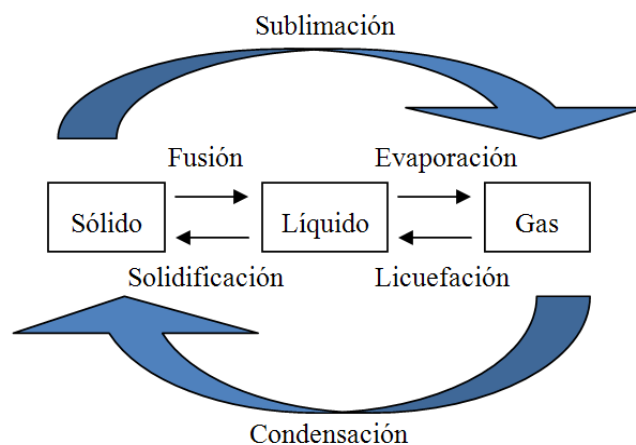


Figura 23: Esquema de los procesos implicados en la liofilización

7.1.1. Ventajas de la liofilización

La temperatura a la que es sometido el producto, está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.

Debido a la baja temperatura a la que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles, es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.

Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y se envasa a alto vacío.

La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado.

Al ser despreciable la humedad residual, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad.

Todas estas particularidades pueden resumirse en: una estabilidad óptima, una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación ilimitada; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso.

7.1.2. Desventajas de la liofilización

Es un proceso costoso.

Necesidad de personal cualificado en la operación y mantenimiento de los equipos.

Elevado coste de inversión de las instalaciones y equipos.

7.2. Descripción del proceso

Se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15 °C por debajo de su temperatura eutéctica¹⁹ para evitar la formación de coágulos de H₂O. Los pasos a seguir son:

- **Congelación inicial:** es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración depende de varios factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto. En líneas generales podemos decir que una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación. La congelación puede ser de dos tipos en función de la velocidad de congelación:

- Lenta:

- Los cristales que se forman son mayores
- Estructura porosa mayor
- Menor resistencia al flujo del vapor de agua
- Menor duración de la desecación primaria
- Estructura menos resistente

- Rápida

- Cristales pequeños
- Estructura porosa más fina
- Mayor resistencia al flujo del vapor de agua
- Mayor duración de la desecación primaria
- Estructura más resistente

¹⁹ En una mezcla de dos componentes, la temperatura eutéctica es la que determina un punto de fusión o de vaporización mínimo, inferior al correspondiente a cada uno de los compuestos en estado puro.

- **Sublimación o desecación primaria:** es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificarlos sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.
- **Desorción o desecación secundaria:** su misión es eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 %.

Tabla 7: descripción del proceso

Velocidad de congelación	Número y tamaño de cristales	Estructura del material	Desecación primaria	Desecación secundaria
Lenta	Pocos y grandes	Poros grandes	Más rápida	Desorción más lenta
Rápida	Numerosos y pequeños	Poros pequeños y mayor superficie específica	Más lenta	Desorción más rápida

7.3. Aplicaciones

Las aplicaciones de la liofilización son muy variadas destacando su uso en la industria farmacéutica y alimentaria.

La primera aplicación de la liofilización la realizó R. Altman (1890), quien utilizó un sistema similar a la liofilización para la preservación de tejidos animales. B. W. Hammer (1911), comprobó la posibilidad de preservar bacterias utilizando el método del científico americano Shackell. L. A. Roger (1914), reportó el uso del proceso de liofilización para preparar grandes cantidades de ácido láctico; y en 1958 se aplicó al sector alimentario enfocándose solamente a unos pocos alimentos, como la leche, las sopas, los huevos, la levadura, los zumos de frutas o el café. Oscar Cuper (1965), aplicó la liofilización a diferentes alimentos, (carnes, frutos de mar, hortalizas, infusiones). J. Alvarado (1979), aplicó los principios de liofilización atmosférica (sin vacío), a diferentes variedades de patata.

La liofilización da lugar a productos alimenticios de más alta calidad que con cualquier método de secado. El factor principal es la rigidez estructural que se preserva en la sustancia congelada cuando se verifica la sublimación. Esto evita el colapso de la estructura porosa después del secado. Al añadir agua posteriormente, el producto rehidratado retiene la mayor parte de su estructura original. La liofilización de materiales biológicos y alimenticios también tiene la ventaja de que conserva su sabor o aroma. Las temperaturas bajas que se emplean reducen al mínimo las reacciones de degradación que casi siempre ocurren en los procesos comunes de secado. Sin embargo, el secado por congelación es una forma de deshidratación de alimentos bastante costosa, debido a la velocidad lenta de secado y a la necesidad de usar vacío.

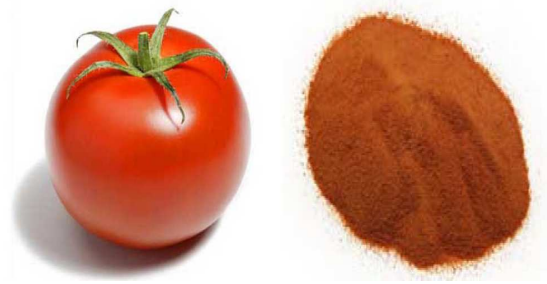


Figura 24: tomate liofilizado

La mayor aplicación de la liofilización está en el campo farmacéutico (comprimidos, tejidos, plasma, sueros y otros productos biológicos), en la industria química para preparar catalizadores, seguida del secado de materiales orgánicos como madera, flores, preservación de animales (taxidermia), preservación de documentos y libros antiguos y finalmente está el campo de los alimentos.



Figura 25: vacunas liofilizadas

Aplicaciones en la Industria Farmacéutica:

- Origen Humano: Plasma, hemoderivados, leche, Huesos, córneas
- Origen animal: Sueros, antígenos, enzimas
- Origen vegetal: Extractos, antibióticos, vitaminas
- Microorganismos: Vacunas, bacilos lácticos, cultivos tipo

Otras Aplicaciones:

- Conservación restos arqueológicos.
- Recuperación archivos y documentos tras inundaciones, incendios...
- Conservación flores, plantas...
- Conservación de pequeños animales.

7.4. Partes generales de un liofilizador

En la figura 26 se ilustra un liofilizador típico, con un condensador externo. Éste tiene tres componentes principales: la cámara de secado, el condensador y el sistema de vacío. La función básica del liofilizador es crear el entorno necesario para el proceso de liofilización. Esta sección, en general, no se ocupará de la operación de este equipo, sino del efecto que diversos componentes en los secadores pueden tener sobre el proceso.

Los equipos de pequeña escala, tipo planta piloto o de laboratorio constan exactamente de las mismas partes representadas en el esquema con la diferencia que se han integrado todas estas en un solo equipo.

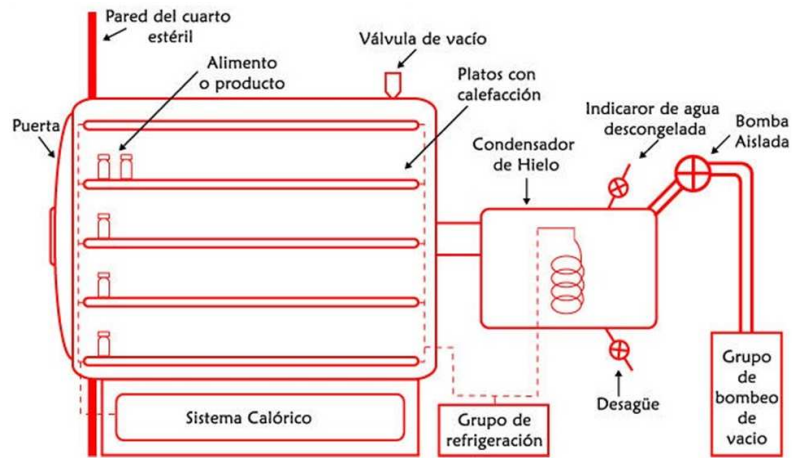


Figura 26: Partes generales de un liofilizador

7.4.1. Cámara del liofilizador

La cámara del secador sirve al proceso de liofilización mediante las siguientes funciones:

- Proporcionando un entorno limpio y a veces estéril para el proceso;
- Proporcionando las temperaturas y presiones necesarias para congelar y secar el producto.

7.4.2. Condensador

La principal función del condensador es eliminar los vapores condensables antes de que entren en el sistema de bombeo de vacío.

7.4.3. Sistema de vacío

El sistema de vacío, según el esquema, está conectado a la cámara del condensador y su función es proporcionar las presiones necesarias para las fases de secado primario y secundario. Los dos rasgos principales de un sistema de vacío que requieren consideración son la tubería de comunicación con el condensador y la naturaleza de la bomba de vacío.

8. TECNICA ELISA

8.1. Introducción

ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)²⁰ es una técnica inmunoenzimática que forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. Se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrá fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable el antígeno en la muestra mediante un espectrofotómetro.

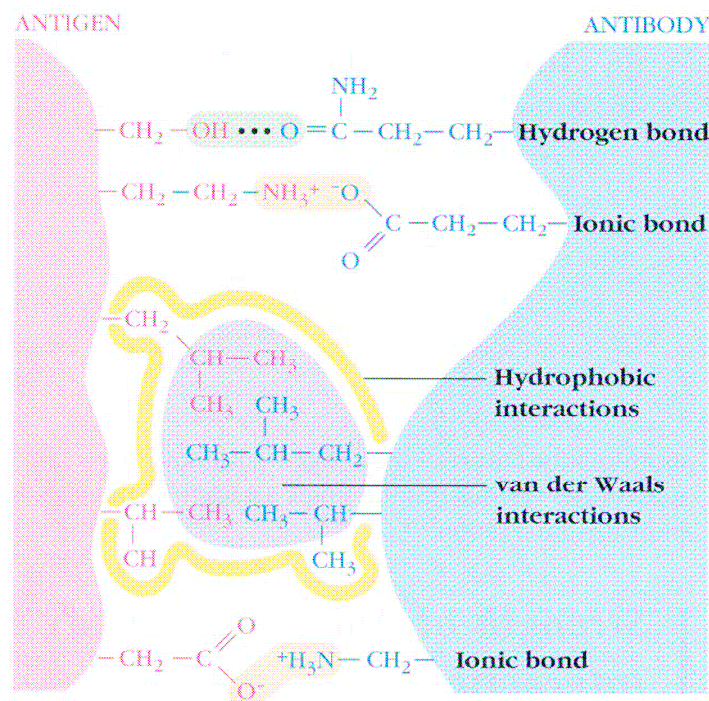


Figura 27: Fuerzas que interaccionan en la reacción antígeno-anticuerpo

Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

²⁰ Ensayo por InmunoAbsorción Ligado a Enzimas

El método ELISA está recomendado fundamentalmente para el estudio de poblaciones. Es una técnica altamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica. Esta técnica presenta además una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados.

Se han adaptado varios tipos del método ELISA tanto para la determinación de antígenos como de anticuerpos.

8.2. Tipos de ensayo ELISA

Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos:

- Anticuerpos Marcados
 - ELISA Directo
 - ELISA Indirecto
 - ELISA Sandwich
 - Doble (DAS)
 - Heterólogo (HADAS)
- Antígenos Marcados
 - ELISA Competitivo

8.2.1. ELISA Directo

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
3. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
4. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

8.2.2. ELISA Indirecto

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

2. Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
3. Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
4. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
5. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

8.2.3. ELISA Sandwich “DAS”²¹

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
3. Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
4. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
5. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

8.2.4. ELISA Sandwich “HADAS”²²

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
3. Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.
4. Adición de anticuerpos conjugados con una enzima anti-anticuerpos empleados en el paso anterior. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

²¹ Double Antibody Sandwich.

²² Heterologous Antglobulin Double Antibody Sandwich

5. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
6. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

8.2.5. ELISA competitivo

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior. Paralelamente, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Lavar para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado.
3. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
4. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tienen nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra.

Todos los tipos de ELISA descritos se pueden resumir en dos grandes grupos:

- ELISA para detectar antígenos: ELISA sándwich.
- ELISA para detectar anticuerpos: ELISA indirectos.

8.3. Técnica ELISA para micotoxinas

Las micotoxinas al no ser antigénicas, para poder ser determinadas mediante la técnica ELISA se tuvo que lograr la conjugación con proteínas o polipéptidos que pudieran producir anticuerpos en condiciones óptimas para conejos y otros animales. A medida que la tecnología ha ido avanzando se han producido anticuerpos monoclonales. Este desarrollo se ha incrementado en los últimos años.

Además de la técnica ELISA se han desarrollado diferentes tipos de inmunoensayos entre los que destacan el método RIA (radioinmunoensayos) y las columnas de inmunoafinidad. La mayoría de inmunoensayos se basan en la competición por los sitios de enlace de las moléculas de los anticuerpos entre las toxinas presentes en la muestra y las toxinas marcadas características del sistema, micotoxinas conjugadas. Por lo tanto es necesario contar con una micotoxina perfectamente marcada además del anticuerpo específico en el sistema de ensayo.

La gran ventaja de los sistemas de inmunoensayo es que no es necesario efectuar los procedimientos de limpieza de extractos. De modo que el extracto de la matriz sólida puede ser usado directamente en el ensayo, previa dilución con una solución amortiguadora característica del propio sistema. Sin embargo la sensibilidad de las determinaciones se incrementa cuando se utiliza un procedimiento adecuado de limpieza de extractos.

Entre los diferentes kits existentes en el mercado para la determinación de fumonisina en este trabajo hemos optado por la adquisición de RIDASCREEN®FAST Fumonisin con la finalidad de poder llevar a cabo los análisis de fumonisina en nuestros experimentos.

8.4. Pasos generales de un ELISA

1. Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.

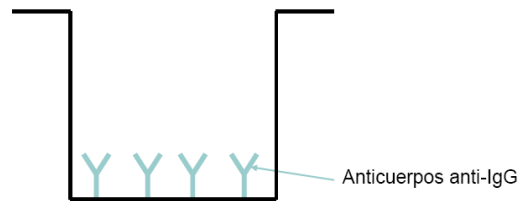


Figura 28: micropozo recubierto con anticuerpos anti-IgG.

En nuestro caso trabajamos con pocillos que están recubiertos con anticuerpos, llamados anticuerpos de captura. Estos anticuerpos de captura se unen a los anticuerpos anti-fumonisina.

2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.

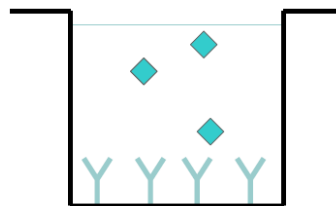


Figura 29: Agregado de estandar o muestra.

3. Se añade el conjugado fumonisina-enzima. La fumonisina no es un verdadero antígeno, pues al entrar en el organismo no tiene la capacidad de crear anticuerpos, por esta razón se crea un antígeno mediante la conjugación con una enzima.

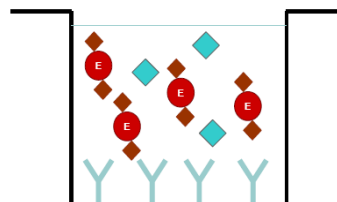


Figura 30: Agregado de enzima conjugada.

4. A continuación se añade el anticuerpo anti-fumonisina, anticuerpo específico para la fumonisina, elaborados a partir de la enzima conjugada con fumonisina y que es capaz de reaccionar con el anticuerpo de captura.

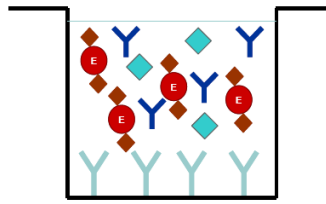


Figura 31: Agregado solución anticuerpo.

5. La adición del anticuerpo específico anti-fumonisina empieza la reacción. La fumonisina libre y el conjugado fumonisina-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-fumonisina (inmunoensayo competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-fumonisina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa.

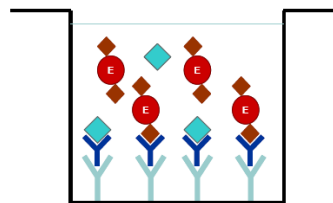


Figura 32: Empieza la reacción: se establece el equilibrio entre el analito ligado y no ligado de muestras o estándares y la enzima conjugada.

6. Posteriormente una vez establecido el equilibrio de competición entre la fumonisina y la enzima conjugada el exceso de fumonisina y conjugado enzima-fumonisina que no se unió es eliminado en un proceso de lavado.

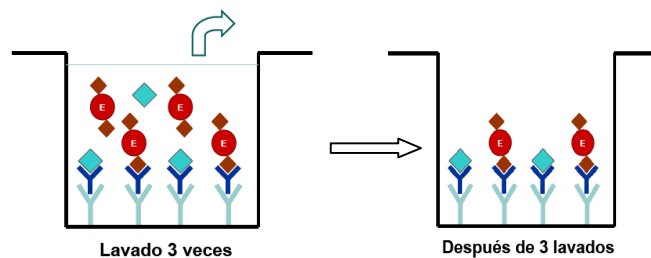


Figura 33: remoción de reactivos en exceso y remoción total de reactivos no ligados.

7. El sustrato/cromógeno es agregado a los pocillos e incubado. El conjugado fumonisina-enzima unido a los pocillos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul.

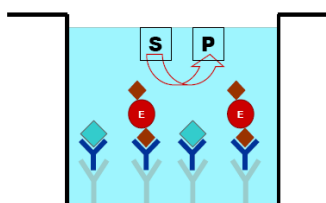


Figura 34: Agregado de substrato/cromógeno. El substrato (S) desarrolla color en el producto (P) en presencia de la enzima.

8. La adición de la solución “stop” provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a una longitud de onda de $\lambda=450$ nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de fumonisina en la muestra / estándar. A más color, más baja será la concentración de la muestra / estándar.

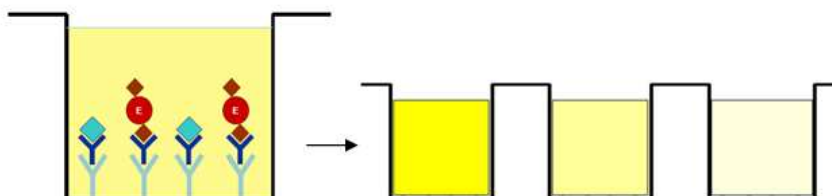


Figura 35: agregado solución “stop”. Se para la reacción y el color desarrollado es medido visualmente ó mediante lector ELISA.

8.5. Interpretación de resultados

En primer lugar se calcula el porcentaje de absorbancia o densidad óptica (O.D.) que se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{\text{absorbancia estándar (ó muestra)}}{\text{absorbancia estándar cero}} \times 100 = \% \text{ absorbancia} \quad (\text{ec. 6})$$

De esta forma, el estándar cero es igual a 100% y los demás valores de absorción se indican en porcentaje. Los valores calculados para la absorción de los estándares se representan respecto a la concentración de fumonisina ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). La concentración de fumonisina en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ correspondiente a la absorción de cada muestra y puede ser leída directamente de la curva de calibrado. La representación del porcentaje de los estándares respecto al logaritmo neperiano (\ln) de la concentración de fumonisina nos da una recta de la cual podemos obtener el valor de la concentración de fumonisina a partir de la absorbancia.

8.6. Dispositivos empleados

Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de adsorción (fenómeno de superficie) de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores **ELISA**. Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos, adecuados para los sistemas de 'screening' masivo de los sistemas robotizados HTS ('High-throughput system').

Los lectores **ELISA** son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie. Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350 μ L son especialmente ventajosos para procesar un elevado número de muestras y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles con o sin tapa.

Para poder realizar el análisis, conjuntamente con el lector se necesita el Kit Elisa para la detección de micotoxinas.



Figura 36: Lector ELISA de 96 pocillos y Kit de análisis fumonisina.

9. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

9.1. Fabricación de perlas de alginato

Preparar una solución de alginato de sodio a una concentración conocida, en este caso al 2%. La disolución tiene que estar en agitación a 600-700 rpm hasta que esté perfectamente disuelta. Llegados a este punto se disminuyen las rpm hasta 50 rpm con el fin de eliminar las burbujas de aire para que no se produzcan en el interior de las perlas.

Para la producción de las perlas de alginato de calcio es necesario bombear gota a gota la disolución anterior sobre una solución de nitrato de calcio de concentración de 0.05M y en continua agitación. De esta manera las gotas gelifican esféricamente y tienen un diámetro aproximado de (2.5mm) (\pm 0.5mm).

Tabla 8: Lotes obtenidos en la fabricación de las perlas de alginato

N° LOTE	PERLAS TOTALES	ALGINATO/PERLA (mg)
LOTE 1	61170	0.3222
LOTE 2	52061	0.3433
LOTE 3	2730	0.3663
LOTE 4	5264	0.3799



Figura 37: Fabricación y montaje de las perlas de alginato de calcio

Reactivos:

- Agua destilada y agua bidestilada.
- Alginato de sodio.
- Nitrato de calcio (CaN₂O₆·4H₂O).

Instrumentación:

- Botes de plástico (100ml)
- Vasos de precipitados (100, 250, 500, 1000, 5000 ml)
- Colador
- Vidrios de reloj
- Espátula
- Parafilm
- Cronómetro

- Balanzas
- pH-metro
- Agitador magnético
- Imán / varilla imantada
- Agitador Rotabit

Proceso:

- Para preparar 1000 ml de solución de alginato de sodio al 2%, pesaremos 20g de alginato de sodio y añadimos agua destilada (H₂O) hasta obtener 1000ml de solución.



Figura 38: Solución de Alginato de sodio al 2%

- Para fabricar las perlas de alginato de calcio necesitamos una solución de Nitrato de Calcio de 0.05M. Se prepara un exceso de nitrato de calcio para asegurar que todo el alginato de sodio se consuma en la reacción. Pesaremos 24g de nitrato de calcio y enrasaremos hasta 2000ml de solución con agua destilada (H₂O).



Figura 39: perlas de alginato de calcio

9.2. Liofilización de las perlas de alginato

Proceso:

Para la liofilización de las perlas de alginato se pesa la cantidad a liofilizar, en este caso 20g de perlas de alginato de calcio. Con un colador se escurren las perlas y se lavan con agua destilada, en una bandeja cubierta de papel absorbente, se intenta retirar el exceso de agua presente en las perlas, a continuación las extenderemos bien en las bandejas del liofilizador.



Figura 40: Bandeja del liofilizador con perlas de alginato de calcio

Antes de liofilizarlas, previamente se congelaron en el congelador del frigorífico alrededor de 2h. Seguidamente se introducen las bandejas en el compartimento para bandejas del liofilizador.



Figura 41: Compartimento de bandejas del liofilizador

Finalmente se introduce el compartimento de las bandejas en el liofilizador procurando que la válvula de escape del agua este cerrada y verificar que en la bomba, el aceite esté por encima del nivel indicado.



Figura 42: Liofilizador utilizado en la liofilización de las perlas de alginato de calcio

El proceso que utilizaremos, será el semiautomático para poder establecer manualmente los tiempos, la temperatura y la presión.

Aunque las perlas estén previamente congeladas, iniciaremos el proceso por la congelación de las perlas para establecer la temperatura de inicio.

Las perlas antes de introducirlas al congelador del frigorífico están a una temperatura de (20°C) llegan a (-18°C) en un tiempo de 2 horas. Al introducirlas en el liofilizador la temperatura baja a (-54.4°C) en 35 minutos, a continuación las perlas estarán al vacío durante 3 horas a una temperatura de (-54.4°C) y a una presión de (0.822 mBar).



Figura 43: Pantalla del liofilizador indicando el punto del proceso (vacío)

Finalmente sublimamos las perlas a una temperatura de (90°C) manteniendo la presión a (0.822 mBar) durante 7 horas.

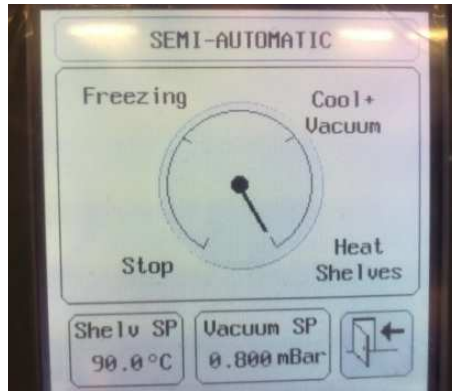


Figura 44: Pantalla del liofilizador indicando el punto del proceso (sublimación)

Al finalizar el proceso paramos el liofilizador, abrimos la válvula de alivio y la del agua, retiramos las perlas y las conservamos en una cápsula de porcelana tapadas con parafilm.



Figura 45: Perlas liofilizadas en la bandeja del liofilizador

Instrumentación:

- Colador
- Vidrios de reloj
- Espátula
- Parafilm
- Balanzas
- Liofilizador
- Cápsulas de porcelana

9.3. Método analítico de detección y adsorción de la fumonisina por el proceso ELISA

Procedimiento:

Para realizar el análisis se necesita un kit especial de detección de fumonisina: el inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de fumonisina.

Fundamento del test:

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo que ya resumimos en el apartado 8.4. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-fumonisina. Se agregan estándares de fumonisina o la solución de las muestras, conjugado fumonisina-enzima y anticuerpos anti-fumonisina a los pocillos. La fumonisina libre y el conjugado fumonisina-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-fumonisina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-fumonisina se une a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado fumonisina-enzima que no se unió es retirado posteriormente en un proceso de lavado. El sustrato / cromógeno es agregado a los pocillos e incubado. El conjugado fumonisina-enzima unido a los pocillos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución “stop” provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a $\lambda=450\text{nm}$; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de fumonisina en la muestra.

Contenido del kit:

- 1 placa con 48 pocillos (6 tiras, cada una de 8 pocillos separables) recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-fumonisina.
- 5 estándares, 1.3ml cada uno: 0ppm (estándar cero), 0.222 ppm, 0.666ppm, 2ppm, 6ppm de fumonisina en metanol/agua.
- 1 conjugado fumonisina-peroxidasa (3ml).
- 1 anticuerpo anti-fumonisina (3ml).
- 1 solución de sustrato/cromógeno rojiza (10ml).
- 1 solución “stop” de ácido sulfúrico 0.5M (14ml).



Figura 46: Estándares y reactivos del contenido del Kit ELISA

Reactivos adicionales e instrumentación requerida:

Equipo:

- Espectrofotómetro para las placas de portapocillos (lector ELISA)
- Embudo Kitasato
- Molino para triturar las muestras.
- Agitador múltiple
- Papel de filtro
- Micropipetas de 50 μ l, 100 μ l, 1000 μ l
- Cronómetro

Reactivos:

- Metanol
- Solución de metanol al 70%.
- Agua destilada

Preparación de las muestras:

La preparación será de la siguiente manera tanto para el cereal como en los alimentos para animales:

- Pesar 25g de la muestra y triturarla en un molino eléctrico, agregarle 125ml de metanol al 70%.
- Agitar la muestra vigorosamente 3 minutos.
- Filtrar el extracto a través del papel de filtro y el Kitasato.
- Diluir el filtrado, en el cereal será de 1:14, en el alimento para animales 1:2.

Proceso para la lectura:

1. Colocar suficientes pocillos en marco portapocillos para los estándares y las muestras a analizar por duplicado.

Agregar 50 μ l de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes.



Figura 47: Agregado de estándares

2. Agregar 50 μ l del conjugado fumonisina-enzima a los pocillos correspondientes.

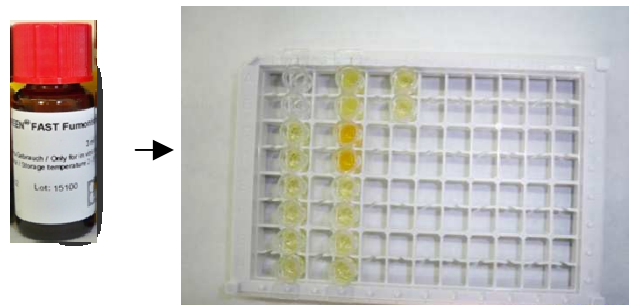


Figura 48: Agregado del conjugado a los pocillos

3. Agregar 50 μ l anticuerpo anti-fumonisinina a cada pocillo. Mezclar el contenido de la microplaca suavemente y dejar incubar 10 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}$ C).

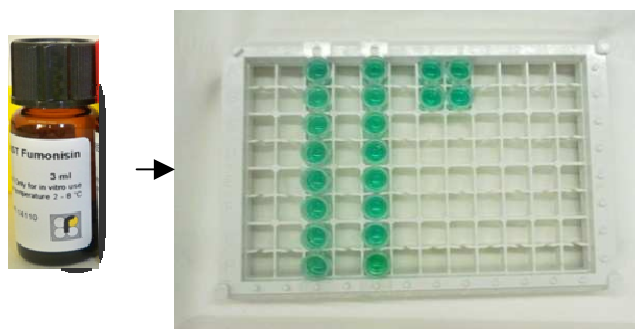


Figura 49: Agregado de anticuerpo

4. Vaciar los pocillos y a continuación golpear energéticamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos de

líquidos. Lavar los pocillos (250 μ l por pocillo) con agua destilada, vaciar de nuevo los pocillos de la forma anterior. Repetir este paso dos veces más.

5. Agregar 100 μ l de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclar el contenido de la microplaca suavemente e incubar durante 5 minutos (+/- 0.5) en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}$ C).

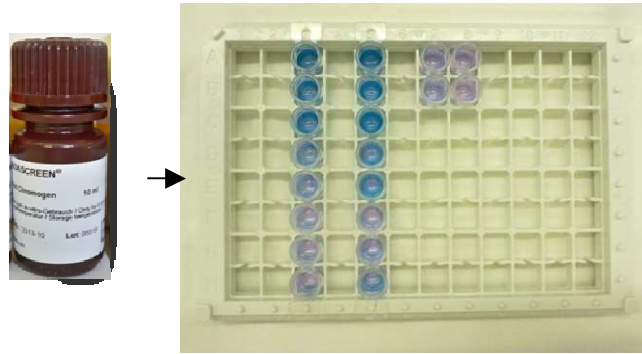


Figura 50: Agregado de sustrato/cromógeno

6. Agregar 100 μ l de la solución “stop” a cada pocillo. Mezclar el contenido de la microplaca suavemente y medir la absorción a ($\lambda=450$ nm) en el transcurso de los siguientes 10 minutos.

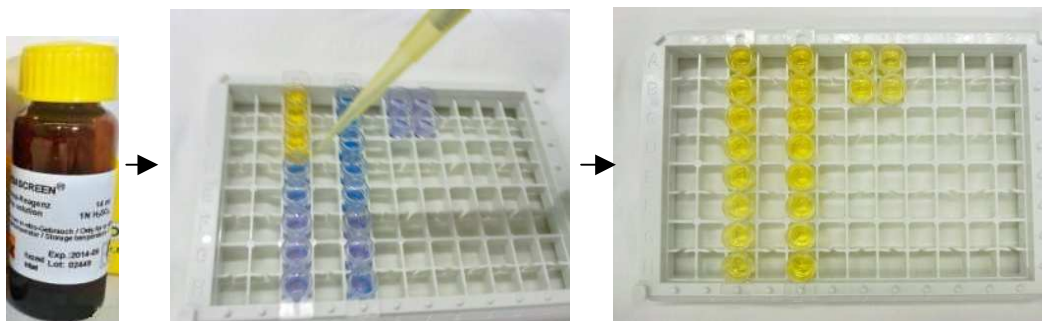


Figura 51: Agregado de la solución stop

7. Medir la absorción a ($\lambda=450$ nm) en el transcurso de los siguientes 10 minutos en el lector ELISA.



Figura 52: Lector ELISA utilizado en el análisis

9.4. Resultados

9.4.1. Calibración

Para cada uno de los análisis realizados, se prepararon 5 patrones para la determinación de la curva de calibración de la fumonisina tal y como se indica en el apartado 9.3.(método de detección y adsorción de la fumonisina por el proceso ELISA) y se determinó la máxima densidad óptica (O.D.) a partir de la ecuación 6. La representación de la máxima densidad óptica frente a la concentración de fumonisina nos da una curva característica tal y como se puede observar en la Figura 53, donde se ha representado la mediana de todas las calibraciones realizadas así como las desviaciones estándar obtenidas.

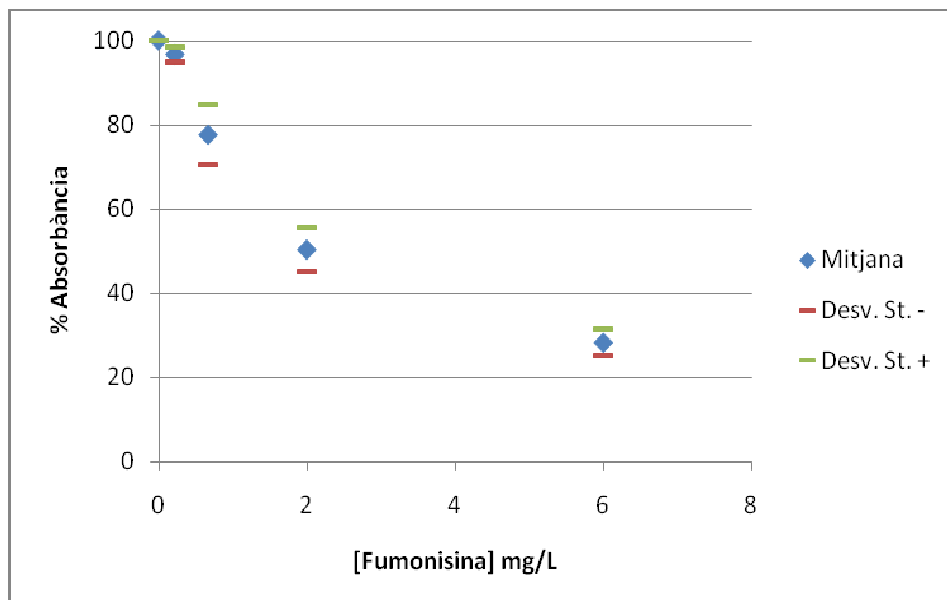


Figura 53: Curva de calibración de la Fumonisin

9.4.2. Determinación de la concentración inicial de las muestras analizadas

La tabla 9 nos muestra los diferentes resultados obtenidos en el análisis de tres tipos de productos alimentarios y tres muestras de fumonisina pura. La muestra de cereal fue proporcionada por los laboratorios r-biopharm. Los piensos destinados a la alimentación animal fueron adquiridos en el comercio presentando como fecha de caducidad el año 2013. Para realizar el análisis en todos los casos se tomaron 25 g del producto y se disolvieron en 125 de metanol al 70 %.

Tabla 9: Concentraciones de fumonisina en las muestras analizadas

Muestras analizadas	[Fumonisina] (mg/L)	[Fumonisina] (mg/Kg)
Fumonisina 1	2.22	11.10
Fumonisina 2	2.67	13.33
Fumonisina 3	3.01	15.05
Cereal 1	5.62	28.10
Cereal 2	6.02	30.01
Pienso (gatos)	4,30	21,49
Pienso (perros)	4,35	21,75

Los resultados obtenidos en el caso de los piensos y el cereal nos muestran según la normativa legal vigente que estos son aptos para la alimentación animal. El cereal analizado no puede ser utilizado para la alimentación humana ya que el límite recomendado es de $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

La adsorción ha sido realizada en las tres muestras de fumonisina y en el cereal.

9.4.3. Adsorción: muestras de Fumonisina

Las soluciones de fumonisina se prepararon a partir de fumonisina patrón de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ suministrada por r-biopharm obteniéndose tres soluciones de fumonisina con una concentración inicial que varía entre 2.22 y $3.01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Se realizaron diferentes experimentos con dichas soluciones tomando volúmenes que oscilan entre 0.1 y 0.01 litros. La cantidad de alginato de calcio añadido a los diferentes volúmenes está comprendida entre 0.004 y 1.5 g de alginato tal como se muestra en la tabla 10. Las soluciones de fumonisina y alginato de calcio se sometieron a agitación de 25 rpm durante 48 h. Los resultados obtenidos para la concentración de equilibrio así como el valor de la capacidad de adsorción obtenida y el pH inicial de las soluciones se indican en la siguiente tabla:

Tabla 10: Resultados obtenidos

Perlas	m (g alginato)	V (L)	pH	Co (mg/L)	Cf (mg/L)	q (mg /L)
10	0,004	0,01	6,98	2,222	1,486	2,01
20	0,007	0,01	7,01	2,222	0,723	2,05
40	0,015	0,01	7,52	2,222	0,190	1,39
60	0,022	0,01	7,72	2,222	0,200	0,92
100	0,050	0,1	7,94	2,665	1,659	2,01
250	0,125	0,1	7,78	2,665	0,522	1,71
500	0,250	0,1	7,96	2,665	0,280	0,95
1000	0,500	0,1	7,98	2,665	0,204	0,49
2000	1,000	0,1	8,02	2,665	0,122	0,25
3000	1,500	0,1	8,10	2,665	0,099	0,17
100	0,050	0,1	7,91	3,011	1,910	2,20
250	0,125	0,1	7,89	3,011	0,394	2,09
500	0,250	0,1	7,86	3,011	0,055	1,17
1000	0,500	0,1	7,96	3,011	0,120	0,50
2000	1,000	0,1	7,99	3,011	0,102	0,29
3000	1,500	0,1	8,01	3,011	0,070	0,08

A continuación se muestra la representación de los resultados experimentales obtenidos (figura 54) así como la modelización de los mismos mediante las ecuaciones de Langmuir y Freunlich y la aplicación de la función SOLVER.

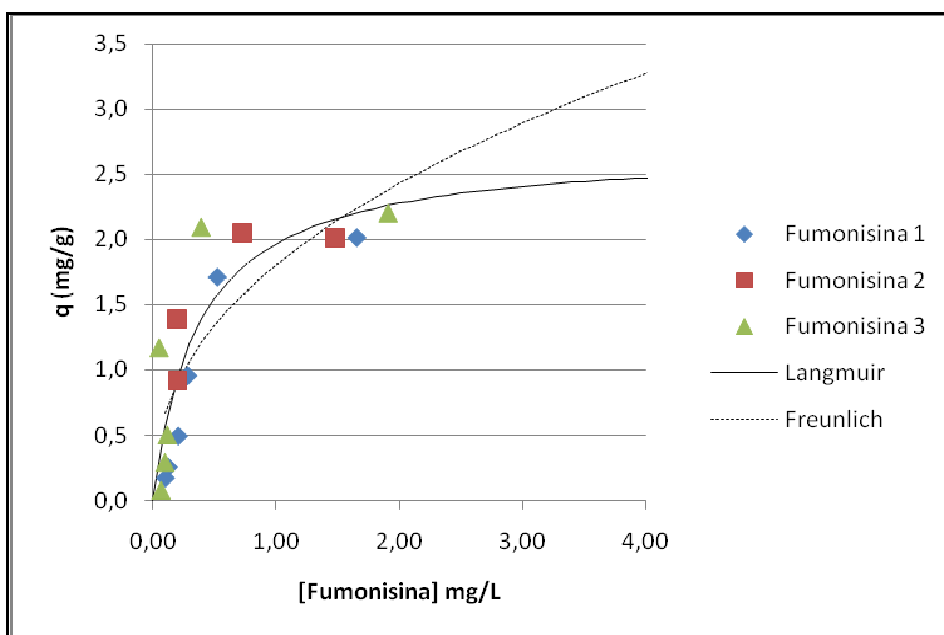


Figura 54: Isoterma de adsorción de la fumonisina mediante alginato de calcio.

Los parámetros de las ecuaciones de Langmuir y Freundlich obtenidos mediante la modelización de los resultados experimentales que se muestran en la Tabla 11. Como puede observarse mediante los valores obtenidos de la mediana de los errores al cuadrado (MRS) (ecuación 7), la ecuación de Langmuir se ajusta más a los valores experimentales. La máxima capacidad de adsorción obtenida a partir de la ecuación de Langmuir es de 2.7 mg de fumonisina por gramo de alginato. El elevado valor de K_L ($2.64 \text{ l}\cdot\text{mg}^{-1}$) nos muestra una gran afinidad de la fumonisina por el adsorbente, como también puede observarse gráficamente a partir de la pendiente inicial de la curva obtenida.

Se ha de tener en cuenta la ecuación MRS, como se define:

$$MRS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(q_{exp,i} - q_{calc,i})^2]}{n}} \quad (\text{ec. 7})$$

Tabla 11: Parámetros obtenidos mediante la aplicación de las ecuaciones de Langmuir y Freundlich.

	Modelo Langmuir			Modelo Freundlich		
	q_m [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	K_L [$\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$]	MRS	K_F [$\text{mg}^{1-1/n}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}^{1/n}$]	n [adimen.]	MRS
Fumonisina pura	2.70	2.64	0.384	1.804	2,32	0.434

A continuación, en la Tabla 12, se presentan los porcentajes de eliminación de fumonisina mediante la utilización del alginato de calcio en función de la cantidad de alginato presente en la disolución a dos concentraciones iniciales diferentes.

Tabla 12: % de eliminación de fumonisina en función de la concentración de alginato

[Alginato] mg/L	% Eliminación [fumonisina]inicial= 2,22 mg/L	% Eliminación [fumonisina]inicial= 3,01 mg/L
	0,5	37,75
1,25	80,41	86,91
2,5	89,49	94,17
5	92,35	96,01
10	95,42	96,61
15	96,29	97,68

En la Figura 55 se representan los resultados obtenidos, pudiéndose observar más claramente que los mejores resultados para el porcentaje de eliminación se obtienen cuando partimos de una concentración inicial de fumonisina más elevada. El máximo porcentaje de eliminación obtenido es del 98% correspondiendo a una concentración de alginato de 15 mg·l⁻¹. Este valor contrasta con los resultados bibliográficos obtenidos en los cuales se muestra que hasta el momento el mejor resultado obtenido se consigue mediante el adsorbente colestiramina dando un porcentaje de eliminación del 85% (ver tabla 4: métodos y porcentajes de reducción de fumonisinas en alimentos).

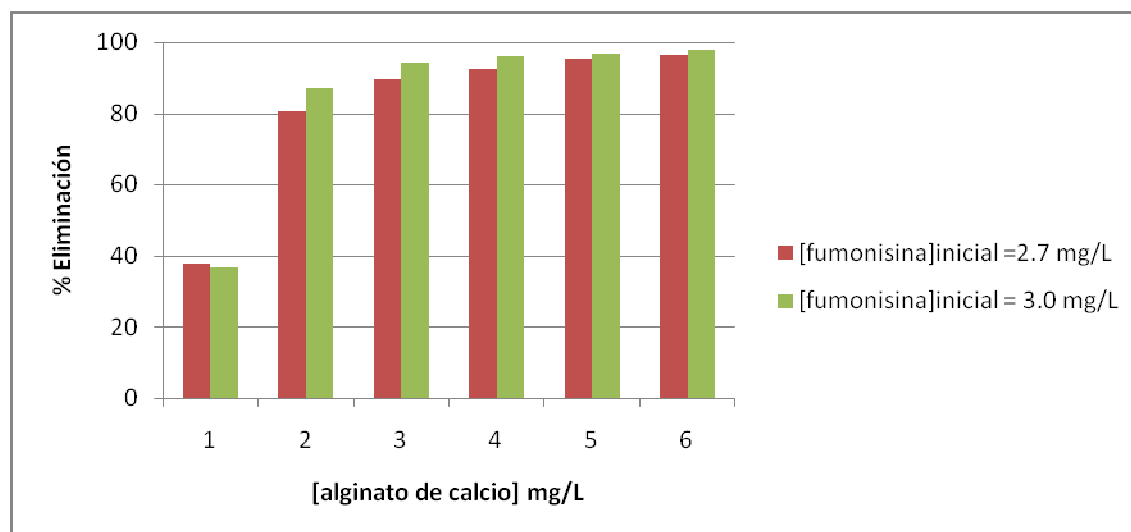


Figura 55: % de eliminación de la fumonisina en función de la concentración de alginato presente en la disolución.

9.4.4. Adsorción: cereal

A partir de una muestra de cereal contaminada con fumonisina suministrada por r-biopharm, se tomaron 25 g de cereal y se disolvieron en 125 ml de metanol al 70%. Después de la agitación correspondiente se

filtró y el filtrado obtenido fue tratado como en el apartado anterior, procediéndose al tratamiento para la adsorción por duplicado.

En este caso se realizaron dos pruebas paralelamente, por un lado se trabajó con las perlas hidratadas como en el caso anterior y por otro se procedió a la liofilización de perlas del mismo lote que fueron utilizadas para la realización de la segunda prueba siendo las condiciones experimentales idénticas. En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos en los dos casos.

Tabla 13: Capacidades de adsorción obtenidas a partir de la muestra de cereal para perlas de alginato de calcio hidratadas y liofilizadas.

Perlas hidratadas	m (g alginato)	V (L)	pH	Co (mg/L)	Cf (mg/L)	q (mg/L)
30	0,0114	0,01	7,76	5,62	3,52	1,85
60	0,0227	0,01	7,83	5,62	2,00	1,59
90	0,0341	0,01	7,59	5,62	1,10	1,33
120	0,0455	0,01	7,26	5,62	0,50	1,13
30	0,0114	0,01	7,46	6,02	3,96	1,81
60	0,0227	0,01	7,58	6,02	2,05	1,75
90	0,0341	0,01	7,59	6,02	1,44	1,34
120	0,0455	0,01	7,36	6,02	1,10	1,08
Perlas liofilizadas						
20	0,0076	0,01	7,32	5,62	5,61	
30	0,0114	0,01	7,28	5,62	5,56	
60	0,0227	0,01	7,36	5,62	5,41	
120	0,0455	0,01	7,39	5,62	5,60	

En la Figura 56 se muestran los resultados experimentales obtenidos en el caso de la adsorción de fumonisina en perlas hidratadas de alginato de calcio a partir de la muestra de cereal juntamente con las curvas obtenidas a partir de la modelización de los resultados experimentales mediante las ecuaciones de Langmuir y Freundlich.

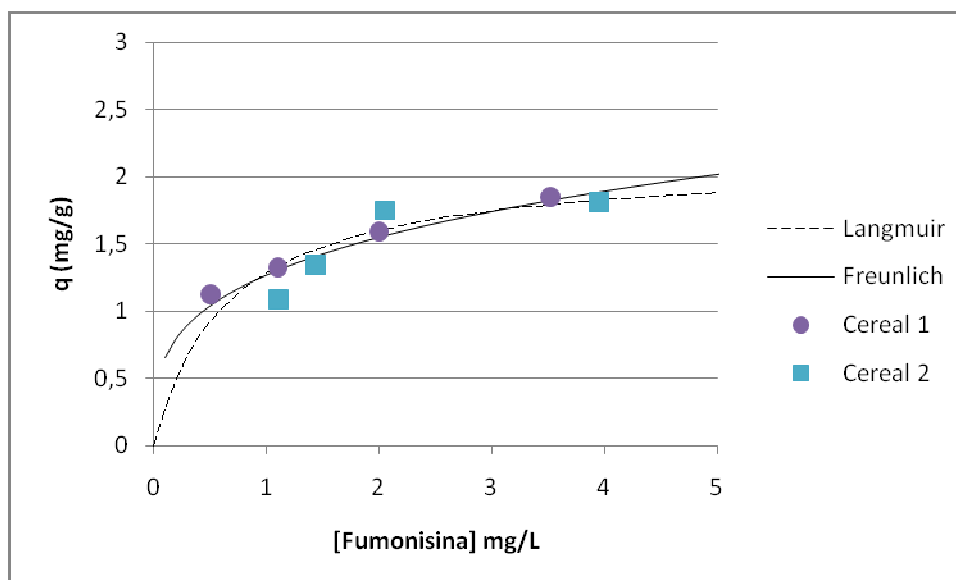


Figura 56: Isotherma de adsorción obtenida a partir de la muestra de cereal

Como puede observarse los valores de la capacidad de adsorción obtenidos para la fumonisina cuando se parte de la muestra de cereal son más bajos que los obtenidos para el caso que se parte de la muestra de fumonisina pura siguiendo la misma metodología experimental y bajo las mismas condiciones esto es debido a que en la matriz del cereal hay imperfecciones.

Tabla 14: Parámetros obtenidos mediante la aplicación de las ecuaciones de Langmuir y Freundlich

	Modelo Langmuir			Modelo Freundlich		
	q_m [mg·g ⁻¹]	K_L [L·mg ⁻¹]	MRS	K_F [mg ^{1-1/n} ·g ⁻¹ ·L ^{1/n}]	n [adimen.]	MRS
Fumonisina cereal	2.12	2.64	0.132	1.269	3.48	0.114

La capacidad máxima de adsorción obtenida a partir de la modelización de los resultados experimentales a partir de la ecuación de Langmuir es de 2.12 mg/g, valor ligeramente inferior al obtenido para la máxima capacidad de adsorción a partir de la muestra de fumonisina pura.

La liofilización de las perlas no ha mostrado resultados satisfactorios. Dicha liofilización se realizó con la finalidad de obtener un adsorbente con poros de mayor tamaño con el cual poder obtener una capacidad de adsorción mayor. Los malos resultados obtenidos se atribuyen a la lenta velocidad de congelación utilizada en el proceso, lo cual nos ha permitido obtener un adsorbente más poroso pero seguramente con los poros de menor tamaño, a la vez que nos demuestra la importancia de la presencia de agua para el establecimiento de las diferentes interacciones entre el adsorbente y la fumonisina.

10. CONCLUSIONES

- En esta investigación se ha detectado la presencia de fumonisina en diferentes tipos de alimentos, cereales y piensos. Paralelamente se han analizado diferentes muestras de fumonisina pura con la finalidad de poder observar las posibles interferencias creadas por la matriz de la muestra.
- Los niveles de fumonisina encontrados en los piensos y en los cereales nos indican que solo son aptos para su utilización en alimentación animal.
- Los resultados obtenidos muestran cómo el alginato de calcio puede considerarse un compuesto capaz de adsorber fumonisinas con una alta afinidad. Los porcentajes obtenidos a concentraciones de $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de alginato de calcio (Figura 55) superan el 91% de eliminación de fumonisina, mostrando valores superiores a los encontrados con la utilización de otros adsorbentes, solamente en el caso de la utilización de la colestiramina se obtiene un 85 % de eliminación de fumonisina (ver tabla 4: Métodos y porcentajes de reducción de fumonisinas en alimentos).
- La aplicación del alginato de calcio como adsorbente nos ha permitido obtener una capacidad de adsorción de $2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para soluciones de fumonisina de aproximadamente $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $\text{pH}=7.5$.
- Los resultados obtenidos para la capacidad de adsorción cuando se parte de una muestra de cereal son ligeramente inferiores a los obtenidos a partir de la disolución de fumonisina pura, atribuyéndose dicha disminución a la posible adsorción de otros compuestos presentes en la matriz de la solución del cereal.
- La modelización de los resultados experimentales nos muestra que el modelo de Langmuir se ajusta mejor a los valores obtenidos, no observándose grandes diferencias con la modelización de Freundlich. El valor de la constante K_L de la ecuación de Langmuir nos demuestra una gran afinidad entre el adsorbente y la fumonisina.
- La liofilización de las perlas no ha mostrado resultados satisfactorios. Dicha liofilización se realizó con la finalidad de obtener un adsorbente con poros de mayor tamaño con el cual poder obtener una capacidad de adsorción mayor. Los malos resultados obtenidos se atribuyen a la lenta velocidad de congelación utilizada en el proceso lo cual nos ha permitido obtener un adsorbente más poroso pero seguramente con los poros de menor tamaño a la vez que nos demuestra la importancia de la presencia de agua para el establecimiento de las diferentes interacciones entre el adsorbente y la fumonisina.
- La utilización del alginato de calcio en lugar de las arcillas como adsorbente proporciona la posibilidad de mejorar las propiedades de los piensos ya que evitaría los problemas digestivos que plantea la utilización de las arcillas.
- Como vemos, la utilización del alginato de calcio como adsorbente a añadir a la composición inicial de los piensos para la prevención de la absorción intestinal de las fumonisinas es una atractiva hipótesis que hay que tener en consideración dentro de la lucha contra la micotoxicosis.

11. AMBIENTALIZACIÓN

Este proyecto sigue la normativa ISO 14001. Es una norma aceptada internacionalmente que establece cómo implantar un sistema de gestión medioambiental (SGM) eficaz. La norma se ha concebido para gestionar el delicado equilibrio entre el mantenimiento de la rentabilidad y la reducción del impacto medioambiental. Lo que contiene ISO 14001:

- Requisitos generales
- Política medioambiental
- Planificación de implantación y funcionamiento
- Comprobación y medidas correctivas
- Revisión de gestión

Ello significa que puede identificar aspectos del negocio que tienen un impacto en el medio ambiente y comprender las leyes medioambientales que son significativas para esa situación.

Realizar un estudio sobre el impacto ambiental de un proyecto permite conocer la incidencia que tiene éste sobre el entorno, de esta forma poder adoptar medidas para evitar o corregir los impactos que podrían ocasionar su ejecución y funcionamiento.

La finalidad de este proyecto es la aplicación del alginato de calcio como adsorbente de micotoxinas en lugar del método utilizado en la actualidad, las arcillas, las cuales presentan muchos inconvenientes desde el punto de vista medioambiental, los cuales quedan reflejados en el apartado 4.2.9.

Actualmente las arcillas son el adsorbente más utilizado para la adsorción de las micotoxinas. En este proyecto se ha propuesto la utilización del alginato de calcio para realizar la adsorción de las micotoxinas, y los motivos, a parte de que este adsorbente no es en absoluto perjudicial para los animales, se trata de un biopolímero natural que es biodegradable y no causa efectos perjudiciales para el medio ambiente, con lo cual tiene en consideración la problemática medioambiental.

Nuestra escuela universitaria, la EPSEVG (UPC) sigue una política medioambiental, lo que conlleva el concepto de mejora continua.

El mayor y más problemático de los residuos que hemos generado durante la realización de este proyecto son las micotoxinas, debido a su actividad tóxica. Al ser de carácter orgánico, se colocaron en recipientes destinados a este fin, y una empresa gestora de residuos se encarga de su manipulación y transporte hacia la planta de residuos especiales.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abad Acinas, Javier y Pozas Selva, Rubén. *Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros*. Trabajo final de carrera, UPC, departamento de Ingeniería Química. Vilanova i la Geltrú, 2010.
- Alimentos Contaminados con micotoxinas. *OCU- Compra Maestra*, 2005, núm. 294, p. 29-32.
- Ariño Moneva, Agustín. Informe relativo a las micotoxinas fumonisinas. Comisión Científica de la Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria [en línea]. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza, 2008. Disponible en: <https://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictámenes_informes/AASA/INFORME_RELATIVO_MI_COTOXINAS_FUMONISINAS.pdf>
- Bauza, R. Las micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal. *IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos* [en línea]. Montevideo, Uruguay, 2007. Disponible en: <<http://www.fagro.edu.uy/~suinos/biblioteca/nutricion/N-Bauza%20-%20Mico toxinas,%20una%20amenaza%20constante%20en%20la%20alimentacion%20animal.pdf>>
- Bermejo, M.V. Liofilización. [en línea]. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia, 1999. Disponible en: <<http://www.uv.es/~mbermejo/Freeze-Drying.pdf>>.
- Borrell, J. Gimeno, G. Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Revista Selecciones Avícolas* [en línea]. 2002, vol. 44, núm. 8, p. 567-572.
- Caballero Torres, Ángel Eladio. *Temas de higiene de los alimentos*. Ed. Ciencias Médicas. La Habana, 2008.
- Calvo, Miguel. *Toxinas fúngicas*. [en línea]. Disponible en: <<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/micotoxinas.html>>.
- Contreras Audiffred, Tomás. Adsorción. [en línea]. División ingeniería química y bioquímica. Tecnológico de estudios superiores de ECATEPEC. Disponible en: <<http://www.scribd.com/doc/18030299/adsorcion>>.
- Diario Oficial de la Unión Europea. 2006/576/CE. *Recomendación de la comisión sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal*. Bruselas, 2006. [en línea]. Disponible en: <<http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/nuevas-recomendaciones-sobre-presencia-t907/253-p0.htm>>.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (CE) 1126/2007. *Reglamento de la comisión que modifica el Reglamento (CE) 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de Fusarium en el maíz y los productos del maíz*. Bruselas, 2007. [en línea]. Disponible en: <http://www.aesan.msps.es/CNA/docs/docs/laboratorio_nacional_referencia/control_micotoxinas/legislacion/reglamento_1126_2007.pdf>.
- E. Zain, Mohamed. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* [en línea]. Abril, 2011. Vol. 15, núm. 2, p. 129-144. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610310000827#s0025>>.
- Gimeno, A. [en línea]: *Los Hongos y las micotoxinas en la Alimentación Animal: Conceptos, Problemas, Control y Recomendaciones*. Disponible en: <<http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/detoxificacion-micotoxinas-t357/p0.htm>>.

- Grupo de Investigación de Recursos Hídricos. Procesos de adsorción [en línea]. Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas. Universidad Jaime I, Castellón. Disponible en: <<http://www.agua.uji.es/pdf/leccionHQ17.pdf>>.
- Jiménez Zaro, Laura. [en línea]: ISO 14001: *Guía para la aplicación de la Norma UNE-EN ISO 14001 en la pyme*. Disponible en: <http://www.usc.es/cpca/WebReacciona/ficheros/gestion medioambiental/SGMA/sgma_docu9.pdf>.
- Jouany, Jean Pierre. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. [en línea]. Octubre, 2007. Vol. 137, núm. 4, p. 342-362. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840107002234>>.
- Marín García, Patricia. *Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "fusarium"*. [en línea]. Tesis doctoral, UCM, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid 2010. Disponible en: <<http://eprints.ucm.es/11150/1/T32054.pdf>>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas*. Ed. Roma Organismo Internacional de Energía Atómica. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2003.
- P.E, Nelson, et al., Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. *Clinical Microbiology Reviews*. [en línea]. Octubre, 1994. Vol. 7, núm. 4, p. 479-504. Disponible en: <<http://cmr.asm.org/cgi/reprint/7/4/479>>.
- Pérez Pérez, José Manuel, Pérez Sevilla, Beatriz. Técnica de ELISA. [en línea]. Laboratorio de inmunología. Facultad de estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2006. Disponible en: <<http://es.scribd.com/doc/15834994/Tecnica-de-ELISA-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay>>.
- Ramírez Navas, Juan Sebastián. Liofilización de alimentos [en línea]. Universidad del Valle, Colombia, 2006. Disponible en: <<http://es.scribd.com/doc/31055971/2006-Ramirez-Liofilizacion>>.
- Schaafsma, A.W. Tamburic-Ilinic, L., Miller, J.D., Hooker, D.C., 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Can. J. Plant Pathologies*. Núm. 23, p. 279-285.
- Soriano del Castillo, J.M. *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos, 2007.
- Soriano del Castillo, J.M. *et al.*, Aclaraciones terminológicas en el campo de la micotoxicología. *Revista Iberoamericana de Micología*. [en línea]. 2006, núm. 23, p. 64-66. Disponible en: <<http://www.reviberoammicol.com/2006-23/064066.pdf>>.
- Terroni equipamentos LTDA. Manual básico de liofilización. [en línea]. Disponible en: <<http://api.ning.com/files/r36cjGKKUjHiYZQH-NMo80UEkCPVAiYsidNyI15yUY1QDCH8ViroxVYM2-kcxgYLQl1ef39s4YBgbVCytr-kKVgvtRESq2U/ManualdeliofilizacinEsp..pdf>>.

