



Adsorción *in vitro* de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: Montmorillonita

Antonio Javier Ramos Girona¹ y Enrique Hernández Giménez²

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat de Lleida, Àrea de Tecnologia de Alimentos, Centro I+D UdL-IRTA (CeRTA), 25198 Lleida (España) y

² Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia (España)

Resumen

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas que se pueden encontrar presentes como agentes contaminantes en una gran variedad de alimentos y piensos. Se ha demostrado que compuestos adsorbentes nutricionalmente inertes son capaces no sólo de adsorber aflatoxinas, sino también de evitar su absorción gastrointestinal al impedir que atraviesen la membrana intestinal.

El objetivo del presente estudio es determinar la capacidad de adsorción de aflatoxinas que posee una montmorillonita (un silicato de origen natural) y evaluar la efectividad y estabilidad del complejo aflatoxina-adsorbente en diferentes condiciones de pH, temperatura y medios de reacción.

Los resultados obtenidos demuestran que, administrado a una concentración del 1% (p/v), este adsorbente presenta una alta eficacia adsorptiva de aflatoxinas, con porcentajes promedios de adsorción superiores al 98%, en la mayoría de los casos. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta adsorción es probablemente una fisisorción.

Palabras clave

Aflatoxinas, Micotoxinas, Detoxificación, Adsorción, Montmorillonita

In vitro adsorption of aflatoxins by means of sorbent compounds: Montmorillonite

Summary

Aflatoxins are a group of mycotoxins that can be present as contaminants in a great number of food and feedstuffs. It has been demonstrated that non-nutritive adsorbent compounds are able not only to adsorb aflatoxins but also to prevent its gastrointestinal absorption.

The objective of this study is to evaluate the adsorptive capacity of a montmorillonite (a natural silicate) with regard to aflatoxins, and to evaluate the efficacy and stability of the aflatoxin-montmorillonite complex in several pH, temperature and reaction media.

Results have demonstrated that, at a concentration of 1% w/v, this adsorbant has a high efficacy in the sorption of aflatoxins, with mean sorption percentages higher than 98% in most of cases. Physisorption is probably the sorption mechanism of this process.

Key words

Aflatoxins, Mycotoxins, Detoxification, Adsorption, Montmorillonite

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos fúngicos tóxicos producidos por cepas micotoxigénicas de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare. Existen cuatro aflatoxinas cuya presencia en los alimentos es más frecuente, las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, siendo la aflatoxina B₁ la que posee una actividad tóxica más potente. La aflatoxina M₁ es uno de los principales productos de biotransformación de la aflatoxina B₁.

Los principales efectos biológicos de las aflatoxinas son la carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis e inmunosupresión [1]. Las aflatoxinas causan daños al hígado, producen una disminución de la producción de

leche y huevos, y afectan severamente al desarrollo y al estado inmunitario de los animales que las consumen con la dieta [2,3]. La presencia de las aflatoxinas B₁ y M₁ en órganos y tejidos animales destinados al consumo humano, así como en la leche o en los huevos, es un hecho que ha sido suficientemente descrito [4-6].

Se han descrito muchos métodos físicos, químicos y biológicos para eliminar las aflatoxinas de los alimentos [7-9], pero aún no existe un método que haya conseguido una detoxificación completa a gran escala de una forma práctica, económica y que no produzca subproductos peligrosos o variaciones no deseadas en la calidad organoléptica de los alimentos.

Una aproximación relativamente reciente al problema ha venido desde el campo de la lucha preventiva contra la aflatoxicosis. Se ha demostrado que la adición de materiales adsorbentes nutricionalmente inertes a los piensos ha ocasionado una reducción de la absorción gastrointestinal de estos metabolitos fúngicos. Diversos estudios *in vitro* han señalado que diferentes compuestos con capacidad adsorbente son capaces de formar complejos alta-

Dirección para correspondencia:

Dr. Antonio Javier Ramos Girona
Dpt. Tecnología d'Aliments, Universitat de Lleida, Alcalde Rovira Roure, 177, 25198 Lleida, SPAIN.
Tel.:(+34 73) 702 500, Fax.: (+34 73) 238 264
E-mail: ajramos@tecal.udl.es

Aceptado para publicación el 29 de marzo de 1996

mente estables con diversas micotoxinas, como las aflatoxinas [10-12] y la ocratoxina A [13], mientras que la incorporación a la dieta de zeolita, bentonita, caolín, y un aluminosilicato hidratado de sodio y calcio (HSCAS) han demostrado ser capaces de reducir los efectos tóxicos observados *in vivo* en diferentes animales de granja alimentados con dietas que presentaban aflatoxinas [11,12,14], zearalenona [15] o toxina T-2 [16,17].

La montmorillonita es un silicato con una estructura tridimensional laminar, que posee la capacidad de adsorber sustancias orgánicas, tanto en su superficie externa como entre sus espacios interlaminares, mediante la interacción con o la sustitución por sus cationes intercambiables [18]. Diversos autores han comprobado la eficacia que presenta este adsorbente en la adsorción de la aflatoxina B₁ [10].

El objetivo del presente estudio es determinar la capacidad de adsorción de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ que posee una montmorillonita comercial y la evaluación de la estabilidad del complejo aflatoxina-adsorbente mediante el estudio de la influencia que tiene el tiempo necesario para que alcance el equilibrio la reacción de adsorción, el pH y la temperatura. Igualmente se evalúa la estabilidad del complejo de adsorción en jugos fisiológicos simulados, así como la resistencia que presenta el complejo a ser roto mediante una serie de disolventes de polaridad diferente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. Los patrones de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ fueron suministrados por Sigma (USA), con una pureza superior al 99%. Se prepararon soluciones stock en metanol que contenían 5 mg de cada aflatoxina y cuya concentración real fue determinada mediante el método descrito por la AOAC [19].

La montmorillonita en polvo K-10 fue suministrada por Aldrich-Chemie (Alemania), con un área de superficie de 20-40 m²/g, una densidad de 800-850 g/l, un tamaño de partícula promedio inferior a 1µm, y una pérdida de peso tras secado a 110°C del 0,5-5,8%.

El agua usada en este trabajo fue primero desionizada mediante una resina de intercambio iónico y posteriormente fue destilada. Todos los disolventes, de calidad HPLC, fueron suministrados por Merck (Alemania).

Soluciones de trabajo de las experiencias de adsorción. A partir de las soluciones stock de aflatoxinas se prepararon las soluciones de trabajo siguientes para llevar a cabo las experiencias de adsorción:

a) Solución con 10 µg/ml de aflatoxina B₁, 1 µg/ml de aflatoxina B₂, 5 µg/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 µg/ml de aflatoxina G₂, en tampones a diferentes valores de pH (2, 4 y 7).

b) Jugo gástrico y jugo intestinal simulado, preparados según las especificaciones de la farmacopea de los Estados Unidos [20], y a los que se les adicionó aflatoxinas hasta obtener una concentración final en los jugos de 10 µg/ml de aflatoxina B₁, 1 µg/ml de aflatoxina B₂, 5 µg/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 µg/ml de aflatoxina G₂.

Experimentos de adsorción. Se añadió una alícuota de 30 ml de la solución de trabajo correspondiente a un tubo de centrifuga de 40 ml que contenía una cantidad determinada de montmorillonita. Los tubos fueron agitados en un baño termostático a la temperatura correspondiente a cada ensayo y a una velocidad de 70 rpm, durante el tiempo requerido para cada experiencia. Se preparó un tubo control sin adsorbente para investigar posibles unio-

nes no específicas de las aflatoxinas, así como para controlar una posible degradación de las aflatoxinas en el medio de reacción. Cada experimento fue realizado por triplicado, sometiendo los resultados a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el fin de detectar diferencias significativas entre ellos, mediante el programa informático Statgraphics 7.0 (Statistical Graphics Corporation, USA).

Los parámetros solución de trabajo empleada, concentración de adsorbente, tiempo de agitación, temperatura del ensayo y pH de la solución, para cada experiencia, fueron los siguientes:

a) *Estudio de la formación del complejo de adsorción en función del tiempo.* Solución de trabajo: medio tamponado con aflatoxinas a pH 7. Temperatura: 25 °C. Tiempo de agitación: 1, 5, 15, 30 min. y 1, 3, 6 y 24 h. Concentración de montmorillonita en el medio: 1% (p/v).

b) *Estudio de la concentración óptima de adsorbente en el medio.* Solución de trabajo: medio tamponado con aflatoxinas a pH 7. Temperatura: 25 °C. Tiempo de agitación: 1 h. Concentración de montmorillonita en el medio: 0,05, 0,1, 0,25, 1, 2,5 y 5 % (p/v).

c) *Estudio de la influencia del pH y la temperatura.* Solución de trabajo: medio tamponado con aflatoxinas a pH 2, 4 y 7. Temperaturas: 25 y 37°C. Tiempo de agitación: 1 h. Concentración de montmorillonita en el medio: 1% (p/v).

d) *Estudio de la formación del complejo de adsorción en jugos fisiológicos simulados.* Solución de trabajo: jugo gástrico (pH 1,2) o jugo intestinal (pH 7,5) simulado con aflatoxinas. Temperatura: 37 °C. Tiempo de agitación: 1 h. Concentración de montmorillonita en el medio: 0,05, 0,1, 0,25, 1, 2,5 y 5 % (p/v).

En todos los casos y tras el tiempo de agitación correspondiente para cada experiencia, la mezcla montmorillonita-solución de trabajo fue centrifugada durante 10 minutos a 3.500 rpm y 20 ml del sobrenadante se extrajeron con 30 ml de cloroformo. Cinco mililitros del extracto clorofórmico fueron purificados mediante un cartucho de extracción en fase sólida de sílice y analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa según el método desarrollado en nuestro laboratorio [21]. El porcentaje de aflatoxina unida al adsorbente fue calculado mediante la diferencia entre la cantidad inicial de aflatoxina en el medio de ensayo y la cantidad final en el sobrenadante.

e) *Estudio de la ruptura del complejo de adsorción mediante una serie de disolventes orgánicos de polaridad decreciente.* Para estudiar la ruptura del complejo de adsorción se procedió a extraer el sedimento obtenido tras la centrifugación, previamente evaporada el agua residual que contenía mediante una desecación en estufa a 50°C, con una serie de disolventes orgánicos de polaridad decreciente. Solución de trabajo: medio tamponado con aflatoxinas a pH 7. Temperatura: 25 °C. Concentración de montmorillonita en el medio: 1,0 % (p/v). Tiempo de agitación: 1 hora. Tiempo de agitación sedimento-disolvente: 1 h. Disolventes empleados: metanol, acetona, cloroformo, 2-propanol, diclorometano, tolueno, tetracloruro de carbono y hexano.

RESULTADOS

En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos tras el estudio de la formación del complejo de adsorción entre la montmorillonita y las cuatro aflatoxinas ensayadas, cuando la concentración de adsorbente en el medio ha variado desde el 0,05 al 5% (p/v). Como se puede obser-

Tabla 1. Porcentaje medio de adsorción de aflatoxinas (\pm DE, media de tres determinaciones) con montmorillonita, en un medio tamponado a pH 7,0 y a 25 °C, tras una hora de agitación. Concentración inicial de aflatoxinas: 10 μ g/ml de aflatoxina B₁, 1 μ g/ml de aflatoxina B₂, 5 μ g/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 μ g/ml de aflatoxina G₂.

Concentración de montmorillonita % (p/v)	Porcentaje medio de adsorción (\pm DE)			
	Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂
0,05	78,35 (1,28) ^a	38,67 (1,17) ^a	67,03 (1,16) ^a	29,84 (0,89) ^a
0,10	93,26 (1,78) ^b	76,32 (2,00) ^b	82,48 (1,72) ^b	57,74 (1,16) ^b
0,25	98,07 (2,15) ^c	94,43 (1,78) ^c	95,91 (2,24) ^c	85,30 (1,17) ^c
0,50	98,95 (2,12) ^{cd}	99,43 (1,15) ^{cd}	96,16 (2,47) ^c	94,40 (1,07) ^c
1,00	99,38 (3,20) ^d	99,27 (1,77) ^d	98,06 (3,00) ^d	98,15 (1,70) ^{de}
2,50	99,47 (4,71) ^d	99,52 (0,99) ^d	98,91 (2,00) ^d	99,14 (0,93) ^e
5,00	99,78 (1,28) ^d	99,56 (1,71) ^d	98,24 (3,03) ^d	98,99 (1,56) ^e

DE: Desviación estándar

a,b,c,d,e Resultados con distinto superíndice en la misma columna, difieren entre sí significativamente (p<0,05)

var, a la concentración de adsorbente más pequeña ensayada se obtiene ya un porcentaje promedio de adsorción elevado, que se sitúa en torno al 78% para el caso de la aflatoxina B₁, alcanzándose porcentajes superiores al 98% para las cuatro aflatoxinas al emplear la concentración del 1%, porcentajes que por otra parte no mejoran significativamente aunque la concentración de adsorbente empleado aumente hasta niveles del 2,5 ó 5% (p/v). Por ello, en las siguientes experiencias y salvo que se indique lo contrario se empleó una concentración de adsorbente en el medio del 1% (p/v), puesto que un incremento en la concentración de adsorbente empleado no ofrecería ninguna ventaja en cuanto a la adsorción total alcanzada, mientras que sí supondría un mayor coste económico en un proceso de detoxificación y un mayor consumo de un producto no nutritivo por parte de los animales, en el caso de estar pensando en adicionar este adsorbente a la composición inicial de un pienso.

La velocidad a la que se forma el complejo de adsorción, empleando una concentración de montmorillonita del 1% (p/v), se muestra en la tabla 2. Durante el primer minuto de contacto entre el adsorbente y la solución con aflatoxinas se forma gran parte del complejo de adsorción, observándose cómo a partir de la primera hora los porcentajes se estabilizan entre el 98-99%, con diferencias no significativas a partir de este momento, por lo que se puede considerar que tras una agitación de una hora ya se ha alcanzado el equilibrio de reacción.

Tabla 2. Porcentaje medio de adsorción de aflatoxinas (\pm DE, media de tres determinaciones) con montmorillonita al 1% (p/v) en un medio tamponado a pH 7,0 y a 25 °C, en función del tiempo de contacto entre las aflatoxinas y la montmorillonita. Concentración inicial de aflatoxinas: 10 μ g/ml de aflatoxina B₁, 1 μ g/ml de aflatoxina B₂, 5 μ g/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 μ g/ml de aflatoxina G₂.

Tiempo	Porcentaje medio de adsorción (\pm DE)			
	Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂
1 min	97,92 (1,24) ^a	89,99 (1,23) ^a	87,79 (1,23) ^a	52,29 (1,31) ^a
5 min	98,24 (1,07) ^a	92,39 (1,95) ^a	95,26 (1,72) ^b	58,58 (1,21) ^a
15 min	98,97 (1,01) ^a	93,36 (1,38) ^a	93,46 (2,14) ^{ab}	82,71 (1,79) ^b
30 min	99,48 (1,17) ^a	95,92 (0,82) ^{ab}	96,49 (2,77) ^b	94,81 (2,11) ^c
1 hora	99,38 (2,16) ^a	99,27 (2,99) ^b	98,06 (3,73) ^b	98,15 (2,17) ^c
3 horas	99,29 (1,31) ^a	99,47 (1,49) ^b	97,91 (3,12) ^b	98,17 (2,09) ^c
6 horas	99,58 (1,48) ^a	99,52 (0,89) ^b	98,27 (3,74) ^b	98,22 (3,10) ^c
24 horas	99,28 (1,23) ^a	99,57 (4,10) ^b	98,21 (2,10) ^b	98,37 (2,17) ^c

DE: Desviación estándar

a,b,c Resultados con distinto superíndice, en la misma columna, difieren entre sí significativamente (p<0,05)

La tabla 3 muestra el efecto producido por tres valores de pH (2, 4 y 7) y dos temperaturas (25 y 37°C) sobre la formación del complejo de adsorción, añadiendo un 1% (p/v) de montmorillonita y tras una agitación de una hora. Como puede apreciarse, en todos los casos el porcentaje de adsorción ha sido superior al 90%, con valores cercanos al 97-99% en la mayoría de las ocasiones, observándose únicamente valores ligeramente superiores a 25°C, respecto de los obtenidos a 37°C.

Las experiencias llevadas a cabo utilizando jugos fisiológicos simulados como medio de reacción se recogen en la tabla 4 (jugo gástrico) y tabla 5 (jugo intestinal). A pesar de que en ambos casos los resultados obtenidos para concentraciones de montmorillonita en el medio inferiores al 1% son menores que los obtenidos análogamente cuando se llevaron a cabo las reacciones en soluciones tampón, a partir del 1% (p/v) se obtienen valores promedios de adsorción superiores al 95%, que no mejoran significativamente aunque se incremente la cantidad de adsorbente añadido.

La tabla 6 recoge los resultados obtenidos tras el proceso de ruptura del complejo aflatoxinas-montmorillonita mediante su extracción con una serie de disolventes orgánicos de polaridad decreciente. Si bien con los dos disolventes más polares, el metanol y la acetona, se obtienen porcentajes de ruptura del complejo que pueden llegar hasta el 79%, en el caso de la aflatoxina G₁ extraída con metanol, cuando la extracción se ha realizado con disolventes con polaridad igual o inferior a la del cloroformo el porcentaje de ruptura del complejo de adsorción se reduce de una forma drástica, con valores en la mayoría de los casos por debajo del 1%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran cómo la montmorillonita ensayada puede considerarse un compuesto capaz de adsorber aflatoxinas con una alta afinidad. Los porcentajes de adsorción obtenidos a concentraciones del 1 al 5% (p/v) (Tabla 1), que superan en todos los casos el 98%, muestran valores muy similares a los obtenidos por otros autores que emplearon montmorillonitas de diversas procedencias, o bentonitas (compuestos estructuralmente muy relacionados con las montmorillonitas), cuando se pretendía adsorber aflatoxina B₁ a partir de una solución acuosa tamponada (pH 6,5) [10]. Estos elevados porcentajes de adsorción, obtenidos a concentraciones tan reducidas como del 1% (p/v), nos indican la alta capacidad adsorptiva que posee este silicato natural y la posibilidad de que tras su adición a alimentos contaminados con afla-

Tabla 3. Porcentaje medio de adsorción de aflatoxinas (\pm DE, media de tres determinaciones) con montmorillonita al 1% (p/v) en un medio tamponado a diferentes valores de pH y temperatura, tras una hora de agitación. Concentración inicial de aflatoxinas: 10 μ g/ml de aflatoxina B₁, 1 μ g/ml de aflatoxina B₂, 5 μ g/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 μ g/ml de aflatoxina G₂.

pH	Porcentajes de adsorción (\pm DE)							
	Aflatoxina B ₁		Aflatoxina B ₂		Aflatoxina G ₁		Aflatoxina G ₂	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
2	99,87 (1,33) ^a	96,38 (0,15) ^b	99,58 (1,00) ^a	98,82 (2,03) ^a	99,83 (1,04) ^a	91,54 (2,14) ^b	99,10 (2,15) ^a	96,72 (1,25) ^b
4	98,41 (1,29) ^a	96,92 (1,22) ^b	99,26 (2,15) ^a	99,24 (1,22) ^a	97,74 (1,60) ^a	95,59 (2,22) ^b	98,97 (1,11) ^a	96,03 (2,18) ^b
7	99,38 (2,15) ^a	97,31 (0,98) ^b	99,27 (2,99) ^a	99,08 (2,99) ^a	98,06 (1,73) ^a	94,94 (1,24) ^b	98,15 (2,17) ^a	97,13 (3,00) ^b

DE: Desviación estándar

a,b,c Resultados con distinto superíndice, para la misma aflatoxina, difieren entre sí significativamente (p<0,05)

Tabla 4. Porcentaje medio de adsorción de aflatoxinas (\pm DE, media de tres determinaciones) con montmorillonita, en jugo gástrico simulado (pH 1,2) a 37 °C, tras una hora de agitación. Concentración inicial de aflatoxinas: 10 μ g/ml de aflatoxina B₁, 1 μ g/ml de aflatoxina B₂, 5 μ g/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 μ g/ml de aflatoxina G₂.

Concentración de montmorillonita % (p/v)	Porcentaje medio de adsorción (\pm DE)			
	Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂
0,05	16,97 (0,98) ^a	34,83 (1,35) ^a	19,19 (1,34) ^a	23,82 (1,32) ^a
0,10	32,75 (1,34) ^b	47,97 (2,22) ^b	22,78 (1,57) ^a	32,26 (1,40) ^b
0,25	63,65 (2,22) ^c	73,81 (2,10) ^c	44,25 (0,98) ^b	63,51 (1,00) ^c
0,50	85,21 (1,69) ^d	92,23 (1,01) ^d	73,85 (1,28) ^c	85,71 (0,97) ^d
1,00	98,71 (2,23) ^e	98,96 (1,00) ^e	96,27 (0,76) ^d	96,72 (1,31) ^e
2,50	99,98 (1,15) ^e	99,41 (0,78) ^e	99,97 (0,99) ^e	99,89 (0,66) ^f
5,00	99,99 (2,00) ^e	99,99 (1,00) ^e	99,99 (1,04) ^e	99,98 (0,98) ^f

DE: Desviación estándar

a,b,c,d,e,f Resultados con distinto superíndice, en la misma columna, difieren entre sí significativamente (p<0,05)

Tabla 5. Porcentaje medio de adsorción de aflatoxinas (\pm DE, media de tres determinaciones) con montmorillonita en jugo intestinal simulado (pH 7,5) a 37°C, tras una hora de agitación. Concentración inicial de aflatoxinas: 10 μ g/ml de aflatoxina B₁, 1 μ g/ml de aflatoxina B₂, 5 μ g/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 μ g/ml de aflatoxina G₂.

Concentración de montmorillonita % (p/v)	Porcentaje medio de adsorción (\pm DE)			
	Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂
0,05	72,22 (1,28) ^a	25,16 (1,98) ^a	64,31 (1,29) ^a	25,16 (2,33) ^a
0,10	92,16 (0,98) ^b	72,66 (1,17) ^b	80,09 (1,62) ^b	55,62 (0,73) ^b
0,25	97,13 (0,72) ^c	90,27 (2,14) ^c	93,25 (2,99) ^c	83,71 (1,25) ^c
0,50	97,66 (0,88) ^{cd}	97,67 (2,94) ^d	95,27 (1,89) ^c	92,17 (2,17) ^d
1,00	98,17 (1,09) ^d	98,88 (1,22) ^{de}	94,63 (2,37) ^{cd}	97,12 (2,18) ^{de}
2,50	98,44 (1,14) ^d	99,01 (3,04) ^e	97,73 (2,58) ^d	98,19 (1,33) ^e
5,00	99,00 (0,98) ^d	99,11 (2,98) ^e	98,11 (1,36) ^d	98,22 (2,00) ^e

DE: Desviación estándar

a,b,c,d,e Resultados con distinto superíndice, en la misma columna, difieren entre sí significativamente (p<0,05)

Tabla 6. Porcentaje medio de ruptura del complejo aflatoxinas-montmorillonita con una serie de disolventes de polaridad decreciente (\pm DE, media de tres determinaciones) tras una hora de agitación a 25 °C. Concentración inicial de aflatoxinas: 10 μ g/ml de aflatoxina B₁, 1 μ g/ml de aflatoxina B₂, 5 μ g/ml de aflatoxina G₁ y 0,5 μ g/ml de aflatoxina G₂.

Disolvente	Polaridad*	Porcentaje medio de ruptura del complejo de adsorción (\pm DE)			
		Aflatoxina B ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina G ₂
Metanol	6,6	35,36 (1,37) ^a	29,58 (1,70) ^a	79,36 (2,03) ^a	36,22 (1,58) ^a
Acetona	5,4	29,35 (0,17) ^b	43,86 (0,38) ^b	55,33 (1,73) ^b	59,13 (1,04) ^b
Cloroformo	4,3	1,02 (0,02) ^c	1,07 (0,04) ^c	1,13 (0,05) ^c	0,77 (0,01) ^c
2-propanol	4,3	0,17 (0,01) ^d	0,45 (0,04) ^d	0,29 (0,01) ^d	0,59 (0,02) ^d
Diclorometano	3,4	0,13 (0,01) ^d	2,22 (0,03) ^e	0,20 (0,003) ^d	3,02 (0,04) ^e
Tolueno	2,3	0,07 (0,004) ^e	0,55 (0,01) ^d	0,10 (0,007) ^e	0,28 (0,02) ^f
Tetracloruro de carbono	1,7	0,06 (0,002) ^e	0,19 (0,02) ^f	0,09 (0,003) ^e	0,10 (0,003) ^g
Hexano	0,0	0,03 (0,002) ^e	0,18 (0,01) ^f	0,07 (0,004) ^f	0,04 (0,005) ^g

DE: Desviación estándar

a,b,c,d,e,f,g Resultados con distinto superíndice, en la misma columna, difieren entre sí significativamente (p<0,05)

* Según Godfrey, N.B. Solvent selection via miscibility number. Chemtech 1972, 359-363

toxinas, especialmente si son líquidos, este adsorbente sea capaz de detoxificar el alimento contaminado. Por otra parte, su adición a la composición inicial de los piensos, formulado de tal manera que finalmente se alcanzara un porcentaje de presencia del adsorbente en el tracto gastrointestinal del 1% (p/v) con respecto al volumen de los jugos fisiológicos generados durante la digestión y posterior absorción del alimento, podría suponer la prevención de la absorción de estas toxinas fúngicas mediante la adsorción de las mismas por este adsorbente, hecho que ya ha sido constatado para otros adsorbentes [22-26].

La formación del complejo de adsorción entre las aflatoxinas y la montmorillonita es un proceso que ocurre de una forma casi inmediata y permanente en el tiempo (tabla 2). Estos resultados coinciden con los observados para el caso de la adsorción de la aflatoxina B₁ con otro silicato, el HSCAS (aluminosilicato hidratado de sodio y calcio), para el cual se ha demostrado que la reacción de formación del complejo alcanza el equilibrio en 30 minutos [27]. Este hecho es de gran importancia si se tiene en cuenta que la absorción intestinal de las aflatoxinas ocurre de una forma muy rápida [21,28]. Es pues necesario que cuando las aflatoxinas lleguen al intestino el complejo montmorillonita-micotoxinas ya esté formado, a fin de que éste evite la absorción intestinal de estos metabolitos fúngicos.

La adsorción de aflatoxinas mediante montmorillonita ha demostrado ser un proceso que no depende decisivamente del pH ni de la temperatura ensayados (Tabla 3). La estabilidad frente al pH del complejo de adsorción es muy importante si se tiene en cuenta el gran intervalo de valores de pH que se encuentra en el tracto intestinal de los animales, con valores que varían desde el extremadamente ácido del estómago (con pH próximo a 1), hasta los valores marcadamente básicos alcanzados en las porciones terminales del intestino grueso. El que el complejo montmorillonita-aflatoxinas sea capaz de resistir estos cambios de pH sin destruirse ni liberar la toxina al medio será decisivo para evitar la absorción intestinal de estas micotoxinas, coincidiendo con lo observado para el caso del carbón activo, considerado como el adsorbente universal para un gran número de compuestos, cuya eficacia tampoco se ve afectada por los cambios de pH ocurridos en el tracto gastrointestinal [29]. También se ensayó la adsorción a pH 10, pero a este pH se produjo una degradación alcalina de las aflatoxinas, hecho que fue constatado por un descenso brusco de la concentración de las aflatoxinas en los controles. No obstante, valores tan elevados de pH solo se presentan en el intestino grueso, donde no se da absorción de micotoxinas sino principalmente reabsorción de agua y minerales.

Respecto a la temperatura, las pequeñas diferencias en los porcentajes de adsorción observadas a 25 y 37°C (Tabla 3) pueden deberse a que la adsorción es generalmente un proceso exotérmico, el cual, si se tiene en cuenta el principio de Le Châtelier, se verá afectado negativamente por un aumento de la temperatura del medio en el que se lleva a cabo la reacción, coincidiendo con lo observado por diversos autores [30,31]. La estabilidad del complejo de adsorción formado por la montmorillonita y las aflatoxinas frente al pH y la temperatura ensayados coincide con lo descrito para el caso del HSCAS, silicato que ha demostrado ser capaz de formar también complejos estables en solución acuosa a diferentes valores de pH, y a las temperaturas de 25 y 37°C [11,27].

El hecho de que, para una concentración del 1% (p/v), la formación del complejo de adsorción se mantenga generalmente por encima del 95%, tanto en el caso del jugo gástrico como en el del jugo intestinal simulado

(Tablas 4 y 5), significa que de suceder lo mismo *in vivo* prácticamente toda la aflatoxina ingerida podría atravesar todo el tracto gastrointestinal en la forma no absorbible montmorillonita-aflatoxina. Además, la utilización de montmorillonita *in vivo* puede favorecer una reducción del tiempo de tránsito del alimento a través del tracto gastrointestinal, tal y como se ha visto que ocurre con un compuesto tan estructuralmente relacionado con la montmorillonita como es la bentonita [22], con la cual el tiempo de tránsito intestinal en ratas se ve reducido de 10 a 7 h. Este hecho, junto con la unión de la toxina al adsorbente a lo largo de todo el tracto intestinal, puede terminar favoreciendo el efecto preventivo de este compuesto al promover la eliminación fecal de las toxinas. Además, la montmorillonita, suministrada de una forma preventiva en la composición inicial de los piensos puede romper el ciclo enterohepático de absorción-excreción que se ha demostrado existe para el caso de las aflatoxinas B₁ y B₂ [32], acelerando así la tasa de eliminación de estas toxinas por vía fecal.

Los fenómenos de adsorción se llevan a cabo en virtud de diversas fuerzas atractivas de naturaleza diferente, siendo éstas en ocasiones de índole física (fuerzas de Van der Waals, interacciones polares, etc.), y en otros casos de índole química (formación de enlaces covalentes), hablándose así de fisisorción o quimisorción respectivamente, pudiendo coexistir a veces los dos mecanismos. El hecho de que con los disolventes más polares se haya recuperado un porcentaje más elevado de las aflatoxinas adsorbidas a la montmorillonita (Tabla 6), parece indicar que en nuestro caso la unión es una fisisorción, probablemente debida a la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la superficie más externa de la montmorillonita.

Por otra parte, no hay que descartar tampoco la existencia de un fenómeno de adsorción física debida al hecho de que las aflatoxinas queden atrapadas dentro de la estructura tridimensional del silicato, como moléculas polares asociadas a los cationes situados entre las capas de los espacios interlaminares del adsorbente, lo que podría explicar el hecho de que un porcentaje importante de las aflatoxinas adsorbidas no puedan ser extraídas con los disolventes ensayados más polares. Estos resultados coinciden con lo observado en otros casos, como en la adsorción del herbicida hidrazida maleica con diversos tipos de montmorillonita [33].

El predominio de la fisisorción trae consigo la posibilidad de la reversibilidad de la reacción de formación del complejo de adsorción. En este caso, nuestros resultados difieren notablemente de lo descrito por otros autores cuando el compuesto empleado para la adsorción de la aflatoxina B₁ ha sido el silicato HSCAS, ya que tras una extracción de la aflatoxina adsorbida con una batería de disolventes orgánicos de polaridad decreciente únicamente se pudo romper un 10% del complejo de adsorción formado, indicando en este caso la existencia probable de una quimisorción como mecanismo principal de adsorción [11].

La utilización de la montmorillonita como adsorbente a añadir a la composición inicial de los piensos para prevenir la absorción intestinal de las aflatoxinas es una atractiva hipótesis que hay que tener en consideración dentro de la lucha contra las micotoxicosis. Esta forma de actuación preventiva ya se ha probado *in vivo* con algunos adsorbentes obteniendo resultados beneficiosos en la mayoría de los casos [22-26].

Sería necesario realizar extensos estudios *in vivo* sobre la inocuidad de la montmorillonita al ser suministrada de forma continua a los animales, tal y como se han

realizado con otros adsorbentes [34-37], sobre todo en lo que se refiere a las posibles interferencias con la absorción de algunos minerales y nutrientes esenciales, y a la no aparición de efectos no deseados a largo plazo. Así, se ha comprobado que la adición de HSCAS a la dieta de pollos puede ocasionar un aumento del fósforo y una disminución del cloro presentes en la sangre [37], aunque se ha demostrado que la presencia de este adsorbente en el pienso no altera la utilización del fósforo suministrado con la dieta [34]. Se ha llegado incluso a sugerir la necesidad de suplementar con Mg, Mn y Zn la dieta de animales que ingieren HSCAS con el pienso de una forma continuada [36]. En el caso de la zeolita, otro silicato de origen natural que se ha estudiado como posible adsorbente de aflatoxinas, se ha comprobado que su adición a la dieta de pollos, a una concentración del 5%, puede originar daños a nivel histopatológico [35].

Si bien la montmorillonita ha demostrado en el presente estudio poseer una prometedora capacidad para la adsorción de aflatoxinas *in vitro*, no hay que perder de vista la posible reversibilidad del proceso, por lo que se debe proseguir con la búsqueda de otros compuestos

adsorbentes estructuralmente relacionados cuyo mecanismo de adsorción sea preferentemente una quimisorción con formación de enlaces covalentes. La utilización de montmorillonitas cuya procedencia sea diferente a la ensayada por nosotros, es algo que debe de ser cuidadosamente vigilado, dada la diferente capacidad adsorbente que pueden presentar montmorillonitas que procedan de distintos yacimientos naturales, ya que sus cationes intercambiables pueden variar no sólo en cuanto a su tipo sino también en cuanto a su proporción [33]. De hecho, las montmorillonitas de origen natural difieren unas de otras en gran medida gracias al tipo de cationes intercambiables que forman parte de su composición, encontrándose de forma natural montmorillonitas ricas en diferentes cationes tales como Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, lo que influye decisivamente en una mayor o menor capacidad adsorptiva [38].

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto CICYT ALI 94-0417-CO3.

Bibliografía

1. Betina V. Mycotoxins. En: Betina V. Chemical, biological and environmental aspects. Amsterdam, Elsevier, 1989.
2. Jones FT, Hagler WM, Hamilton PB. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. Poultry Sci 1982; 61: 861-868.
3. Robens JF, Richard JL. Aflatoxins in animal and human health. Rev Environ Contam Toxicol 1992; 127: 69-94.
4. Patterson DSP. Aflatoxin in animal feedstuffs and its 'carry-over' into food products. En: Pepin GA, Patterson DSP, Shreeve BJ (Eds). Proceedings of the third meeting on mycotoxins in animal disease. National College of Food Technology, Weybridge, 1978: 71-72.
5. Patterson DSP, Glancy EM, Roberts BA. The 'carry over' of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. Food Cosmet Toxicol 1980; 18: 35-37.
6. Munksgaard L, Larsen J, Werner H, *et al*. Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. Milchwissenschaft 1987; 42: 165-167.
7. Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, *et al*. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. J Food Prot 1982; 45: 964-971.
8. Samarajeewa V, Sen AC, Cohen MD, *et al*. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. J Food Prot 1990; 53: 489-501.
9. Ramos AJ, Hernández E. Reducción de los niveles de aflatoxinas y otras micotoxinas en alimentos mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Alimentaria 1991; 225: 45-55.
10. Masimango N, Remacle J, Ramaut JL. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B₁ from contaminated media. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 1978; 6: 101-105.
11. Phillips TD, Harvey RB, Kubena LF, *et al*. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. Poultry Sci 1988; 67: 243-247.
12. Maryamma KI, Rajan A, Gangadharan B, *et al*. *In vitro* and *in vivo* studies on aflatoxin B₁ neutralization. Indian J Anim Sci 1991; 61: 58-60.
13. Rotter RG, Frohlich AA, Marquardt RR. Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in Leghorn chicks. Can J Vet Res 1989; 53: 449-453.
14. Huff WE, Kubena LF, Harvey RB *et al*. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. Poultry Sci 1992; 71: 64-69.
15. Smith TK. Influence of dietary fiber, protein and zeolite on zearalenone toxicosis in rats and swine. J Anim Sci 1980; 50: 278-285.
16. Carson MS. The effect of dietary fiber and non-nutritive mineral additives on T-2 toxicosis in rats. MSc Thesis, Department of Nutrition, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 1982.
17. Smith TK. Spent canola oil bleaching clays: potential for treatment of T-2 toxicosis in rats and short-term inclusion in diets for immature swine. Can J Physiol Pharmacol 1984; 64: 725-732.
18. Rodríguez JM, López AJ, Bruque S. Adsorption of phenamins by homoionic montmorillonites. Agrochimica 1989; 33: 312-321.
19. Association of Official Analytical Chemists. Book of Methods. Arlington, Virginia, AOAC, 1990: 976,22 Sec.
20. The United States Pharmacopeia (USP XXII). The National Formulary (NF XVII). Rockville, MD, The United States Pharmacopeia Convention, 1990; 1007-1008, 1760, 1788-1789.
21. Ramos AJ. Prevención de los efectos cancerígenos de las aflatoxinas y la zearalenona mediante el empleo de compuestos adsorbentes no nutritivos. Estudios *in vitro*. Tesis Doctoral, Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, España, 1994.
22. Carson MS, Smith TK. Role of bentonite in prevention of T-2 toxicosis in rats. J Anim Sci 1983; 57: 1498-1506.
23. Bonna RJ, Aulerich RJ, Bursian SJ, *et al*. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate and activated charcoal in reducing the toxicity of dietary aflatoxin to mink. Arch Environ Contam Toxicol 1991; 20: 441-447.
24. Harvey RB, Kubena LF, Phillips TD, *et al*. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. Am J Vet Res 1991; 52: 152-156.
25. Harvey RB, Phillips TD, Ellis JA *et al*. Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. Am J Vet Res 1991; 52: 1556-1559.
26. Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, *et al*. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. Avian Dis 1993; 37: 67-73.
27. Phillips TD, Clement BA, Kubena LF, *et al*. Detection and detoxification of aflatoxins: prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. Vet Hum Toxicol 1990; 32(Suppl): 15-19.
28. Thompson MC, Dutton MF, Bye SN, *et al*. An investigation into the passage of selected natural toxins across the digestive tract wall using everted sac technique. J Natural Toxins 1992; 1: 9-16.
29. Oikkola KT, Neuvonen PJ. Effect of gastric pH on antidotal efficacy of activated charcoal in man. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1984; 22: 565-569.
30. Bañares MA, Del Arco M. Estudio de la interacción de sepiolita de Vallecas con DDT. II. Parámetros para la adsorción de DDT sobre sepiolita. Agrochimica 1989; 33: 267-274.
31. Bosetto M, Arfaio P, Fusi P. Adsorption and desorption of Linuron by activated charcoal. Bull Environ Contam Toxicol 1991; 46: 37-44.
32. Shanta T, Sreenivasamurthy V. Photo-destruction of aflatoxin in groundnut oil. Indian J Technol 1977; 15: 453-454.
33. Hermosin MC, Roldán I, Cornejo J. Adsorption-desorption of maleic hydrazide on mineral soil components. J Environ Sci Health 1991; 26: 165-183.
34. Scheideler SE. Effect of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on toxicity, chick performance and mineral status. Poultry Sci 1993; 72: 292-288.
35. Chung TK, Baker DH. Phosphorus utilization in chicks fed hydrated sodium calcium aluminosilicate. J Anim Sci 1990; 68: 1992-1998.
36. Chestnut AB, Anderson PD, Cochran MA, *et al*. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on fescue toxicosis and mineral absorption. J Anim Sci 1992; 70: 2836-2846.
37. Sova Z, Pohunková H, Reisnerová H, *et al*. Hematological and histological response to the diet containing aflatoxin B₁ and zeolita in broilers of domestic fowl. Acta Vet Brno 1991; 60: 31-40.
38. Dale J, Kowalska M, Cocke DL. Interactions of montmorillonite with organic compounds adsorptive and catalytic properties. Chemosphere 1991; 22: 769-798.