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

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 para redução das concentrações de micotoxinas, que estão disponíveis ou em desenvolvimento. A tecnologia de adsorção, assim como das metodologias disponíveis para avaliação *in vitro* da capacidade de adsorção foram abordadas com mais ênfase. Na etapa experimental deste projeto, avaliaram-se cinco carvões ativados quanto a suas propriedades e capacidade de adsorção de micotoxinas presentes individualmente e combinadas (multi-micotoxinas) (Aflatoxina B1, Desoxinivalenol, Fumonisina B1 e Zearalenona). O carvão que apresentou maior capacidade de adsorção multi-micotoxinas foi selecionado para um estudo das interações entre adsorvente/adsorvato e possíveis fatores 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 de quais fatores podem afetar o processo de adsorção de cada uma delas. Porém mais estudos são necessários para esclarecer melhor o papel 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 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

1. INTRODUÇÃO

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 (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, hepato estimulante ou hepato protetora 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 carvões ativados 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 CAs para adsorção multi-micotoxinas e também um estudo mais detalhado da adsorção do CA selecionado a partir da triagem realizada.

2. CONCLUSÃO

A revisão apresentada 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 considerar a presença multi-micotoxinas nos últimos anos (a partir de 2014). Falar da distância dos protocolos usados com as condições reais e falta de padronização.

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

As características de área de superfície específica e tamanho e distribuição dos poros tiveram influência sobre a adsorção das micotoxinas estudadas, exceto para ZEA.

A presença de outras micotoxinas no meio reacional influenciou de maneira diferente a adsorção de FB1 e DON pelo CA5, sendo a adsorção de FB1 promovida e a adsorção de DON suprimida quando comparada a condição individual. A promoção da adsorção de FB1 no MIX pode estar relacionada com a redução da adsorção de DON.

A mudança para pH 6 provocou a dessorção de FB1 e DON. Os resultados sugerem que a dessorção da FB1 ocorreu devido ao PCZ do CA5 e às estruturas iônicas da molécula da micotoxina formadas na faixa de pH estudada. Não ficou claro o que causou a dessorção de DON.

O estudo do tempo de contato mostrou que as micotoxinas são rapidamente adsorvidas pelo CA5 em pH3 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.

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, a composição do meio e o método de elevação do pH podem influenciar significativamente nos resultados de adsorção de DON e FB1. Resultados superestimados ou mesmo subestimados podem levar a escolhas equivocadas para aplicação *in vivo*.

Sendo uma ferramenta tão importante, fica evidente a necessidade de aprimoramento e padronização dos protocolos *in vitro* bem como a inclusão de multi-micotoxinas no meio reacional para os testes.

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 low doses 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. **Critical 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.