Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Adsorção multi-micotoxinas: revisão e estudo de carvões ativados

Susana Maria Cabral

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2019

Susana Maria Cabral
Cientista dos Alimentos

Adsorção multi-micotoxinas: revisão e estudo de carvões ativados

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Cabral, Susana Maria

Adsorção multi-micotoxinas: revisão e estudo de carvões ativados / Susana Maria Cabral. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

97 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Adsorvente 2. Micotoxinas 3. Coocorrência 4. Teste *in vitro* 5. Carvão ativado I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, ao Universo e toda energia e força positiva que me permitiram realizar essa jornada em meio a tantos desafios na vida pessoal e familiar durante esses dois últimos anos.

Aos meus pais tão amados, pelo apoio, incentivo e presença. Sempre.

As minhas irmãs queridas, Letícia e Cristiane, água e óleo, emulsão da minha vida!

Ao meu afilhadinho Bento, por cada sorriso e momento de descontração e alegria.

Às minhas parceiras de café e de cerveja, de estudos e risadas, Larissa e Rachel.

À professora Thaís Vieira e Eduardo da Glória, pela paciência, orientação e ensinamentos, além da confiança em mim depositada.

Ao professor de estatística Marcelo Corrêa Alves pelo auxílio na finalização dos dados e pelos conhecimentos prestados na área.

A todos do laboratório de Micotoxinas e Micologia, em especial Yumi, Ivani e Tota.

À professora Maraísa (UNIFESP) que auxiliou em diversas análises oferecendo sua estrutura, materiais e conhecimento.

À banca examinadora pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À FEALQ e PPG-CTA pelo apoio financeiro que permitiram minha participação em eventos importantes na área.

À todos os funcionários do LAN que ajudaram indiretamente neste trabalho.

E a todos que não mencionei acima, amigos e familiares que tornaram esse trabalho possível.

Obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 7
LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE TABELAS 9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 10
1. INTRODUÇÃO GERAL 11
REFERÊNCIAS 13
2. ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS 17
RESUMO 17
ABSTRACT 17
2.1. MICOTOXINAS 18
2.1.1 Aditivos antimicotoxinas (AAM) 21
2.1.2 Mitigação dos efeitos tóxicos das micotoxinas 28
2.1.3 Avalição de aditivos antimicotoxinas 29
2.1.4 Parâmetros considerados nas avaliações in vitro 30
2.2. CONCLUSÃO 36
REFERÊNCIAS 36
3. ADSORÇÃO DE MICOTOXINAS EM CARVÕES ATIVADOS: ESTUDO DE FATORES INTERFERENTES 53
RESUMO 53
ABSTRACT 53
3.1. INTRODUÇÃO 54
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 56
3.2.1 Reagentes e amostras 54
3.2.2 Caracterização dos carvões 54
3.2.3 Avaliação da capacidade de adsorção de micotoxinas 55
3.2.5 Análise estatísitca 60
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 62
3.3.1 Caracterização dos carvões 60
3.3.2 Avaliação da capacidade de adsorção de micotoxinas 70
3.3.3 Estudo das características de adsorção do carvão selecionado 77
3.4. CONCLUSÃO 89
REFERÊNCIAS 90
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 97

RESUMO

Adsorção multi-micotoxinas: revisão e estudo de carvões ativados

Elevada incidência de contaminação de micotoxinas em grãos de cereais e alimentos processados tem sido relatada em todo o mundo, principalmente em produtos destinados à alimentação animal. O objetivo desse trabalho foi explorar as tecnologias disponíveis e em desenvolvimento para redução das concentrações de micotoxinas presente nos alimentos com foco na adsorção, bem como a metodologia *in vitro* utilizada para testes. Neste projeto, avaliaram-se cinco carvões ativados quanto a suas propriedades e capacidade de adsorção de micotoxinas em concentrações individuais e combinadas (multi-micotoxinas) (Aflatoxina B1, Desoxinivalenol, Fumonisina B1 e Zearalenona). O carvão ativado que apresentou maior capacidade de adsorção multi-micotoxinas foi selecionado para continuar no estudo a fim de explorar as interações entre adsorvente/adsorvato e possíveis interferentes. Foram avaliados parâmetros físico-químicos do carvão, o efeito do tempo de contato, efeito dose, isotermas e efeito da composição do meio e da mudança do pH. A adsorção de Aflatoxina B1 e Zearalenona não sofreu efeito dos fatores estudados, diferente da adsorção de Fumonisina B1 e Desoxinivalenol. Os resultados auxiliam na análise da interação das moléculas de micotoxinas e do carvão ativado, bem como quais fatores podem afetar o processo de adsorção de cada uma delas. Porém mais estudos são necessários para esclarecer melhor o paprel de cada um dos fatores na adsorção das micotoxinas aqui estudadas.

Palavras-chave: Adsorvente; Micotoxinas; Coocorrência; Teste *in vitro*; Carvão ativado

ABSTRACT

Multi-mycotoxin adsorption: review and study of activated carbons

The high incidence of mycotoxins contamination in cereal grains and processed foods have been reported worldwide, especially in products intended for animal feed. The objective of this work was to explore the available and upcoming technologies applied for the reduction of mycotoxins present in foods with a focus on adsorption, as well as in the *in vitro* methodology. Following, five activated carbon were evaluated about their properties and its individual and multi-mycotoxin adsorption capacity (Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Fuminisin B1 and Zearalenone). The activated carbon that presented the highest capacity of multi-mycotoxin adsorption was selected to continue the study in order to explore the interactions between adsorbent / adsorbate and possible interferents. Physicochemical parameters of the coal were evaluated, the effect of the contact time, concentration, isotherms and effect of the composition of the medium and the pH change. The adsorption of Aflatoxin B1 and Zearalenone had no effect of the factors studied, different from the adsorption of Fumonisin B1 and Deoxynivalenol. The results help in the analysis of the interaction of mycotoxins and activated carbon molecules, as well as which factors may affect the adsorption process of each of them. However, more studies are needed to clarify the role of each of the factors in the adsorption of these mycotoxins studied.

Keywords: Adsorbent; Mycotoxins; Co-ocorrence; *In vitro* Test; Activated carbon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamentos combinando diferentes composições de meio e pH para testes. 62

Figura 2. Isotermas de adsorção de N2 a 77K obtidas para os CA estudados. 64

Figura 3. Distribuição de tamanho de poros obtidos por DFT para os CAs estudados. 65

Figura 4. Imagens obtidas por MEV da amostra CA1. 67

Figura 5. Imagens obtidas por MEV da amostra CA2. 68

Figura 6. Imagens obtidas por MEV da amostra CA3. 68

Figura 7. Imagens obtidas por MEV da amostra CA4. 69

Figura 8. Imagens obtidas por MEV da amostra CA5. 69

Figura 9. Resultados de adsorção (%) para micotoxinas FB1, DON e AFB1 na condição individual e mix, em pH 3 e 6 pelos CAs 1, 2, 3,4 e 5..... 70

Figura 10. Fórmula estrutural da AFB1. 73

Figura 11. Fórmula estrutural de ZEA. 74

Figura 12. Fórmula estrutural da DON. 74

Figura 13. Distribuição da conformação da molécula de FB1 de acordo com a variação do pH. 75

Figura 14. Estados iônicos da molécula de FB1 no pH 3 (A, B, C, D). 76

Figura 15. Estados iônicos da molécula de FB1 no pH 6 (E, F). 77

Figura 16. Relação entre pH final e inicial (PCZ corresponde à faixa em que o pH final se mantém constante, independentemente do pH inicial). 80

Figura 17. Adsorção de AFB1 proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (ng/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas. 85

Figura 18. Adsorção de DON proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (µg/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas. 85

Figura 19. Adsorção de FB1 proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (µg/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas. 86

Figura 20. Adsorção de ZEA proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (ng/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das micotoxinas utilizadas para obtenção da isoterma..61

Tabela 2. Resultados de grupos ácidos dos CAs. 63

Tabela 3. Valores da área superficial e volume de poros dos CAs. 65

Tabela 4. Tamanho das moléculas de micotoxinas (ǎ)*.....66

Tabela 5. Resultados de adsorção (%) para micotoxinas FB1, DON e AFB1 na condição individual e mix, em pH 3 e 6 pelos cas 1, 2, 3,4 e 5. Valores marcados com as mesmas letras em uma coluna não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) 71

Tabela 6. Efeito do tempo de contato para a adsorção de micotoxinas em pH3 e pH6 em solução teste contendo as micotoxinas individualmente ou combinadas. Testes de adsorção realizados a temperatura constante (37 °C) e com nível de inclusão do adsorvente de 0,5%.....81

Tabela 7. Efeito da dosagem do carvão ativado sobre a adsorção de micotoxinas em pH3 e pH6 a 37°C com a presença combinada das micotoxinas na solução teste. 83

Tabela 8. Relação entre adsorção das micotoxinas estudadas no mix/individual em ambos os phs.....79

Tabela 9. Relação mix/ind das micotoxinas AFB1, FB1 e DON nos pHs 3 e 6 em diferentes concentrações.....84

Tabela 10. Valores obtidos pelas equações das isotermas 87

Tabela 11. Efeito da composição do meio e método de elevação do pH na adsorção de micotoxinas.....88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Agentes adsorventes
AAM	Aditivo antimicotoxina
AB	Agentes Biotransformadores
AFB1	Aflatoxina B1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
CA	Carvão Ativado
CAST	Council for Agricultural Science and Technology DON
DFT	Density Functional Theory
DON	Desoxinivalenol
DR	Equação de Dubinin-Radushkevich
EFSA	European Food Safety Authority
EU	União Europeia
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FUMO	Fumonisinas
HT2	Micotoxina HT2 (grupo dos tricotecenos)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IND	Solução contendo apenas uma micotoxina (presença individual)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIX	Solução multi-micotoxinas (contendo AFB1, FB1, DON e ZEA)
NIV	Nivalenol
OCRA	Ocratoxina
PCZ	Ponto de carga zero
T2	Micotoxina T2 (grupo dos tricotecenos)
ZEA	Zearalenona

1. INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação por micotoxinas tem sido relatada ao redor do mundo, principalmente em cereais. A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, sendo assim, pode ocorrer em qualquer fase: no campo, colheita, transporte ou armazenamento do produto/alimento. Amendoim, milho e caroço de algodão apresentam maior risco de contaminação por fungos, sendo que no Brasil a maior incidência tem sido relatada em milho e amendoim (IMAMURA, 2014).

Os gêneros fúngicos produtores de micotoxinas de maior destaque são *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillium*. Cerca de 300 micotoxinas já foram descritas (CAST, 2003), sendo que pelo menos 30 apresentam propriedades tóxicas preocupantes à saúde. As micotoxinas de maior relevância são: aflatoxinas (AFLA), zearalenona (ZEA), Desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FUMO) e ocratoxina A (OCRA) (IARC, 1993).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, assim como uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Deste modo, vários tipos de micotoxinas podem ser encontrados no mesmo produto ou alimento (GALVANO *et al.*, 2005). Dados da coocorrência de micotoxinas tem mostrado que a atenção não deve ser direcionada para uma única micotoxina, mas sim para multi-micotoxinas. Foi detectada, por exemplo, a coocorrência de patulina e citrinina em maçãs portuguesas (MARTINS *et al.*, 2002). Almeida *et al.* (2012) analisaram 230 amostras de arroz e frações processadas, observando a coocorrência de AFB1 e ZEA em 17% das amostras e Afla e Ocra em 24,2%. Em um estudo realizado por Monbaliu *et al.* (2010) com amostras de trigo e milho provenientes de países europeus (Chéquia, Dinamarca, Hungria, Espanha e Portugal) constatou-se que 75% das amostras contaminadas apresentavam mais de uma micotoxina. Além da coocorrência natural em um mesmo produto, pode acontecer de a mistura de diferentes ingredientes ou lotes de um mesmo ingrediente resultar na presença de diferentes micotoxinas no produto final (para a fabricação de rações por exemplo).

A presença de micotoxinas em alimentos e rações é indesejável, pois estas substâncias são capazes de provocar vários tipos de distúrbios à saúde humana e animal. Os efeitos observados dependem do nível e tipo de micotoxina, da duração da exposição, da espécie animal e das condições fisiológicas do animal (VILA-DONAT *et al.*, 2018). As micotoxinas e seus metabólitos podem induzir diferentes distúrbios celulares e efeitos adversos, como estresse oxidativo, inibição da tradução, dano ao DNA e no processo de apoptose nas células do organismo (WEN *et al.*, 2016). Estudos recentes também mostram que as micotoxinas afetam a integridade da barreira intestinal e podem resultar em um aumento da translocação de estressores

nocivos e ainda podem desempenhar um papel importante em várias doenças inflamatórias intestinais (AKBARI *et al.*, 2017). Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pela interação que pode existir entre elas (ALASSANE-KPEMBI *et al.* 2013, KLARIC *et al.*, 2013 e CLARKE *et al.*, 2014) ou com doenças, principalmente agentes imunossupressores (HUSSEIN; BRASSEL, 2001).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para prevenir ou minimizar a formação de micotoxinas, sempre tendo como foco a prevenção do crescimento fúngico (DAWSON *et al.*, 2006). Assim, como exemplo destas estratégias tem-se a aplicação de agentes antifúngicos, o emprego engenharia genética para obtenção de vegetais mais resistentes à infecção e/ou colonização fúngica, secagem para diminuição da água disponível ao crescimento fúngico e o controle das condições de armazenamento para evitar o aparecimento de condições favoráveis ao crescimento fúngico (JOUANY, 2007; KABAK *et al.*, 2006). É importante monitorar a temperatura de armazenamento, por exemplo, pois seu aumento pode indicar desenvolvimento e aumento da população de insetos e consequentemente de fungos (DALPASQUALE, 2002). A presença de insetos aumenta a umidade e temperatura da massa dos grãos que podem estimular o desenvolvimento de fungos presentes (HAGSTRUM e FLINN, 1992).

Apesar destas estratégias para minimizar a ocorrência de micotoxinas, lotes de matéria-prima contaminados com altos níveis podem ser encontrados. Assim, a detecção da contaminação com micotoxinas em lotes de matérias-primas exige que o controle da qualidade na indústria de ração e alimentícia tenha um bom sistema de amostragem disponível. Desta maneira, lotes contaminados acima de um limite aceitável deverão ser detectados e segregados. No entanto, um sistema realmente eficaz de detecção de micotoxinas nem sempre está disponível e logo, lotes contaminados acima de um limite podem ser aceitos e processados.

Em vista dessa insegurança na etapa de prevenção e no sistema de controle de qualidade, buscando evitar o processamento de lotes não conformes, o segmento da indústria de ração animal tem utilizado uma classe de aditivos que reduzem a bioacessibilidade e/ou os efeitos prejudiciais que a exposição a micotoxinas pode causar à saúde e desempenho dos animais. Esses aditivos podem apresentar vários tipos de estratégias para desempenhar as funções desejadas, tais como ação antioxidante, hepatoestimulante ou hepatoprotetora e redução da bioacessibilidade das micotoxinas (PATRIARCA; FERNÁNDEZ PINTO, 2017).

A redução da bioacessibilidade de micotoxinas é a estratégia mais utilizada e tem sido estudada desde o início dos anos 80, empregando compostos adsorventes que complexam as moléculas de micotoxinas (que chegam ao trato gastrointestinal a partir dos ingredientes contaminados), a fim de evitar que as mesmas possam causar danos durante a passagem pelo

trato gastrointestinal. Os compostos usados como adsorventes de micotoxinas podem variar amplamente quanto a sua natureza. Podem ser minerais de argila natural ou modificada, fibras vegetais, leveduras, bactérias ou constituintes da parede celular ou citoplasmático destes microrganismos, polímeros sintéticos e carvão ativado (PENG *et al.*, 2018).

Entre os adsorventes estudados, os carvões ativados (CA) têm apresentado os melhores resultados para a adsorção de micotoxinas com diferentes características químicas (AVANTAGGIATO *et al.*, 2005). Entretanto, nem todos os CA apresentam as mesmas características físico-químicas. Assim, as propriedades de adsorção dos CA são dependentes da matéria-prima e do processo utilizado na sua obtenção, o que resultará em diferenças nas suas características, tais como na área superficial e da distribuição do tamanho dos poros, parâmetros importantes no processo de adsorção (KOLOSOVA e STROKA, 2011)

A eficiência de adsorção dos compostos candidatos a serem utilizados comercialmente como adsorventes de micotoxinas pode ser avaliada *in vitro* ou *in vivo*. A avaliação *in vivo* é a técnica que permite a melhor avaliação dos compostos pois é realizada utilizando indivíduos da espécie animal de interesse, porém apresenta as desvantagens de ser de alto custo e utilizar seres vivos para experimentação. O uso de avaliações *in vitro,* por outro lado, permite uma triagem prévia, selecionando os compostos com melhor potencial de adsorção, reduzindo assim a possibilidade de ser realizado o teste *in vivo* com produtos ineficientes. Em vista disso, as metodologias de avaliação *in vitro* precisam ser executadas em condições que simulem o melhor possível as condições do trato gastrointestinal, para assim realizar a triagem de maneira mais eficiente possível.

Existem variações consideráveis nas metodologias *in vitro* que têm sido reportadas. A maioria delas utiliza um meio muito simples para avaliar a adsorção, composto apenas de água e um ou mais sais tamponantes de pH, sem a adição de outros constituintes do suco gastrointestinal, sem considerar a dinâmica de alteração dos valores de pH e considerando apenas a presença de uma única micotoxina no teste (VILA-DONAT *et al.*, 2018). Entretanto, a adição de outros constituintes do suco gastrointestinal, a dinâmica de alteração do pH, o efeito da presença de constituintes da matriz e a presença de mais de uma micotoxina no meio deveriam ser consideradas nos protocolos, pois podem influenciar os resultados obtidos (JAYNES *et al.*, 2007; VEKIRU *et al.*, 2007).

Este trabalho é apresentado em dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão sobre aditivos antimicotoxinas e metodologias *in vitro* utilizadas para avalia-los, a fim de contextualizar o leitor e explorar os parâmetros adotados nas metodologias dos testes de avaliação de adsorção *in vitro*. Dada a frequente ocorrência de mais de uma micotoxina em uma

matriz alimentar, o segundo capítulo traz uma metodologia de avaliação *in vitro* empregada para a triagem de CA para adsorção multi-micotoxinas e também um estudo mais detalhado da adsorção do CA selecionado a partir da triagem realizada.

Referências

AKBARI, P. *et al.* The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1007–1029, 14 mar. 2017.

ALASSANE-KPEMBI, I., KOLF-CLAUW, M., GAUTHIER, T., ABRAMI, R., ABIOLA, F. A., OSWALD, I. P., *et al.* New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of lowdoses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. **Toxicology Applied Pharmacology**. 272, 191–198. 2013. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.023

ALMEIDA, M. I.; ALMEIDA, N. G.; CARVALHO, K. L.; GONÇALVES, G. A.; SILVA, C. N.; SANTOS, E. A.; GARCIA, J. C.; VARGAS, E. A. Co-occurrence of aflatoxins B_1 , B , G_1 and G , ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. **Food Additives & Contaminants.** Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, Abingdon, v. 29, n. 4, p. 694-703, 2012.

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379–388, 2005.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*; Task Force Report 139; Ames, IA, 2003.

CLARKE, R., CONNOLLY, L., FRIZZELL, C., ELLIOT, C. T. Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. **Toxicon**, 90, 70–81. 2014. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.07.019.

DALPASQUALE, V. A. Procedimentos essenciais de recepção e limpeza de grãos. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (Ed.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Biogeneziz, 2002. p. 191-212.

DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries**, 22, Lexington: Alltech, p.169-181, 2006.

GALVANO, F.; RITIENI, A.; PIVA, G.; PIETRI, A. Mycotoxins in the human food chain. In: DIAZ, D. E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press. p. 187-224, 2005.

HAGSTRUM DW, FLINN PW. Integrated pest management of stored-grain insects. In: Sauer, DB, editor. Storage of cereal grains and their products. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1992, 607p.

HUSSEIN, S.H.; BRASELL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

IARC (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56 of Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. IARC, Lyon.

IMMAMURA KB, TONI JCV, BOCCHE MAL, SOUZA DA, GIANNONI JA. Incidência de aflatoxinas no amendoim (Arachis hypogaea L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. Revista Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2014; 73(2):178-87.

JAYNES, W. F.; ZARTMAN, R. E.; HUDNALL, W. H. Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1–3, p. 197–205, 1 abr. 2007.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science Technology**. 137, 342–362. 2007.

KABAK, B., DOBSON, A.D.W., VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critial Reviews in Food Science and Nutrition**. 46, 593–619. 2006.

KLARIC, M. S., RAŠIC, D., AND PERAICA, M. Deleterious effects of mycotoxin combinations involving ochratoxin A. **Toxins** 5, 1965–1987. 2013. doi: 10.3390/toxins5111965.

KOLOSOVA A., STROKA J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: A review. **World Mycotoxin Journal**. 2011;4:225–256. doi: 10.3920/WMJ2011.1288.

MARTINS, M. L.; GIMENO, A., MARTINS, H. M.; BERNARDO, F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 19, n. 6, p. 568-574, 2002.

MONBALIU, S., VAN POUCKE, C., DETAVERNIER, C., DUMOULIN, F., VAN DE VELDE, M., SCHOETERS, E., VAN DYCK, S., AVERKIEVA, O., VAN PETEGHEM, C., DE SAEGER, S. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **Journal of Agricultural and Food Chemestry**. 58, 66–71. 2010.

PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, 2017. 14, 40-60.

PENG, W. X.; MARCHAL, J. L. M.; VAN DER POEL, A. F. B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. **Animal Feed Science and Technology**, 2018.

VEKIRU, E. *et al.* Investigation of various adsorbents for their ability to bind Aflatoxin B1. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 1, p. 27–33, 2007.

VILA-DONAT, P. *et al.* A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

WEN, J.; MU, P.; DENG, Y. Mycotoxins: cytotoxicity and biotransformation in animal cells. **Toxicology research**, v. 5, n. 2, p. 377–387, 1 mar. 2016.

2. ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS

RESUMO

Micotoxinas são encontradas como contaminantes naturais em muitos alimentos de origem vegetal, especialmente os cereais. Apesar dos esforços para controle e redução tanto dos fungos produtores quanto das micotoxinas a ocorrência de alimentos contaminados ainda é elevada, causando enormes prejuízos econômicos e danos à saúde humana e animal no mundo todo. A coocorrência de micotoxinas em uma mesma matriz ou alimento tem sido relatada cada vez mais frequentemente e vem aumentar o desafio para redução destas micotoxinas. Este trabalho apresenta uma revisão sobre as tecnologias utilizadas para redução/degradação de micotoxinas, com o foco em adsorventes e explora métodos aplicados em testes de avaliação *in vitro*. Foi observada a falta de pesquisas com a avaliação de adsorventes em meio multi-micotoxinas e a discrepância entre os parâmetros e metodologias adotados entre os autores, sugerindo uma necessidade de aprimoramento e padronização dos testes. As tecnologias estudadas são amplas, sendo que a adsorção é a que tem mostrado maior potencial para aplicação para contaminação multi-micotoxinas. Apesar dos grandes avanços nas tecnologias dos aditivos anti-micotoxinas, ainda não há disponível um composto que seja efetivo para todas, sugerindo que a opção mais viável é a combinação de diferentes estratégias.

Palavras-chave: Adsorvente; Micotoxinas; Coocorrência; Teste *in vitro*

ABSTRACT

Mycotoxins are found as natural contaminants in many plant foods, especially cereals. Despite efforts to control and reduce both producer fungi and mycotoxins, the occurrence of contaminated feed is still high, causing enormous economic losses and affecting human and animal health worldwide. The co-occurrence of mycotoxins in the same matrix or food has been reported frequently and increase the challenge to reduce these mycotoxins. This work presents a review on the technologies used for mycotoxin reduction / degradation, focusing on adsorbents and exploring methods applied in *in vitro* evaluation tests. It was observed the lack of research with the evaluation of adsorbents in multi-mycotoxins medium and the discrepancy between the parameters and methodologies adopted among the authors, suggesting a need to improve and standardize the tests. The technologies for mitigation of mycotoxin effects are wide, and the adsorption is the one that has shown the greatest potential for application to multi-mycotoxin contamination. Despite the great advances in the technologies of the anti-mycotoxin additives, a compound that is effective for all is not yet available, suggesting that the most viable option is the combination of different strategies.

Keywords: Adsorbent; Mycotoxins; Co-occurrence; *In vitro* test

2.1. Micotoxinas

A contaminação por micotoxinas na dieta animal é frequentemente relatada na literatura, apesar do desenvolvimento e disponibilização de procedimentos que possam levar a uma redução dos níveis de ocorrência destas em ingredientes da ração animal.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, os quais estão adaptados para colonização e crescimento em substratos com ampla faixa de disponibilidade de umidade e conteúdo nutricional. A maioria das micotoxinas consideradas importantes são produzidas por três gêneros de fungos: *Aspergillus, Penicillium* e *Fusarium*. Os fungos podem se desenvolver em plantas em crescimento antes da colheita e produzir micotoxinas ainda no campo, ou produzir as micotoxinas após a colheita, durante o transporte e armazenamento. Em geral, condições ambientais como alta temperatura, altos níveis de umidade e danos causados por insetos aumentam a probabilidade de contaminação (MEDINA *et al.*, 2015). As micotoxinas de maior relevância são: aflatoxinas (AFLA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FUMO) e zearalenona (ZEA).

As AFLAs são as micotoxinas com maior distribuição no mundo, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (MOSS, 2002). Suas principais formas incluem B1, B2, G1 e G2, sendo a aflatoxina B1 a micotoxina mais comum e mais ativa biologicamente. (DEVEGOWDA; MURTHY, 2005). A toxicidade crônica é a forma mais comum da aflatoxicose e é causada pelo consumo em doses relativamente reduzidas destes compostos tóxicos durante um período prolongado. O órgão alvo da AFB1 é o fígado, onde pode ser metabolizado em diferentes metabólitos (Di GREGORIO *et al.*, 2014). Os efeitos a longo prazo estão associados à redução do ganho de peso, redução da produção de leite ou ovos, aumento da susceptibilidade a doenças, tumores e teratogenicidade (STREIT *et al.*, 2012; BARATI *et al.*, 2018).

A micotoxina DON pertence à família dos tricotecenos e pode ser produzida por diferentes gêneros de fungos, principalmente Fusarium. Os efeitos tóxicos de DON incluem alteração das funções intestinais e da imunidade, redução da absorção de nutrientes e anorexia (PAYROS *et al.*, 2016). Quando ingerido em doses elevadas por animais, causa náuseas, vômitos e diarreia. Por induzir esses sintomas o desoxinivalenol é conhecido como vomitoxina ou fator de recusa de alimento (FREIRE *et al.*, 2007).

A FB1 é o tipo de fumonisina mais frequente e mais tóxico dentre as fumonisinas e um importante contaminante de produtos à base de milho (LABUDA *et al.*, 2003). São produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*. A ingestão de alimentos com elevados níveis de FB1 pode causar edema pulmonar, lesões cerebrais em cavalos (leucoencefalomalacia - LEME) e

câncer em outras espécies animais. A fumonisina B1 apesar de não ser uma molécula mutagênica, é um promotor de câncer (SUMMERELL e LESLIE, 2011). O fígado e o rim foram identificados como os principais órgãos-alvo da toxicidade da FB1 (SCOTT, 2012). O mecanismo de ação das fumonisinas baseia-se na semelhança de sua estrutura química com a estrutura de esfingolipídeos do tipo da esfingosina e esfinganina (RILEY *et al.*, 1993). Por consequência, esta semelhança interfere na biossíntese de esfingolipídios causando danos celulares e consequentemente ao organismo (MOBIO *et al.*, 1996). Estes componentes têm um importante papel na estrutura da membrana, na interação intracelular, na matriz celular e regulação de fatores de crescimento.

A ZEA é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium* que contaminam grãos, especialmente o milho. A ZEA demonstrou ser imunotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e ainda potencializador da peroxidação lipídica (PISTOL *et al.*, 2014). Porém, o principal alvo dessa micotoxina é o sistema reprodutivo, devido à similaridade estrutural da ZEA e de alguns de seus metabólitos com a estrutura do hormônio estrogênio. Apresenta efeitos sobre a reprodução e a indução do hiperestrogenismo, sendo os suínos a espécie mais sensível. O estrogenismo em suínos apresenta-se como um inchaço da vagina nas fêmeas jovens e inchaço do prepúcio em machos, além de infecções secundárias que podem levar à morte (ZINEDINE, 2007). Estudos têm demonstrado o potencial da ZEA em estimular o crescimento de células tumorais de mama também em humanos (VLATA, 2006; BINDER, 2007).

As culturas mais suscetíveis à contaminação com micotoxinas são os cereais, principalmente trigo, milho, cevada, centeio e aveia (RODRIGUEZ-CARRASCO *et al.*, 2013; VIDAL *et al.*, 2013). Os cereais constituem uma parte importante da dieta diária dos animais (PINOTTI *et al.*, 2016). Além da ocorrência em cereais, as micotoxinas podem ocorrer em frutas, amêndoas, outras sementes e forragens.

O risco de contaminação por micotoxinas torna-se um problema mundial crescente para alimentação humana e produção animal. Em um levantamento de três anos (2009-2011) realizado por Rodrigues e Naehrer (2012), em que 7049 amostras de milho, soja, farelo de soja e trigo, provenientes da América, Europa e Ásia foram analisadas para presença de micotoxinas, mostrou que 81% das amostras estavam contaminadas por pelo menos uma das micotoxinas analisadas (AFB1, ZEA, DON, FB1 e OCRA). Entre as amostras, o milho apresentou a maior frequência de contaminação por micotoxinas.

Kosicki *et al.* (2016) avaliaram a presença de micotoxinas (DON, NIV, T-2 e HT-2, ZEA, FBs, OCRA, e AFs) em matérias-primas e produtos para nutrição animal na Polônia de 2011 a 2014. Foram analisadas 1384 amostras de milho, silagem de milho, cereais e ração . DON

e ZEA foram as micotoxinas mais frequentes e estavam presentes em 89% e 92% das amostras de milho, e em 86% e 88% das amostras de silagem de milho, respectivamente.

A coocorrência de micotoxinas em uma mesma matriz também tem sido relatada com frequência e é um tema de grande preocupação (KOSICKI *et al.*, 2016; ZACHARIASOVA *et al.*, 2014). Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, assim como uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Assim, diferentes micotoxinas podem ser encontradas no mesmo alimento (GALVANO *et al.*, 2005). Das várias centenas de micotoxinas identificadas, apenas algumas foram exploradas quanto a estruturas químicas e toxicidade em animais (WEN *et al.*, 2016).

Mesmo estudos mais antigos já relatavam a co-contaminação de alimentos para animais por AFB1 e OCRA (HUFF e DOERR, 1981), AFB1 e ZEA (RAVINDRAN *et al.*, 1996), por exemplo. Um estudo britânico analisou 67 amostras de produtos de milho destinados à alimentação animal para 22 micotoxinas e constatou que todas as amostras tinham mais de uma micotoxina (SCUDAMORE, 1998). Em um trabalho realizado na Alemanha com 84 amostras de milho, foi relatada a coocorrência de 14 micotoxinas de *Fusarium* (GOERTZ, 2010).

Sendo o Brasil o terceiro produtor mais importante de milho do mundo e grande exportador, o nível de contaminação deste cereal é de importância internacional (FAO, 2016). A ocorrência de micotoxinas e a coocorrência de micotoxinas no milho brasileiro já foram relatadas em diversos trabalhos.

Vargas *et al.*, (2001) analisaram 214 amostras e relataram a coocorrência de AFB1 e FB1 em 38% delas, enquanto 30% apresentaram FB1 e ZEA e 8% AFB1, FB1, ZEA. Oliveira *et al.* (2017) analisaram 148 amostras de milho coletadas nos estados da região sul do Brasil. Todas as amostras estavam contaminadas com pelo menos 10 metabólitos fúngicos e a maior coocorrência detectada em uma mesma amostra foi 51 de compostos. Dentre as micotoxinas mais comuns (e com limites regulamentados no Brasil), as frequências e combinações encontradas foram: 73% FB1, FB2 e ZEA; 47,9% FB1, FB2 e DON; 35,8% ZEA e DON; 25,6% AFB1, FB1 e FB2; 20,2% AFB1 e ZEA; 14,2% AFB e DON; 12,1% AFB, ZEA e DON.

Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pela interação que pode existir entre elas ou com outras doenças (HUSSEIN; BRASSEL, 2001). Em uma revisão, Grenier e Oswald (2011) analisaram 112 trabalhos e compararam os efeitos toxicológicos *in vivo* causados pela exposição as micotoxinas combinadas aos efeitos devidos à exposição a micotoxinas individualmente. A maioria dos estudos mostrou uma interação sinérgica ou aditiva nos efeitos adversos sobre o desempenho dos animais.

Devido aos problemas que as micotoxinas acarretam, muitos países têm estabelecido medidas para o controle da contaminação por micotoxinas nos alimentos para o consumo humano e animal e determinado limites máximos para a presença delas. No Brasil, para alimentos destinados ao consumo humano, os valores máximos tolerados são determinados pela Resolução RDC 07/2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e para consumo animal a regulamentação é feita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88. Para ingredientes de ração animal o MAPA impões limite apenas para Aflatoxinas (50 μg/kg).

A União Europeia (UE) possui os regulamentos mais extensos para micotoxinas, segundo a FAO. A estratégia da UE (Regulamento EC N° 882/2004) visa garantir um elevado nível de segurança alimentar, saúde e bem-estar dos animais e fitossanidade. Para evitar contaminação advinda de fora da UE, o Regulamento (CE) n.º 1152/2009 impõe condições especiais à importação de determinados gêneros alimentícios de alguns países devido ao risco de contaminação por aflatoxinas (CHELI *et al.*, 2014). Ou seja, as micotoxinas podem impactar diretamente na importação/exportação de alimentos e na economia de um país.

De acordo com uma revisão realizada por Wielogórska *et al.* (2016), as regulamentações relacionadas às micotoxinas também estão presentes em algumas zonas de livre comércio, como Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), Associação do Sudeste Asiático Nações Unidas, Conselho de Cooperação do Golfo, Austrália / Nova Zelândia. Na África, poucos países têm controles específicos para micotoxinas (FAO, 2011).

Contudo, o estabelecimento de concentrações máximas legais de micotoxinas não significa que a presença de micotoxinas em níveis baixos seja segura. Pequenas quantidades de micotoxinas também podem interromper o funcionamento celular normal e causar alterações patológicas cumulativas. Além disso, baixos níveis de micotoxinas em dietas podem levar a problemas e sintomas que são mais difíceis de identificar (PENG *et al.*; 2018). As moléculas de micotoxinas são de difícil remoção de uma matriz e podem entrar na cadeia alimentar mantendo suas propriedades tóxicas, mesmo após o processamento do alimento (TRISTAN, 2002). O ideal então seria fazer o controle do crescimento fúngico evitando que a micotoxina seja produzida no alimento, evitando que os animais possam ser expostos a micotoxinas através da alimentação e sofrerem os efeitos deletérios que elas podem exercer sobre a saúde animal.

Assim, a adoção das Boas Práticas Agrícolas para o controle da contaminação pré-colheita é muito importante. O preparo e cultivo do solo e a tecnologia de plantio direto auxiliam no controle da contaminação por micotoxinas, assim como a rotação de culturas. O fornecimento inadequado de água e nutrição pode fomentar o estresse do solo, promovendo o

acúmulo de micotoxinas (RICHARD, 2007). A engenharia genética é outra importante ferramenta visando grãos mais resistentes ao ataque dos fungos (MESTERHAZY *et al.*, 2012).

No entanto, em muitas situações, devido a questões de ordem prática e econômica, é necessário mitigar os efeitos de possíveis fungos já instalados e/ou micotoxinas já formadas. Ou seja, o manejo pós-colheita também é crucial para diminuir os riscos de micotoxinas.

Para estocagem, por exemplo, os grãos devem passar previamente pelo processo de secagem. Manter uma baixa umidade nos ambientes de armazenamento é essencial para controlar o nível de fungos e micotoxinas. É preciso também evitar os "pontos quentes" dentro da pilha de grãos que podem fornecer um ambiente adequado para o crescimento de fungos decorrentes do desenvolvimento de insetos (MAGAN *et al.*, 2007). Para isso é importante monitorar a temperatura interna dos silos.

Remover grãos danificados antes da estocagem pode eliminar muitos focos de contaminação. A triagem manual de grãos danificados mostrou eficiência, levando a redução de 70% a 99% dos diferentes tipos de micotoxinas em estudos (van der WESTHUIZEN *et al.*, 2011).

Outros tratamentos podem ser aplicados para descontaminação/redução da contaminação, como separação física por densidade (HUFF e HAGLER, 1985; MATUMBA *et al.* 2015), degradação por ozônio (McKENZIE *et al.*, 1998; SAVI *et al.*, 2014) e aplicação de amônia (WENG *et al.*, 1994). No entanto, poucas das técnicas desenvolvidas são viáveis em escala industrial e a aplicação pode ser restrita devido a problemas associados a questões de segurança, possíveis perdas na qualidade nutricional e implicações de custo (KOLOSOVA e STROKA, 2011).

Atualmente, uma das formas mais utilizadas para minimizar os efeitos das micotoxinas que podem estar presentes nas dietas dos animais é o uso de aditivos antimicotoxinas (AAM).

2.1.1. Aditivos Antimicotoxinas (AAM)

O Regulamento n.º 386/2009 da Comissão europeia (CE), de 12 de maio de 2009 define um novo grupo funcional de aditivos para alimentação animal como "substâncias para reduzir a contaminação de alimentos pelas micotoxinas: substâncias que podem suprimir ou reduzir a absorção, promover a excreção de micotoxinas ou modificar seu modo de ação". São os chamados aditivos antimicotoxinas (AAM). Esses aditivos são adicionados à dieta de animais a fim de reduzir absorção e ou o efeito das micotoxinas do trato gastrointestinal. Os AAMs podem

conter diferentes estratégias em sua formulação para desempenhar sua função, conforme sua definição.

Comercialmente, são apresentados produtos com misturas de compostos baseados em diferentes estratégias, como adsorventes de micotoxinas (agentes sequestradores) e complexos que visam a estimulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal. No entanto, poucos produtos fornecem informações detalhadas sobre suas alegações e modo de ação no rótulo (WIELOGÓRSKA *et al*, 2016). Na União Europeia, para receber autorização os produtos devem ser avaliados pela EFSA - European Food Safety Authority (EFSA, 2010). O EFSA preconiza que, além do teste *in vitro*, o produto deve ser avaliado *in vivo* no mínimo três vezes em pelo menos dois locais diferentes.

No Brasil, os aditivos em geral destinados a inclusão na ração animal devem ser devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mediante a comprovação de sua eficiência (Instrução Normativa nº 44, de 15/12/2015) com cópia dos estudos desenvolvidos e de outros materiais disponíveis que demonstrem que o aditivo cumpre os critérios estabelecidos. Especificamente para os aditivos antimicotoxinas, para maiores orientações quanto às avaliações necessárias para comprovação da eficácia, encontra-se disponível para consulta um documento elaborado por um Grupo de trabalho sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal, que sugere protocolos mais detalhados para avaliação e validação dos AAM (MAPA, Processo nº 21000.005214/2006-46). Entre as técnicas empregadas nos AAM, a adsorção das micotoxinas é a mais amplamente estudada e aplicada (SHANAKHAT *et al.*, 2018).

2.1.1.1. Adsorção de micotoxinas

Para a técnica de adsorção, utilizam-se compostos que tenham a capacidade de se ligar às micotoxinas presentes em rações contaminadas sem se dissociarem no trato gastrointestinal do animal, limitando a acessibilidade das micotoxinas após a ingestão e diminuindo a exposição dos animais. Desta maneira, o complexo micotoxina-adsorvente passa através do trato gastrointestinal animal e é eliminado pelas fezes. A interação entre as micotoxinas e o adsorvente pode ocorrer por diferentes formas, tais como interação hidrofóbica, ponte de hidrogênio, atração eletrostática ou repulsão e ligações covalentes coordenadas (DI GREGORIO *et al.*, 2014). Entretanto, é importante que essa interação seja estável em todo o trato gastrointestinal, a fim de evitar a dessorção da micotoxina. A adsorção/dessorção é influenciada pelas propriedades físicas dos adsorventes (carga total e distribuição de carga, o tamanho dos poros e a área de superfície

acessível) e as propriedades físico-químicas das micotoxinas, como polaridade, solubilidade e a conformação espacial das moléculas (AVANTAGGIATO *et al.*, 2005; HUWIG *et al.*, 2001).

Segundo Jard *et al.* (2011) um adsorvente de micotoxinas ideal deve apresentar as seguintes características: ser inofensivo à saúde animal e ao desempenho produtivo; ter ação rápida junto às micotoxinas evitando que estas entrem na corrente sanguínea e devem atuar em todo o trato gastrointestinal (de modo que não ocorra dessorção); ser eficaz para diferentes micotoxinas e em diferentes concentrações; não causar danos ao meio ambiente após excreção.

Os adsorventes podem ser classificados em inorgânicos ou orgânicos. Os adsorventes inorgânicos contemplam as argilas (aluminossilicatos), que podem ser naturais ou modificadas (conhecidas como argilas organofílicas). Os aluminossilicatos podem ser divididos em filossilicato (montmorilonitas e outras esmectitas, etc) e os tectossilicato (incluem as zeolitas). As bentonitas (rochas compostas predominantemente do mineral montmorilonita) têm demonstrado uma grande eficácia na adsorção de AFBs (MAGNOLI *et al.*, 2011; RAMOS e HERNÁNDEZ, 1996; THIEU *et al.*, 2008; VEKIRU *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2014).

As argilas organofílicas são as de maior importância comercial. São argilas quimicamente modificadas sendo que a base do processo de transformação das argilas inorgânicas em argilas organofílicas reside em fazer com que seus cátions naturais inorgânicos sejam trocados por cátions orgânicos, em presença de água. Em geral essa alteração acarreta em melhores resultados para adsorção de outras micotoxinas, além das AFBs. Por exemplo, zeolitas modificadas se mostraram mais eficazes do que as argilas naturais para FBs em estudo conduzido por Baglieri *et al.* (2013). Viotti (2006) encontrou resultados promissores para AFB, FB e ZEA após modificação das argilas que estava estudando.

Apesar da ampla aplicação dos aluminossilicatos na dieta animal existem algumas preocupações relacionadas ao uso destes. Uma primeira preocupação é a possibilidade de que alguns aluminossilicatos possam exercer uma adsorção inespecífica e assim adsorver minerais e outros nutrientes presentes na dieta dos animais (KOLOSOVA e STROKA, 2011, VEKIRU *et al.*, 2007). Outra preocupação é o risco de as argilas estarem contaminadas com metais pesados (JOUANY, 2007) e/ou as dioxinas (MOSHTAGHIAN,1991), composto altamente tóxico segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC). Tal contaminação pode ser proveniente da exposição do solo a pesticidas e incineração de resíduos (RAPPE, 1994) ou pela formação espontânea de compostos por precursores do ambiente (GU *et al.*, 2008). Esta contaminação pode variar com o tipo de solo, localização, disponibilidade de precurssores e microorganismo presentes (GU *et al.*, 2011).

Os adsorventes orgânicos englobam os carvões ativados (CA), os biossorventes (resíduos orgânicos, fibras micronizadas, parede de levedura, bactérias, enzimas, etc) e os polímeros sintéticos.

O CA é um pó formado pela pirólise de diferentes compostos orgânicos que pode passar por diferentes processos de ativação visando ao desenvolvimento de uma estrutura altamente porosa (DUBININ, 1965). É conhecido como um dos mais eficazes e atóxicos adsorventes, sendo comumente usado como tratamento médico para intoxicações. As propriedades sequestrantes de micotoxinas por um CA dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho dos poros, a área superficial, a estrutura da micotoxina e a concentração da mesma (RAMOS *et al.*, 1996). Os CA têm apresentado em testes *in vitro* uma alta eficácia para a adsorção de diferentes micotoxinas tais como AFB1, FB1, ZEA, OCRA e também para a micotoxina DON, para a qual a existências de um adsorvente tem sido pouco relatada (AVANTAGGIATO *et al.*, 2005, 2004, 2003; DIAZ e SMITH, 2005; MEZES *et al.*, 2010; SABATER-VILAR *et al.*, 2007). No entanto, assim como as argilas, apresentam o incoveniente de poder adsorver nutrientes da dieta animal (VEKIRU *et al.*, 2007).

Os biossorventes podem ser enquadrados nas seguintes categorias: resíduos agrícolas primários (palha, espiga de milho, etc.), subprodutos da indústria de alimentos (cascas, sementes e polpa de frutas) ou resíduos naturais (resíduos vegetais, serragem, casca de árvore), parede de leveduras, bactérias, fungos filamentosos e outros biomateriais (materiais a base de quitosana por exemplo) (PARK, YUN, PARK, 2010).

Biossorventes derivados de fontes vegetais são compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. Além da ação adsorvente para micotoxinas (AOUDIA *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2014) podem auxiliar no funcionamento do intestino (AOUDIA *et al.*, 2009). Os biossorventes surgiram como uma alternativa favorável em relação aos materiais adsorventes convencionais, com os benefícios de baixo custo, maior lucratividade, praticidade e boa eficiência. Além disso, o desenvolvimento de novos usos de resíduos reverte o conceito de resíduo ao de matéria-prima para a produção de novos materiais, essencial para otimizar a eficiência do agronegócio, além de reduzir o impacto ambiental (ROSA *et al.*, 2011). Esses resíduos podem passar pelo processo de micronização (redução a pó), dando origem às chamadas fibras micronizadas.

Muitos estudos *in vitro* tem explorado esse potencial: SHAR *et al.*(2015) trabalharam com casca de banana para verificar a adsorção das aflatoxinas (AFB1, B2, G1 e G2) e obtiveram níveis adsorções acima de 85% para todas as aflatoxinas em pH8; Zavala-Franco *et al.* (2018) utilizaram casca de banana, folhas de *Pyracantha koidzumii* e *Aloe vera* em pó para AFB1, sendo que

Aloe vera mostrou melhor adsorção (69%) da micotoxina nas condições estudadas. Ramales-Valderrama *et al.* (2016) utilizaram biomassa de *Pyracantha koidzumii* em diferentes formas para adsorção de AFB1 e AFB2 obtendo resultados de até 86% e 82% respectivamente. Avantaggiato *et al.* (2014) relataram que o bagaço de uva (casca e polpa) foi capaz de sequestrar rapidamente e simultaneamente AFB1, ZEA, OCRA, e FB1 mas não apresentou adsorção para DON . Akar *et al.* (2018) testaram resíduo de polpa de beterraba obtendo adsorções de 40% de ZEA para resíduo in natura e 98% para resíduo modificado. Seccadio (2013) investigou a capacidade de adsorção seletiva de OCRA na fração de lignina-celulose de açaí, bagaço de cana-de-açúcar e castanha-do-brasil, chegando a adsorções de até 92%. Um ponto de atenção no uso de resíduos é a possível presença de contaminação prévia, principalmente cereais, polpa e cascas de frutas, que podem conter fungos. Logo estes devem ser previamente analisados quanto a presença de micotoxinas e resíduos de pesticidas (VILA-DONAT *et al.,* 2018).

Leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae,* e bactérias ácido-láticas têm demonstrado excelente capacidade de adsorção de micotoxinas *in vitro*. Contudo, a maioria das pesquisas são voltadas para a avaliação de aflatoxinas (EL-NEZAMI *et al.*, 1998; HASKARD *et al.*, 2000, 2001; LEE *et al.*, 2003; BATISTA, 2004; SHETTY; BUENO *et al.*, 2007; ARMANDO *et al.*, 2011; PIZZOLITTO; SALVANO; DALCERO, 2012; FRUHAUF *et al.*, 2012; PEREYRA *et al.*, 2012). Para outras micotoxinas tais como zearalenona, tricotecenos e fumonisinas poucas avaliações são relatadas (EL-NEZAMI *et al.*, 2002; YIANNIKOURIS *et al.*, 2003, 2004; NIDERKORN *et al.*, 2006; FRUHAUF *et al.*, 2012; PEREYRA *et al.*, 2012; PFOHL-LESZKOWICZ *et al.*, 2015; PIZZOLITTO; SALVANO; DALCERO, 2012; ARMANDO *et al.*, 2013).

A parede de leveduras consiste quase inteiramente de proteínas e carboidratos. Glucanas e mananas são os dois principais polisacarídeos que a compõe (EVANS e DAWSON, 2000) e que conferem a capacidade de adsorção superficial (SHETTY e JESPERSEN, 2006). Podem ser utilizadas na forma ativa, inativa ou a partir da extração de seus componentes. São ainda fonte de vitaminas, proteínas e enzimas (KRAUSE *et al.* 1989). Assim, além da adsorção das micotoxinas, a utilização de leveduras pode contribuir com a redução dos danos causados pelas micotoxinas nos animais, tendo efeito na atividade imunológica e em patógenos bacterianos gastrointestinais (KOGAN e KOCHER, 2007; MEISSONNIER *et al.*, 2009).

A habilidade de adsorção das paredes de leveduras pode ser aumentada através de tratamentos (físicos, químicos ou enzimáticos). Após tratamento com ácido, Shetty *et al.* (2007) observaram uma adsorção de 72% de AFB1, contra 38,7% quando utilizadas células viáveis da levedura.

A imensa variedade de bactérias no ambiente e nos organismos requer muito estudo para seleção de potenciais adsorventes. Peltonen *et al.* (2001) analisaram 20 linhagens de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias. Duas linhagens de *Lactobacillus amylovorus* e uma de *Lactobacillus rhamnosus* removeram mais de 50% de AFB1. Vega *et al* (2017) mostraram que *Lactobacillus plantarum* isolados de porcos apresentaram pontencial para adsorção de ZEA, removendo 68% da micotoxina nos testes *in vitro*. Fuchs *et.al.* (2008) obtiveram resultados positivos para *Lactobacillus acidophilus* VM 20, com redução de 95% de OCRA e a *Bifidobacterium animalis* VM12 reduziu a concentração de Patulina em 80%.

Polímeros sintéticos são macromoléculas produzidas em laboratório pela junção de muitas moléculas pequenas semelhantes (manômeros) (ATKINS, 2000). Alguns polímeros sintéticos demonstraram capacidade de adsorver micotoxinas *in vitro*: Avantaggiato *et al.* (2005) observou adsorções de 90% de FB1 e 100% ZEA por colestiramina, um polímero de estireno. Doll *et al.* (2004) obtiveram em seu experimento 94% de adsorção de ZEA com o mesmo polímero. A colestiramina mostrou também reduzir o nível de DON (60%) em pH 7, embora não tenha sido efetiva nos testes com células Caco-2 (CAVRET *et al.*, 2010). Alegakis (2008) avaliou dois polímeros de polivinilpirrolidona (PVP) modificados, para verificar a adsorção de ZEA e obteve resultados de adsorção que variaram de 33,5 a 66,2%. Soli-Cruz *et al* (2017) estudaram a aplicação de diferentes polímeros celulósicos (Hidroxipropil metil celulose HMC, Carboximetilcelulose CMC e celulose Microcristalina MCC) para AFB1, FB1, DON, T2, ZEA e OCRA. Os resultados apresentaram grande variação entre os polímeros e entre as micotoxinas. O HMC apresentou melhor adsorção para OCRA, sendo que os resultados entre os polímeros variaram de 60 a 86%. ZEA teve adsorções de 77 a 89%. FB1 variou de 48 a 54%, AFB1 de 35 a 44%, T2 de 9 a 51% e DON de 16 a 36%.

2.1.1.2. Biotransformação de micotoxinas

Esta estratégia baseia-se na transformação das moléculas de micotoxinas em metabólitos menos tóxicos. A biotransformação pode ser realizada por micro-organismos (incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras) ou enzimas purificadas (WIELOGÓRSKA *et al.*, 2016). Trata-se de uma tecnologia promissora por ser específica, eficaz, irreversível e não deixar resíduos tóxicos/poluentes. Porém, a aplicação de agentes de biotransformação de micotoxinas requer mais estudos para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de transformação, a toxicidade dos produtos derivados da biotransformação e a segurança em relação aos animais (CHENG JI, 2016).

Segundo Vanhoute (2016), um agente ideal de biodegradação/desintoxicação deve atender os seguintes requisitos: agir de forma rápida e eficiente na degradação de um amplo espectro de toxinas; após degradação gerar produtos atóxicos; não deve ser patogênico; ser eficaz em diferentes matrizes.

Um dos primeiros estudos nessa área foi o realizado na década de 1960 por Ciegler *et al.*, quando os autores avaliaram cerca de 1.000 tipos de micro-organismos quanto à habilidade de degradar a aflatoxina. Depois desse estudo, muitos outros foram realizados (sendo a maioria ainda para AFBs). Assim, muitas bactérias têm sido testadas quanto a sua capacidade de modificar ou inativar os diferentes tipos de micotoxinas: *B. licheniformis* CK1 para ZEA (YI *et al.*, 2011), *B. subtilis* para ZEA (CHO *et al.*, 2010), e para M1 (Motaweee e Abd El-Ghany, 2011). El-Nezami *et al* (1998) avaliaram a ação de sete diferentes tipos de bactérias sobre a AFB_1 e encontraram que algumas linhagens de Lactobacilos apresentaram capacidade de remover cerca de 80% de AFBs. Haskard *et al* (2000) analisaram linhagens de Lactobacilos e chegaram a resultados semelhantes (78,9%). Recentemente Wang *et al.* (2019) mostraram que *D. insulae* A16 tem grande potencial para degradação de DON em cereais (88%).

Alguns fungos, além de produzir micotoxinas, podem degradá-las (WU *et al.*, 2009). Assim, fungos filamentosos e leveduras têm sido explorados como biotransformadores. *Phoma* sp. degradou 99% de AFB1 presentes no meio estudado e *Rhizopus oligosporus* degradou 90% (SHANTHA, 1999). Zhang *et al.* (2014) selecionaram linhagens de *A. niger* (ND-1) capazes de degradar até 58,2% de AFB_1 do meio.

A aplicação de enzimas tem suas vantagens comparada à aplicação dos micro-organismos vivos, pois garantem desempenhos mais robustos, facilidade de manuseio, sem riscos de contaminação e sem preocupações de segurança para os operadores (LOI *et al*, 2017).

Vários tipos de enzimas já foram utilizados para biodegradação de micotoxinas, para as AFBs em geral são utilizadas as enzimas do grupo das oxidoredutases (LIU, 1998; YEHA, 2014; LOI, 2016). Yehia (2014) isolou enzimas de *P. ostreatus*, cuja aplicação causou 90% de redução de AFB1. Para as FBs, enzimas do grupo das esterases têm sido utilizadas (HEINL, 2009; EFSA, 2014) ou as carboxilesterases em conjunto com as aminotransferases (PIONEER, 1995). Já para a ZEA e seus derivados a clivagem do anel de lactona é catalisada por esterases (TAKAHASHI-NADO, 2005; LOI *et al*, 2017), além de outras enzimas já identificadas: uma lactona-hidrolase do fungo *Clonostachys rosea*, além da lacase (100% de degradação) (BANU *et al*, 2013) e oxidoreductase extraída de *Acinetobacter* sp. SM04 (90 a 95% de degradação) (YU *et al.*, 2012) ou de *Saccharomyces cerevisiae* (TANG, 2013). Para a DON e outras micotoxinas do grupo dos tricotecenos tem-se alguns trabalhos que mostraram bons resultados, por exemplo um conjunto

de enzimas produzidas por *Sphingomonas* sp. e glicosiltransferases por *Arabidopsis thaliana* (ITO *et al*, 2013; POPPENBERGER *et al.*, 2003; PIERRON *et al.*, 2016). Garda-Buffon *et al.* (2011) estudaram a degradação de Desoxinivalenol por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. correlacionando com a atividade das enzimas oxirredutase.

Uma limitação importante relacionada à aplicação de micro-organismos e enzimas é a possível redução da efetividade devido aos possíveis efeitos matriciais. Apesar disso, sua aplicação é versátil, uma vez que podem ser usados tanto em forma livre ou imobilizada e facilmente aplicados a processos industriais bem estabelecidos tais como, fermentações, fabricação de cerveja ou queijo e produção de ração (LOI *et al.*, 2017).

2.1.2. Mitigação dos efeitos tóxicos das micotoxinas

Existem também substâncias que podem ser muito eficientes para reduzir a toxicidade das micotoxinas, mas que não atuam diretamente nas moléculas de micotoxinas. Dentre estas substâncias têm-se agentes antioxidantes, imuno estimuladores, hepatoprotetores, etc (BOURDEGUE *et al.*, 2009). Por exemplo a silimarina, um agente hepatoprotetor adicionado à ração (junto com o adsorvente), que impede a peroxidação dos lipídios da membrana celular e organelas dos hepatócitos (células do fígado) e, ainda, auxilia na regeneração do tecido hepático, protegendo a integridade e a função hepática (TEDESCO, 2003; 2004). Ou seja, apesar de não atuar diretamente na micotoxina, é um composto que auxilia na prevenção da micotoxicose.

Minerais e vitaminas também podem ser adicionados a ração com esse intuito. Por exemplo, YU *et al* (2009) mostraram que adição de selênio e a vitamina E foram capazes de aliviar o estresse oxidativo e os danos à função hepática de ratos devido ao consumo de milho naturalmente contaminado com micotoxinas.

Os extratos naturais de plantas também podem ser explorados para essa aplicação. A cúrcuma, por exemplo, já demonstrou efeitos benéficos quando administrada na ração animal fornecendo proteção contra os efeitos tóxicos da AFB1 no fígado e nos rins de frangos (GHOLAMI, 2014).

Substâncias naturais como óleos essenciais, também podem ser usadas na nutrição como método combate aos efeitos deletérios causados por micotoxinas. A aplicação de piperina, componente do óleo essencial de pimenta negra (*Piper nigrum*) *in vivo* mostrou redução na toxidez da aflatoxina, diminuindo os danos hepáticos e seus efeitos adversos sobre os parâmetros hematológicos característicos da aflatoxicose (CARDOSO *et al.*, 2011). Óleo essencial de

Melaleuca alternifolia previniu danos hepáticos em bagres prateados (*Rhamdia quelen*) alimentados com dieta contaminada por aflatoxina, segundo estudo conduzido por Souza *et al.* (2019).

2.1.3. Avaliação de aditivos antimicotoxinas

Em geral, a capacidade de adsorção do AAM é inicialmente avaliada por um teste *in vitro*, permitindo a triagem de materiais em menor tempo, com menor custo e sob condições experimentais controladas. Normalmente, se um AAM não apresenta capacidade de diminuir a bioacessibilidade da micotoxinas *in vitro*, ele terá pouca ou nenhuma chance de fazê-lo *in vivo* (WHITLOW, 2006). Embora os resultados entre a eficácia *in vitro* e *in vivo* possam variar muito, estudos de Vekiru *et al.* (2015) comparando resultados *in vitro* e *in vivo* para AFB1 concluíram que os ensaios *in vitro* podem sim servir como uma boa ferramenta de triagem para a seleção de adsorventes. Porém é necessária a comprovação *in vivo* de sua eficácia antes de seu uso como aditivo alimentar. Alguns compostos podem interagir com nutrientes, como vitaminas ou outros compostos alimentares (Jans *et al.*, 2014) e antibióticos (EFSA, 2011). Além disso, durante o processo digestivo real a composição do meio é muito complexa e dinâmica, podendo haver influência de efeitos não considerados nos testes. Ou seja, o desafio no organismo vivo é muito maior.

Ao realizar uma revisão de publicações sobre avaliação *in vitro* de adsorventes de micotoxinas um problema que pode ser observado é a adoção de metodologias que apresentam condições de execução bem distantes das condições reais e diferentes entre si, portanto sem padronização.

A tarefa de mimetizar as condições do organismo vivo não é simples, mas há a necessidade de se adotar nos testes *in vitro* parâmetros que reflitam melhor as condições do trato gastrointestinal animal, para se procecer assim uma seleção confiável do adsorvente a ser utilizado na avaliação *in vivo*. As metodologias *in vitro* publicadas mostram que, em geral, as avaliações têm adotado parâmetros que: tendem a utilizar uma composição do meio teste muito simples, em que são utilizados dois valores de pH; não atentam para a adição de constituintes do suco gástrico ou intestinal; não consideraram a dinâmica de elevação do pH gástrico ao intestinal; não consideram o efeito causado pela presença da matriz e não tem considerado a presença de múltiplas micotoxinas. Boudergue *et al.* (2009) fizeram um levantamento e elencaram estudos com avaliações de adsorção *in vitro* publicados até 2009. Neste levantamento ficou clara a grande variação nos valores dos parâmetros adotados nestas avaliações.

Os testes *in vitro* normalmente têm sido utilizados para avaliar um AAM com tecnologia de adsorção, mas com o advento de outras tecnologias, por exemplo a mitigação dos efeitos, os testes podem não refletir o potencial total do produto a ser avaliado.

2.1.4. Parâmetros considerados nas avaliações *in vitro*

2.1.4.1. Dose de inclusão

A dose ou nível de inclusão de adsorvente refere-se à quantidade de adsorvente que será adotada para realizar o teste e, proporcionalmente, à quantidade do produto que deverá ser adicionado à ração para adsorção da micotoxina.

As avaliações *in vitro* podem trabalhar com a dose de inclusão de diferentes maneiras. A dose pode ser única frente a uma concentração específica da micotoxina; a dose pode ser única frente a diferentes concentrações da micotoxina, utilizada quando se pretende construir as isotermas de adsorção ou pode-se variar as doses do produto adsorvente para uma mesma concentração da micotoxina, quando se pretende obter a equação dose resposta para o produto.

Normalmente as avaliações *in vitro* têm relatado o uso de uma dose única do produto frente a uma concentração única da micotoxina ou construído as isotermas de adsorção (RAMOS e HERNANDEZ, 1996; RINGOT *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2011; AVANTAGGIATO *et al., 2014;* ZHAO *et al.,* 2015). A obtenção de equações dose resposta tem sido menos relatada (ZHAO *et al.,* 2015, GRECO *et al*, 2018). Em geral diferentes doses são testadas nos trabalhos quando se trata de um novo produto em desenvolvimento, como Avantaggiato *et al.* (2014) com resíduos de uva e Shar *et al.* (2016) com resíduos de banana.

As doses utilizadas têm variado bastante, mas têm ficado normalmente entre 0,002 a 2% (VEKIRU *et al.*, 2008; AVANTAGGIATO *et al.*, 2004; PAPPAS *et al.*, 2014). Doses superiores a 0,5% podem sofrer restrições para inclusão pois pode acarretar problemas no balanço dos diferentes componentes contemplados em uma formulação de ração. Além disso há de considerar o impacto do custo dessa aplicação em grandes proporções.

2.1.4.2. Composição do meio de adsorção, tempo de contato e ambiente

Entre as variações da composição para o meio onde será avaliada a adsorção, a mudança da concentração de íons hidrogênio normalmente é a mais utilizada. A adoção de diferentes valores de pH é vista como muito importante no processo de adsorção pois pode afetar a

interação adsorvente/adsorvato. A intensidade desse efeito pode ser maior ou menor conforme a composição e características da superfície do adsorvente, assim como as características do adsorvato. O valor de carga nula do adsorvente, também chamado ponto de carga zero (pH_{PZC}), é um índice que auxilia no entendimento dessas interações. Para valores de pH inferiores ao pH_{PZC}, a carga superficial é positiva e a adsorção de ânions é favorecida; e para valores de pH superiores ao pH_{PZC}, a carga superficial é negativa e a adsorção de cátions é favorecida (APEEL *et al.*, 2003). A carga superficial de cada partícula dependerá do pH da solução. Para que ocorra interação eletrostática entre adsorvente e adsorvato as cargas devem ser opostas (TOLEDO *et al.*, 2005).

Em animais monogástricos, como suínos, há uma grande mudança no pH ao longo do trato gastrointestinal, com pH baixo no estômago (1,5–4,5), aumentando no intestino delgado, com um pico na extremidade distal (7,5) e, posteriormente, caindo no ceco e cólon (6,5) (GRECO *et al.*, 2018). Como mencionado, o pH é um parâmetro importante que afeta a interação entre as moléculas de micotoxinas e os adsorventes. Assim, um adsorvente eficiente deve ter alta adsorção nos diferentes valores de pH encontrados ao longo do trato gastrointestinal.

Nos testes de adsorção relatados, têm sido reportados valores de pH desde 2,5 até 9, sendo que em geral os autores realizam a avaliação em dois valores diferentes. Além dos diferentes valores de pH utilizados, o método adotado para fazer a elevação do pH também pode diferir, podendo ser o procedimento dinâmico ou o estático. No método estático, diferentes tubos testes contendo a solução com os valores de pH a serem avaliados são elaborados, incubados a temperatura constantes por um período e ao final, alíquotas destes tubos são retiradas para determinação da concentração residual de micotoxina que não foi adsorvida, desta maneira tem-se o valor de adsorção para cada pH obtido de forma simultânea e independente em tubos separados. Já no método considerado dinâmico, os tubos com o valor de pH mais reduzido são elaborados, submetidos a um período de incubação, e então alíquotas destes tubos são retiradas para determinação da concentração residual de micotoxina permitindo expressar a adsorção que houve neste primeiro pH. Os mesmos tubos prosseguem na avaliação e para isso têm o valor de pH elevado para o valor mais alto, incubados novamente e alíquotas destes tubos são retiradas para determinação da concentração residual de micotoxina permitindo expressar a adsorção que houve neste pH final. Neste protocolo as adsorções em diferentes valores de pH são determinadas nos mesmos tubos de modo subsequente desde o pH mais reduzido até o pH mais elevado. Esse método é mais próximo ao que ocorre na realidade, e já foi adotado em alguns trabalhos, por exemplo Sabater-Vilar *et al.* (2007) e Avantagiatto *et al.* (2006, 2014). A adoção deste método é interessante pois considera um possível efeito promotor que pHs mais

ácidos possam ter sobre a adsorção de um adsorvente específico, assim como a dessorção que a elevação do pH no meio possa provocar. Os valores de pH adotados nos testes devem ser o mais próximo possível do pH do trato gastrointestinal da espécie alvo.

Quanto à composição do meio para realizar o teste, muitos trabalhos utilizam apenas água (YIANNIKOURIS *et al.*, 2003, 2004; RINGOT *et al.*, 2005; 2007) ou solução tampão (KONG *et al.*, 2014; SHAR *et al.*, 2016; AVANTAGGIATO, 2005; YIANNIKOURIS *et al*, 2013; WANG *et al.*, 2019). Apenas uma parcela menor de artigos relata na composição outros componentes além dos sais tamponantes tentando assim, simular o suco gastrointestinal através da utilização de enzimas e ácidos orgânicos (TAGNI *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 1996; VILA-DONAT *et al*, 2016). Alguns artigos consideraram a composição real inclusive retirando o suco gástrico de suinos (VEKIRU *et al*, 2007; VEKIRU *et al*, 2015). Vekiru *et al.* (2007) fizeram uma comparação entre a adsorção *in vitro* de AFB1 por CA e diferentes argilas, avaliada em tampão acetato, suco GI artificial e GI real. A maior adsorção foi observada em tampão, seguida pelo GI real e GI artificial. Isso pode indicar que o uso somente de tampão pode superestimar os resultados já que em sua composição existem poucos componentes que possam consistir em interferentes à adsorção da micotoxina pelo adsorvente. Além disso, observa-se que o GI artificial não substitui totalmente o GI real mostrando diferença entre os resultados obtidos.

A adição da matriz passível de estar contaminada, tal como o milho, é rara nos experimentos, mas estudos têm mostrado que os componentes da matriz podem interferir no processo de adsorção. Jaynes *et al.* (2007) compararam a adsorção de AFB1 em água e em suspensão de farinha de milho e observaram redução de cerca de 100 vezes na adsorção de AFB1 pelas argilas e CA na presença de farinha de milho. Lemke *et al.* (2001) também observaram redução na adsorção de AFB1 por CA ao adicionar farinha de milho no teste sugerindo que os componentes da matriz alimentar podem atuar como ligantes e cobrir a superfície do adsorvente diminuindo sua capacidade de adsorver as micotoxinas. Alguns artigos também avaliaram a interferência e possível adsorção de outros componentes no meio, por exemplo vitaminas (VEKIRU *et al.*, 2007) e antibióticos (GOOSSENs *et al*, 2012).

O tempo de incubação adotado nos testes também apresenta variações. Normalmente a primeira etapa, realizada em pH mais reduzido e simulando as condições gástricas, tem apresentado duração de 1 a 2 horas e a segunda, realizada com valores de pH mais elevados e simulando as condições intestinais, tem apresentado duração de 2 a 4 horas. Considerando-se que o protocolo *in vitro* deve simular o processo de digestão e absorção que ocorre na espécie alvo, o ideal é que o teste tenha a duração das fases de simulação gástrica e intestinal aproximada à fisiologia do animal de interesse. O efeito do tempo de contato é um fator importante a ser

estudado, sendo que o desejável é que a interação adsorvente e adsorvato ocorra no menor tempo possível, de modo que a micotoxina fique não acessível para absorção pelo organismo animal no início de sua passagem no trato gastrointestinal ou ao menos já no início do intestino. Caso o processo seja muito lento, há possibilidade de uma parcela considerável da micotoxinas ser absorvida pelo organismo antes da adsorção. A interação inicial das micotoxinas é com o epitélio intestinal, sendo que a ingestão e a subsequente distribuição tecidual são controladas pela absorção do TGI. A biodisponibilidade da micotoxinas é muito diversificada e difere entre as espécies animais (GRENIER e APPLEGATE, 2013), exceto para AFB1 que é 80% absorvida tanto em aves quanto suínos (AFSSA, 2009). DON apresenta índice de 55% de absorção em suínos e 5-20% em aves (CRAVET e LANCOUER, 2006; OSSELAERE *et al*, 2013) e FB1 apenas 3% em suínos e 1% em aves (BOUHET e OSWALD, 2007). A não absorção da micotoxinas sugere que o epitélio é repetidamente exposto a esses compostos tóxicos (como a FB1), e em concentrações mais altas do que outros tecidos, sofrendo danos. As células epiteliais intestinais são um componente crítico do sistema imunológico (BROOM, 2015). Assim, se a micotoxina estiver aderida ao adsorvente logo no início do processo, os efeitos podem ser evitados ou reduzidos.

As metodologias de avaliações *in vitro* têm realizado as avaliações utilizando diferentes volumes de solução, que é contida em tubos de testes que podem ser mantidos em repouso ou agitados de acordo com o protocolo seguido. Uma exceção a isto consistiu no protocolo proposto Minekus *et al.* (1995) utilizando um equipamento constituído de compartimentos e dutos simulando o trato gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno e íleo), onde o bolo alimentar composto de alimento, micotoxina e adsorvente, é movimentado através dos compartimentos e dutos com velocidade pré-estabelecida para simular a fisiologia animal, inclusive com a adição de secreção gástrica, biliar e pancreática na sequência e nos tempos que o processo iria ocorre no organismo animal. Avantagiatto *et al.* (2004; 2007) utilizaram esse modelo e alegaram que os resultados obtidos no estudo foram consistentes com os dados farmacocinéticos disponíveis para as micotoxinas estudadas (DON, NIV, FB1, FB2, AFB1, OCRA e ZEA).

2.1.4.3. Temperatura

O controle da temperatura nos testes de adsorção é importante pois esta exerce efeito sobre processos de adsorção, principalmente na constante de velocidade de adsorção. O aumento

da temperatura pode ocasionar aumento de energia cinética e da mobilidade das moléculas do adsorvato, e ainda provocar um aumento na taxa de difusão do adsorvato (JIMENEZ *et al*, 2004).

Quando a temperatura aumenta pode ocorrer uma desobstrução de poros no interior da estrutura do adsorvente, permitindo a penetração de moléculas maiores do adsorvato (DOGAN *et al.*, 2006). A solubilidade do adsorvato também pode ser afetada pelo aumento na temperatura, assim como a viscosidade da solução (KHATTRI e SINGH; 1999). Assim, diferenças de temperatura nos testes podem influenciar nos resultados obtidos.

A temperatura de incubação mais utilizada nos estudos têm sido de 37°C, mas há variações: Galvano *et al.* (2006; 2007; 2008) trabalharam a 20°C, Avantagiatto *et al.* (2004) em temperatura ambiente, KONG *et al.* (2014) a 39°C. Para ficar mais próximo da realidade, o ideal seria adotar a temperatura corporal do animal alvo, sendo relatado para frangos a temperatura de 41°C e para suínos 39°C, por exemplo.

2.1.4.4. Contaminação com micotoxinas

Com relação ao tópico micotoxinas, dois fatores devem ser considerados: a concentração da micotoxina utilizada e a presença individual ou simultânea de micotoxinas.

Em geral, a contaminação com micotoxina nos testes *in vitro* é feita artificialmente, pela adição de padrões analíticos em concentrações na maioria das vezes bem elevadas. Como o cálculo da adsorção *in vitro* é feito baseado na resposta cromatográfica, utilizado na maioria das vezes a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ou não a espectrometria de massa (GCMS e LCMS/MS), o limite de detecção e quantificação do método deve ser considerado. Desta maneira, muitas vezes empregam-se concentrações de micotoxinas elevadas visando uma leitura confiável da micotoxina residual (não adsorvida).

Nas avaliações *in vitro,* a concentração das micotoxinas pode ser mantida constante ou ser empregada com diferentes níveis. A variação nos níveis de concentração das micotoxinas é utilizada quando a obtenção das isotermas de adsorção é desejável. Para construção da isotermas são utilizadas concentrações crescentes de micotoxinas mantendo fixa a quantidade de adsorvente, bem como a temperatura, ou seja, sob condições isotérmicas (RAMOS e HERNANDEZ, 1996). Através da isoterma é possível determinar a capacidade máxima de adsorção do adsorvente e avaliar o grau de afinidade com o adsorvato/composto (AYOTAMUNO *et al.*, 2006). Os gráficos representando as equações modeladas para o processo de adsorção podem fornecer informações importantes sobre o mecanismo de adsorção, por exemplo: a isoterma côncava indica comportamento desfavorável à remoção do composto

estudado enquanto que a isoterma convexa indica que o processo de adsorção é favorável (McCABE, SMITH e HARRIOTT, 2001).

Estudos com a utilização de concentrações únicas e constantes da micotoxina são relatados e empregados quando o interesse é somente triar materiais quanto à capacidade de adsorção (GALVANO *et al.*, 1996, 1997, 1998; KONG *et al.*, 2014).

Embora uma percentagem muito elevada de alimentos para animais à base de cereais esteja contaminada com mais de uma micotoxina como já mencionado, de acordo com a revisão de VILA-DONAAT *et al.* (2018) sobre esse tema, a maioria dos estudos ainda se concentra na eficácia da adsorção de apenas uma micotoxina específica. Poucos são os trabalhos que consideraram a presença simultânea de duas ou mais micotoxinas na solução teste (AVANTAGGIATO *et al.*, 2004, 2014; FAUCET-MARQUIS, *et al*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015) entretanto, a presença de outras micotoxinas pode afetar o nível de adsorção de uma micotoxina pois pode haver uma competição por sítios de ligação do adsorvente.

2.2. Conclusão

A ocorrência de micotoxinas ainda representa um grande problema econômico e de saúde humana e animal. É muito importante investir na prevenção e evitar o desenvolvimento fúngico e a produção da micotoxina no alimento. Considerando os níveis de contaminação encontrados nos produtos/alimentos, pode-se notar que as práticas de prevenção não têm sido suficientes para garantir a qualidade dos mesmos. Assim, ações aplicadas diretamente às micotoxinas são necessárias, como o uso do AAM.

Esta revisão mostra que os estudos para desenvolvimento de tecnologias e de aditivos antimicotoxinas têm se diversificado e evoluído bastante. Observa-se que a crescente coocorrência de micotoxinas começa a refletir nos estudos e pesquisas que passam a ser voltados a presença multi-micotoxinas nos últimos anos (a partir de 2014).

Os testes *in vitro* mostraram muita variação entre as metodologias adotadas sugerindo uma necessidade de padronização. Mas antes disso, é importante que o método seja aprimorado no sentido de contemplar o máximo de variáveis possíveis, relacionadas ao animal e dieta, já que podem interferir nos resultados.

Apesar do teste *in vitro* constituir-se apenas em uma simulação das condições fisiológicas do intestino animal, ele é muito importante pois fornece subsídios para seleção de potenciais adsorventes e auxiliam na elucidação dos mecanismos de interação dos compostos e possíveis

interferentes. Além disso, contribuem para minimizar a utilização de animais em avaliações *in vivo* e economiza tempo e recursos.

Referências

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale; **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments**: Maisons-Alfort, France, 2009; pp. 1–308.

AKAR, T. et al. Biosorptive detoxification of zearalenone biotoxin by surface-modified renewable biomass: process dynamics and application. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1850–1861, 15 mar. 2019.

ARMANDO, M.R., PIZZOLITTO R.M., DOGI R.P., CRISTOFOLINI A, MERKIS C, POLINI V, DALCERO AM, CAVAGLIERI LR. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic Saccharomyces cerevisiae strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**. 113:256–264. 2012.

AYOTAMUNO, M.J., KOGBARA, R.B., OGAJI, S.O.T., PROBERT, S.D. Petroleumcontaminated ground-water: Remediation using activated carbon. **Applied Energy.** 83, p. 1258–1264, 2006.

BINDER E.M., TAN L.M., CHIN L.J., HANDL J., RICHARD J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, 137: 265–282. 2007.

BOUHET, S.; OSWALD, I.P. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. **Molecular Nutricion and Food Research**. 2007, 51, 925–931.

BRASIL **ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada **RDC 07/2011.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/. Acesso em 8 ago. 2018.

BRASIL.**MAPA**. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. Acesso em 8 ago. 2018.

BROOM, L. Mycotoxins and the intestine. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 262–265, 1 dez. 2015.

CARDOSO, S. *et al.* Efficacy of piperine in reducing the effects of aflatoxin intoxication in broiler chickens: a preliminary report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.63, n.2, p.495-498, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n2/31.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2018.

CAVRET, S. *et al.* Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary in vitro tests. **Food Additives and Contaminants** Part A, v. 27, n. 1, p. 43–53, 2010.

CAVRET S., LECOEUR S. Fusariotoxin transfer in animal. **Food Chemistry and Toxicology**. 44:444–453. 2006. doi: 10.1016/j.fct.2005.08.021.

CHELI, F. *et al.* EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 37, p. 315–325, 1 mar. 2014.

CHENG-JI, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of mycotoxins. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 127–133, 1 set. 2016.

CHO, K. J. *et al.*, 2010. *In vitro* degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis.* **Biotechnology Letters**, 32 (12). 2010, pp. 1921-1924

CIEGLER, A.; LILLEHO, E. B.; PETERSON, J, R e HALL, H. H. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. **Applied Microbiology**. 14:934–939.

DEVEGOWDA, G., MURTHY, T.N.K. Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. In: The Mycotoxin Blue Book (D. Diaz, eds). Nottingham University Press, United Kingdom, 2005, 25-56.

DI GREGORIO, M.C.; NEEFF, D.V.D.; JAGER, A.V.; CORASSIN, C.H.; CARÃO, Á.C.D.P.; ALBUQUERQUE, R.D.; AZEVEDO, A.C.D.; OLIVEIRA, C.A.F. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin**. 2014, 33, 125–135.

DOGAN, M.; ALKAN, M.; DEMIRBAS, Ö. Adsorption kinetics of maxilon blue GRL onto sepiolite. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, p. 89-101, nov. 2006.

DIAZ, D.E.; SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: pratical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: DIAZ, D. E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 323-339.

DÖLL, S., DÄNICKE, S., VALENTA, H., FLACHOWSKY, G. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. **Archives of Animal Nutrition**, 58, 2004, 311-324

DOLL, S.; DANICKE, s.; VALENTA, H.; FLACHOWSKY, G. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 311–324, 2004.

DUBININ M.M. Porous Structure and adsorption properties of activated carbons. Chemistry and Physics of Carbon/A Series of Advances. New York: Marcel Dekker, p. 51-120. 1965.

EFSA, 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. **The European Food Standard Agency (EFSA)** Journal, 39, 1-27.

EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the safety of the product "Biomin BBSH 797" for piglets, pigs for fattening and chickens for fattening **The European Food Standard Agency (EFSA) Journal.**

EFSA, 2011. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on the safety and efficacy of bentonite (dioctahedral montmorillonite) as feed additive for all species. EFSA Journal 9(2): 24

EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S., & AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food and Chemical Toxicology, 36(4), 1998, 321-326.

EL-NEZAMI, H.S., CHREVATIDIS, A., AURIOLA, S., SALMINEN, S., MYKKÄNEN, H. Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium. Food Additives & Contaminants 19, 2002, 680–686.

EVANS, J., DAWSON, K. The ability of Mycosorb to bind toxins present in endophyte-infected tall fescue. **Science and Technology in the feed industry.** 2008. Disponível em: http://www.engormix.com/e_articles_view.

asp?art=676&AREA=MYC. Acesso em 14 mai. 2018.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. (2011).Cereal supplyand demand brief. In FAO cereal supplyand demand situation. Disponível em http://www.fao.org/home/en/. Acesso em 20 jan. 2019.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** FAOSTAT. Food and agriculture data. Corn Production. Disponível em http://www.fao.org/home/en/. Acesso em 20 jan. 2019.

FAUCET-MARQUIS, V. *et al.* Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7583–7596, 13 set. 2014.

FREIRE, F., VIEIRA, I., GUEDES, M., MENDES, F. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 110, p. 48, Out. 2007.

FRUHAUF, S., SCHWARTZ, H., OTTNER, F., KRSKA, R., VEKIRU, E., 2012. Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B1 and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**. 29, 217–231.

FUCHS, S. *et al.* Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1398–1407, 1 abr. 2008.

GALVANO, F.; RITIENI, A.; PIVA, G.; PIETRI, A. Mycotoxins in the human food chain. In: DIAZ, D. E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press. p. 187-224, 2005.

GALVANO, F., A. PIETRI, T. BERTUZZI, G. FUSCONI, M. GALVANO, A. PIVA, AND G. PIVA. 1996. Reduction of carry-over of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. **Journal of Food Protection**. 59:551-5544.

GALVANO, F., A. PIETRI, B. FALLICO, T. BERTUZZI, S. SCIRE, M. GALVANO, e R. MAGGIORE. 1996. Activated carbons: in vitro affinity for aflatoxin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **Journal of Food Protection**. 59:545-5500.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 198–203, mar. 2011.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; RANGSAZ, N.; AZIZI, S. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) effect on biochemical and pathological parameters of liver and kidney in chicken aflatoxicosis. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 5, p. 780–787, 3 maio 2016.

GOERTZ, A.; ZUEHLKE, S.; SPITELLER, M.; STEINER, U.; DEHNE, H.W.; WAALWIJK, C.; VRIES, I.; OERKE, E.C. Fusarium species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. **European Journal of Plant Pathology.** 2010, 128, 101–111.

GOOSSENS, J. *et al.* Influence of mycotoxins and a mycotoxin adsorbing agent on the oral bioavailability of commonly used antibiotics in pigs. **Toxins**, v. 4, n. 4, p. 281–95, 2012.

GRECO, D. *et al.* Comparative efficacy of agricultural by-products in sequestering mycotoxins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1623–1634, 2019.

GRENIER, B.; APPLEGATE, T.J. Modulation of intestinal functions upon mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals **Toxins**, 5 (2013), pp. 396-430.

GRENIER, B.; OSWALD, I. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 285–313, 5 ago. 2011.

GU, C.; LI, H.; TEPPEN, B. J.; BOYD, S. A. Octachlorodibenzodioxin formation on Fe(III)-montmorillonite clay. **Environmental Science and Technology**. 2008, 42, 4758–4763.

GU, C. et al. Clay mediated route to natural formation of polychlorodibenzo- p -dioxins. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 3445–3451, 2011.

HAGLER, W. M.; TOWERS JUNIOR, N. R.; MIROCHA, C. J.; EPPLEY, R. M.; BRYDEN, W. L. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? In: Summerell, B. A.; Leslie, J. F.; Backhouse, D.; Bryden, W. L.; Burgess, L. W. (Ed.) **Fusarium.** St. Paul: APS Press, p.321-331, 2001.

HASKARD, C. A. *et al.* Surface Binding of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, jul. 2001. 67(7):3086-91.

HEINL, S., HARTINGER, D., THAMHESL, M., VEKIRU, E., KRSKA, R., SCHA TZMAYR, G., *et al.* (2010). Degradation of fumonisin B-1 by the consecutive action of two bacterial enzymes. **Journal of Biotechnology**. 145, 120–129. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.11.00

HEINL, S., HARTINGER, D., THAMHESL, M., SCHATZMAYR, G., MOLL, W.-D., GRABHERR, R., 2010. An aminotransferase from bacterium ATCC 55552 deaminates hydrolyzed fumonisin B1. **Biodegradation** 22, 25–30.

HUFF, W.E., DOERR, J.A., 1981. Synergism between aflatoxin and ochratoxin in broiler chickens. **Poultry Science**. Mar. 1981. 60(3):550-5.

HUFF, W. E.; HAGLER, W.M. 1985. Density segregation of aflatoxin-contaminated corn. **Cereal Chemistry**, 57, 236-238.

HUSSEIN, S.H.; BRASELL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001

HUWIG A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxification of animals feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**.; v.122: p.179–188. 2001.

IARC. 2002. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. World Health Organization, **IARC**, Lyon, France, 82: 171.

ITO, M. *et al.* Bacterial cytochrome P450 system catabolizing the Fusarium toxin deoxynivalenol. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1619–28, 1 mar. 2013.

JANS, D., PEDROSA, K., SCHATZMAYR, D., BERTIN, G. e GRENIER, B., 2014. Mycotoxin reduction in animal diets. In: Leslie, J.F. and Logrieco, A. (eds.) Mycotoxin reduction in grain chains. Wiley-Blackwell, New York, NY, USA, pp. 101-115.

JARD, G. *et al.* Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation**. Food Additives e Contaminants**: Part A, v. 28, n. 11, p. 1590–1609, 2011.

JAYNES, W. F.; ZARTMAN, R. E.; HUDNALL, W. H. Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1–3, p. 197–205, 1 abr. 2007.

JIMENEZ, R. S.; BOSCO, S. M.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolecita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 734- 738, 2004.

JOUANY, J.P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**. 137, 342–362.

KHATTRI, S. D.; SINGH, M. K. Colour removal from dye wastewater using sugar cane dust as an adsorbent. 1999. **Singh/Adsorption Science & Technology**. Vol. 17 No.4.

KOGAN, G., KOCHER, A., 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, 109, 161-165.

KOLOSOVA A., STROKA J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: A review**. World Mycotoxin Journal**. 2011;4:225–256. doi: 10.3920/WMJ2011.1288

KONG, C.; SHIN, S.; KIM, B. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an in vitro approach. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 346, 2014.

KOSICKI, R., BŁAJET-KOSICKA, A., GRAJEWSKI, J., TWARUŻEK, M., 2016. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. **Animal Feed Science and Technology**. 215, 165–180.

KRAUSE, O.G.; RICHARDSON, C.R.; CASTLEBERRY, R.E.; COBB, C.W. 1989 Biological response of chicks fed sorghum grain based diets with added grain specific enzymes mixture and yeast. Texas **Technology of Agricultural Science** 5, 727–735.

LABUDA, R.; TANCINOVA, D.; HUDEC, K. Identification and enumeration of Fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. 2003; 10(1):61–66

LEMKE, S. L.; OTTINGER, S. E.; MAYURA, K.; AKE, C.L.; PIMPUKDEE, K.; WANG, N.; PHILLIPS, T.D. Development of a multi-tired approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. **Animal Feed Science and Technology**. v.93, p. 17- 29. 2001.

LOI, M.; FANELLI, F.; ZUCCA, P.; LIUZZI, V.C.; QUINTIERI, L.; CIMMARUSTI, M.T.; MONACI, L.; HAIDUKOVSKI, M.; LOGRIECO, A.F.; SANJUST, E.; *et al.* Aflatoxin B1and M1degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and redox mediators.**Toxins**. 2016,8, 245.

LIU, D.L., YAO, D.S., LIANG, Y.Q., ZHOU, T.H., SONG, Y.P., ZHAO, L., Ma, L., 2001. Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillariella tabescens* (E-20). **Food and Chemical Toxicology**, 39, 461-466.

LIU, D.L.; YAO, D.S.; LIANG, R.; MA, L.; Cheng, W.Q.; GU, L.Q. Detoxifcation of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. **Food and Chemical Toxicology**.1998, 36, 563–574.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Why do fungi produce mycotoxins? In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. A. (Eds.). Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food. New York: CRC Press, 2007. p. 121–134.

MAGNOLI, A. P. *et al.* Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. **Poultry Science**, v. 90, p. 48–58, 2011.

MATUMBA,L.; van POUCKE, C.; EDIAGE, E.N.; JACOBS, B.; DE SAEGER, S. 2015. Effectiveness of hand sorting, flotation/washing, dehulling and combinations thereof on the decontamination of mycotoxin-contamineted white maize. **Food Additives Contamination**. Part A 32, 960-969.

McCABE, W. L., SMITH, J. C., HARRIOTT, P. Unit Operations of Chemical Engineering.6. Ed. McGraw-Hill, p.1114. 2001.

MCKEINZIE, K. S.; KUBENA, L. F.; DENVIR, A. J.;ROGERS, T. D.; HITCHENS, G. D.; BAILEY, R.H.; HARVEY, R.B.;. BUCKLEY, S. A.; PHILLIPS, T. D. 1998. Aflatoxicosis in turkey poults is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**. 77, 1094-1102.

MEDINA, A. *et al.* Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action**. Current Opinion in Food Science**. V.17, Oct. 2017, Pages 41-48. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.008.

MEISSONNIER, G.M., RAYMOND, I., LAFFITTE, J., COSSALTER, A.M., PINTON, P., BENOIT, E., BERTIN, G., GALTIER, P., OSWALD, I.P., 2009. Dietary glucomannan improves the vaccinal response in pigs exposed to aflatoxin B1 or T-2 toxin. **World Mycotoxin Journal**, 2, 161-172.

MESTERHAZY, K,; LEMMENS, M.; REID, I. M. 2012. Breeding for resistence to ear rots caused by Fusarium spp. In maize – a review. **Plant Breed**. 131, 1-19.

MEZES, M., BALOGH, K., TOTH, K., 2010. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins – a review. **Acta Veterinaria Hungarica**. 58, 1–17.

MINEKUS, M.; MARTEAU, P.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. A multi compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine**. Alternatives to Laboratory Animals**.1995, 23, 197-209.

MOBIO, T.A. *et al.* Lipid peroxidation as a sensitive marker of cellular response to fumonisin B1: implication in cytotoxicity and inhibition of protein and DNA syntheses. **Toxicology Letters**, v.88, p.71, 1996.

MOSHTAGHIAN, J.; PARSONS, C.M.; LEEPER, R.W.; HARRISON, P.C.; KOELKEBECK, K.W. Effect of sodium aluminosilicate on phosphorus utilization by chicks and laying hens. **Poultry Science**. 1991, 70, 955–962.

MOTAWEE, M. M. AND ABD EL-GHANY, M. A. Effect of Some Lactic Acid Bacteria Strains on Aflatoxins Reduction in Some Dairy Foods. The 6th Arab and 3rd International Annual Scientific Conference on: Development of Higher Specific Education Programs in Egypt and the Arab World in the Light of Knowledge Era Requirements. 2011.

NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.

OSSELAERE A, SANTOS R, HAUTEKIET V, DE BACKER P, CHIERS K, DUCATELLE R, CROUBELS S. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small intestine. **Plos One** 8:e69014. 2013, doi:10.1371/journal. pone.0069014

PAPPAS, A.C., TSIPLAKOU, E., GEORGIADOU, M., ANAGNOSTOPOULOS, C., MARKOGLOU, A.N., LIAPIS, K., ZERVAS, G., 2014. Bentonite binders in the presence of mycotoxins: results of in vitro preliminary tests and an in vivo broiler trial. **Applied Clay Science**. 99, 48–53.

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. **The past, present, and future trends of biosorptionBiotechnology and Bioprocess Engineering**, 2010. 15, 86-102.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., HADJEBA-MEDJDOUB, K., BALLET, N., SCHRICKX, J., FINK-GREMMELS, J., 2015. Assessment and characterization of yeast-based products intended to mitigate ochratoxin exposure using in vitro and in vivo models. **Food Additive e Contaminants**. 32, 604–616.

PAYROS, D. *et al.* Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 12, p. 2931–2957, 23 dez. 2016.

PELTONEN, K. *et al.* Aflatoxin B1 Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, 2001. 84(10):2152-6. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74660-7

PENG, W. X.; MARCHAL, J. L. M.; VAN DER POEL, A. F. B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. **Animal Feed Science and Technology**, 2018.

PEREYRA, C. M. *et al.* In vitro ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. 2015 Animal Feed and Metabolites. **Revista brasileira de Medicina veterinária**. 37 (1).

PIERRON, A. *et al.* Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29105, 6 set. 2016.

PIERRON, A.; ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P. Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. **Animal Nutrition**, v. 2, p. 63–68, 2016. PIONEER HI-BRED. International, Inc. fumonisin-Detoxifying Enzymes. World Patent 1996006175, 11 August 1995. **Adsorption Science & Technology**, Brentwood, v. 17, n. 4, p. 269-282, 2009.

PINOTTI, L., OTTOBONI, M., GIROMINI, C., DELL'ORTO, V., CHELI, F., 2016. Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal byproducts. **Toxins**. 8, 45.

PISTOL, G.C., GRAS, M.A., MARIN, D.E., ISRAEL-ROMING, F., STANCU, M., TARANU, I., 2014. Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro- and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/ NF-kB signaling molecules in pigs. **British Journal Nutrition**. 111, 452–464.

PIZZOLITTO R. P.; BUENO D. J.; ARMANDO M. R.; CAVAGLIERI L.; DALCERO A. M.; SALVANO M. A. Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. Intech Open Access Publisher, p.1-20, 2011.

PIZZOLITTO, R. P.; SALVANO, M. A.; DALCERO, A. M. Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-ocurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v.4156, p.214-221, 2012.

POPPENBERGER, B.; BERTHILLER, F.; LUCYSHYN, D.; SIEBERER, T.; SCHUHMACHER, R.; KRSKA, R.; KUCHLER, K.; GLÖSSL, J.; LUSCHNIG, C.; ADAM, G. Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemestry**. 2003, 278, 47905–47914.

RAMALES-VALDERRAMA, R. *et al.* Biosorption of B-aflatoxins Using Biomasses Obtained from Formosa Firethorn [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 218, 13 jul. 2016

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rats small intestine. **Mycopathologia**, v. 134, p .27-30, 1996.

RAMOS, A.J., HERNANDEZ, E., PLA-DELFINA, J.M., MERINO, M., 1996. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. **International Journal of Pharmaceutics**, 128, 129-137.

RAMOS, A.J.; FINK-GREMMELS, J.; HERNANDEZ, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. **Journal of Food Protection**, 1996; v. 59, p. 631–641.

RAMOS, A.J., HERNANDEZ, E., 1996. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. Animal Feed Science and Technology 62, Anim. Sci. 71, 1209–1218. 263–269

Rappe, C. Dioxin, patterns and source identification. Fresenius. Journal of Analytical Chemistry. 1994, 348, 63–75.

RAVINDRAN, G., GILL, R.J., BRYDEN, W.L., 1996. Aflatoxin, fumonisin and zearalenone contamination of Australian maize. Proceedings of the World's Poultry Congress, New Delhi. WPSA (India Branch), Pune, India 273.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicosesan overview. **International Journal of Food Microbiology**. 2007, 119, 3−10.

RILEY, R. T.; AN, N. H.; SHOWKER, J. L.; YOO, H. S.; NORRED, W. P.; CHAMBERLAIN, W. J.; WANG, E.; MERRIL JR., A. H.; MOTELIN, G.; BEASLEY, V.R.; HASCHEK, W. M. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.118, p.105-112, 1993.

RINGOT D, LERZY B, CHAPLAIN K, BONHOURE JP, AUCLAIR E, LARONDELLE Y (2007) In vitro biosorption of ochratoxin A on the *yeast* industry by-products: comparison of isotherm models. **Bioresour Technology**. 98:1812–1821

RINGOT D, LERZY B, BONHOURE JP, AUCLAIR E, ORIOL E, LARONDELLE Y (2005) Effect of temperature on in vitro ochratoxin biosorption onto *yeast* cell wall derivatives. **Process Biochemestry**. 40:3008–3016

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed**. Toxins** 2012, 4, 663–675.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y., RUIZ, M. J., FONT, G. & BERRADA, H. 2013. Exposure estimates to Fusarium mycotoxins through cereals intake. **Chemosphere**, 93, 2297-2303

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M S. M. ; FIGUEIREDO, M. C. B. ; MORAIS, J. P. S. ; SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C. **Valorização de resíduos da agroindústria**. 2011. Vol.1. Disponível em: <http://www.sbera.org.br/2sigera/obras/p12.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2018.

SABATER-VILAR, M; MALEKINEJAD, H; SELMAN, M.H.J.; VAN DERDOELEN, M.A.M; FINK-GREMMELS, J. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**. N.163, p. 81–90. 2007.

SANTOS, P. S. **Ciência e Tecnologia de Argilas**, vol. 2, Ed. Edgard Blucher Ltda, S. Paulo, SP (1992).

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K.C.; BITTENCOURT, K.O.; SCUSSEL, V.M. 2014. Ozone treatment effiency on Fusarium graminearum and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (Triticum aestivum L.) quality and germinatin**. Journal of stored Product Research**. 59, 245-253.

SCOTT, P. M. Recent research on fumonisins: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 2, p. 242–248, 2012.

SCUDAMORE, K.A.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M.T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Additives and Contaminants**. 1998, 15, 30–55.

SHANAKHAT, H.; SORRENTINO, A.; RAIOLA, A.; ANNALISA, R.; PAOLO, M.; SILVANA, C. Current methods for mycotoxins analysis and 1jsfa.8933.

SHANTHA, T. Fungal degradation of aflatoxin B_1. **Natural Toxins**, 7 (5) (1999), pp. 175-178

SHAR, H. Z. *et al.* Banana peel: an effective biosorbent for aflatoxins. 2016. **Food additives and contaminants**: part a, 2016 vol.33, N05, 849-860

SHETTY, P.H., JESPERSEN, L., 2006. Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends Food Science and Technology**. 17, 48–55.

SOLÍS-CRUZ, B. *et al.* Evaluation of chitosan and cellulosic polymers as binding adsorbent materials to prevent Aflatoxin B1, Fumonisin B1, Ochratoxin, Trichothecene, Deoxynivalenol, and Zearalenone mycotoxicoses through an in vitro gastrointestinal model for poultry. **Polymers**, v. 9, n. 10, p. 1–10, 2017.

SOUZA, C. *et al. Melaleuca alternifolia* essential oil abrogates hepatic oxidative damage in silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed with an aflatoxin-contaminated diet. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 221, p. 10–20, 2019.

STREIT, E. *et al.* Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 788–809, 1 out. 2012

TAKAHASHI-ANDO, N.; TOKAI, T.; HAMAMOTO, H.; YAMAGUCHI, I.; KIMURA, M. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2005, 67, 838–844

TANG, Y.; XIAO, J.; CHEN, Y.; YU, Y.; XIAO, X.; YU, Y.; WU, H. Secretory expression and characterization of a novel peroxiredoxin for zearalenone detoxification in Saccharomyces cerevisiae. **Microbiology Research**. 2013, 168 , 6–11

TANGNI, E.K., 2003. **Occurrence of mycotoxins in beer, exposure assessment for consumers and development of biological detoxification options for the control of ochratoxin A during brewing.** Thesis.

TEDESCO, D., TAMENI, M., STEIDLER, S., GALLETTI, S., DI PIERRO, F., 2003. Effect of silymarin and its phos-pholipid complex against AFM1 excretion in an organic dairy herd, Milchwissenschaft, 58: 416-419

TEDESCO, D., STEIDLER, S., GALLETTI, S., TAMENI, M., SONZOGNI, O., RAVAROTTO, L., 2004, Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks, Poultry Science., 83 (11): 1839-1843

THIEU, N. Q.; OGLE, B.; PETTERSSON, H. Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. **Tropical animal health and production**, v.40, n.2, p. 649-56, dez. 2008.

TRISTAN, T.Q. Dinâmica toxicológica de aflatoxinas em alimentos de origen animal em Aguascalientes y Querétaro. Santiago de Querétaro: Consejo Nacional de Ciência y Tecnologia; Edicion Comunicación del Centro, 2002. 117p.

TOLEDO, B. I. *et al.* Bisphenol a removal from water by activated carbon, Effects of carbon characteristics and solution chemistry. **Environmental Science Technology**, v. 39, p. 6246–6250, 9 jul. 2005.

VARGAS, E.A.; PREIS, R.A.; CASTRO, L.; SILVA, C.M.G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**. 2001, 18, 981–986.

VANHOUTTE, I., AUDENAERT, K., DE GELDER, L., 2016. Biodegradation of mycotoxins: tales from known and unexplored worlds. **Frontiers in Microbiology**. 7, 1–20.

VEKIRU, E. *et al.* Investigation of various adsorbents for their ability to bind Aflatoxin B1. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 1, p. 27–33, 2007.

VEKIRU, E. et al. *In vitro* binding assessment and *in vivo* efficacy of several adsorbents against aflatoxin B $_1$. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 4, p. 477–488, 17 ago. 2015.

VEGA, M. F. *et al.* Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 715–723, 1 out. 2017.

VIDAL, A., MARÍN, S., RAMOS, A.J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V., 2013. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food Chemestry Toxicology**. 53, 133–138.

VIOTTI, G. C. DE A. Desenvolvimento e caracterização de argilas organofílicas para uso em alimentação animal como adsorvente inativador de micotoxinas: aflatoxina B1 e fumonisina B1. 2006. Tese.

VILA-DONAT, P. *et al.* A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

van der WESTHUIZEN, L., SHEPHARD, G. S., SCUSSEL, V. M., COSTA, L. L. F., VISMER, H. F., RHEEDER, J. P., *et al.* (2003). Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(18), 5574e5578.

VLATA, Z.; PORICHIS, F.; TZANAKAKIS, G.; TSATSAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. A study of zearalenone citotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology Letters**, v. 165, p. 274-281, 2006.

WANG, G. *et al.* Biodegradation of deoxynivalenol and its derivatives by Devosia insulae A16. **Food Chemistry**, v. 276, p. 436–442, 15 mar. 2019.

WEN, J.; MU, P.; DENG, Y. Mycotoxins: cytotoxicity and biotransformation in animal cells. **Toxicology research**, v. 5, n. 2, p. 377–387, 1 mar. 2016.

WENG, C.Y.; MARTINEZ, A.J.; PARK, D. L. 1994. Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. **Food additives and Contaminants**. 11, 649-658.

WHITLOW, L. **Evaluation of mycotoxin binders**. Proceedings of the 4th Mid-Atlantic Nutrition …, 2006.

WIELOGÓRSKA, E.; MACDONALD, S.; ELLIOTT, C. T. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 3, p. 419–433, jun. 2016.

WU, Q., JEZKOVA, A., YUAN, Z., PAVLIKOVA, L., DOHNAL, V., AND KUCA, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**. 41, 1–7. doi: 10.1080/03602530802563850

YEHIA, R. S. (2014). Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 45,127e133.

YI, P. *et al.*. Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27 (5) (2011), pp. 1035-1043

YIANNIKOURIS A, KETTUNEN J, APAJALAHTI E, PENNALA A, MORAN CA (2013) Comparison of the sequestering properties of *yeast* cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three in vitro models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone. **Food Additives and Contaminants**. 30(9):1641–1650

YIANNIKOURIS A, POUGHON L, CAMELEYRE X, DUSSAP CG, FRANÇOIS J, BERTIN G, JOUANY JP (2003) A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letter**. 25:783–789

YIANNIKOURIS, A.; ANDRÉ, G.; BULÉON, A., JEMINET, G.; CANET, I.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J. P. (2004) Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with beta-d-glucans. **Biomacromolecules**. 5:2176–2185

YU, Y.; WU, H.; TANG, Y.; QIU, L. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from Acinetobacter sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification. **Microbiology Research**. 2012, 167 , 121–126.

ZACHARIASOVA, M., DZUMAN, Z., VEPRIKOVA, Z., HAJKOVA, K., JIRU, M., VACLAVIKOVA, M., ZACHARIASOVA, A., POSPICHALOVA, M., FLORIAN, M., HAJSLOVA, J., 2014. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**. 193, 124–140.

ZAVALA-FRANCO, A. *et al.* Assessing the Aflatoxin B1 Adsorption Capacity between Biosorbents Using an In Vitro Multicompartmental Model Simulating the Dynamic Conditions in the Gastrointestinal Tract of Poultry. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 484, 21 nov. 2018.

ZHANG, W. B.; XUE, M.; LI, Y. MU, Z.CHEN, J. LI, *et al.* Screening a strain of *Aspergillus niger*and optimization of fermentation conditions for degradation of aflatoxin B_1. **Toxins**, 6 (11) (2014), pp. 3157-3172

ZHAO, Z. *et al.* Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. **Food Control**, v. 57, p. 362–369, 2015.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin**. Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.

3. ADSORÇÃO DE MICOTOXINAS EM CARVÕES ATIVADOS: ESTUDO DE FATORES INTERFERENTES

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que causam prejuízos à saúde dos animais e seres humanos. A incidência de contaminação de micotoxinas em grãos de cereais e alimentos processados a partir deles têm sido relatadas em todo o mundo, principalmente em produtos destinados à alimentação animal. Uma forma muito utilizada para minimizar os efeitos das micotoxinas é a utilização de compostos adsorventes, que podem ser adicionados à ração. Este trabalho caracterizou cinco carvões ativados (quanto à acidez, área superficial, distribuição de poros e morfologia da superfície através de Micrsocopia Eletrônica de Varredura) e realizou a avaliação quanto a adsorção em solução multi-micotoxinas. O CA5 apresentou maior adsorção para as micotoxinas estudadas (AFB1, DON, FB1 e ZEA) na condição MIX (mistura de todas no meio) e foi selecionado para um estudo mais aprofundado. Para este CA foram verificados os efeitos do pH, PCZ (ponto de carga zero), tempo de contato, efeito da concentração, composição do meio e da dinâmica de pH na adsorção das micotoxinas, além de serem obtidas as isotermas. A adsorção de AFB1 e ZEA não foi afetada pela mudança do pH (3 para 6) e nem pela presença de outras toxinas no meio, diferente da adsorção de DON e FB1. A adsorção de DON foi a mais sensível a mudanças e a adsorção de FB1 apresentou maior influência do pH. Os mecanismos de interação entre micotoxina/adsorvente variaram, para AFB1 e ZEA a característica hibrofóbica foi a mais importante. No caso de FB1, constatou-se que a dessorção em pH6 pode ser decorrente do PCZ do CA e das conformações estruturais da micotoxina que variam na faixa de pH do estudo. Não ficou claro o que levou a dessorção de DON em pH6. Mesmo assim, o CA5 mostrou adsorções elevadas para todas as micotoxinas, inclusive DON, que é de difícil adsorção por meio de outros adsorventes como relatado em diversos trabalhos. Analisar as características do adsorvente e do adsorvato auxilia no entendimento das interações moleculares e parâmetros que levam a uma maior adsorção, bem como os interferentes desse processo. Tais informações podem orientar uma produção de adsorventes que atendam a determinadas demandas. Apesar dos resultados promissores, é preciso confirmar a eficácia deste adsorvente *in vivo*.

Palavras-chave: Adsorvente; Micotoxinas; Coocorrência; Teste *in vitro*; Carvão ativado

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that cause harm to the health of animals and humans. High incidence rates of contamination of mycotoxins in cereal grains and processed foods from them have been reported worldwide, especially in animal feed products. A widely used way to minimize the effects of mycotoxins is the use of adsorbent compounds, which can be added to the feed. This work characterized five activated carbons (acidity, surface area, pore distribution and surface morphology through SEM) and performed the evaluation of multi-mycotoxin adsorption. The CA5 presented higher adsorption for the studied mycotoxins (AFB1, DON, FB1 and ZEA) in the MIX condition (mixture of all in the medium) and was selected for further study. It was verified the effects of pH, PZC, contact time, concentration effect, medium composition and pH dynamics on mycotoxin adsorption, besides the isotherms construction. The adsorption of AFB1 and ZEA was not affected by pH change (3 to 6) nor by the presence of other toxins in the medium. The adsorption of DON was the most sensitive to changes and

the adsorption of FB1 showed greater influence of pH. The mechanisms of interaction between mycotoxin/adsorbent varied, for AFB1 and ZEA the most important was the hygrophobic characteristic. In the case of FB1, it was found that desorption at pH6 may be due to PZC of the CA5 and mycotoxin charge configuration that vary in the pH range of the study. It was not clear what led to the desorption of DON at pH6. Even so, CA5 showed high adsorption for all mycotoxins, including DON, which is difficult to adsorb with other adsorbents as reported in several studies. Analyzing the characteristics of the adsorbent and the adsorbate assists in the understanding of the molecular interactions and parameters that lead to a greater adsorption, as well as which are the interferents of this process. Such information serves as the north for the production of adsorbents that meet certain demands. Despite the promising results, it is necessary to confirm the efficacy of this adsorbent *in vivo*.

Keywords: Adsorbent; Mycotoxins; Co-occurrence; *In vitro* test; Activated carbon

3.1. Introdução

A presença de micotoxinas na dieta animal é variável em termos de frequência e nível de ocorrência e difícil de ser evitada. A contaminação de ingredientes das rações tal como o milho pode ser por uma única micotoxina ou, como tem sido exaustivamente relatada por mais de uma micotoxina simultaneamente (BENSASSI *et al.,* 2014; SMITH *et al.*, 2016). A frequência e níveis de ocorrência podem variar como resultado de fatores ambientais presentes durante o pré e pós-colheita da cultura, e a tecnologia utilizada na produção e processamento do grão (PENG *et al.*, 2018).

A coocorrência de micotoxinas é um tema de grande preocupação (KOSICKI *et al.*, 2016; ZACHARIASOVA *et al.*, 2014). Isso ocorre porque diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, assim como uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina (GALVANO *et al.*, 2005). Além disso, produtos agrícolas de diversas fontes com diferentes perfis de contaminações com micotoxinas podem ser misturados durante o processamento. A presença de contaminação multi-micotoxinas pode levar às mais diversas interações toxicológicas incluindo a aquelas que podem potencializar os efeitos observados individualmente (GRENIER e OSWALD 2011).

A redução da bioacessilidade de micotoxinas no estômago ou intestino animal utilizando compostos adsorventes tem sido estudada desde o início dos anos 80, como instrumento de mitigação dos efeitos deletérios das micotoxinas. Estes compostos complexam as moléculas livres de micotoxinas que chegam ao trato digestivo a partir dos ingredientes contaminados, a fim de evitar que essas moléculas causem danos durante a passagem no trato gastrointestinal. A natureza dos compostos usados como adsorventes de micotoxinas pode variar amplamente, mas os mais comumente utilizados são os minerais de argila, sendo eles naturais ou modificadas, fibras

vegetais, leveduras ou constituintes de células bacterianas, resinas sintéticas e o carvão ativado (PENG *et al.*, 2018). Entre os adsorventes estudados, os carvões ativados têm apresentado os melhores resultados *in vitro* quanto aos níveis de adsorção e abrangência de diferentes tipos de micotoxinas (AVANTAGGIATO *et al*, 2005; VILA-DONAT *et al.* 2018).

O Carvão Ativado (CA) é um adsorvente muito eficaz devido à sua porosidade altamente desenvolvida e elevada área superficial (RODRÍGUES-REINOSO, 1997). A estrutura porosa do CA, bem como sua distribuição são determinadas pela natureza da matéria-prima e pelo processo de carbonização (PIS *et al.*, 1998). A maioria das substâncias orgânicas de alto teor de carbono são matérias-primas potenciais para a produção de CA. Entretanto, além do alto teor de carbono, é importante considerar alguns fatores na seleção de matérias-primas a serem utilizadas para elaboração de CA, tais como o conteúdo inorgânico, densidade, disponibilidade e custo da matéria-prima (TADDA *et al.*, 2016). Em relação ao processo de ativação, os parâmetros que afetam as propriedades de adsorção do CA são temperatura, tempo, taxa de aquecimento e vazão de gás. Materiais de baixo custo, como resíduos agroindustriais, com alta concentração de carbono e baixo conteúdo inorgânico, têm sido utilizados como matéria-prima para a produção de CA.

A ativação do carvão pode ser realizada por um processo químico, físico ou mesmo pela combinação destes. A ativação física ocorre na presença de CO_2, vapor, ar ou uma mistura deles, que atuam como gases oxidantes. O vapor e o CO_2 são os reagentes mais utilizados, influenciando significativamente na porosidade do CA. Na ativação química, agentes químicos são usados para preparar o CA. Existem diferentes agentes de ativação química que podem ser usados neste processo, sendo os mais utilizados são $ZnCl_2$ (cloreto de zinco), H_3PO_4 (ácido fosfórico), KOH (hidróxido de potássio), K_2CO_3 (carbonato de potássio), NaOH (hidróxido de sódio), H_2SO_4 (ácido sulfúrico). Os agentes químicos ajudam a desenvolver a porosidade do CA por meio de desidratação e degradação (JANKOWSKA *et al.*, 1991). Assim, a variação dos processos e parâmetros adotados resulta em CA com diferentes características.

A avaliação *in vitro* de diferentes tipos de CA como adsorvente de micotoxinas tem sido bastante relatada (KANA *et al.*, 2009; DOLL *et al.*, 2004; BUENO *et al.*, 2005; AVANTAGGIATO *et al.* 2004; 2005; 2007; BHATTI *et al*, 2018). Entretanto, a grande maioria das avaliações foi realizada considerando somente a presença de uma única micotoxina e não a presença multi-micotoxina (JOUANY, 2007; KABAK *et al.*, 2006; KONG *et al.*, 2014; RAMOS e HERNÁNDEZ, 1997; VEKIRU *et al.*, 2007; VILA-DONAT *et al.*, 2017).

Considerando a ampla variedade de características que diferentes CA podem apresentar e o crescente relato da ocorrência multi-micotoxinas, este estudo realizou a caracterização físico-

química e a avaliação *in vitro* da capacidade de adsorção de micotoxinas em CA comerciais, em meio de adsorção com multi-micotoxinas (MIX). A partir da avaliação da capacidade adsortiva, o CA mais eficaz, quanto aos níveis de adsorção para as micotoxinas avaliadas, foi selecionado para um estudo complementar, em que o comportamento das isotermas das diferentes micotoxinas, o efeito da dose do CA, a influência do tempo de contato, o efeito da dinâmica de mudança do pH e o efeito da presença de outros constituintes do meio foram avaliados, considerando a presença multi-micotoxinas.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Reagentes e Amostras

Amostras de cinco carvões comerciais (CA1- JTBaker®, CA2-Carbomafra®, CA3-Sigma®, CA4-Synth®, CA5-Norit®) foram obtidas através de aquisição com fornecedores locais. Para padronização da granulometria, os materiais passaram por uma peneira e apenas a porção do material que apresentou granulometria inferior a 100 mesh seguiu para análise. Os componentes sólidos utilizados para as soluções do teste de adsorção (pancreatina, ácidos biliares, ácido cítrico e pepsina) foram da Sigma-Aldrich e os ácidos láctico e acético da Synth. Os padrões de micotoxinas utilizados foram da marca Sigma-Aldrich para Aflatoxina (A6636) e Zearalenona (Z2125) e checadas de acordo com procedimentos recomendados pelo método 971.22 da A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists). O padrão de Desoxinivalenol (CRM46911) utilizado foi da Supelco e de Fumonisina B1 da Biopure, ambos padrões certificados. Os solventes (grau cromatográfico) foram adquiridos do representante no Brasil da empresa Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada foi qualidade ultrapura tipo Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

3.2.2. Caracterização dos carvões

As amostras dos cinco carvões ativados (CA) foram caracterizadas quanto a área superficial específica, distribuição dos tamanhos de poros e morfologia. Para o cálculo da área superficial foram obtidas as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77K em um equipamento Quantachrome, Modelo Autosorb, EUA. A área Superficial específica foi calculada utilizando a equação proposta por Brunauer, Emmett, Teller (1938) - BET. O volume microporoso foi determinado através do ajuste dos resultados experimentais à equação de

Dubinin-Radushkevich (1969) - DR. O volume total de mesoporos foi obtido por diferença, subtraindo o volume de microporos do volume total de poros obtido em P/Po= 0,95. A distribuição de tamanho de poro foi estabelecida utilizando-se o método DFT (Density Functional Theory**)**.

A morfologia das amostras foi observada utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) modelo MV Zeiss DSM 940 (Oberkochen, Alemanha). As amostras foram depositas em stubs com fita dupla face e então revestidas com ouro à vácuo (model Polaron SC7640, Quorum Technologies Ltd., Reino Unido) para assegurar a condutividade elétrica da superfície.

Para determinação de grupos ácidos da superfície foi utilizado o método de titulação de Bohem (1994). Para determinar os ácidos totais foram pesados 0,7g do CA e adicionados 30 ml de NaOH 0,1M, mantidos em agitação por 24 horas. A solução foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram tituladas com HCl 0,1M padronizado e indicador fenolftaleína (realizado em triplicata).

Para a amostra do CA selecionado determinou-se adicionalmente o pH e o ponto de carga zero (PCZ). A determinação do pH da amostra de CA foi baseada na norma ASTM D3838 –05 citada por Valix *et al.* (2004). Assim, 0,5 g de carvão ativado foram aquecidos em 20mL de água destilada. A suspensão permaneceu na chapa aquecedora por 15 minutos após o início da ebulição. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel de filtro qualitativo e posteriormente foi medido o pH da solução obtida, com auxílio de pHmetro digital (PA 200, Marconi, Brasil). O procedimento foi realizado em triplicata.

A metodologia empregada para determinação do ponto de carga zero é denominada "experimento dos 11 pontos", descrita por Regalbuto e Robles (2004) com modificações de Guilarduci *et al.* (2006). O procedimento consistiu em adicionar 30mg do CA em 30mL de água deionizada sob 11 diferentes condições de pH inicial (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) ajustadas, conforme necessário, com soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,1M. Os tubos ficaram sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período, as soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo e os valores do pH final determinados com auxílio de pHmetro (PA 200, Marconi, Brasil). O procedimento foi realizado em triplicata.

3.2.3. Avaliação da capacidade de adsorção de micotoxinas

Os CAs foram avaliados quanto à capacidade de adsorção de micotoxinas *in vitro* utilizando o protocolo recomendado por Lemke *et al.* (2001) com modificações simulando as condições encontradas em um organismo animal. Assim, a adsorção *in vitro* foi determinada

considerando dois valores de pH da solução teste: 3 para simular condições gástricas (incluindo pepsina e ácidos orgânicos) e 6 para simulação de condições intestinais (com sais biliares e pancreatina).

3.2.3.1. Determinação de Micotoxinas

As análises de micotoxinas necessárias para as avaliações de adsorção foram realizadas empregando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão) composto por uma bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20A5, misturador de fase móvel FCV-10ALvp, injetor automático SIL-20A, forno CTO-20A, detector de arranjo de diodo SPD-M20A e detector de fluorescência RF10AXL. A análise de aflatoxina B1 empregou a derivação fotoquímica pós-coluna usando o fotoreator pHred-12 (KRC25, Aura Industries, NY, EUA) e a análise de FB1 foi realizada com derivação pós-coluna utilizando a solução derivatizante cuja composição por litro foi de: ortoftaldeído (0,8g), N-acetilcisteina (1,0g), ácido bórico (13,4g), carbonato de sódio (40,7g), sulfato de potássio (18,8g), empregada a uma vazão de 0,45mL/min.

A fase móvel para análise de FB1 foi constituída de água e ácido fórmico (100:0,1) e acetonitrila e ácido fórmico (100:0,1). O fluxo adotado foi de 1,1mL/min e o detector de fluorescência trabalhou com um comprimento de emissão de 440nm e excitação 335nm. Para ZEA utilizou-se como fase móvel uma mistura de água, acetonitrila e ácido acético (64:35:1), comprimento de emissão de 465nm e excitação de 274nm. A composição da fase móvel para AFB1 foi constituída de água, metanol e acetonitrila (60:25:15) comprimento de emissão de 465nm e excitação de 335nm. Para DON, utilizou-se o detector de arranjo de diodo com comprimento de onda de 219nm e a fase móvel constituída de água e acetonitrila na proporção de 9:1, a um fluxo de 0,9mL/min.

A temperatura da coluna e volume de injeção para a análise de todas as micotoxinas foi de 40°C e 40μL, respectivamente.

As quantificações foram feitas por padronização externa através da construção de curvas de calibração para cada micotoxina usando seis diferentes concentrações de soluções padrões de micotoxinas.

O cálculo da adsorção foi feito por diferença entre o valor da concentração da micotoxina nos tubos controle (sem adsorvente) e a concentração residual da micotoxina no meio após tempo de incubação, resultando no valor que foi adsorvido (sempre considerando a média entre as repetições) de acordo com a fórmula abaixo:

$$Ads\% = 100 - (M \times 100)/C$$

Onde:

Ads% = % micotoxina adsorvida

M = concentração de micotoxinas remanescente no tubo após período de incubação

C = concentração do tubo controle (100%)

3.2.3.2. Avaliação da capacidade de adsorção de micotoxinas de CAs

As amostras de cinco CA foram avaliadas para a adsorção das micotoxinas aflatoxina B1 (AFB1), zearalenona (ZEA), desoxinivalenol (DON) e fumonisina B1 (FB1) considerando a presença, na solução de avaliação, de cada uma das quatro micotoxinas individualmente ou concomitantemente (MIX).

Os ensaios *in vitro* foram realizados em microtubos de centrífuga, utilizando em cada ensaio de avaliação dos CAs cinco microtubos. Para cada micotoxina os ensaios de avaliação foram repetidos duas vezes. Nas avaliações de aflatoxina B1 (AFB1) e zearalenona (ZEA) a concentração de 1µg/mL (1 ppm) foi empregada, enquanto para as micotoxinas desoxinivalenol (DON) e fumonisina B1 (FB1) a concentração foi de 5µg/mL (5 ppm). A concentração dos CAs empregada foi de 0,5% (p/v). O delineamento experimental adotado foi o DIC (inteiramente casualizado). Foi preparado um tubo controle negativo, sem a presença de micotoxina e contendo somente o CA, para indicar a presença de possíveis interferências que poderiam ocorrer no cromatograma das amostras devido aos compostos presentes nos CA avaliados. Para a avaliação da adsorção, um tratamento controle positivo, também com 5 microtubos, contendo somente as micotoxinas sem o produto adsorvente, foi preparado para cada ensaio e condição. Após a adição das soluções e produto adsorvente ao microtubo o conteúdo dos tubos foi homogeneizado durante 30 segundos através de um agitador de tubos (Go Mixer MX-S, Tedia, Brasil) em seguida o pH de cada tubo foi corrigido para 3 usando alíquotas de HCl 0,1M (conforme avaliação preliminar). Inicialmente os tubos foram incubados durante 1 hora a 37±0,5°C em rotação de 14rpm. Após este tempo de incubação, 1 mL do conteúdo devidamente homogeneizado foi transferido para um microtubo e centrifugado a 6.600g por 10 minutos (5937, Centrilab, Brasil). O sobrenadante foi usado para analisar o teor residual de micotoxinas. O volume remanescente nos tubos de ensaio foi ajustado para pH 6,0 com alíquotas de NaOH 0,1M (conforme avaliação preliminar) e adicionado pancreatina e sais biliares a fim de simular o processo intestinal e então incubado nas mesmas condições acima descritas durante 3 horas. Em seguida, uma alíquota de 1mL foi retirada e processada como descrito anteriormente, para compor a solução injetável. Foram realizados ensaios de adsorção considerando a presença

individual ou conjunta das quatro micotoxinas na solução de avaliação. Os resultados forneceram subsídios para seleção do CA mais eficaz. O critério de seleção foi baseado na adsorção observada em meio multi-micotoxinas, ou seja, o CA selecionado foi aquele que apresentou os maiores valores de adsorção para a maioria das micotoxinas na condição multi-micotoxinas (MIX).

3.2.4.2. Estudos das características de adsorção do CA selecionado

O CA selecionado foi empregado como modelo de adsorção visando avaliar o efeito do tempo de contato entre micotoxina e adsorvente, a dose do CA empregado, a concentração das micotoxinas e a composição da solução teste.

a) Cinética de adsorção das micotoxinas

A avaliação da cinética de adsorção foi realizada utilizando o protocolo *in vitro* descrito anteriormente, entretanto, nesta avaliação alíquotas para determinação da concentração residual das micotoxinas foram retiradas nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20, 40 e 60 minutos. As avaliações em cada tempo foram feitas em quintuplicata.

b) Dose do adsorvente e concentração das micotoxinas

O efeito da dose de adsorvente (CA) ou taxa de inclusão sobre a adsorção foi avaliado, para isto o protocolo de avaliação da adsorção, como já descrito, foi utilizado empregando-se doses crescentes e incrementais de 1 mg do adsorvente desde 1 até 5mg/mL (0,1 até 0,5% p/v). As avaliações em cada dose foram repetidas duas vezes e cada concentração utilizou-se cinco microtubos.

O efeito da concentração das micotoxinas também foi avaliado através da obtenção das isotermas a 37°C em pH 3 e 6. Para construção das isotermas as concentrações das micotoxinas utilizadas estão apresentadas na Tabela 1. Para esta avaliação a taxa de inclusão do adsorvente permaneceu fixa em 0,5%. Os ensaios para obtenção das isotermas foram realizados duas vezes e para cada ponto de concentração três microtubos foram elaborados.

Tabela 1. Concentrações das micotoxinas para cada ponto (1 a 9) utilizadas para obtenção da isoterma.

	Concentração (ng/mL)								
Micotoxina	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9
AFB1	100	250	500	1000	1500	2000	3000	4000	5000
ZEA	100	200	300	400	600	1000	1500	2000	3000
FB1	500	1000	1500	2000	3000	4000	5000	6000	7000
DON	1000	2000	2500	3000	4000	5000	6000	7000	8000

c) Composição da solução do teste *in vitro* e dinâmica de elevação do pH

Para avaliação do efeito da composição do meio sobre a adsorção duas condições foram consideradas: a) solução de avaliação composta somente de tampão fosfato, incubando os microtubos na primeira incubação com a solução teste ajustada para pH 3,0 utilizando HCl 0,1 M e, posteriormente na segunda incubação com a elevação do pH para 6,0 utilizando NaOH 0,1M e b) solução teste em pH 3,0 e 6,0 como descrita no item 3.2.4.1 empregando ou não a pancreatina, quando a solução dos microtubos foi transformada em pH 6,0. O efeito da mudança do pH foi avaliado considerando duas situações: a) A condição dinâmica, onde os microtubos preparados com a solução gástrica (pH 3,0) foram subsequentemente transformados, após a retirada da alíquota para determinação da concentração residual, em microtubos com solução pH 6,0 e b) A condição estática, onde os microtubos preparados com a solução gástrica serviram somente para avaliação neste pH e microtubos contendo a solução intestinal foram preparados para a avaliação da adsorção em pH 6,0. Ao combinar essas diferentes situações, os seguintes tratamentos foram obtidos: A = solução tampão e pH Estático, B = solução tampão e pH Dinâmico, C = Suco Gastrointestinal sem Pancreatina e pH Estático, D = Suco Gastrointestinal com Pancreatina e pH Estático E = Suco Gastrointestinal e pH Dinâmico (Figura 1).

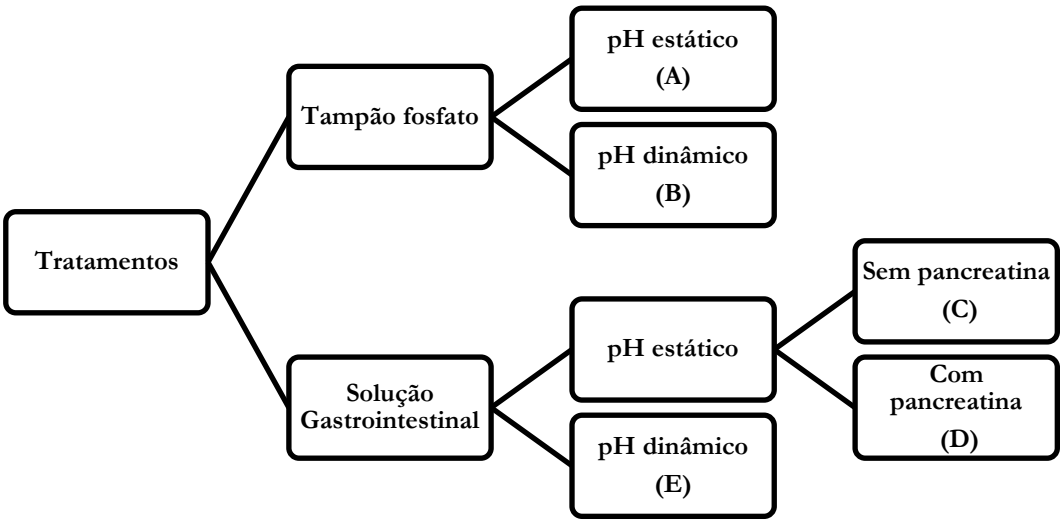

Figura 1. Tratamentos combinando diferentes composições de meio e pH para testes.

3.2.5 Análises estatísticas

Para todas as análises, foi utilizado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1996). Os valores médios foram calculados para análise de comparações múltiplas de Tukey-Kramer considerando um nível de significância de 5%. As isotermas de adsorção foram obtidas pela plotagem da razão da quantidade de micotoxina adsorvida por unidade de massa de adsorvente contra a concentração de toxina no meio sob condições de equilíbrio. Como os dados descreveram curva linear, não houve ajuste adequado pelos modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich, Sips e Hill como habitualmente é utilizado.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Caracterização dos carvões

Os resultados obtidos para determinação dos grupos ácidos por titulação preconizada por Bohem são mostrados na Tabela 2 (média de triplicata ± DP). Os CAs estudados apresentaram reduzida quantidade de grupos ácidos de acordo com o método de Bohem. A presença de grupos ácidos na superfície do CA confere a propriedade de trocadores catiônicos enquanto que aqueles com baixo conteúdo são trocadores aniônicos (BOHEM, 2002).

Tabela 2. Resultados de Grupos ácidos dos CAs, média ± desvio padrão (n=3)

Amostra	Total grupos ácidos ($mmolH^+/g$)	
CA1	0,203	± 0,01
CA2	0,156	± 0,01
CA3	0,233	± 0,02
CA4	0,159	± 0,01
CA5	0,217	± 0,01

A forma de ativação afeta profundamente as propriedades de adsorção do carvão, porém como foram utilizadas amostras comerciais não estão disponíveis detalhes sobre o método utilizado para cada um deles.

A presença de grupos funcionais de superfície tem sido relacionada à acidez superficial. Esses grupos tendem a desprotonar na região de pH ácido a neutro e podem favorecer a ligação de cátions como mencionado. Já a origem de propriedades básicas presentes na superfície de carvões é mais controversa e segundo Barton (1997), pode estar relacionada à própria estrutura e distribuição dos átomos de carbono no sólido. Mangum *et al.* (2001) realizaram o tratamento de um carvão com amônia em altas temperaturas introduzindo grupos básicos em sua superfície e assim conseguiram observar o favorecimento da adsorção de contaminantes ácidos. Allwar (2012) obteve resultados de 0,01$mmolH^+/g$ para CA preparado com KOH, 0,06$mmolH^+/g$ preparado com uréia e 0,15$mmolH^+/g$ com amônia.

Já a ativação ácida gera carvões de maior acidez. Mantovani *et al.* (2014) analisaram carvões manufaturados a partir de glicerina e obtiveram os seguintes resultados de concentração de grupos ácidos variando de 0,8 a 3,9$mmolH^+/g$. Bueno e Carvalho (2007) analisaram carvões comerciais sem ativação química entraram resultados bem menores: entre 0,48 e 0,56$mmolH^+/g$.

A Figura 2 apresenta as isotermas de adsorção de nitrogênio obtidas para cada um dos CA avaliados.

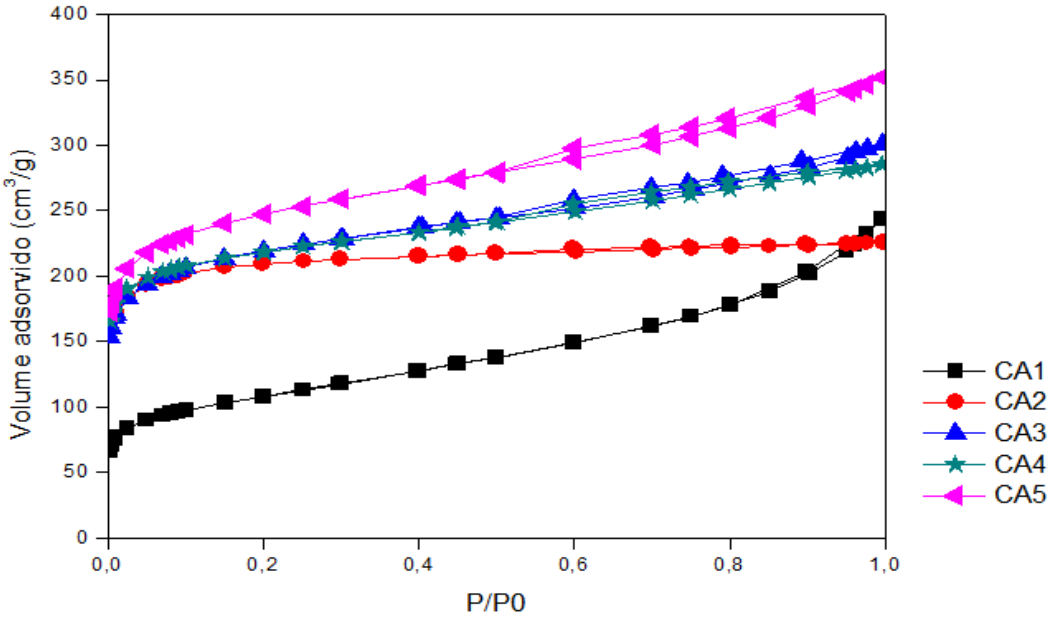

Figura 2. Isotermas de adsorção de N_2 a 77K obtidas para os CA estudados.

Segundo classificação da União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (1985) as isotermas do tipo I, como a obtida para o CA2 são características de materiais microporosos. O CA2 foi o que apresentou menor volume de mesoporos (Tabela 3). As demais isotermas podem ser classificadas como tipo I e Tipo IV, características de adsorventes micro e mesoporosos (IUPAC, 1985). São consideradas mistas pois tem área elevada e uma grande adsorção em baixa pressão (característica de Tipo I) e uma pequena histerese em pressão relativa superior a P/P0 maior que 0,4 característica de Tipo IV (THOMMES, 2015).

Os dados de área de superfície são mostrados na Tabela 3, na qual pode-se observar que o CA5 apresentou maior área e maior volume de microporos enquanto que CA1 tem a menor área superficial e menor volume de microporos.

Tabela 3. Valores obtidos para área superficial e volume de poros dos CAs estudados.

Amostra	**Área Superficial$_{BET}$**	**Volume Total de poros ($V_{0,95}$)**	**Volume microporos**	**Volume Mesoporos**
	($m^2.g^{-1}$)	($cm^3.g^{-1}$)	($cm^3.g^{-1}$)	($cm^3.g^{-1}$)
CA 1	280	0,194	0,091	0,103
CA 2	790	0,348	0,315	0,033
CA 3	810	0,450	0,314	0,136
CA 4	800	0,434	0,325	0,109
CA 5	920	0,528	0,370	0,158

Os CA possuem alta área superficial variando de 800 a 1500 $m^2.g^{-1}$, e em alguns casos atingindo até 4000 m^2 g^{-1} dependendo das condições de produção (CLAUDINO, 2003). De maneira geral, quanto maior a área superficial, maior a capacidade de adsorção (BANSAL; GOYAL, 2005). Galvano *et al.* (1996) avaliaram 17 CAs, entre comerciais e manufaturados cujas áreas variaram entre 260,3 a 1122 $m^2.g^{-1}$. Eles observaram uma correlação entre a área superficial do adsorvente e a adsorção de AFB1 de 0,84. Para FB1 a correlação foi de apenas 0,66 (GALVANO *et al.*,1997) e para DON 0,51 (GALVANO *et al.*, 1998).

A Figura 3 mostra a distribuição do tamanho dos poros observada para os carvões avaliados.

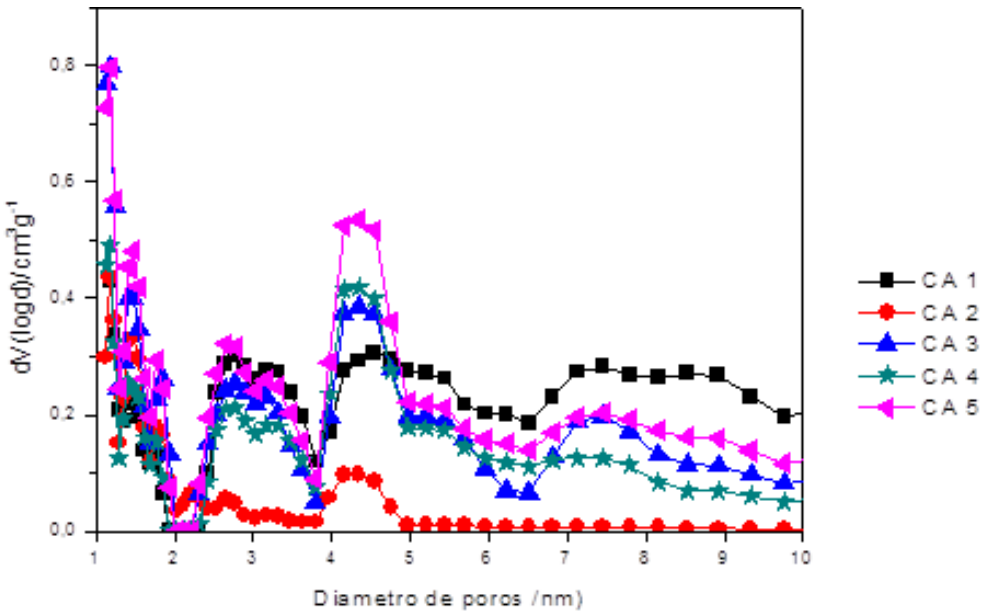

Figura 3. Distribuição de tamanho de poros obtidos por DFT para os CAs estudados.

Segundo a IUPAC, as dimensões dos poros são classificadas como macroporos (poros com diâmetro acima de 50nm), mesoporos (poros de diâmetro entre 2 nm e 50 nm) ou microporo (inferior a 2nm). Os microporos, por sua vez, podem ser classificados em supermicroporos ou ultramicroporos (quando são estreitos e apresentam diâmetro inferior 0,7nm) (THOMMES *et al.*,2015). A distribuição de poros também varia conforme o método de ativação do carvão.

De acordo com Hsieh e Teng (1999), os mesoporos desempenham um papel fundamental na aceleração da difusão do adsorbato dentro dos microporos. Eles aumentariam a capacidade de adsorção em soluções aquosas, especialmente para adsorção de grandes moléculas, ocorrendo a difusão dos mesoporos para os microporos. Já os microporos contribuem para uma maior área superficial, o que proporciona alta capacidade de adsorção para moléculas pequenas (< 2nm).

Observa-se que há grande variação da distribuição dos tamanhos de poros entre os CA analisados. Embora todos apresentem um pico para poros entre 4 e 5nm, os CA 2 e CA 5 apresentaram maior volume de microporos de 1nm, porém apresentam também poros com tamanhos maiores, corroborando com os dados de área superficial e volume poroso (Tabela 3).

Teoricamente, poros com 1nm (equivale a 10 Ǎ) têm espaço suficiente para alojar todos os tipos de moléculas das micotoxinas estudadas, exceto FB1 (Tabela 4). Porém, além do tamanho da molécula, um fator que pode interferir no processo de adsorção é a conformação 3D. Por exemplo, as AFBs são moléculas planas (BREN *et al.*, 2007) e as ZEAs são moléculas flexíveis (MALEKINEJAD *et al.*, 2005). Já a DON, é uma molécula pouco flexível, dado seu anel tetracíclico rígido (STEINMETZ, 2008).

Tabela 4. Tamanho das moléculas de micotoxinas em Angstron (Ǎ)*

Micotoxina	Raio Projeção Máxima	Raio Projeção Mínima
AFB1	6,51	5,39
ZEA	5,95	5,78
FB1	13,05	7,93
DON	5,46	4,46

*Dados adaptados do Chemicalize (2019).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos CAs são apresentadas a seguir nas figuras 4, 5, 6 ,7 e 8.

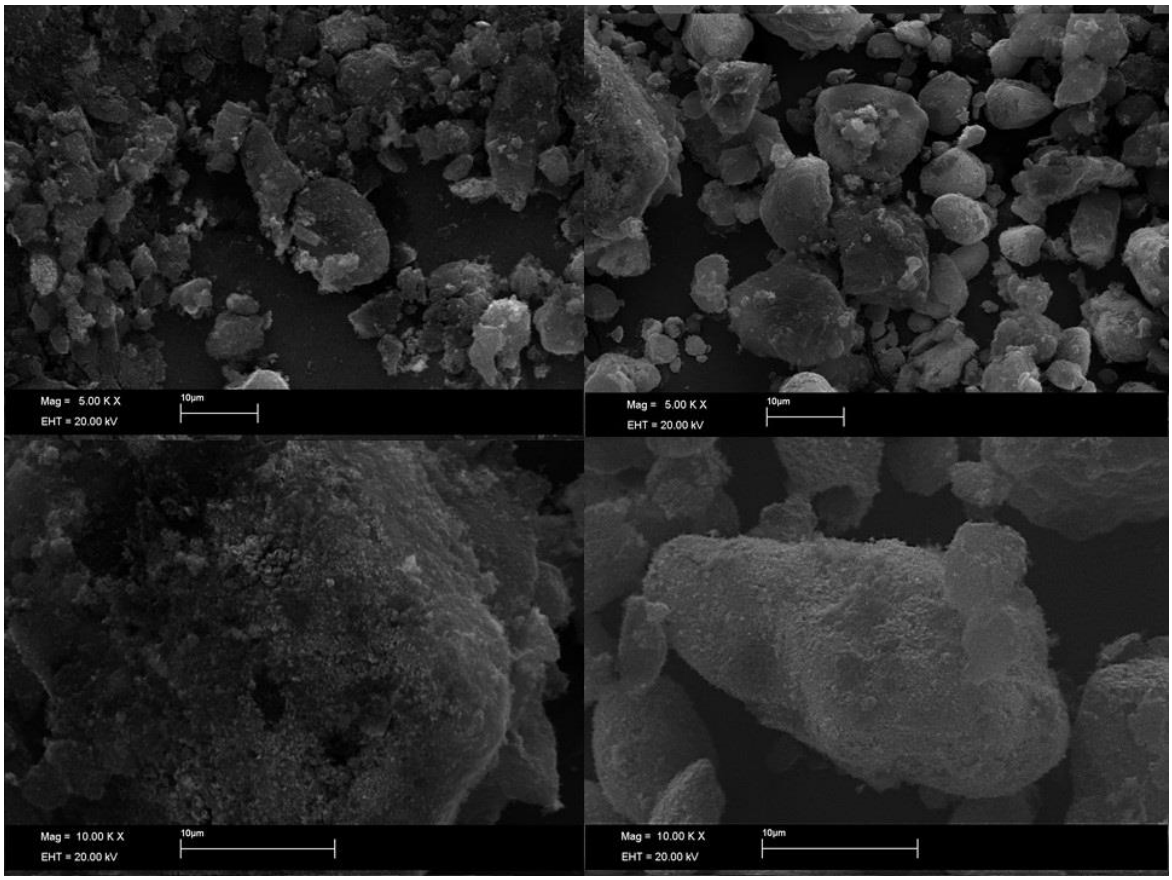

Figura 4. Imagens obtidas por MEV da amostra CA1.

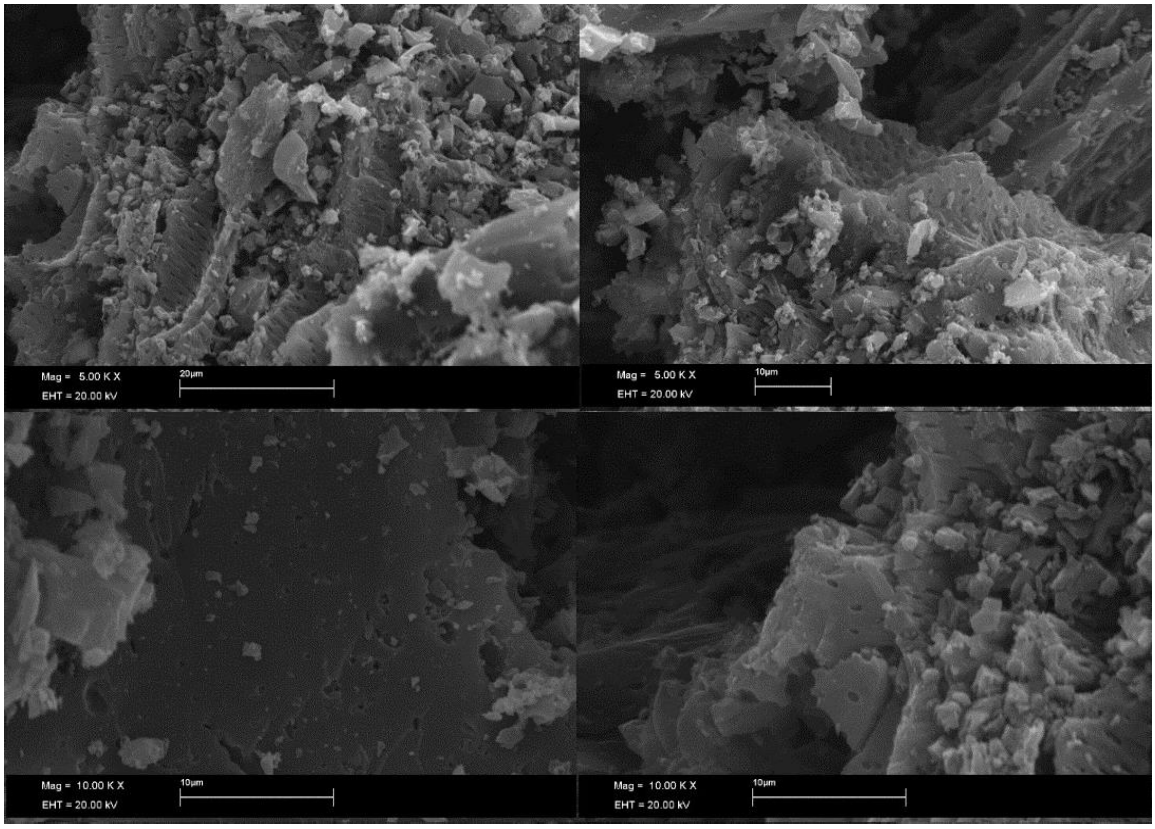

Figura 5. Imagens obtidas por MEV da amostra CA2.

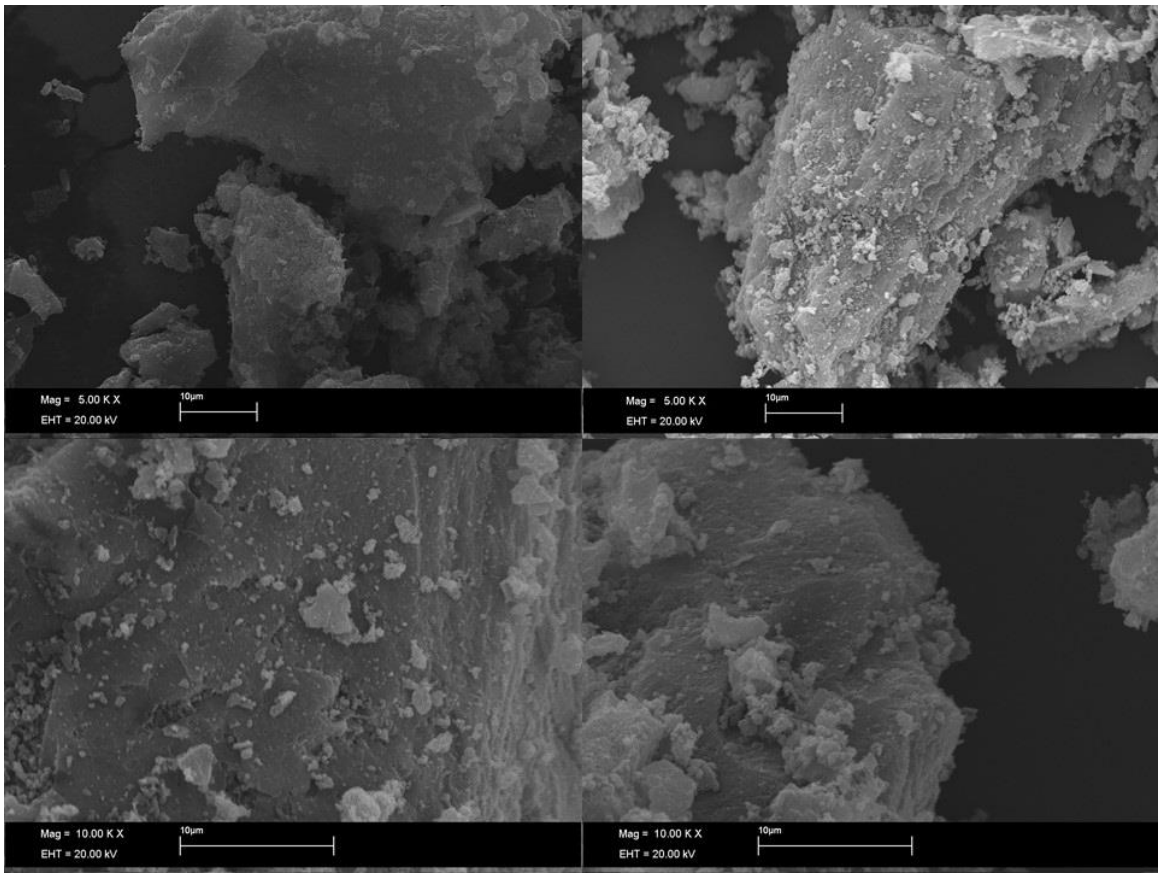

Figura 6. Imagens obtidas por MEV da amostra CA3.

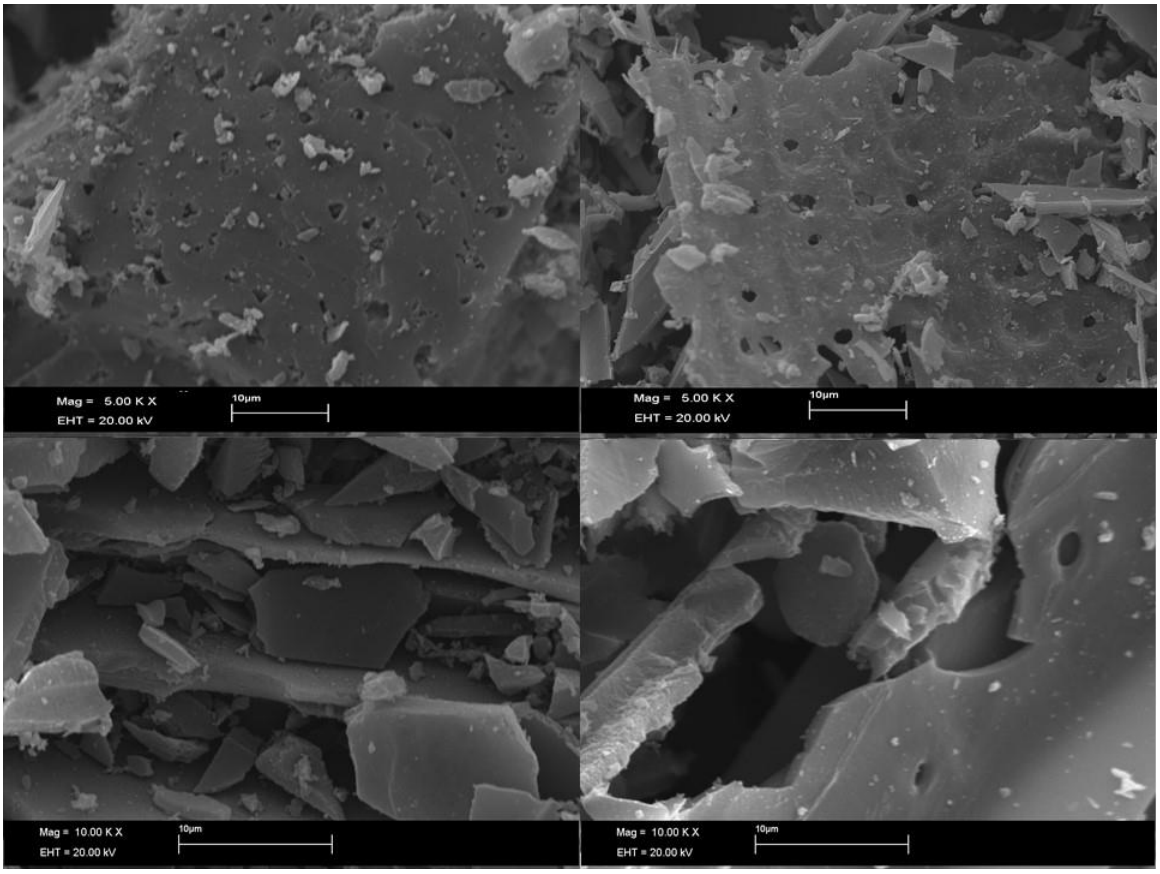

Figura 7. Imagens obtidas por MEV da amostra CA4.

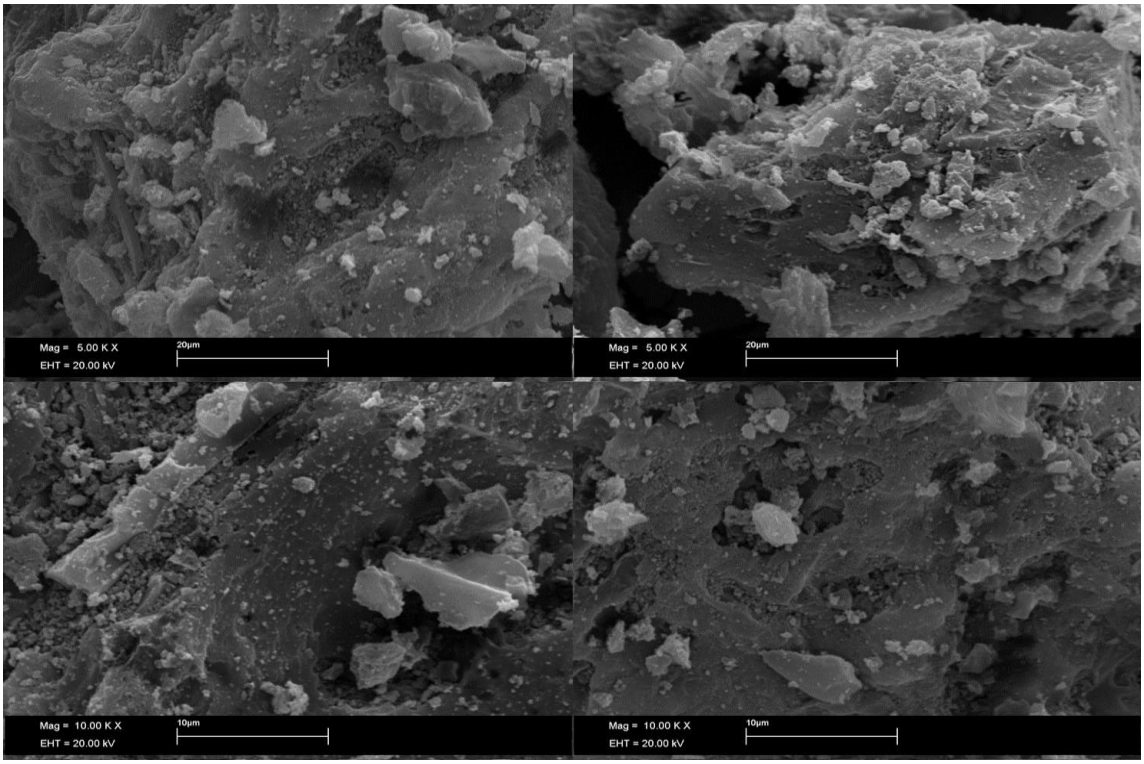

Figura 8. Imagens obtidas por MEV da amostra CA5.

A morfologia descreve a forma geométrica e a estrutura da superfície. As imagens mostram que as características visuais de um carvão ativado podem variar muito, o que pode influenciar nas suas propriedades de adsorção. Essas variações são principalmente decorrentes da matéria prima utilizada e do método de ativação.

Os carvões ativados CA3 e CA5 apresentaram características visuais bastante semelhantes como pode ser observado nas imagens. Eles apresentaram superfície rugosa, com aspecto de camadas. A imagem do CA1 mostra uma superfície com muitas irregularidades enquanto CA4 apresenta superfície lisa com macroporos, sugerindo que parte da estrutura da matéria prima foi preservada. CA2 tem superfície bastante irregular e heterogênea, com macroporos e reentrâncias em algumas partes e superfície mais plana em outras.

3.3.2. Avaliação da capacidade de adsorção de micotoxinas

Os resultados de adsorção (%) para micotoxinas AFB1, FB1 e DON na condição individual e mix, em pH 3 e 6 para os CAs avaliados estão apresentados na Figura 9. A adsorção para a ZEA não foi apresentada pois foi sempre de 100%, em ambos os pHs e nas duas situações, individual e mix. Outros trabalhos também relataram alta adsorção de ZEA por carvões ativados (SABATER *et al.*, 2007; DE MIL *et al.;* 2015).

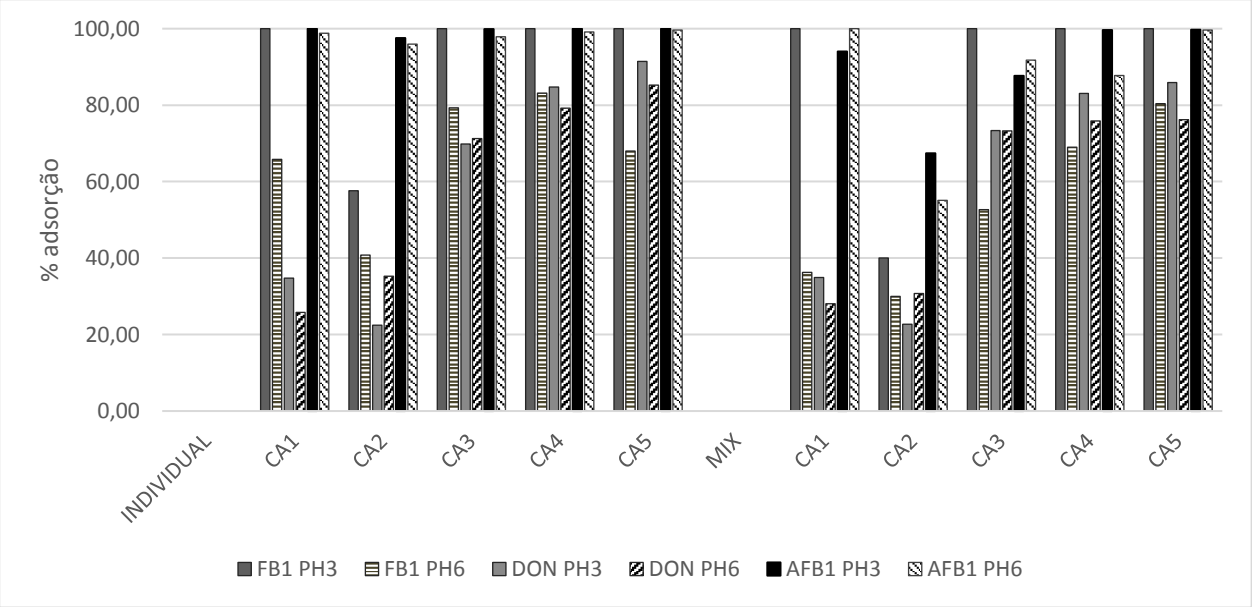

Figura 9. Resultados de adsorção (%) para micotoxinas FB1, DON e AFB1 na condição individual e mix, em pH 3 e 6 pelos CAs 1, 2, 3,4 e 5.

As diferenças nas características químicas das micotoxinas, sugerem que a capacidade de adsorção de um adsorvente pode não ser igual para diferentes micotoxinas. Ratificando o esperado, os resultados mostram que os carvões apresentaram capacidade adsortiva variável em função da micotoxina para os dois valores de pH estudados. A magnitude da variação dos valores da capacidade de adsorção entre as micotoxinas foi maior para os carvões CA1 e CA2, que apresentaram valores da porcentagem de adsorção desde 22,4% até 100% em pH 3 e 6. Já para os CA3, CA4 e CA5 as variações observadas foram consideravelmente menores, variaram desde 52,9 até 100%.

A análise estatística aplicada mostrou que para AFB1 e FB1 houve interação tripla entre os fatores pH e Condição do meio (micotoxina individual ou múltiplas micotoxinas), como pode ser visto na Tabela 5. Como a distribuição dos dados de AFB1 não foi considerada normal, foi necessário transformar os dados para uma análise não paramétrica.

Tabela 5. Resultados de adsorção (%) para micotoxinas FB1, DON e AFB1 na condição individual e mix, em pH 3 e 6 pelos CAs 1, 2, 3,4 e 5 (n=5). Valores marcados com as mesmas letras em uma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0.05$).

CA	Fator	pH	FB1		AFB1		CA	Fator*	DON	
1	IND	3	100,00	A	99,98	A	1	IND	30,33	F
1	IND	6	72,14	C	98,82	BCD	1	MIX	31,18	F
1	MIX	3	100,00	A	93,99	ED	2	IND	27,86	G
1	MIX	6	36,26	H	100,00	A	2	MIX	26,74	G
2	IND	3	57,59	E	97,58	CDE	3	IND	70,54	E
2	IND	6	40,75	G	95,93	ED	3	MIX	73,40	D
2	MIX	3	40,01	G	67,40	GH	4	IND	81,95	B
2	MIX	6	30,02	I	55,13	H	4	MIX	79,44	C
3	IND	3	100,00	A	99,92	AB	5	IND	86,49	A
3	IND	6	79,30	B	97,86	BCD	5	MIX	81,05	BC
3	MIX	3	100,00	A	87,63	FG	1	pH3	34,82	E
3	MIX	6	52,69	F	91,78	EF	1	pH6	26,69	G
4	IND	3	100,00	A	99,97	AB	2	pH3	22,60	H
4	IND	6	82,83	B	99,10	ABC	2	pH6	32,00	F
4	MIX	3	100,00	A	99,65	AB	3	pH3	71,69	D
4	MIX	6	68,99	C	87,76	FG	3	pH6	72,24	D
5	IND	3	100,00	A	99,95	A	4	pH3	83,88	B
5	IND	6	67,18	C	99,64	A	4	pH6	77,52	C
5	MIX	3	100,00	A	99,72	A	5	pH3	88,60	A
5	MIX	6	80,41	B	99,66	A	5	pH6	78,95	C

*Os dados de adsorção para AFB1 e FB1 apresentaram interação tripla, enquanto os dados para DON não apresentaram.

A FB1 foi altamente adsorvida em pH3 para todos os carvões, exceto pelo CA2. Neste pH não houve diferença significativa entre a condição IND e MIX exceto para o CA2. A passagem do pH para 6,0 provocou a dessorção da FB1 para todos os CAs e neste caso, houve diferença entre a condição individual e MIX, sendo que na condição da presença de múltiplas micotoxinas (MIX) a dessorção foi mais intensa e os carvões apresentaram menores valores de adsorção que FB1 que na condição individual, exceto para o CA5, no qual o comportamento foi inverso. Isto mostra que houve interação entre o pH6 e a presença de outras micotoxinas no meio para adsorção de FB1.

A adsorção de AFB1 sofreu influência do pH na condição individual ou em MIX para todos os carvões com exceção do CA5, o qual mostrou não ser influenciado quanto a sua capacidade de adsorção de AFB1 com a elevação do pH ou a presença de outras micotoxinas no meio. O efeito da elevação do pH do meio de 3,0 para 6,0 para os CA1, CA2, CA3 e CA4 foi dependente da presença individual ou de outras micotoxinas. Assim, para os CA1 e CA3 a elevação do pH provocou uma dessorção da AFB1 quando a micotoxina estava sozinha no meio, mas quando outras micotoxinas estavam presentes a elevação do pH provocou um aumento nos níveis de adsorção desta micotoxina. Para o CA2 a elevação do pH sempre provocou uma dessorção da AFB1, tanto com a presença individual da micotoxina como na presença de outras micotoxinas. O CA4 não dessorveu nem adsorveu mais AFB1 quando a elevação do pH foi no meio contendo somente a AFB1, contudo quando a elevação se deu na presença de outras micotoxinas este CA dessorveu a AFB1.

A adsorção de DON foi influenciada pela elevação do pH de 3,0 para 6,0, com exceção na avaliação do CA3 o qual não mostrou ter sua capacidade de adsorção de DON influenciável pela elevação do pH. Para os CAs em que a elevação do pH provocou um efeito nos níveis de adsorção de DON, este efeito foi semelhante tanto com a presença individual de DON na solução como com a presença de outras micotoxinas. Assim, o efeito da elevação do pH foi de provocar a dessorção da DON quando os adsorventes foram os CA1, CA4 e CA5, mas provocar uma adsorção mais elevada da DON quando o adsorvente foi o CA2.

A análise dos dados mostra que o CA5 apresentou os resultados mais elevados de adsorção para todas as micotoxinas na condição MIX sendo assim selecionado para a etapa seguinte do estudo.

Segundo Cheremisinoff e Ellerbusch (1978), existem basicamente dois tipos de adsorção: a adsorção física (fisiossorção), que ocorre por uma diferença de energia e/ou forças de atração que tornam as moléculas fisicamente presas ao carvão (interação molecular) e a adsorção química (quimiossorção) que corresponde a uma interação similar a uma reação química. Esses

mecanismos podem ocorrer simultaneamente e estão relacionados à porosidade e química superficial do CA.

Os tipos mais importantes de interação entre a micotoxina e o adsorvente são: interação hidrofóbica, interações de hidrogênio, atração ou repulsão eletrostática e ligações de coordenação (Di GREGORIO *et al.*, 2014).

Em geral, o CA tem pouca atividade química (dependendo do método de ativação), mas sua alta superfície específica e natureza poli aromática asseguram a maximização de possíveis interações fracas (Van der Waals principalmente), o que permite a fisissorção de micotoxinas (SANCHEZ *et al.*, 2012).

O pH do meio pode afetar tanto a carga superficial dos adsorventes quanto o grau de ionização das micotoxinas. A AFB1 é uma molécula não ionizável e assim, não sofre efeito do pH (Figura 10), o que pode explicar porque sua adsorção também não foi afetada pelo pH. Trata-se de uma molécula hidrofóbica e a sua ligação com o adsorvente em meio aquoso se dá por interação física. Segundo Di Gregorio *et al.* (2014) a afinidade da aflatoxina por CAs tem como principal mecanismo de interação a ligação hidrofóbica.

Uma característica da adsorção física é que ela ocorre em toda a superfície dos poros do adsorvente, diferente da adsorção química que ocorre nos sítios ativos, sendo considerada localizada. A maior área superficial do CA5 pode ter influenciado na adsorção elevada observada para este.

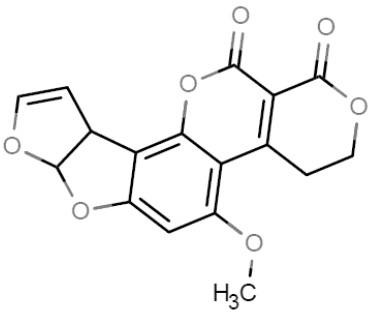

Figura 10. Fórmula estrutural da AFB1.

A molécula de ZEA começa a sofrer ionização somente a partir do pH 6,5, valor acima do pH máximo utilizado nas avaliações deste estudo. Portanto, uma vez que a molécula não sofre ionização, ligações que seriam favorecidas por este tipo de processo não são relevantes para adsorção nesse caso, sendo mais influenciado pelo tamanho de poro do adsorvente. A molécula de ZEA (Figura 11) é muito mais hidrofóbica que a molécula de AFB1(Di GREGORIO *et al.*, 2014), o que pode justificar sua total adsorção pelo CAs nesse estudo. Essa conclusão corrobora

os resultados de Lemke *et al.* (1998) de que as interações hidrofóbicas são as mais relevantes para a adsorção de ZEA.

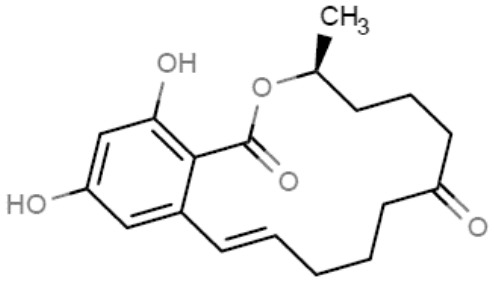

Figura 11. Fórmula estrutural de ZEA.

A molécula de DON sofre ionização a partir do pH 10, ou seja, fora da faixa de pH utilizada nos testes. Diferente da molécula de AFB1 e ZEA, a molécula de DON é uma molécula hidrofílica (DI GREGORIO *et al.*, 2014; BEHRENS *et al.*, 2015) (Figura 12). Sua maior solubilidade em água pode ser um fator que dificulta sua partição com a superfície do CA acarretando em uma menor adsorção se comparada com a adsorção das moléculas hidrofóbicas.

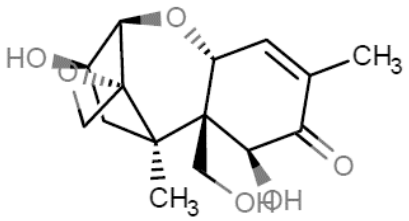

Figura 12. Fórmula estrutural da DON.

A molécula de FB1 sofre várias alterações de carga conforme a mudança do pH, o que pode explicar sua dessorção em pH6. A figura 13 apresenta a distribuição dos grupos ionizados encontrados na molécula de FB1 (identificados com as letras de A a F) dependendo do pH do meio.

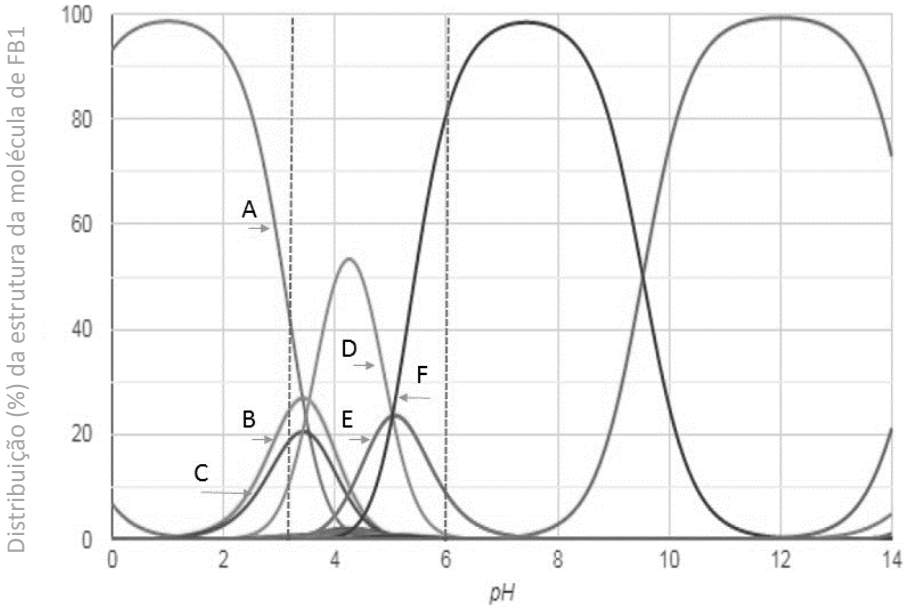

Figura 13. Distribuição dos tipos de estrutura e cargas da molécula (estados iônicos) de FB1 de acordo com a variação do pH. A, B, C e D apresentados na Figura 14 e E e F na Figura 15.

Fonte: Adaptado de Chemicalize, 2019.

As estruturas seguintes mostram os principais grupos ionizados na molécula FB1 com alterações de carga em cada intervalo de pH, considerando o intervalo utilizado nos testes, de 3 (Figura 14) a 6 (Figura 15).

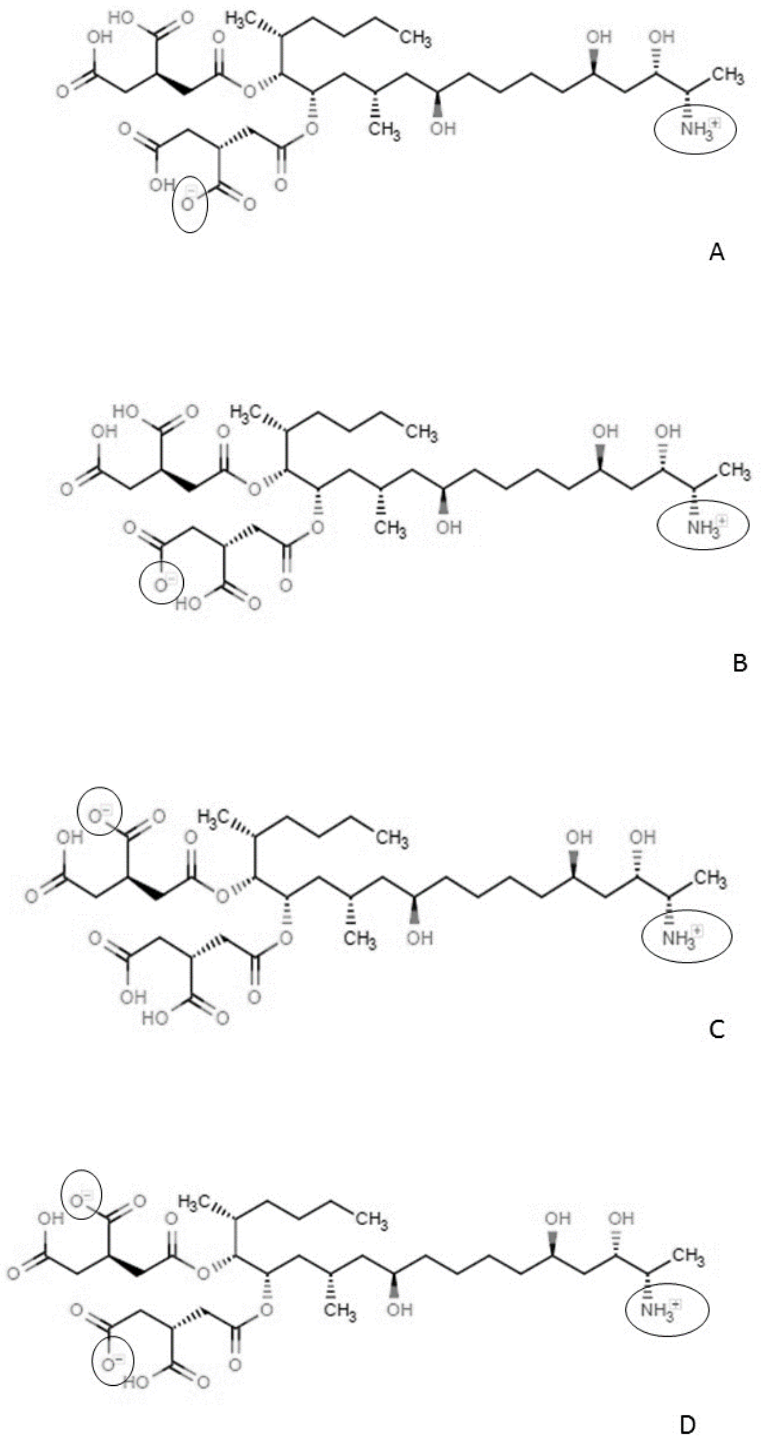

Figura 14. Estados iônicos da molécula de FB1 no pH 3 (A, B, C, D).

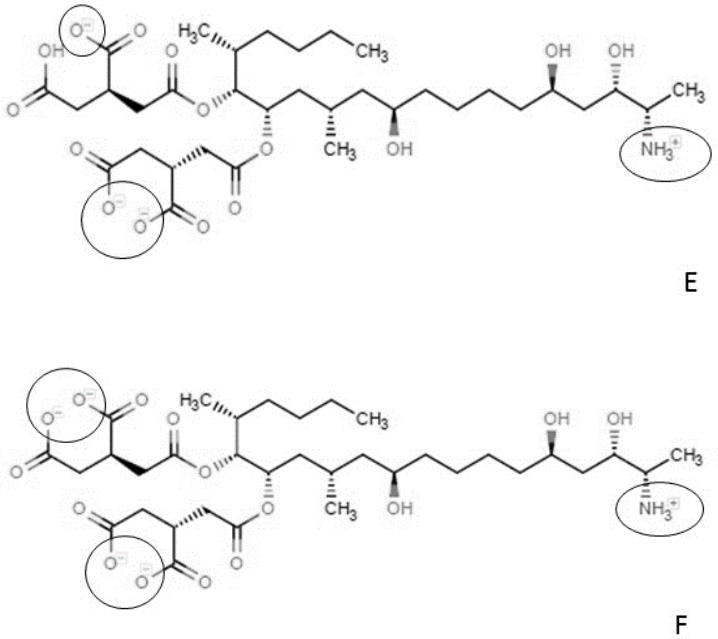

Figura 15. Estados iônicos da molécula de FB1 no pH 6 (E, F).

A comparação dos valores de alguns dos parâmetros utilizados para caracterização dos CAs com os valores de adsorção para as micotoxinas permite algumas observações. Para uma comparação mais realística os dados de adsorção em pH 6,0 na situação da presença de múltiplas micotoxinas devem ser considerados. Nota-se que de maneira geral a área superficial dos carvões e o volume de poros ou mesmo a distribuição do tamanho dos poros não influencia a adsorção de ZEA pois ela foi sempre de 100% para todos os carvões mesmo estes apresentando consideráveis variações nestes parâmetros. Já para a AFB1, o volume de mesoporos mostrou ser um fator importante na adsorção desta micotoxina. Os carvões que apresentaram maiores valores de mesoporos apresentaram maiores valores de adsorção de AFB1, independentemente do volume de microporos ou área superficial. A adsorção de FB1 e DON por sua vez parece estar mais relacionada à área superficial e volume de mesoporos. O aumento da capacidade de adsorção para estas micotoxinas acompanhou o aumento da área superficial dos carvões, exceto para o CA2 que apesar de área superficial próxima aos outros CAs, apresentou uma capacidade de adsorção de FB1 e DON bastante inferior. Esse resultado é decorrente da estrutura microporosa e baixo volume de mesoporos do CA2, o que pode evidenciar que os mesoporos são importantes para a adsorção destas micotoxinas (FB1 e DON).

Assim, pode-se sugerir que quanto menor a hidrofobicidade da molécula maior será a interferência de outros fatores na adsorção. No caso, as características físicas da superfície e distribuição e tamanho de poros têm maior relevância para FB1 e DON.

Resultados obtidos por diferentes trabalhos: Galvano *et al.* (1996), Galvano *et al.* (1997), Galvano *et al.* (1998), confirmaram a influência da matéria-prima e do tratamento químico utilizados na produção do carvão na sua capacidade de adsorção. As propriedades específicas do adsorvato também interferem no processo de adsorção, tais como a polaridade, solubilidade, tamanho, configuração 3D e capacidade de dar origem a produtos de dissociação (XU *et al.*, 2007).

Galvano *et al.* (1996) concluiram que a acidez da superfície dificulta a capacidade de adsorção para AFB1, independentemente da distribuição do tamanho dos poros, provavelmente em função da acidez da própria molécula. A natureza química da superfície do CA é um parâmetro fisico-químico fundamental na determinação da capacidade dos CAs adsorverem a AFB1. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com essa observação, uma vez que os carvões analisados apresentaram baixa acidez e elevada adsorção de AFB1.

A molécula de FB1 é maior que a molécula AFB1 e tem uma estrutura longa e ramificada, o que poderia sugerir que ela cabe nos espaços internos dos poros de maneira menos eficiente do que a AFB1 (GALVANO *et al.*, 1997). Porém, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que além do tamanho dos poros, a adsorção da FB1 sofre forte efeito do pH do meio reacional devido a variação das cargas na estrutura da molécula decorrentes da ionização de grupos distribuídos ao longo da mesma. As FB1 são moléculas fortemente polares (SCOTT *et al.*, 1993) sofrendo o efeito da mudança de pH, ocorrendo dessorção de parte da micotoxina quando em pH 6 como observado nos resultados.

O efeito da interação das micotoxinas na adsorção pode ser representada pela relação da capacidade de adsorção de uma micotoxina na presença de outras micotoxinas (MIX) com a capacidade de adsorção da mesma micotoxina quando isolada na solução (IND). Este modelo foi apresentado por Avantaggiato *et al.* (2014) de modo que quando a relação é igual a 1,0 não há interferência. Quando < 1,0 a adsorção é suprimida pela presença de outras micotoxinas e quando > 1,0 a adsorção de uma micotoxina específica é promovida pela presença de outras. As relações entre os valores da adsorção das micotoxinas em condição multi-micotoxinas e condição individual, em função dos CA estudados são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Relação entre adsorção das micotoxinas estudadas no MIX/IND em ambos os pHs para os CA estudados.

Carvões Ativados		AFB1	DON	FB1	ZEA
CA1	pH3	0,94	1,01	1,00	1,00
	pH6	1,01	1,09	0,55	1,00
CA2	pH3	0,69	1,01	0,69	1,00
	pH6	0,57	0,87	0,74	1,00
CA3	pH3	0,88	1,05	1,00	1,00
	pH6	0,94	1,03	0,66	1,00
CA4	pH3	1,00	0,98	1,00	1,00
	pH6	0,89	0,96	0,83	1,00
CA5	pH3	1,00	0,94	1,00	1,00
	pH6	1,00	0,89	1,18	1,00

Como já observado ZEA não apresenta variação na adsorção mantendo a relação para todos os CA. As demais toxinas apresentaram relações diferentes dependendo do CA.

Para o CA1 e CA3 a presença de outras micotoxinas não afetou a adsorção de AFB1, DON e FB1 em pH3 já que os valores ficaram bem próximos de 1. A adsorção de FB1 em pH6 foi a mais influenciada pela presença de outras micotoxinas, já que a relação foi de 0,55 e 0,66 respectivamente para CA1 e CA3. O CA2 apresentou adsorções reduzidas de AFB1 e FB1 em ambos os pHs e para DON em pH 6,0. Para o CA4, não houve influência da presença de outras micotoxinas em pH 3,0 para a adsorção das micotoxinas. Em pH6, a adsorção de AFB1 e DON apresentou uma pequena redução, o que pode indicar que na presença de outras micotoxinas há diminuição da adsorção das mesmas por este carvão.

Os resultados mostram que adsorção de AFB1 pelo CA5 não sofreu influência da presença de outras micotoxinas nos valores de pH utilizados. A adsorção de DON sofreu uma influência de outras micotoxinas no meio quando avaliada em pH6. A adsorção deFB1 sofreu em pH 6,0 um efeito oposto, apresentando adsorções mais elevadas no MIX (1,18). Tais conclusões podem ser observadas também nas isotermas apresentadas na próxima etapa. Isso pode indicar que a adsorção de FB1 influencia a adsorção de DON, dificultando sua interação com o adsorvente e dificultando seu acesso aos poros devido suas cadeias longas que poderiam obstruir a passagem.

3.3.3. Estudo das características de adsorção do carvão selecionado

3.3.3.1. pH e Ponto de carga zero do CA

O ponto de carga zero (PCZ) é um fator importante nos processos adsortivos. É definido como o pH em que a superfície do sólido possui carga neutra. Sua identificação auxilia a prever a ionização de grupos funcionais de superfícies e sua interação com espécies em solução (as micotoxinas no caso). Quando o adsorvente entra em contato com uma solução líquida com pH abaixo do PCZ, a superfície é carregada positivamente e um grande número de ânions (grupos de cargas negativas) é adsorvido para balancear as cargas positivas (FIOL e VILLAESCUSA, 2008). Já em soluções aquosas com um pH mais alto do que o PCZ, a superfície é carregada negativamente e, adsorve, preferencialmente, cátions (grupos de cargas positivas). Neste caso, os adsorventes são mais eficazes para a remoção de materiais catiônicos (FIOL e VILLAESCUSA, 2008). Ou seja, a adsorção do cátion é favorecida a um pH> PCZ, enquanto que a adsorção de ânions é favorecida quando pH< PCZ.

O pH do CA5, pela metodologia utilizada, foi 5,91±0,05 e o PCZ 5,81±0,23 (Figura 16). O PCZ do carvão (momento em que as cargas estão em equilíbrio) é muito próximo ao valor do pH de simulação do ambiente intestinal neste estudo, pH 6,0. Essa pode ser uma explicação para a adsorção de FB1 não ser elevada neste pH. Além disso, pH6,0 é superior ao PCZ e isto favorece a adsorção de cátions em detrimento de uma diminuição da adsorção de grupos aniônicos, grupos estes em maior quantidade na molécula de FB1 neste valor de pH.

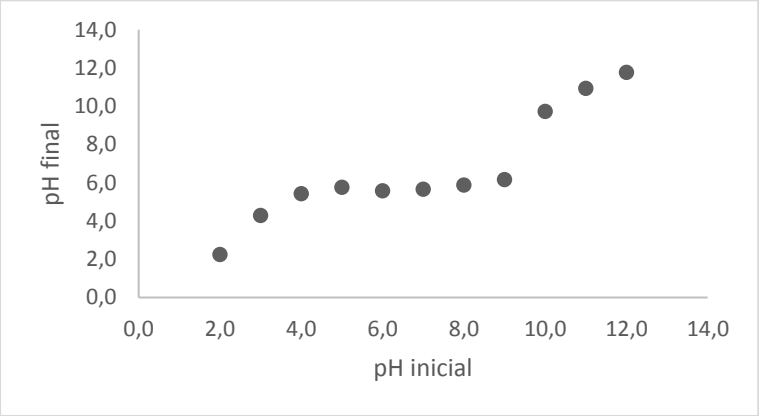

Figura 16. Relação entre pH final e pH inicial (PCZ corresponde à faixa em que o pH final se mantém constante, independentemente do pH inicial).

3.3.3.2. Tempo de contato entre micotoxinas e adsorvente

Os dados das adsorções observadas, para os diferentes tempos de contato entre adsorvente e micotoxinas, tanto em solução contendo as micotoxinas individualmente como em conjunto são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito do tempo de contato para a adsorção de micotoxinas em pH3 e pH6 em solução teste contendo as micotoxinas individualmente ou combinadas. Testes de adsorção realizados a temperatura constante (37°C) e com nível de inclusão do adsorvente de 0,5%. Média±Desvio Padrão (n=5)

pH	Tempo (min)	Adsorção individual* (% ± DP)				Adsorção MIX (% ± DP)			
		AFB1	DON	FB1	ZEA	AFB1	DON	FB1	ZEA
3	1	98,3±0,5^{C}	51,9±3,8^{C}	85,3±1,5^{B}	96,9±1,9^{B}	98,6±0,29^{D}	69,8±3,1^{C}	82,4±0,8^{B}	94,2±1,8^{B}
3	5	99,1±0,7^{B}	80,9±2,3^{B}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,3±0,16^{C}	78,3±2,3^{B}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
3	10	99,3±0,2^{B}	78,2±2,2^{B}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,1±0,09^{B}	80,8±1,5^{AB}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
3	15	99,6±0,2^{A}	88,6±1,4^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,6±0,10^{A}	81,4±4,1^{AB}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
3	20	99,6±0,1^{A}	86,9±1,0^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,8±0,06^{A}	84,6±2,4^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
3	40	99,7±0,0^{A}	89,8±0,8^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,7±0,29^{A}	85,9±3,1^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
3	60	99,8±0,1^{A}	90,1±1,2^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,8±0,10^{A}	86,0±1,4^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
6	1	99,7±0,07^{A}	84,5±3,6^{C}	96,5±5,0^{A}	100,0±0,0^{A}	99,9±0,0^{A}	73,5±2,5^{B}	90,7±2,2^{A}	100,0±0,1^{A}
6	5	99,7±0,2^{A}	76,5±1,2^{BC}	90,3±2,5^{B}	100,0±0,0^{A}	99,8±0,0^{A}	81,1±2,2^{A}	90,4±1,1^{AB}	100,0±0,0^{A}
6	10	99,8±0,1^{A}	77,9±2,0^{BC}	89,5±1,1^{B}	100,0±0,0^{A}	99,8±0,1^{A}	80,7±3,2^{A}	88,3±0,7^{AB}	100,0±0,0^{A}
6	15	99,9±0,1^{A}	80,3±0,7^{BC}	76,7±1,8^{C}	100,0±0,0^{A}	99,6±0,3^{A}	80,5±1,2^{A}	87,6±1,1^{BC}	100,0±0,0^{A}
6	20	99,8±0,2^{A}	78,8±1,4^{B}	73,6±0,9^{C}	100,0±0,0^{A}	99,8±0,2^{A}	80,0±1,4^{A}	86,3±1,1^{CD}	100,0±0,0^{A}
6	40	99,9±0,1^{A}	80,0±0,5^{AB}	75,9±2,0^{C}	100,0±0,0^{A}	99,6±0,1^{A}	81,5±1,0^{A}	84,3±2,1^{DE}	100,0±0,0^{A}
6	60	99,7±0,2^{A}	81,5±1,6^{A}	71,9±1,2^{C}	100,0±0,0^{A}	99,7±0,1^{A}	80,1±2,0^{A}	82,2±1,6^{E}	100,0±0,0^{A}

* Valores marcados com as mesmas letras em uma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0.05$), considerando os pH3 e 6 em grupos separados.

Pode-se observar que a adsorção de todas as micotoxinas foi rápida, sendo maior que 50% já no primeiro minuto de contato, provavelmente devido a grande superfície disponível do CA e sua alta capacidade adsortiva. Os resultados indicam que a adsorção máxima de ZEA foi alcançada nos primeiros 5 minutos de contato entre o CA e a solução e aos 15 minutos para AFB1. Não houve dessorção dessas micotoxinas após mudança do pH.

Contudo, este carvão avaliado dessorveu a DON e a FB1 adsorvidas em pH 3,0 logo ao primeiro minuto de permanência no pH 6,0. Esta dessorção ocorreu para as duas micotoxinas tanto na situação da presença individual da micotoxina, quanto na presença concomitante das outras micotoxinas e, foi mais intensa para FB1 que para a DON. Para a DON a dessorção máxima ocorreu dentro dos primeiros 5 minutos em pH 6,0, tanto no meio com a micotoxina

individual como no meio com o mix de micotoxinas. Isso pode ser devido à repulsão que pode ter existido entre as cargas da molécula e os grupos superficiais deste CA ou simplesmente falta de atração entre elas, mostrando a forte dependência do pH do meio reacional para adsorção desta molécula. Para FB1 a dessorção máxima foi aos 15 e 40 minutos, para situação de micotoxina individual e presença concomitante, respectivamente. Os níveis de dessorção promovidos pela elevação do pH neste carvão não foram altos para a DON (inferiores a 10%), mas para FB1 foram mais elevados situando-se entre 10 a 20%. Como os valores de pH utilizados aqui não têm a capacidade de promover uma mudança na carga molecular da DON (CHEMICALIZE, 2019), é possível que a mudança na carga superficial do carvão selecionado (CA5) tenha afetado a capacidade de adsorção deste com a elevação do pH de 3,0 para 6,0. Para FB1 a mudança na carga da molécula é possível com a elevação pH tornando a molécula negativamente carregada o que pode ter ocasionado os níveis de dessorção observados.

A possibilidade da ocorrência de dessorção em níveis de pH semelhantes ao que ocorrem no trato intestinal é preocupante, pois o retorno da molécula de micotoxina ao estado livre justamente no lúmen intestinal onde a processo de absorção é mais intenso pode propiciar uma absorção das micotoxinas ou mesmo uma exposição ao epitélio intestinal. Segundo revisão levantada por Grenier e Applegate (2013) sobre os efeitos das micotoxinas no organismo, os estudos analisados sugerem que o epitélio intestinal é o principal local a sofrer os efeitos das micotoxinas, mesmo em baixos níveis de contaminação. As micotoxinas teriam influência no equilíbrio intestinal comprometendo funções como digestão, absorção, permeabilidade e sistema de defesa do organismo.

3.3.3.3. Dose do adsorvente e concentração das micotoxinas

A alteração da dose do adsorvente teve efeito mais expressivo para DON e FB1 conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Efeito da dose do carvão ativado sobre a adsorção de micotoxinas em pH3 e pH6 a 37°C com a presença combinada das micotoxinas na solução teste, durante 60 minutos (cada pH). Média±Desvio Padrão (n=5).

		Adsorção (% ± DP)			
pH	Dose CA (mg/mL)	AFB1	DON	FB1	ZEA
3	1	99,5±0,3^{AB}	8,4 ±2,1^{F}	91,8±1,2^{B}	98,9±0,0^{B}
3	2	99,3±0,2^{AB}	46,3±3,2^{D}	100,0±0,0^{A}	99,2±0,1^{B}
3	3	99,7±0,1^{AB}	64,3±0,7^{C}	100,0±0,0^{A}	98,9±0,0^{B}
3	4	99,7±0,2^{AB}	75,7±1,1^{AB}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
3	5	99,8±0,1^{A}	82,4±1,2^{A}	100,0±0,0^{A}	100,0±0,0^{A}
6	1	98,4±0,5^{C}	6,3±0,3^{F}	57,8±2,1^{E}	94,8±3,5^{C}
6	2	99,1±0,2^{AB}	36,4±1,0^{E}	70,2±3,0^{D}	99,0±0,1^{B}
6	3	98,6±0,8^{AB}	55,2±1,5^{D}	71,2±1,4^{D}	100,0±0,0^{A}
6	4	98,8±0,3^{ABC}	66,0±1,2^{C}	76,4±0,9^{C}	100,0±0,0^{A}
6	5	99,1±0,5^{ABC}	74,2±1,0^{B}	79,6±1,1^{C}	100,0±0,0^{A}

* Valores marcados com as mesmas letras em uma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A adsorção de DON foi a mais afetada pela variação da dose de adsorvente, sendo esta relação diretamente proporcional. Para FB1, a dose de adsorvente afetou sua adsorção em pH 6. Neste pH, a relação dose adsorvente foi também diretamente proporcional. Entretanto, como os valores de adsorção observados no pH foram inferiores aos observados no pH 3,0 e o processo de mudança de pH utilizado neste estudo foi dinâmico, ou seja, o mesmo microtubo que passou por um pH de 3,0 segue para o pH 6,0 pode se concluir que houve dessorção da FB1 adsorvida em pH 3,0. Portanto, observa-se que o aumento da dose do adsorvente provocou uma menor dessorção da FB1 adsorvida no pH 3,0. A adsorção igual ou bem próxima de 100% para AFB1 e ZEA para valores de dose de 1 mg/mL mostra que o carvão selecionado apresentou uma grande afinidade para estas micotoxinas. Porém, levando-se em consideração a possibilidade de coocorrrência, para a aplicação deste CA seria mais pudente adotar uma maior concentração de CA a fim de garantir a adsorção de DON.

Ao diminuir a concentração de adsorvente, a área disponível para adsorção reduz também. Micotoxinas de maior afinidade podem ter preferência em detrimento da DON, por exemplo. A maior adsorção para ZEA comparada à adsorção de DON sugere que o grau de hidrofobicidade pode desempenhar um papel importante na adsorção de micotoxinas por CA (Avantaggiato *et al.*, 2004).

A fim de verificar se a relação da adsorção na condição MIX e IND se altera quando varia a concentração, a fórmula foi aplicada para outras concentrações na faixa estudada (Tabela 9).

Observa-se que a relação se mantém para as quatro micotoxinas. FB1 e DON apresentam leve tendência de diminuição conforme a concentração aumenta, o que pode indicar que em concentrações mais elevadas pode haver interferência da presença de outras toxinas no meio (MIX) para adsorção destas micotoxinas.

Tabela 9. Relação da adsorção observada considerando a condição com múltiplas micotoxinas e micotoxina individual, em pH 3,0 e 6,0 em função do aumento da concentração das micotoxinas.

	AFB1			FB1			DON	
mg/mL	pH3	pH6	mg/mL	pH3	pH6	mg/mL	pH3	pH6
0,5	0,969	0,980	1	1,000	1,200	1	1,042	0,998
1	0,961	0,981	2	1,000	1,156	2	1,002	0,963
2	0,957	0,981	3	1,000	1,141	3	0,987	0,950
3	0,955	0,981	4	1,000	1,133	4	0,979	0,943
4	0,955	0,981	5	1,000	1,128	5	0,975	0,939
5	0,954	0,981	6	1,000	1,125	6	0,972	0,936
6	0,954	0,981	7	1,000	1,122	7	0,969	0,934
7	0,954	0,981	8	1,000	1,121	8	0,968	0,932

As isotermas de adsorção foram obtidas pela plotagem da quantidade de micotoxina adsorvida por unidade de massa de adsorvente contra a concentração da toxina na solução (meio) sob condições de equilíbrio. Foram obtidas isotermas tanto para adsorção individual quanto multi-micotoxinas para os dois pHs (Figuras 17, 18, 19 e 20).

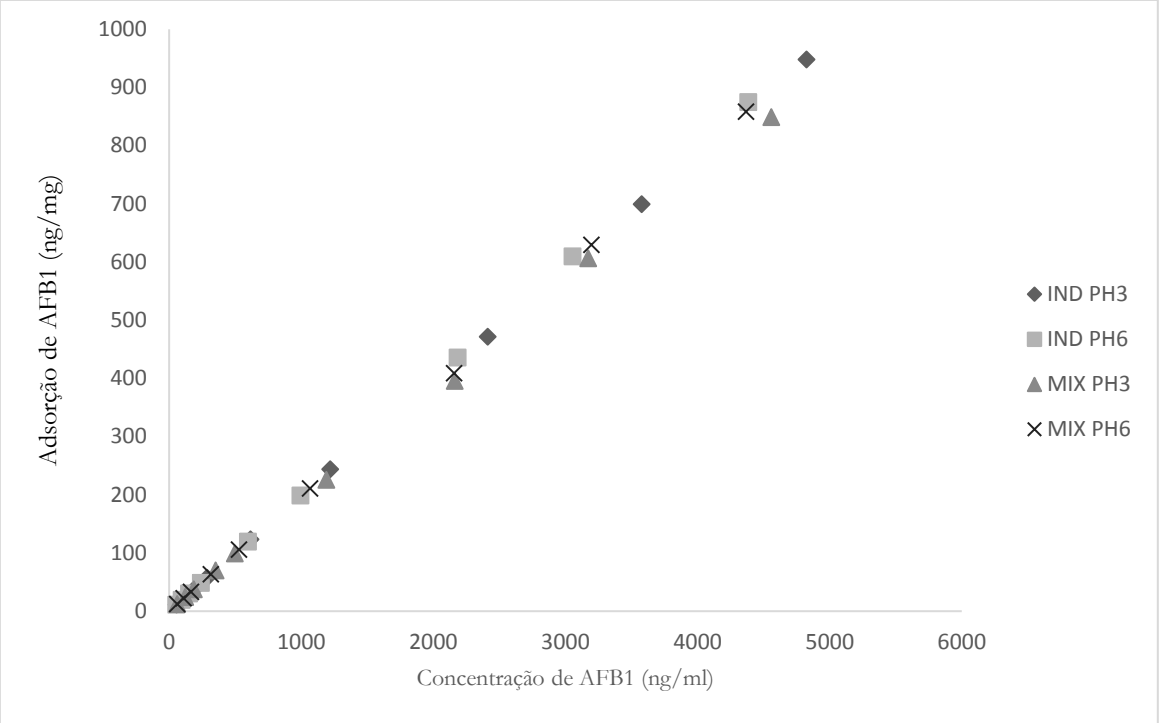

Figura 17. Adsorção de AFB1 proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (ng/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas.

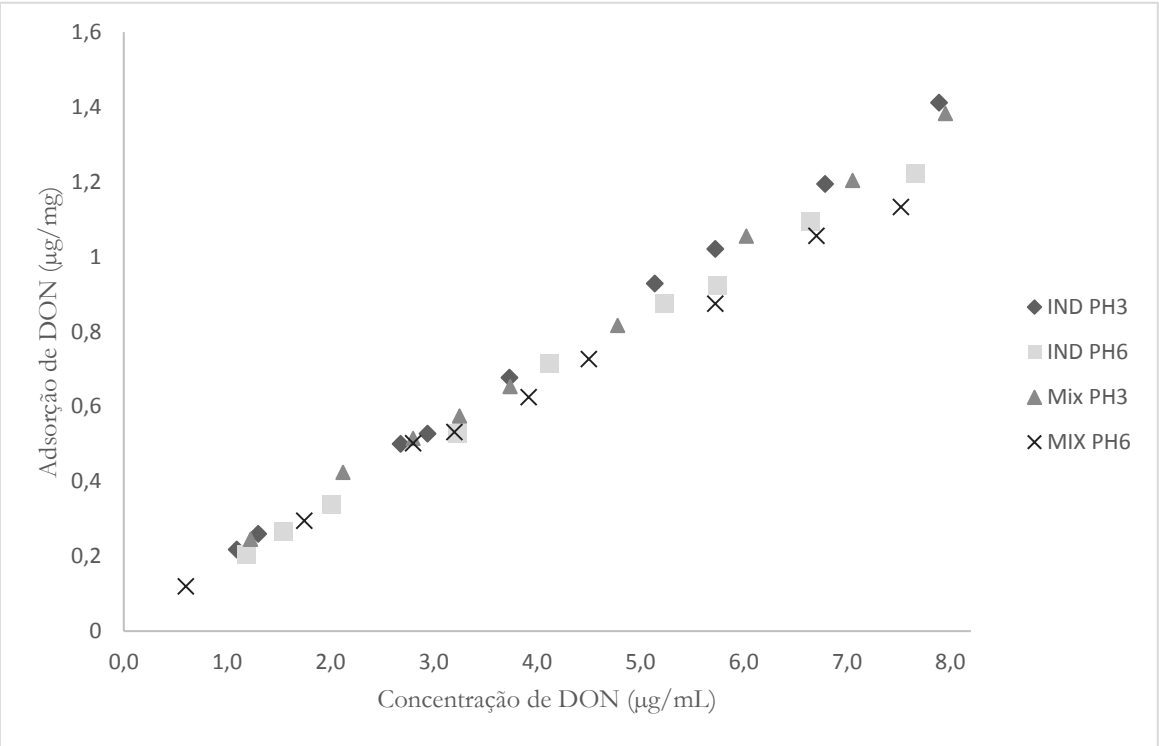

Figura 18. Adsorção de DON proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (µg/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas.

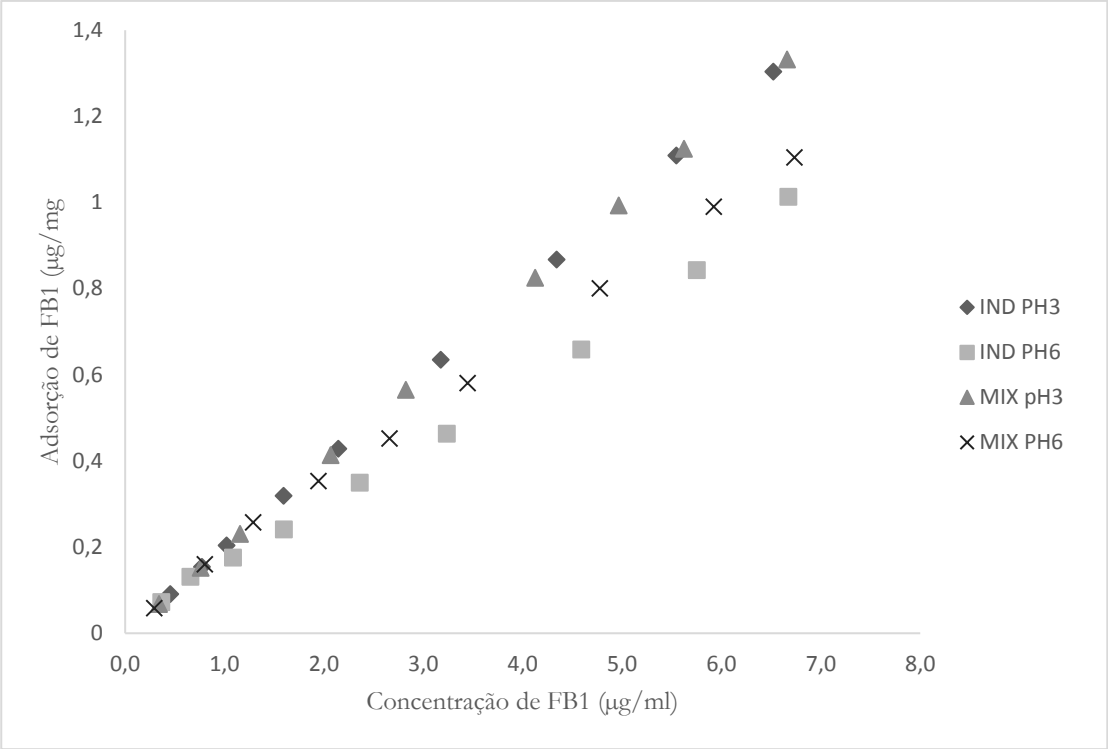

Figura 19. Adsorção de FB1 proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (µg/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas.

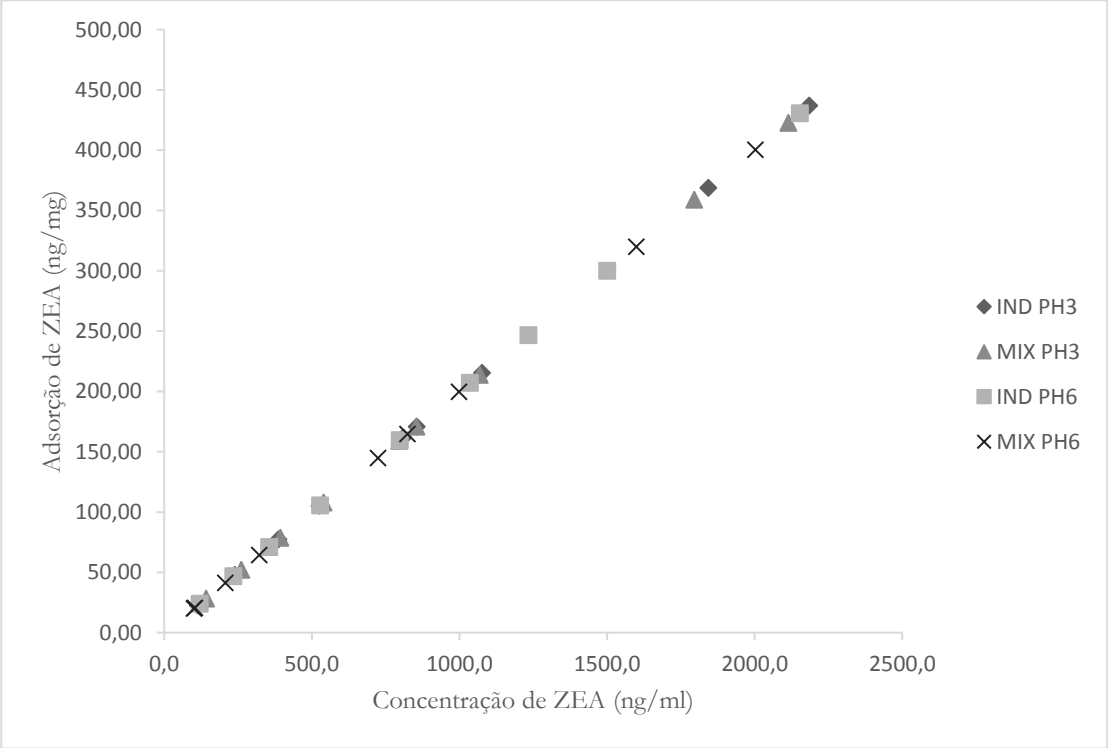

Figura 20. Adsorção de ZEA proporcionada pelo CA5, em função da concentração da micotoxina (ng/mL), em pH3 e 6 a 37°C, considerando a presença individual da micotoxina e simultânea das micotoxinas.

As isotermas obtidas são bem descritas pelo modelo linear (Tabela 10), indicando que na dose utilizada do CA e na faixa das concentrações das micotoxinas estudadas, houve uma relação de afinidade constante entre o adsorvente e o adsorvato, ou seja, a quantidade adsorvida é proporcional à concentração do adsorvato no meio. Dessa maneira, com o delineamento utilizado neste trabalho (quantidade do CA utilizado), não é possível se determinar a capacidade máxima de adsorção do carvão. O fato da isoterma ser linear sugere um mecanismo de partição entre a molécula (adsorvato) e o CA (adsorvente) (WANG *et al.*, 2018). Quanto menor o ângulo de inclinação da reta, menor a afinidade do carvão para a micotoxina. Para FB1, por exemplo, uma menor afinidade de adsorção ocorre para o pH6 na condição com múltiplas micotoxinas presentes, que é a reta de menor coeficiente angular (Tabela 10). Essa menor afinidade pode ser efeito da ionização da molécula como já discutido e de uma possível competição entre as micotoxinas.

Tabela 10. Valores de determinação, coeficientes angulares e lineares das equações das isotermas.

Micotoxina	Condição	pH	R^2	Coeficiente angular	Coeficiente linear
AFB1	IND	PH3	1	0,196	1,32
		PH6	1	0,199	0,11
	MIX	PH3	0,99	0,187	2,89
		PH6	0,99	0,196	0,039
DON	IND	PH3	0,99	0,174	0,029
		PH6	0,99	0,16	0,025
	MIX	PH3	0,99	0,166	0,045
		PH6	0,99	0,147	0,054
FB1	IND	PH3	0,99	0,45	0,015
		PH6	1	0,2	-
	MIX	PH3	1	0,2	-
		PH6	0,99	0,161	0,031
ZEA	IND	PH3	1	0,2	-
		PH6	1	0,2	-
	MIX	PH3	1	0,2	-
		PH6	1	0,2	-

3.3.3.4. Composição da solução do teste in vitro e dinâmica de mudança do pH

Os resultados de adsorção das micotoxinas estudadas nos diferentes tratamentos referentes a composição do meio estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito da composição do meio e método de elevação do pH na adsorção de micotoxinas. Média ±DP (n=5).

	Adsorção de micotoxinas* (%±DP)			
	AFB1	DON	FB1	ZEA
A	99,5±0,6 ^{A}	100,0±0,0 ^{A}	100,0±0,00 ^{A}	100,0 ^{A}
B	99,4±0,4 ^{A}	100,0±0,0 ^{A}	100,0±0,0 ^{A}	100,0 ^{A}
C	99,9±0,1 ^{A}	89,1±0,2 ^{B}	100,0±0,0 ^{A}	100,0 ^{A}
D	99,4±0,1 ^{A}	66,6±1,0 ^{D}	78,7±0,5 ^{C}	100,0 ^{A}
E	99,1±0,1 ^{A}	75,7±1,1 ^{C}	80,8±0,9 ^{B}	100,0 ^{A}

* Valores marcados com as mesmas letras em uma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0.05$)
** A = tampão e pH Estático, B = tampão e pH Dinâmico, C = Suco Gastrointestinal sem Pancreatina e pH Estático, D = Suco Gastrointestinal com Pancreatina e pH Estático e E = Suco Gastrointestinal com pancreatina e pH Dinâmico.

A adsorção de AFB1 e ZEA não sofreu o efeito do método de elevação do pH e nem da composição do meio. A adsorção de DON foi a mais sensível às mudanças aplicadas, mostrando diferença no uso da solução gastrointestinal com ou sem pancreatina e o método de elevação do pH evidenciando que ocorreu uma interação entre a composição do meio com solução gastrointestinal e a mudança do pH. A adoção do suco gastrointestinal reduziu os níveis de adsorção da DON pelo CA5 e a inclusão da pancreatina com a elevação de modo estático (D) foi o que apresentou menor adsorção para esta micotoxina.

Ao utilizar o tampão não ocorreu dessorção da FB1, independentemente do método de elevação do pH. Já no meio simulando a solução gastrointestinal, ocorre dessorção e interferência no método de elevação do pH. A escolha do meio para o teste *in vitro* dessa micotoxina pode ser determinante para a confiabilidade dos resultados obtidos e segurança para aplicação *in vivo*.

A adsorção proporcionada em solução tampão pode superestimar a adsorção de uma micotoxina, como observado neste trabalho, pois ao utilizar-se soluções com composição mais complexas como as de simulação do suco gastrointestinal, um maior número de compostos pode interagir com o adsorvente e ser adsorvidos preferencialmente em detrimento da adsorção das micotoxinas. A influência da presença de competidores em soluções de avaliação de adsorventes de micotoxinas foi observada também por Vekiru *et al.* (2007) que constataram a variação da adsorção em tampão, solução GI real e solução GI artificial. Jaynes *et al.* (2007) e Lemke *et al.* (2001) observaram o efeito matriz e Goossens *et al.* (2012) a influência da presença de antibióticos. Esses estudos mostraram que a presença de componentes da matriz alimentar e outros componentes da dieta, e mesmo a natureza do suco gastrointestinal, real ou artificial, podem influenciar negativamente na adsorção de micotoxinas em materiais adsorventes.

A simulação das condições fisiológicas do intestino animal, da complexidade da dieta alimentar e mesmo da microbiota intestinal presente é difícil de ser conseguida para uma representação autêntica da situação que ocorre quando uma dieta contaminada adicionada com adsorvente é ingerida por um animal. Contudo, as avaliações *in vitro* da adsorção de micotoxinas têm seu valor, pois permitem uma triagem de possíveis compostos candidatos a serem utilizados como adsorventes de micotoxinas, minimizando a utilização de animais em avaliações *in vivo*, tempo e recursos (VILA-DONAT *et al.*, 2018). Entretanto, para cumprir este objetivo, as metodologias de avaliação precisam ser aprimoradas no sentido de contemplar o máximo de variáveis possíveis, relacionadas ao animal e dieta, sem afetar viabilidade técnica e econômica dos mesmos.

3.4. Conclusão

Os cinco carvões ativados avaliados mostraram comportamento variável quanto à capacidade de adsorção das micotoxinas, frente à modificação do pH e à presença de outras micotoxinas no meio de avaliação. De modo geral a capacidade de adsorção da DON e FB1 foi mais afetada por estes dois fatores.

As características de área de superfície específica e tamanho e distribuição dos poros parecem ter uma influência sobre a adsorção das micotoxinas estudadas, relacionada com o grau de hidrofobicidade da molécula da micotoxinas. Assim, para a micotoxina mais hidrofóbica estudada, a ZEA, não houve influência da área de superfície específica e tamanho e distribuição dos poros sobre sua adsorção para os carvões estudados. Contudo, a quantidade de mesoporos influenciou a adsorção de AFB1, uma micotoxina menos hidrofóbica que a ZEA, mas com uma hidrofobicidade mais elevada que a FB1 e a DON. Já para FB1 e DON, as duas micotoxinas menos hidrofóbicas avaliadas, os dois parâmetros dos carvões influenciaram o processo de adsorção.

Dentre os cinco carvões ativados avaliados, o carvão CA5 (Norit) foi selecionado por apresentar elevada adsorção para todas as micotoxinas na condição MIX.

O pH e a presença de outras micotoxinas no meio reacional influenciou a adsorção de FB1 e DON pelo CA5. Os resultados sugerem que a dessorção da FB1 em pH 6 ocorreu devido ao PCZ do CA5 que é muito próximo do pH do meio. A adsorção de DON foi mais sensível aos fatores estudados, mas não ficou claro o que causou a dessorção desta micotoxina.

O estudo do tempo de contato mostrou que as micotoxinas são rapidamente adsorvidas pelo CA5 em pH3 (de 5 a 15 minutos para atingir adsorção máxima) o que é positivo pois evitaria

que a micotoxina ficasse exposta ao organismo. O efeito da dose de adsorvente influenciou principalmente a adsorção de DON e a dessorção de FB1 que ocorre no pH6. As isotermas obtidas foram lineares para as quatro toxinas. DON mostrou tendência de alteração na relação MIX/IND podendo indicar que em altas concentrações a presença de outras micotoxinas pode atrapalhar sua adsorção.

Os estudos *in vitro* são de grande relevância para a pré-seleção e classificação de AAM promissores. No entanto, muitas das metodologias adotadas estão muito longe das condições *in vivo*. Como visto nos resultados obtidos, as condições do teste podem influenciar nos resultados de adsorção (DON e FB1 neste caso). Sendo uma ferramenta tão importante, fica evidente a necessidade de aprimoramento e padronização dos protocolos *in vitro* e posteriormente a inclusão do meio reacional para multi-micotoxinas.

Referências

ALLWAR, A. Characteristics of Pore Structures and Surface Chemistry of Activated Carbons by Physisorption, Ftir And Boehm Methods**. Journal of Applied Chemistry (IOSRJAC)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.iosrjournals.org>. Acesso em: 16 maio. 2019.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in* V*itro* gastrointestinal model. **Food Chemestry and Toxicology.** 2003, 41, 1283-1290.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 817–824, 2004.

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379–388, 2005.

AVANTAGGIATO, G. *et al.* Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 497–507, 2014.

BANSAL, R.C.; GOYAL, M. Activated Carbon Adsorption. 2005. New York: Taylor & Francis. 497 pp.

BARATI M, CHAMANI M, MOUSAVI SN, HOSEINI SA, TAJ ABADI EBRAHIMI M. 2018. Effects of biological and mineral compounds in aflatoxin-contaminated diets on blood

parameters and immune response of broiler chickens. **Journal of Applied Animal Research**. 46:707–713

BARTON, S. S.; EVANS, M. J. B.; HALLIOP, E.; MCDONALD, J. A. F. Acidic and basic sites on the surface of porous carbon. **Carbon** 1997, 35 (9), 1361-1366.

BEHRENS, M. et al. Blood-Brain Barrier Effects of the Fusarium Mycotoxins Deoxynivalenol, 3 Acetyldeoxynivalenol, and Moniliformin and Their Transfer to the Brain. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143640, 23 nov. 2015.

BENSASSI, F. et al., In vitro investigation of toxicological interactions between the fusariotoxins deoxynivalenol and zearalenone, **Toxicon** 84 (2014) 1–6. DOI:10.1016/j.toxicon.2014.03.005

BHATTI, S.A.; KHAN, M.Z.; UL HASSAN, Z.; SALEEMI, M.K.; SAQIB, M.; KHATOON, A.; AKHTER, M. Comparative efficacy of bentonite clay, activated charcoal and trichosporon mycotoxinivorans in regulating the feed-to-tissue transfer of mycotoxins. **Journal of Science and Food Agricultural**. 2018, 98. 884–890

BOEHM H. P. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks on other carbons, **Carbon**, v. 32, p. 759-769, 1994.

BOEHM H. P., Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. **Carbon**, v. 40, p. 145–149, 2002.

BREN, U; PETER, F.; MAVRI, J. Guanine Alkylation by the Potent Carcinogen Aflatoxin B1: Quantum Chemical Calculations. **Chemical Research in Toxicology**. 2007 20 (8), 1134-1140 DOI: 10.1021/tx700073d

BRUNAUER, S; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, **Journal of the American Chemical Society**, 60 (1938) 309-319.

BUENO, D.J., L. di MARCO, G. OLIVER, A. BARDÓN. 2005. *In vitro* binding of zearalenone to different adsorbents. **Journal of Food Protection**. 68:613-615.

BUENO, C. I. C.; CARVALHO, W. A. Remoção de chumbo (II) em sistemas descontínuos por carvões ativados com ácido fosfórico e com vapor. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1911-1918, 2007.

CHEMICALIZE. Disponível online: http://www.chemicalize.org. Acesso em 4 fev. 2019.

CHEREMISINOFF, P.N., ELLERBUSCH, F. **Carbon Adsorption Handbook**. Ann Arbor Science 1 Ed, 1978

CLAUDINO, A. Preparação de Carvão Ativado a partir de Turfa e sua Utilização na Remoção de Poluentes. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

DI GREGORIO, M.C.; NEEFF, D.V.D.; JAGER, A.V.; CORASSIN, C.H.; CARÃO, Á.C.D.P.; ALBUQUERQUE, R.D.; AZEVEDO, A.C.D.; OLIVEIRA, C.A.F. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin**. 2014, 33, 125–135.

DOLL, S., DANICKE, S., VALENTA, H., FLACHOWSKY, G., 2004. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. **Archieve Animal Nutrition**. 58, 311–324.

FIOL, N.; VILLAESCUSA, I. Determination of sorbent point zero charge: Usefulness in sorption studies. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 79–84, 2009.

GALVANO, F.; RITIENI, A.; PIVA, G.; PIETRI, A. Mycotoxins in the human food chain. In: DIAZ, D. E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press. p. 187-224, 2005.

GALVANO, F., A. PIETRI, T. BERTUZZI, G. FUSCONI, M. GALVANO, A. PIVA, AND G. PIVA. 1996. Reduction of carry-over of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons**. Journal of Food Protection**. 59:551-5544.

GALVANO, F., A. PIETRI, B. FALLICO, T. BERTUZZI, S. SCIRE, M. GALVANO R. MAGGIORE. 1996. Activated carbons: in vitro affinity for aflatoxin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **Journal of Food Protection**. 59:545-5500.

GOOSSENS, J. *et al.* Influence of mycotoxins and a mycotoxin adsorbing agent on the oral bioavailability of commonly used antibiotics in pigs. **Toxins**, v. 4, n. 4, p. 281–95, 2012.

GRENIER, B.; APPLEGATE, T.J. Modulation of intestinal functions upon mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, 5 (2013), pp. 396-430

GRENIER, B.; OSWALD, I. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 285–313, 5 ago. 2011.

GUILARDUCI V. V. S., MESQUITA J. P., MARTELLI P. B., GORGULHO H. F., Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino, **Química Nova**, v. 29, p. 1226 – 1232, 2006.

HSIEH, C.T.; TENG, H. Influence of mesopore volume and adsorbate size on adsorption capacities of activated carbons in aqueous solutions. **Carbon**, v. 38, n. 6, p. 863–869, 1 jan. 2000.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic version (2006) of IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nded. (the "Gold Book"). A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1997.

IUPAC Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure and Applied Chemistry**; v. 66, p. 1739-1758. 1994.

IUPAC Reporting Physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface-area and porosity (recommendations 1984). Pure and Applied Chemistry; v. 57, n. 4, p. 603-619. 1985

JANKOWSKA, H., SWIATKOWSKI, A. e CHOMA, J. **Active Carbon**. New York, Ellis Horwood, 280 p., 1991.

JAYNES, W. F.; ZARTMAN, R. E.; HUDNALL, W. H. Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. Applied Clay Science, v. 36, n. 1–3, p. 197–205, 1 abr. 2007.

JOUANY, J.P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**. 137, 342–362.

KABAK, B., DOBSON, A.D.W., VAR, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrution**. 46, 593–619.

KANA, J. R.; TEGUIA, A.; TCHOUMBOUE, J. Effect of dietary plant charcoal from Canarium schweinfurthii Engl. and maize cob on aflatoxin B1 toxicosis in broiler chickens. **Advances in Animal Biosciences**, v. 1, n. 2, p. 462–463, 8 nov. 2010.

KONG, C.; SHIN, S.; KIM, B. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an in vitro approach. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 346, 2014.

KOSICKI, R., BŁAJET-KOSICKA, A., GRAJEWSKI, J., TWARUŻEK, M., 2016. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. **Animal Feed Science and Technology**. 215, 165–180.

LEMKE, S.L., OTTINGER, S.E., MAYURA, K., AKE, C.L., PIMPUKDEE, K., WANG, N., PHILLIPS, T.D., 2001. Development of a muti-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. **Animal Feed Science and Technology**, 93, 17-29.

MALEKINEJAD H., MAAS-BAKKER R.F., FINK-GREMMELS J. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. **Veterinary Research**, 36 (2005), pp. 799-810

MANTOVANI, M. Carvões ácidos obtidos a partir de resíduo da produção do biodiesel para utilização como catalisador na reação de esterificação do glicerol. Tese.

MIL, T. de; et al. Characterization of 27 mycotoxin binders and the relation with in vitro zearalenone adsorption at a single concentration. **Toxins**, v. 7, n. 1, 2015.

MISRA, D.N. Adsorption on heterogeneous surfaces: A dubinin-radushkevich equation, **Surface Science**, 18 (1969) 367-372

PENG, W. X.; MARCHAL, J. L. M.; VAN DER POEL, A. F. B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. **Animal Feed Science and Technology**, 2018.

PIS, J.J., PARRA, J.B., PUENTE, G., RUBIERA, F., PAJARES, J.A.. Development of macroporosity in activated carbons by effect of coal preoxidation and burn-off. **Fuel**, v. 77, p. 625-630, 1998.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. *In situ* absorption of aflatoxins in rats small intestine. **Mycopathologia**, v. 134, p .27-30, 1996.

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**. University of Illinois: Chicago, 2004.

RODRÍGUES-REINOSO, F. **Introduction to Carbon Technologies**. Publicaciones de la Universidad de Alicante. Spain.1997.

SABATER-VILAR, M; MALEKINEJAD, H; SELMAN, M.H.J.; VAN DERDOELEN, M.A.M. ; FINK-GREMMELS, J. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**. N.163, p. 81–90. 2007.

SÁNCHEZ, R C; MARTORELL, J C; BALDOVÍ, E C. Neutralización de micotoxinas por sustancias adsorbentes **Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación.** No 4 (2012): Nereis. 77-88

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT Guide for personal computers. 6. Ed. Cary: SAS Institute, 1996. 1028p.

SCOTT, P. 1993. Recent developments in analysis for mycotoxins in foodstuffs**. Trends in Analyses and Chemistry** 12: 373– 81.

SMITH M, MADEC S, COTON E, HYMERY N. Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. **Toxins** 2016, 8(4), 94; DOI: 10.3390/toxins8040094

STEINMETZ W.E., ROBUSTELLI P., EDENS E., HEINEMAN D. Structure and conformational dynamics of trichothecene mycotoxins**. Journal of Natural Products**. 2008;71:589–594. DOI:10.1021/np070562x

TADDA, A. M. et al. A review on activated carbon: process, application and prospects. **Journal of Advanced Civil Engineering Practice and Research**, v. 2, n. 1, p. 7–13, 2016.

THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9–10, 2015.

VALIX, M.; CHEUNG, W. H.; MCKAY, G. Preparation of activated carbon using low temperature carbonisation and physical activation of high ash raw bagasse for acid dye adsorption. **Chemosphere**, v.56, p.493-501, 2004.

VEKIRU, E. et al. Investigation of various adsorbents for their ability to bind Aflatoxin B1. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 1, p. 27–33, 2007.

VILA-DONAT, P. *et al.* A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

WANG, G. *et al.* Biodegradation of deoxynivalenol and its derivatives by Devosia insulae A16. **Food Chemistry**, v. 276, p. 436–442, 15 mar. 2019.

XU, X., PENG, Y., SAGHI, Z., GAY, R., INKSON, B.J.; MÖBUS, G. 2007. 3D reconstruction of SPM probes by electron tomography. **Journal of Physics: Conference Series**. 61, 810–814.

ZACHARIASOVA, M., DZUMAN, Z., VEPRIKOVA, Z., HAJKOVA, K., JIRU, M., VACLAVIKOVA, M., ZACHARIASOVA, A., POSPICHALOVA, M., FLORIAN, M., HAJSLOVA, J., 2014. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**. 193, 124–140.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos considerando a presença multi-micotoxinas começam a ganhar atenção e importância, tendendo a aumentar o número de trabalhos dada a frequente e muito preocupante coocorrência de micotoxinas. A falta de um AAM de amplo espectro estimula os estudos para novas tecnologias e principalmente para entender melhor os mecanismos envolvidos.

A tecnologia de adsorção tem grande potencial para atender essa demanda. As análises e meios de caracterização disponíveis/acessíveis atualmente não permitem uma conclusão exata dos parâmetros e características necessárias para obtenção de um adsorvente "perfeito". São muitos os fatores envolvidos, conforme ficou demonstrado neste trabalho. Porém os resultados fornecem informações importantes e subsídios para dar continuidade a estudos na área.

Resíduos agroindustriais são bons candidatos pela crescente onda de consciência ambiental e pela questão de custo, seja *in natura* ou modificados. São também matérias-primas para produção de carvões, que já se mostraram bons adsorventes para micotoxinas. Embora os carvões ativados sejam os mais promissores adsorventes para multi-micotoxinas, mais investigações *in vivo* são necessárias para confirmar suas habilidades e determinar quaisquer efeitos a longo prazo que possam ter sobre a absorção gastrointestinal de nutrientes essenciais.