

VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ALGUNOS ADSORBENTES DE MICOTOXINAS DE SECUESTRAR VITAMINAS HIDROSOLUBLES Y LIPOSOLUBLES

Kihal, A., Rodríguez-Prado, M. y Calsamiglia, S.

Servei de Nutrició i Benestar Animal; Facultat de Veterinària.

Universitat Autònoma de Barcelona, 08913 Bellaterra, Barcelona, España.

Email: Sergio.calsamiglia@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los piensos con micotoxinas representa un problema global para la industria de producción animal. El método más utilizado para proteger a los animales, frente a micotoxinas, es la utilización de adsorbentes. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los adsorbentes de micotoxinas tienen la capacidad de secuestrar algunas vitaminas y minerales (Ghanshyam *et al.*, 2009; Barrientos-Velázquez *et al.*, 2016). El objetivo de este estudio fue valorar la capacidad de 6 tipos distintos de adsorbentes de micotoxinas de secuestrar ciertas vitaminas liposolubles (D y E) e hidrosolubles (B2, B3 y B6) en un sistema *in vitro* que simula las condiciones del tracto gastrointestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento *in vitro* se realizó mediante una adaptación de la técnica descrita por Lemke *et al.* (2001) y Gallo & Masoero (2010). Las incubaciones se realizaron en tubos de 100 ml, por triplicado y en dos periodos consecutivos. Las incubaciones se realizaron por grupos de vitaminas: hidrosolubles y liposolubles. Para cada grupo de vitaminas se realizaron dos estudios. El diseño experimental del estudio 1, para las vitaminas hidrosolubles, fue un factorial 6x3, con 6 tipos de adsorbentes y tres vitaminas (B2, B3 y B6). Para el caso de las vitaminas liposolubles, el arreglo factorial fue un 6x2, con los mismos adsorbentes y dos vitaminas (D y E). En este primer estudio, las vitaminas se incubaron por separado. Se preparó un medio de incubación que simula la digestión gástrica con 1,25 g/l de pepsina (Sigma 77160, Sigma, St. Louis, MO), 0,5 g/l de ácido málico, 42 µl/l de ácido láctico, 0,5 g/l de ácido cítrico y 50 µl/l de ácido acético, y se ajustó a pH 3. La dosis de los adsorbentes de micotoxinas se calculó según su uso en condiciones de campo (2 kg/tonelada), y las dosis de vitaminas se calcularon en base a las recomendaciones para especies monogástricas, según lo especifica Barroeta *et al.* (2012). Se pesaron en cada tubo 100 mg de cada adsorbente (bentonita, clinoptiolita, sepiolita, montmorillonita, carbón activo y paredes celulares de levaduras (LEV)). Las dosis de vitaminas hidrosolubles fueron: 0,50 mg de B2, 4,0 mg de B3 y 0,25 mg de B6; y para las vitaminas liposolubles fueron: 0,0075 mg de D y 7,45 mg de E. Se añadieron 50 ml por tubo del medio de incubación que simula las condiciones gástricas del animal. Los tubos se incubaron en un baño María a 37°C durante 2 h y se agitaron con un vortex al inicio de la incubación y a intervalos de 1 h hasta el final de la incubación. Después de 2 h, el pH se neutralizó a 6,5 con 2 ml de bicarbonato sódico (8,8 g/100 ml) y 2 ml de un segundo medio para simular la digestión intestinal (3,5 g/100 ml de sales biliares y 1 g/100 ml de pancreatina (Sigma P7545, Sigma, St. Louis, MO)). La incubación continuó en las mismas condiciones durante 2 h más. Al final de la segunda incubación, se tomó sub-muestra que se centrifugó a 7000 x g durante 15 min a 5°C, y el sobrenadante resultante se congeló a -20°C hasta el análisis de la concentración de vitamina mediante cromatografía líquida (HPLC). El estudio 2 se realizó en las mismas condiciones de incubación, y las mismas dosis de los adsorbentes y vitaminas, pero cada adsorbente se incubó con el grupo de vitaminas liposolubles juntas y el grupo de las vitaminas hidrosolubles juntas. Los datos de adsorción de vitaminas fueron analizados por el procedimiento MIXED del SAS (v.9.4). El modelo utilizado incluyó como efectos fijos el estudio (1 y 2), los adsorbentes (6), las vitaminas en estudio y sus interacciones. El periodo experimental se consideró como efecto aleatorio. Los resultados se presentan como las medias ajustadas por mínimos cuadrados (LSMEANS) y su error estándar. Cuando la diferencia entre medias resultó significativa (P<0,05), la comparación de medias se hizo mediante el test de Tukey y se separaron mediante la opción SLICEBY del PROC PLM del SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos del estudio, adsorbentes, vitaminas y la interacción adsorbente x vitamina fueron significativos ($P < 0,05$). En el estudio 1 (incubaciones por separado) el índice de adsorción medio de las vitaminas hidrosolubles (B2, B3, B6) fue de 28%. La montmorillonita fue el adsorbente que mostró mayor capacidad de adsorción (45%) de este tipo de vitaminas, seguido por la bentonita (36%) y la sepiolita (27%), mientras el carbón activo fue el que mostró menor afinidad (17%, $P < 0,05$). Con respecto a las vitaminas liposolubles, la B6 fue adsorbida en mayor proporción (45%) comparado con la B2 (33%), mientras que la B3 fue la menos adsorbida (6%, $P < 0,05$). Para las vitaminas liposolubles, el índice de adsorción medio fue del 20%. La E tuvo una media de adsorción del 33% y la D del 7% ($P < 0,05$). Respecto a los adsorbentes, la montmorillonita (25%) y la bentonita (25%) tuvieron la mayor adsorción entre los 6 adsorbentes, mientras la sepiolita y el carbón activo tuvieron la menor adsorción (13%, $P < 0,05$). En la Tabla 1 se presentan los resultados del estudio 1, donde están indicados los valores medios del porcentaje de adsorción de cada vitamina según el adsorbente utilizado. El porcentaje de adsorción difirió entre vitaminas del grupo de las hidrosolubles, con diferencias significativa entre la B3 vs. B6 y B2 para la bentonita, la sepiolita y la montmorillonita; y entre las B6 vs. B3 y B2 para el carbón activo y las LEV, y entre la B2 vs. B3 vs. B6 en la clinoptilolita. La adsorción de la B3 fue similar entre adsorbentes, pero la adsorción de la B2 y la B6 fue mayor en la montmorillonita y menor en los otros adsorbentes. En el caso de las vitaminas liposolubles, el porcentaje de adsorción fue distinto ($P < 0,05$) entre la D y la E en la bentonita, la clinoptilolita y la montmorillonita. La adsorción de la D fue mayor en LEV y menor en la bentonita. Asimismo, la adsorción de la E fue mayor en la bentonita y la montmorillonita, y menor en la sepiolita y el carbón activo.

Tabla 1. Índice de adsorción de los 6 adsorbentes con las vitaminas hidrosolubles y liposolubles incubados por separado (Estudio 1).

Vitaminas	Adsorbentes					
	Bentonita	Clinoptilolita	Sepiolita	Montmorillonita	Carbón activo	LEV
Hidrosolubles						
B2	52,7 ^{w,b}	18,0 ^{x,d}	32,9 ^{w,c}	67,7 ^{w,a}	8,6 ^{x,d}	18,3 ^{x,d}
B3	8,0 ^x	4,3 ^y	6,1 ^x	4,7 ^x	6,2 ^x	5,6 ^x
B6	48,2 ^{w,b}	34,7 ^{w,b}	43,4 ^{w,b}	63,4 ^{w,a}	36,6 ^{w,b}	45,7 ^{w,b}
SEM	7,05	7,05	6,87	6,87	7,18	6,96
Liposoluble						
D	0 ^{x,c}	2,9 ^{x,bc}	8,6 ^b	3,9 ^{x,bc}	8,5 ^b	20,2 ^a
E	54,5 ^{w,a}	34,1 ^{w,b}	16,6 ^c	46,3 ^{w,a}	18,5 ^c	30,0 ^b
SEM	5,88	5,88	5,88	5,98	5,88	5,88

(x,w,y) Letras distintas en la misma columna indican diferencias ($P < 0,05$) entre vitaminas.

(a,b,c,d) Letras distintas en una misma fila indican diferencias ($P < 0,05$) entre adsorbentes.

(LEV) paredes celulares de levaduras.

El índice de adsorción medio en el estudio 2 (incubados juntos) fue en general mayor que en el estudio 1 para las vitaminas hidrosolubles (media 35%), siendo mayor en la B6 (66%) comparado con la B2 (35%) y la B3 (6%, $P < 0,05$). Dentro de los adsorbentes, la montmorillonita (48%) tuvo una adsorción mayor que la bentonita (38%) y la sepiolita (34%, $P < 0,05$), y el carbón activo tuvo la adsorción menor (18%, $P < 0,05$). El índice de adsorción medio de las vitaminas liposolubles fue inferior al estudio 1 (17%). La montmorillonita y la bentonita (29%) tuvieron mayor capacidad de adsorción que la sepiolita (8%), que fue la que tuvo la menor capacidad de adsorción. En la Tabla 2 se muestran los valores medios del porcentaje de adsorción de cada vitamina en cada adsorbente cuando se incubaron juntos. Las vitaminas hidrosolubles mostraron un patrón de adsorción diferente según el adsorbente utilizado. El índice de adsorción fue distinto ($P < 0,05$) en la B3 con la bentonita y la

montmorillonita; en la B6 con el carbón activo y las LEV; y entre las 3 vitaminas en la clinoptiolita y la sepiolita. La adsorción de la B3 fue similar entre adsorbentes, al igual que en el estudio 1. Sin embargo, la adsorción de la B2 fue mayor en la montmorillonita que en la sepiolita y la clinoptiolita, mientras el carbón activo y las LEV tuvieron la adsorción menor. La adsorción de la B6 fue mayor en la montmorillonita y menor en el carbón activo. El índice de adsorción de las vitaminas liposolubles fue distinto ($P < 0.05$) para la D y la E entre adsorbentes. La D se adsorbió sólo en presencia de montmorillonita, mientras la E se adsorbió más en presencia de bentonita y montmorillonita, y menos cuando se incubó con clinoptiolita y sepiolita.

Los resultados indican que los adsorbentes de micotoxinas probados tienen un grado de adsorción alto para la B2 y B6, lo que coincide con los resultados de Barrientos-Velázquez *et al.* (2016), pero no es el caso de la E. Según este mismo autor, los adsorbente de micotoxinas tienen menor afinidad por las vitaminas liposolubles. En general, la B3 y la D tuvieron un índice de adsorción muy bajo. Al contrario de lo observado con los aminoácidos estudios previos en nuestro laboratorio, el porcentaje de adsorción no difirió en gran medida cuando las vitaminas se incubaron juntas o por separado.

Tabla 2. índice de adsorción de los 6 adsorbentes con las vitaminas hidrosolubles y liposolubles incubados juntos (Estudio 2).

Vitaminas	Adsorbentes					
	Bentonita	Clinoptiolita	Sepiolita	Montmorillonita	Carbón activo	LEV
Hidrosolubles						
VB2	55,2 ^{w,ab}	35,3 ^{x,c}	51,0 ^{x,b}	65,8 ^{w,a}	0 ^{x,e}	9,3 ^{x,d}
VB3	0 ^x	0,9 ^y	8,3 ^y	7,0 ^x	4,3 ^{x,e}	4,2 ^x
VB6	62,2 ^{w,ab}	66,7 ^{w,ab}	67,1 ^{w,ab}	72,1 ^{w,a}	59,2 ^{w,b}	66,9 ^{w,ab}
SEM	4,8	4,9	4,8	4,7	4,6	4,6
Liposolubles						
VD	0 ^{x,ab}	0 ^{x,ab}	0 ^{x,ab}	7,4 ^{x,a}	0 ^{x,b}	0 ^{x,ab}
VE	61,8 ^{w,a}	38,3 ^{w,c}	15,4 ^{w,e}	50,7 ^{w,b}	28,5 ^{w,cd}	28,5 ^{w,cd}
SEM	3,54	3,54	3,54	3,54	3,54	3,69

(x,w,y) Letras distintas en la misma columna indican diferencias ($P < 0,05$) entre vitaminas.

(a,b,c,d,e) Letras distintas en una misma fila indican diferencias ($P < 0,05$) entre adsorbentes.

(LEV) paredes celulares de levaduras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barrientos-Velázquez *et al.*, 2016. App. Clay Sci. 120: 17-23
- Barroeta *et al.*, 2012. 5M Publishing, London, UK.
- Ghanshyam *et al.*, 2009. App. Clay Sci. 45: 248-253
- Lemke *et al.*, 2001. Anim. Feed Sci. Technol. 93: 17-29
- Gallo, A. & Masoero, F. 2010. Italian J. Anim. Sci. 9: 21.

ASSESSMENT OF THE CAPACITY OF CERTAIN MYCOTOXIN BINDERS TO ADSORB VITAMINS

ABSTRACT: The objective of the study was to evaluate the capacity of 6 mycotoxin binders to adsorb vitamins. The experiment was conducted in vitro to simulate digestion modes in 2 phases: gastric and intestinal digestion. The experiment used 2 groups of vitamins, liposoluble (VL) and hidrosoluble (VH) and divided in 2 studies (incubated separately and together). Results show that the adsorption average between study 1 and 2 was nearly the same (about 30%) with the highest adsorption for montmorillonite for VL and VH in both studies, and lowest for active charcoal. The B6 and D were adsorbed in a small proportion, and the B6 and E were highly adsorbed. Mycotoxin binders may affect bioavailability of some hydro- and lipo- soluble vitamins.

Keywords: mycotoxin binders, vitamins, adsorption.