



# Informe Técnico

## Actividad detoxificante del Detoxa Plus®

El siguiente trabajo es un resumen e interpretación del artículo científico publicado en la revista **TOXINS NÚMERO 8**, el 15 de octubre del 2019.

### ***“Enzyme Degradation Reagents Effectively Remove Mycotoxins Deoxynivalenol and Zearalenone from Pig and Poultry Artificial Digestive Juices”***

Ko-Hua Tso, Jyh-Cherng Ju, Yang-Kwang Fan and Hsin-I Chiang

*\*El artículo completo es de libre acceso y se encuentra on-line.*

Las micotoxinas (MX) son metabolitos secundarios tóxicos producidas por varios hongos filamentosos, principalmente *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* [1]. Cuando los animales consumen alimentos contaminados con micotoxinas, ellos sufren una serie de efectos tóxicos como ser: disminución del consumo de alimentos, disminución de la ganancia de peso, diarrea, inmunosupresión, vómitos, lesiones ulcerativas, etc. [2]. Existen muchas estrategias distintas son utilizadas en los molinos y las granjas para reducir la concentración de micotoxinas: inactivación térmica, irradiación, dilución física y removedores de micotoxinas [3].

Los removedores de micotoxinas son, actualmente, la herramienta más eficaz para disminuir la concentración de micotoxinas en el animal. Hay dos grandes grupos de removedores de micotoxinas: los secuestrantes y los inactivadores enzimáticos. Los secuestrantes (SC) trabajan evitando la absorción de las micotoxinas a través del tracto gastrointestinal al unirlas a la superficie de los mismos. Pueden ser inorgánicos (Bentonitas, Aluminosilicatos, etc.) u orgánicos (Pared de levaduras) [4,5]. Los inactivadores enzimáticos (EZ) poseen una actividad biológica que les permite alterar la estructura química de las MX, transformándolas en metabolitos con menor o nulo efecto tóxico. Normalmente pueden ser la totalidad de una bacteria, levadura o tan solo un extracto enzimático [6].

Las MX se clasifican en polares y no polares según su estructura química [7]. Las micotoxinas polares, como Aflatoxina B1 y Fumonisina B1 son las más polares de las micotoxinas y son más fácilmente secuestradas que las no polares. A su vez, el peso molecular, solubilidad, capacidad de disociación y cargas iónicas también juegan un papel esencial en la capacidad de ser adsorbidas [8]. Aflatoxina B1 tiene una mayor tasa de adsorción que Fumonisina B1, debido a esto, Aflatoxina B1 es el principal objetivo de los secuestrantes [9].

La mayoría de los secuestrantes han demostrado una baja, o nula, capacidad para adsorber micotoxinas NO polares como Deoxynivalenol (DON) y Zearalenona (ZEA) [6]. Por otra parte, los inactivadores enzimáticos han demostrado ser la mejor opción para el control de dichas micotoxinas [10, 11].

A la fecha, no existe un método analítico sencillo y práctico que pueda evaluar la capacidad de remoción de micotoxinas *in vivo*. Los métodos de evaluación estándar son los ensayos *in vitro*. A pesar de esto, es importante que las condiciones del ensayo *in vitro* sean estrictamente controladas para que se asemejen lo más posible al modelo *in vivo*, de manera tal que los resultados puedan ser replicados [12].

En el presente ensayo, se diagrama un modelo *in vitro* que asemeja las condiciones del tracto gastrointestinal del animal. Replicando los tiempos de permanencia del alimento en cada una de las estructuras anatómicas, los pH de cada una de las estructuras, la temperatura, la motilidad intestinal y la presencia de enzimas digestivas propias del animal. De esta forma se logró un modelo que se ajusta, con gran satisfacción, a las condiciones *in vivo*.

Para el estudio se utilizó una dosis de desafío de DON según las directivas de China Hygienic Standard for Feed (GB13078-2017) y las regulaciones de la FDA, resultando en una dosis de 5.000 ppb [13].

Los removedores evaluados, expuestos en la Tabla 2, se seleccionaron en base a los de mayor prevalencia en el mercado. Se utilizaron a las dosis recomendadas por los fabricantes.

MARCA/COMPAÑÍA	DOSIS (KG/TN)
Detoxa Plus® New/ BV Science*	0,5
Detoxa Plus®/BV Science	1
Competidor internacional enzimatico (EDR1)	1
Competidor asiático enzimatico (EDR2)	1
Competidor asiático enzimatico (EDR3)	1
Competidor Adsorbente mineral 1 (ADM1)	2
Competidor Adsorbente mineral 2 (ADM2)	2

**Tabla 2. EDR: Inactivadores enzimáticos. \*Producto en fase de desarrollo, no disponible para la venta. Para información detallada por favor consultar el paper completo**

Para la evaluación se utilizó HPLC ya que es considerado el método más preciso para evaluar las micotoxinas.

La dosis inicial fue de 5.000 ppb de DON, esta dosis está muy por encima de los límites máximos recomendados.

En el Gráfico 1 se puede observar la capacidad de remoción de DON en función del tiempo a lo largo del modelo in vitro del tracto gastrointestinal.

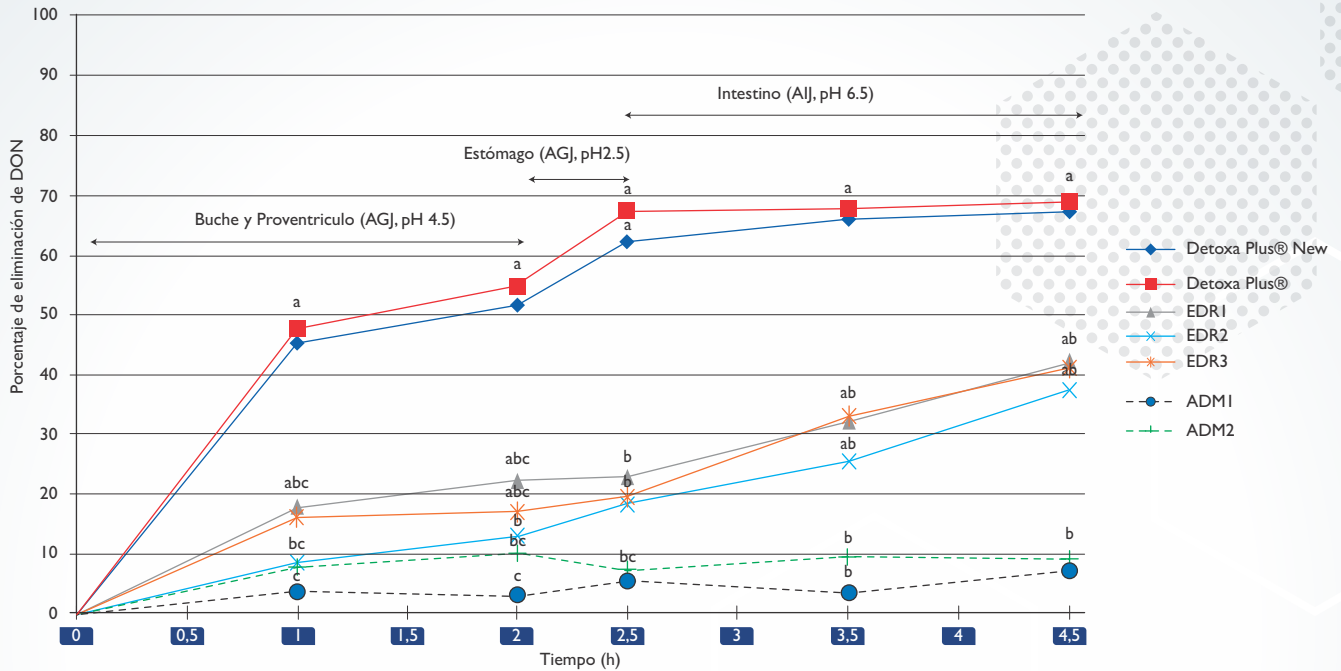


Gráfico 1. Remoción de DON (5.000 ppb iniciales) a lo largo de 4.5 horas en distintos pH con la presencia de inactivadores enzimáticos (línea sólida) o adsorbentes (línea punteada).

AGJ: jugo gástrico artificial,

AIJ: jugo intestinal artificial.

EDR: inactivador enzimático.

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos con  $p < 0.05$

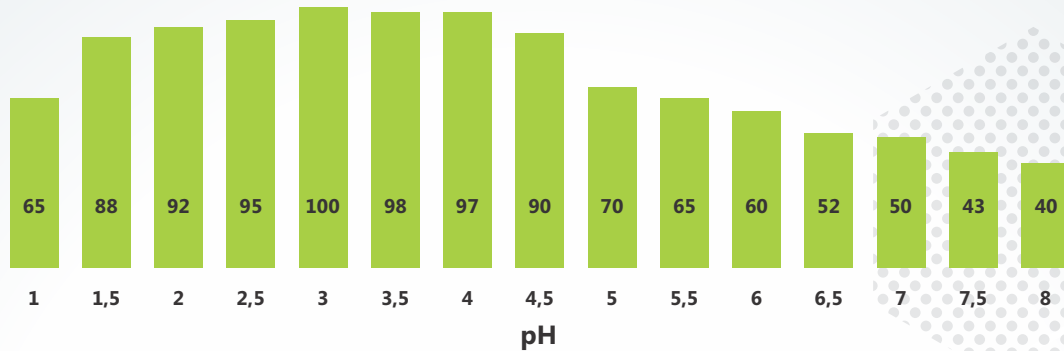
### Discusión

Cuando evaluamos las primeras 2 horas podemos observar cómo **Detoxa Plus®** y **Detoxa Plus® New** (producto en fase de desarrollo, no disponible para la venta) poseen una capacidad de eliminación significativamente superior (50% y 52% respectivamente) al resto de los inactivadores enzimáticos (EDR1 es de 22%, EDR2 de 13% y EDR3 de 17%) y de los secuestrantes (ADM1 es de 3% y ADM2 de 7%). Cuando el pH desciende incluso más, debido al pasaje de la solución al estómago, encontramos un incremento aún mayor en la capacidad de remoción del **Detoxa Plus®** y el **Detoxa Plus® New** (67% y 62% respectivamente), mientras que el resto de los removedores no presentan cambios significativos.

Esta capacidad de eliminar las micotoxinas en las primeras porciones del tracto gastrointestinal es específica de **Detoxa Plus®**, ya que, a diferencia del resto, las enzimas presentes en el producto poseen su pico de actividad enzimática a pH ácidos.



Porcentaje de actividad enzimática a distintos pH



Cuando la solución llega a los intestinos, y se genera un incremento de pH (de 2.5 a 6.5), evidenciamos como la capacidad de biotransformación del **Detoxa Plus®** se ve disminuida, mientras que el resto de los inactivadores enzimáticos aumenta significativamente. Esta variación se da, ya que, las enzimas del resto de los productos evaluados, poseen su pico de actividad a un pH más cercano a la neutralidad. Por otra parte, la actividad de los secuestrantes no varía, demostrando que la capacidad de adsorción de los mismos no se ve influenciada por el pH.

Por último, luego de la totalidad del tránsito de la solución por el modelo animal (4.5 horas), se obtuvo una capacidad de remoción TOTAL de DON del **Detoxa Plus®** y el **Detoxa Plus® New** de (69% y 68% respectivamente) mientras que el resto de los inactivadores enzimáticos tuvieron una acción del 42% (EDR1), 41% (EDR2) y 38% (EDR3). A su vez los adsorbentes tuvieron una capacidad de eliminación de DON del 7% y 9% para ADM1 y ADM2 respectivamente.

La diferencia de eliminación total de DON entre **Detoxa Plus®** y el resto de los productos se da debido a que las enzimas de **Detoxa Plus®** comienzan a trabajar a pH ácido, en las primeras porciones del tracto gastrointestinal, lo que le permite un mayor tiempo de acción total. El resto de los productos aumenta su velocidad de acción con la llegada al intestino, pero para entonces el alimento permanecerá muy poco tiempo en el mismo.

## Conclusión

El presente trabajo demuestra que los inactivadores enzimáticos son una opción robusta para la eliminación de DON en el modelo *in vitro* y dentro de estos, el **Detoxa Plus®** y **Detoxa Plus® New** son los de mayor capacidad de eliminación. A su vez, bajo las mismas condiciones de desafío, los secuestrantes no fueron capaces de eliminar DON.

## Referencias

1. **Pierron, A.; Alassane-Kpembé, I.; Oswald, I.P.** Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porc. Health Manag.* 2016, 2, 21. [CrossRef] [PubMed]
2. **Wang, S.; Yang, J.; Zhang, B.; Wu, K.; Yang, A.; Li, C.; Zhang, J.; Zhang, C.; Rajput, S.A.; Zhang, N.; et al.** Deoxynivalenol impairs porcine intestinal host defense peptide expression in weaned piglets and IPEC-J2 Cells. *Toxins* 2018, 10, 541. [CrossRef] [PubMed]
3. **He, J.; Zhou, T.; Christopher, Y.J.; Greg, B.J.; Scott, P.M.** Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2010, 21, 67–76. [CrossRef]

4. **Nedeljkovic-Trailovic, J.; Trailovic, S.; Resanovic, R.; Milicevic, D.; Jovanovic, M.; Vasiljevic, M.** Comparative investigation of the efficacy of three different adsorbents against OTA-induced toxicity in broiler chickens. *Toxins* 2015, 7, 1174–1191. [CrossRef]
5. **Saminathan, M.; Selamat, J.; Abbasi Pirouz, A.; Abdullah, N.; Zulkifli, I.** Effects of Nano-composite adsorbents on the growth performance, serum biochemistry, and organ weights of broilers fed with aflatoxin-contaminated feed. *Toxins* 2018, 10, 345. [CrossRef]
6. **Kabak, B.; Dobson, A.D.; Var, I.** Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46, 593–619. [CrossRef]
7. **Wang, G.; Lian, C.; Xi, Y.; Sun, Z.; Zheng, S.** Evaluation of nonionic surfactant modified montmorillonite as mycotoxins adsorbent for aflatoxin B1 and zearalenone. *J. Colloid Interface Sci.* 2018, 518, 48–56. [CrossRef] [PubMed]
8. **Huwig, A.; Freimund, S.; Kappeli, O.; Dutler, H.** Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett.* 2001, 122, 179–188. [CrossRef]
9. **Phillips, T.D.; Kubena, L.F.; Harvey, R.B.; Taylor, D.R.; Heidelbaugh, N.D.** Hydrated sodium calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult. Sci.* 1988, 67, 243–247. [CrossRef] [PubMed]
10. **Karlovsky, P.; Suman, M.; Berthiller, F.; De Meester, J.; Eisenbrand, G.; Perrin, I.; Oswald, I.P.; Speijers, G.; Chiodini, A.; Recker, T.; et al.** Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Res.* 2016, 32, 179–205. [CrossRef]
11. **Tan, H.; Hu, Y.; He, J.; Wu, L.; Liao, F.; Luo, B.; He, Y.; Zuo, Z.; Ren, Z.; Zhong, Z.; et al.** Zearalenone degradation by two *Pseudomonas* strains from soil. *Mycotoxin Res.* 2014, 30, 191–196. [CrossRef] [PubMed]
12. **Hahn, I.; Kunz-Vekiru, E.; Twaruzek, M.; Grajewski, J.; Krska, R.; Berthiller, F.** Aerobic and anaerobic in vitro testing of feed additives claiming to detoxify deoxynivalenol and zearalenone. *Food Addit. Contam. Part A* 2015, 32, 922–933. [CrossRef] [PubMed]
13. **Park, D.L.; Troxell, T.C.** US Perspective on mycotoxin regulatory issues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002, 504, 277–285.