



AGRABOND

PRUEBAS “In Vitro” Realizadas En
Laboratorio Independiente En Europa
Comparando La Eficacia de Adsorción
de AGRABOND Con Los Productos Mas
Importantes De La Competencia

MÉTODOS Y MATERIALES

Es preciso establecer con detalle las condiciones de trabajo, simulando las condiciones fisiológicas de las especies de destino. Dada la diferencia estructural existente entre las distintas micotoxinas, por comportamientos distintos de los materiales para las distintas micotoxinas, por lo que debe establecerse un protocolo estándar de trabajo para cada una de ellas.

Tras realizar una exhaustiva revisión bibliográfica* sobre estudios de la capacidad de adsorción *In vitro* de distintos adsorbentes, se decidió tomar como base las condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación, así como de soluciones de trabajo descritas en Ramos (1994) y por Larsson et al.(1997)*. Puesto que se desconoce la posibilidad de des-adsorción de la micotoxina durante el tránsito digestivo, se deciden testar varios tiempos de reacción (2, 4 y 8 horas). Todos los estudios se llevaron a cabo a 38°C, por ser ésta la temperatura de los animales de destino. Se evaluaron 3 pH: 2, 4 y 6 de forma independiente, y para simular los cambios de pH que se dan en el tracto digestivo, se añadió un estudio en el que se testaba primero en una solución de pH 2 , pasando posteriormente la solución a pH 6. Se emplearon dos tipos de soluciones, solución 1. (tampón fosfato-citrato ajustada a los diferentes valores de pH) y solución 2. (soluciones fisiológicas gástricas simulada de pH 2, tampón de pH 4 conteniendo electrolitos e intestinal simulada de pH 6).Según los trabajos consultados, la concentración óptima de adsorbente es de 0.1%, por lo que todos los materiales se testaron a este nivel de inclusión.

Como materiales para el desarrollo del protocolo, se tomaron las muestras M5 y M10, consideradas como las más representativas. A fin de investigar posibles uniones no específicas de la micotoxina, así como controlar una posible degradación de la misma en el medio de reacción, se incluyó un blanco con micotoxina pero sin adsorbente (SB) como control negativo. En el caso de existir en el mercado un producto de eficacia probada, se incluyó como control positivo de la adsorción (el nivel de inclusión se realizó según recomendaciones del fabricante). La concentración de micotoxina fué de 150 ppb para aflatoxina B1 y Ocratoxina A, y de 1500 ppb para zearalenone y deoxynivalenol.

* (Ramos, 1994; Phillips et al.,1994; Ramos y Hernandez, 1994; Larson et al., 1997; Natour y Youssef, 1998)

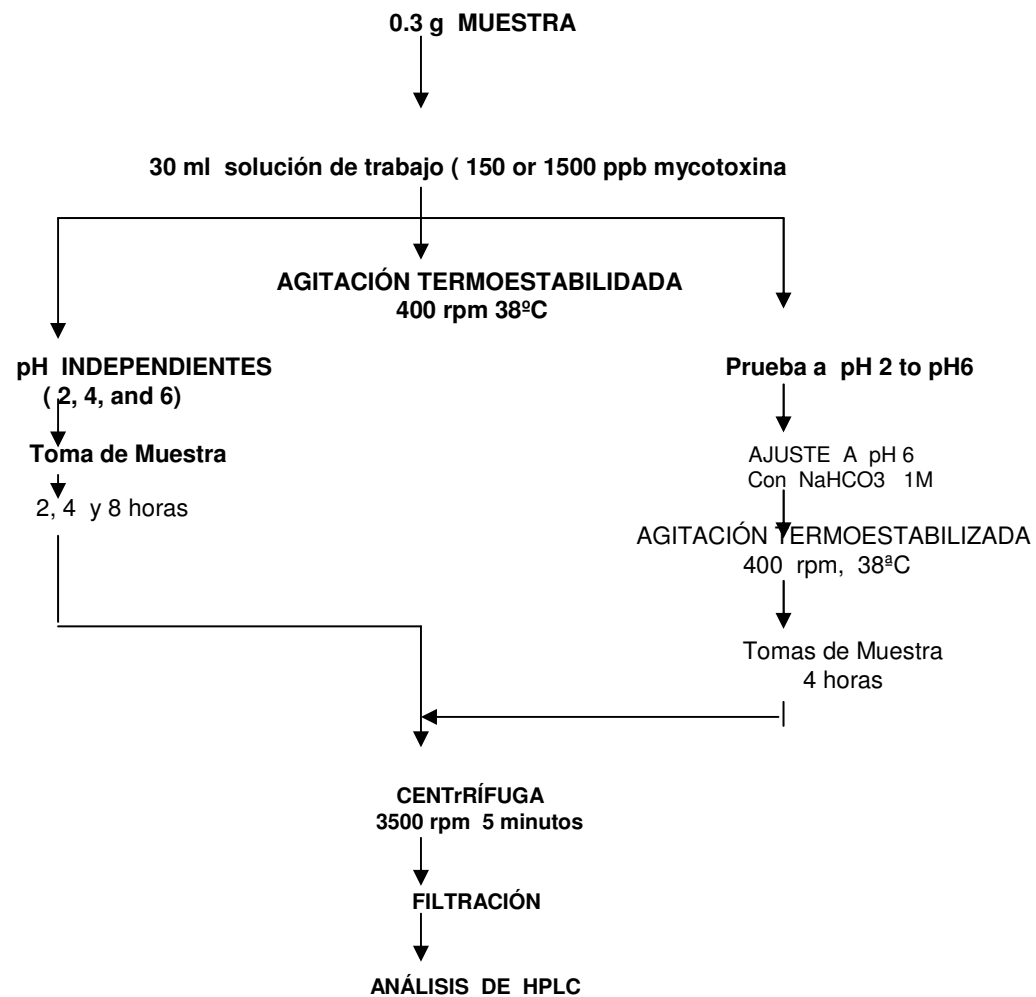


PROCEDIMIENTO

A 0.3 gramos de la muestra se añadieron 30 ml de la solución de trabajo (solución 1 o 2) con la micotoxinas a testar. Se incubó en un baño termoestabilizado (38°C) con agitador magnético (400 rpm). Transcurrido el tiempo de reacción, se tomó una alícuota (2 ml), se centrifugó (3,500 rpm, 5 minutos) y se filtró (PDVF, 13 rpm y 0.40 u, Millex-HV, Ireland).

Ver esquema adjunto:

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO



ANÁLISIS

El análisis de las micotoxinas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de acuerdo con los métodos descritos en la bibliografía consultada (AOAC, 1995; CEN, 2001; Joseph et al., 2003; Stroka et al. 2003; Trcksess et al., 1998, Velluti, A., 2001).

La capacidad de adsorción se determina como porcentaje según:

$$([\text{Micotoxina}] \text{ en SR } \times 100) / [\text{Micotoxina}] \text{ en Solución Blanco (SB)}$$

Cada experimento fue realizado por duplicado, sometiendo los resultados a un análisis de varianza (ANOVA), mediante el programa informático SAS.

RESULTADOS

LOS RESULTADOS DE ADSORCIÓN DE ZEARALENONA CON “AGRABOND” Y OTROS DOS PRODUCTOS DE LA COMPETENCIA:

Objetivo: Determinación de la capacidad de adsorción “In Vitro”.

Muestras: Agrabond (Agranco, USA)
Mycosorb (Alltech, USA)
DIASOL ((MO + Ag) 6+1)

Niveles de Inclusión de las Muestras: 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5% (p / v).

Condiciones: Condiciones fisiológicas de pH , tiempo de tránsito y temperatura simuladas en el tracto digestivo. Soluciones intestinales simuladas pH6, (USPXXII, Larson et al, 1997), 4 horas de incubación a 38°C con 400 rpm de

Concentración de Zearalenona: 1500 ng/ml de solución fisiológica simulada.

Resultados:

La siguiente tabla contiene los resultados de adsorción de los productos arriba mencionados:

% Muestra (p / v)	% Adsorción de Zearalenona		
	Agrabond	Mycosorb	DIASOL (MO) + Ag
0.5	> 96.5	63.0 (2.2)	> 96.5.5
0.2	> 96.5	NA*	> 90.9 (0.4)
0.1	> 96.5	47.2 (0.0)	> 72.3 (2.0)
0.05	94.3 (1.0)	26.3 (4.5)	> 54.0 (1.0)

• Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estandar de 3 réplicas.

* NA – No analizadas

LISTA DE PRODUCTOS PROBADOS Y LOS RESULTADOS

ref.	muestra	Aflatoxina B1 150ng/ml			ZEA 1500ng/ml				OTA 150ng/ml				DON 1500ng/ml
		ads al 1%	ads al 0,5%	ads al 0,1%	ads al 1%	ads al 0,5%	ads al 0,1%	ads al 0,05%	ads al 1%	ads al 0,5%	ads al 0,1%	ads al 0,05%	ads al 1%
38	Exal	*	100,0	100,0	47,3 (6,7)	*	*	*	28,2 (7,8)	*	*	*	0,0 (0,0)
39	T. Diatomea Biofarma	*	99,3	95,5	3,7 (2,9)	*	*	*	0,0 (0,0)	*	*	*	0,0 (0,0)
40	Clinosen	*	*	*	23,1 (0,8)	*	*	*	0,0 (0,0)	*	*	*	0,0 (0,0)
41	Zeo-kler	*	*	*	13,2 (1,4)	*	*	*	0,8 (0,0)	*	*	*	0,0 (0,0)
	Olmix (ALL142)	*	*	*	*	*	63,6 (9,5)	*	*	*	9,4 (3,2)	*	0,0 (0,0)
C-4	Olmix (ALL272)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-1	NOVASIL (ENGELHARD)	100,0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-2	AGRABOND (AGRACO)	98,3 (0,1)	90,9 (1,1)	*	*	>96,5	>96,5	93,6 (0,3)	*	>96,0	>96,0	91,1 (0,5)	0,0 (0,0)
C-3	FLOBON (BROOK SIDE AGRA)	99,9 (0,0)	100,0 (0,0)	*	77,0 (3,4)	31,6 (9,7)	8,3 (5,0)	23,9 (1,1)	*	0,0 (0,0)	*	*	0,2(0,5)
C-5	BINDER PLUS 1				1,7 (1,6)	*	1,3 (1,4)	*	*	0,0 (0,0)	*	*	0,0 (0,0)
C-6	BINDER PLUS 2				45,8 (4,4)	*	7,3 (2,5)	*	*	0,0 (0,0)	*	*	3,8 (0,7)
C-7	BINDER PLUS (AL2005 00384)				51,3 (3,8)	*	11,4 (0,4)	*	*	4,8 (1,7)	*	*	0,0 (0,0)
C-8	MYCOFIX PLUS 3.0 (BIOMIN)				*	36,6 (6,7)	*	*	*	*	*	*	0,0 (0,0)
C-9	AGRABOND 12-05-05 (25k)				*	*	>96,5	94,3 (1,3)	*	>96,0	*	*	0,0 (0,0)
C-10	AGRABOND 12-05-05 (25k)				*	*	>96,5	95,2 (0,1)	*	*	*	*	0,0 (0,0)
C-11	Mycosorb lote. ES56619 Vto. 14/04/08				*	63,0 (2,2)	47,2 (0,09)	26,3 (4,5)	*	4,7 (3,2)	*	*	0,0 (0,0)

10000ng/ml
ZEA