

VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CIERTOS ADSORBENTES DE MICOTOXINAS DE SECUESTRAR AMINOÁCIDOS

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

Las micotoxinas son contaminantes importantes en alimentos para el consumo animal y un riesgo para la salud animal y humana. Los adsorbentes de micotoxinas se utilizan por su capacidad de secuestrar micotoxinas y limitar su absorción en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, algunos de estos adsorbentes también secuestran otros nutrientes en el tracto gastrointestinal, como vitaminas y minerales, reduciendo su biodisponibilidad (Vekiru *et al.*, 2007; Barrientos-Velázquez *et al.*, 2016). Sin embargo, existe poca información sobre la interacción de estos compuestos en la biodisponibilidad de aminoácidos (AA).

El objetivo de este estudio fue valorar la capacidad de 6 tipos distintos de adsorbentes de micotoxinas de secuestrar algunos AA esenciales (Lisina-Lys, Metionina-Met, Treonina-Thr y Triptófano-Trp) en un sistema *in vitro* de simulación del tracto gastrointestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento *in vitro* fue adaptado 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. El experimento se realizó en dos estudios. El diseño experimental del estudio 1 fue un factorial 6x4, con 6 tipos de adsorbentes y 4 AA 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 AA se calculó proporcionalmente a las recomendaciones de monogástricos según Barroeta *et al.* (2012). Se pesaron en cada tubo 100 mg de cada adsorbente (bentonita, clinoptilolita, sepiolita, montmorillonita, carbón activo y paredes celulares de levaduras); 100 mg de Lys, Met y Thr; y 50 mg de Trp, por separado. Se añadieron 50 ml por tubo del medio de incubación gástrico. 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 cada hora. 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, una submuestra se centrifugó a 7000 x g durante 15 min a 5°C, y el sobrenadante se congeló a -20°C hasta el análisis de AA mediante cromatografía líquida (HPLC). El segundo estudio se realizó en las mismas condiciones de incubación y las mismas dosis de los adsorbentes y AA, pero cada adsorbente se incubó con los 4 AA juntos.

Los datos de adsorción de AA fueron analizados por el procedimiento MIXED del SAS (v.9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). El modelo utilizado incluyó como efectos fijos el estudio (1 y 2), los adsorbentes (6), los AA 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, AA y la interacción adsorbente x AA fueron significativos ($P < 0,05$). El índice de adsorción medio de los AA en el estudio 1 (incubados por separado) fue elevado (media de 49%) y mayor en la clinoptilolita (57%) que en la

sepiolita (44%, $P < 0,05$). El Trp (63%) tuvo una adsorción mayor que la Lys (36%), siendo intermedio para la Met (47%) y la Thr (49%, $P < 0,05$).

La Tabla 1 muestra los valores medios del porcentaje de adsorción de cada AA en cada adsorbente para el estudio 1. El porcentaje de adsorción de los 6 adsorbentes fue distinto de un AA a otro con diferencias significativas entre el Trp vs. la Lys en la bentonita y la clinoptiolita; y entre el Trp vs. la Lys y la Thr en el carbón activo. La adsorción de la Lys y la Met fue similar entre adsorbentes, pero la Thr se adsorbió menos en el carbón activo y más en los otros adsorbentes, mientras que el Trp se adsorbió menos en la montmorillonita y más en la clinoptiolita y el carbón activo.

El índice de adsorción medio de los AA en el estudio 2 (incubados juntos) fue inferior al estudio 1 (media de 19%), siendo la sepiolita (14%) mayor que la clinoptiolita (5%) y menor que el carbón activo (24%, $P < 0,05$). La capacidad de adsorción de las paredes celulares de levaduras (32%) fue mayor que la del carbón activo (24%, $P < 0,05$). Asimismo, la Thr (22%) fue más adsorbida que la Met (16%), mientras que la Lys (21%) y el Trp (17%) presentaron valores intermedios ($P < 0,05$).

Tabla 1. Índice de adsorción de los 6 adsorbentes con los 4 aminoácidos incubados por separado (Estudio 1).

Adsorbentes	Aminoácido				SEM
	Lisina	Metionina	Treonina	Triptófano	
Bentonita	28,4 ^w	51,9 ^{wx}	53,6 ^{wx,b}	68,4 ^{x,ab}	6,02
Clinoptiolita	36,1 ^w	50,8 ^{wx}	62,4 ^{wx,b}	78,6 ^{x,b}	6,20
Sepiolita	31,2	41,4	48,1 ^{ab}	57,5 ^{ab}	5,57
Montmorillonita	47,0	40,1	53,1 ^b	40,3 ^a	6,02
Carbón activo	38,4 ^w	50,4 ^{wx}	20,0 ^{w,a}	77,4 ^{x,b}	6,20
Paredes celulares de levaduras	38,7	47,9	58,4 ^b	57,7 ^{ab}	5,87

(x,w) Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre aminoácidos.

(a,b) Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre adsorbentes.

La Tabla 2 muestra los valores medios del porcentaje de adsorción de cada AA en cada adsorbente cuando se incubaron juntos.

Tabla 2. Índice de adsorción de los 6 adsorbentes con los 4 aminoácidos incubados juntos (Estudio 2).

Adsorbentes	Aminoácido				SEM
	Lisina	Metionina	Treonina	Triptófano	
Bentonita	15,7	9,9 ^{ab}	17,1	2,8 ^b	4,11
Clinoptiolita	18,9 ^x	5,6 ^{x,a}	13,6 ^x	0,0 ^{w,a}	3,86
Sepiolita	14,6	11,8 ^{ab}	18,9	10,9 ^{bc}	3,20
Montmorillonita	28,8	24,9 ^b	29,2	32,5 ^{ed}	3,21
Carbón activo	24,5	20,0 ^{ab}	25,6	26,4 ^{dc}	3,36
Paredes celulares de levaduras	25,7 ^w	23,6 ^{w,ab}	29,8 ^w	49,2 ^{x,e}	3,28

(x,w) Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre aminoácidos.

(a,b,c,d,e) Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre adsorbentes.

El índice de adsorción de los 6 adsorbentes fue distinto de un AA a otro con diferencias significativas para el Trp con la clinoptilolita y las paredes celulares de levaduras. La adsorción de la Lys y la Thr fue similar entre adsorbentes, pero el Trp se adsorbió menos en la clinoptilolita, bentonita y sepiolita, y más en las paredes celulares de levaduras, mientras que la Met se adsorbió menos en la clinoptilolita y más en la montmorillonita.

Varios estudios previos observaron que algunos adsorbentes de micotoxinas también secuestraban vitaminas y minerales a niveles similares a los observados en el presente estudio (Vekiru *et al.*, 2007; Ghanshyam *et al.*, 2009; Barrientos-Velázquez *et al.*, 2016). Sin embargo, no se han encontrado referencias científicas que demuestren el secuestro de AA por parte de los adsorbentes de micotoxinas. Además, Barrientos-Velázquez *et al.* (2016) ya sugirieron la existencia de competencia por las cargas negativas de los adsorbentes entre la vitamina B1 y la pepsina, un efecto similar observado al comparar los resultados de adsorción entre el estudio 1 y 2.

Los resultados indican que los adsorbentes de micotoxinas probados tienen un grado de adsorción de AA alto, lo que puede limitar su biodisponibilidad. Además, los resultados del segundo experimento sugieren que esta adsorción es competitiva entre AA por los sitios de adsorción en cada adsorbente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barrientos-Velázquez, A.L., Arteaga, S., Dixon, J.B. & Deng, Y. 2016. The effects of pH, pepsin, exchange cation, and vitamins on aflatoxin adsorption on smectite in simulated gastric fluids. *App. Clay Sci.* 120: 17-23.
- Barroeta, A., Calsamiglia, S., Cepero, R., Lopez-Bote, C. & Hernandez, J.M. 2012. Optima nutrición vitamínica de los animales para la producción de alimentos de calidad. 5M Publishing, London, UK.
- Ghanshyam, V., Joshi, G.V., Patel, H.A., Kevadiya, B.D. & Bajaj, H.C. 2009. Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier. *App. Clay Sci.* 45: 248-253.
- Lemke, S.L., Ottinger, S.E., Mayura, K., Ake, C.L., Pimpukdee, K., Wang, N. & Phillips, T.D. 2001. Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. *Anim. Feed Sci. Technol.* 93: 17-29.
- Gallo, A. & Masoero, F. 2010. In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Italian. J. Anim. Sci.* 9:21
- Vekiru, E., Fruhauf, S., Sahin, M., Ottner, F., Schatzmayr, G. & Krska, R. 2007. Investigation of various adsorbents for their ability to bind aflatoxin B1. *Myc. Res.* 23: 27-33.

ASSESSMENT OF THE CAPACITY OF CERTAIN MYCOTOXIN BINDERS TO ADSORB AMINO ACIDS

ABSTRACT: The objective of the study was to evaluate the capacity of 6 mycotoxin binders (bentonite, clinoptilolite, sepiolite, montmorillonite, active carbon and yeast cell walls) to adsorb 4 different amino acids (Lysine, Methionine, Threonine and Tryptophan). The experiment was conducted in in vitro conditions to simulate a monogastric digestion model. The experiment was divided in 2 studies to show if mycotoxin binders adsorbed the amino acids when incubated separately (Study 1) or together (Study 2) at the same doses. Results show that the average adsorption in the Study 1 was high (49%), with highest adsorption for clinoptilolite (56%) and lowest for sepiolite (44%). For the adsorption of amino acids, Tryptophan (63%) was adsorbed the highest and Lysine (36%) the lowest. In the Study 2, the average adsorption was lower (19%), being the yeast cell wall the highest (22%) and clinoptilolite the lowest (4%). For the adsorption of amino acids, Threonine (22%) was the highest and Methionine (16%) the lowest. Mycotoxin binders have a high grade of adsorption of amino acids, which can limit their availability. This adsorption is competitive among them.

Keywords: mycotoxin binders, amino acids, adsorption.