

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS - PPGCEM**

PAULA SILVEIRA BETTIOL

**UTILIZAÇÃO DE ARGILA BENTONITA LIOFILIZADA NA
ADSORÇÃO DE MICOTOXINAS “AFLATOXINA B₁”**

**CRICIÚMA
2018**

PAULA SILVEIRA BETTIOL

**UTILIZAÇÃO DE ARGILA BENTONITA LIOFILIZADA NA
ADSORÇÃO DE MICOTOXINAS “AFLATOXINA B₁”**

Dissertação de Mestrado - DM
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais da Universidade do Extremo
Sul Catarinense - UNESC, como
requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciência e Engenharia de
Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Michael Peterson

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre
Gonçalves Dal-Bó

**CRICIÚMA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B565u Bettiol, Paula Silveira.

Utilização de argila bentonita liofilizada na adsorção de micotoxinas "aflatoxina B₁"/ Paula Silveira Bettiol. - 2018.

102 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Criciúma, 2018.

Orientação: Michael Peterson.

Coorientação: Alexandre Gonçalves Dal-Bó.

1. Argila. 2. Bentonita. 3. Micotoxinas.
4. Aflatoxina B₁. 5. Adsorção. Título.

CDD. 22. ed.

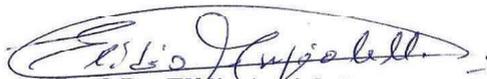
PAULA SILVEIRA BETTIOL

**UTILIZAÇÃO DE ARGILA BENTONITA LIOFILIZADA NA
ADSORÇÃO DE MICOTOXINAS “AFLATOXINA B₁”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais na área de Tecnologia de Materiais no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC.

Criciúma, 31 de julho de 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Elídio Angioletto

Universidade do Extremo Sul Catarinense – Unesc



Prof. Dr. Adriano Michael Bernardin

Universidade do Extremo Sul Catarinense – Unesc



Jeane de Almeida do Rosário

Universidade do Estado de Santa Catarina - Udesc

As pequenas Chiara e Elisa, que
possuem o futuro em suas mãos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a maior fonte de conforto nos momentos difíceis e por seus planos para minha vida serem sempre maiores que os meus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Michael Peterson, pela confiança, conhecimento, apoio e amizade dedicado a todas as etapas no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó, pela confiança, conhecimento e apoio para entrada no programa de mestrado e sua amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano Michael Bernardin, pelos ensinamentos na área de estatística, sua amizade e incentivo para a realização deste trabalho, e por prontamente aceitar ser banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Elídio Angioletto, pela participação na banca, sua amizade e sobretudo, pela cordialidade e prontidão em sempre atender minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Jeane de Almeida do Rosário, por prontamente aceitar ser banca examinadora deste trabalho e estar disposta a contribuir com seus conhecimentos na área de argilominerais.

À Profa. Dra. Maria Alice Prado Cechinel, pela confiança, amizade e pelos valiosos ensinamentos sobre a área de adsorção e por todas as excelentes contribuições dadas para o melhoramento desta dissertação.

Às Empresas Rio Deserto e seus funcionários Rosimere Redivo Venâncio, Sabrina Tavares, Cinthia Miotello e Bruna Matiola Scursel por fornecerem a amostra para estudo e por disponibilizarem sua estrutura e tempo para a realização dos principais ensaios.

Ao Instituto SENAI de Tecnologia em Cerâmica e seus funcionários, por realizar as análises de caracterização e o pronto atendimento.

Ao diretor executivo do Instituto SAMITEC o Sr. Leandro Zanini Giancomini, por toda a atenção dada às amostras enviadas para análise de HPLC.

Ao Instituto de Engenharia e Tecnologia IDT/UNESC e sua equipe de profissionais, especialmente Leticia Patrício Ferreira e Fábio Elyseu, que auxiliaram nos ensaios de caracterizações deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Reatores e Processos Industriais - LabRePI, principalmente ao bolsista de iniciação científica Kelvin Goularte dos Santos e à Doutoranda Camila Machado de Oliveira, pela valiosa participação na execução do planejamento experimental deste trabalho, amizade e carinho serão para sempre guardados no coração.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - PPGCEM/UNESC, por todos os conhecimentos compartilhados em sala de aula, amizade e ótimo atendimento junto a coordenação.

Aos meus colegas e amigos de pós-graduação, em especial a Aline Ribeiro, que foi um presente desta fase, a Danila Ferreira Niero, Natassia Bratti, Gabriela Milak, Maria Claudia Damo Marcon, Gabriela Ugioni Felipe e Radamés Darós Darolt, por toda a amizade e pelas atividades desenvolvidas em conjunto e principalmente pelas ótimas risadas.

Ao PROSUC - CAPES, Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Educação Superior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

À UNESC e a toda sua equipe de profissionais que, juntamente com uma excelente estrutura, forneceram todos os recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Luana Silva Claumann e Rogério Giron Claumann, por liberarem a troca de horários de turno de serviço facilitando minha ida às aulas do programa.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

E finalmente às pessoas possuem o maior significado e dão sentido a toda essa trajetória: meus queridos pais Fernando Bettiol Filho e Albertina Silveira Bettiol pelo dom da vida e que vibraram cada segundo com minha entrada no programa de mestrado, as minhas queridas irmãs e seus esposos Fernanda Silveira Bettiol e Raquel Silveira Bettiol, amigas companheiras e fiéis incentivadoras de todas as fases e escolhas da vida, aos meus amados sogros Paulo Souza Pereira e Sonia Maria Rosso Pereira e minha cunhada Tayse Rosso Pereira por serem minha segunda família, por todo apoio e carinho prestado e, finalmente, a ele, meu amado noivo e maior incentivador Richard Rosso Pereira, pelo carinho incondicional e por ser companheiro no real sentido da palavra, estando ao meu lado em todos os momentos.

“Na caminhada da vida, aprendi
que nem sempre temos o que
queremos.

Porque nem sempre

o que queremos nos faz bem.

Foi preciso sentir dor, para que
eu aprendesse com as lágrimas.

Foi necessário o riso, para que
eu não me enclausurasse com o
tempo.

Foram precisas as pedras, para que
eu construísse meu caminho.

Foram fundamentais as flores, para
que eu me alegrasse na caminhada.

Foi imprescindível a fé, para que
eu

não perdesse a esperança.

Foi preciso perder, para que
ganhasse de verdade.

Foi no silêncio que me
escutaram com clareza.

Pois sem provas não tem
aprovação.

E a vitória sem conquista é ilusão.”

Autor desconhecido

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por uma variedade de fungos filamentosos de diferentes linhagens. O fungo *Aspergillus* é responsável por produzir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é considerada a micotoxina de maior toxicidade e com maior poder carcinogênico natural dentre as micotoxinas classificadas como “Grupo 1” pela International Agency for Research on Cancer. As constantes contaminações de rações comerciais por micotoxinas ocasionam a exposição crônica de animais de corte a estas toxinas que afetam significativamente a rentabilidade de sua produção, bem como causa contaminações indiretas aos seres humanos. Nesse sentido, métodos para a desintoxicação de alimentos contaminados com AFB₁ em larga escala, práticos e econômicos são atualmente de grande interesse. Entre as abordagens mais promissoras e práticas na redução das aflatoxicose está a adição de materiais adsorventes não nutritivos aos alimentos contaminados destinados à ração animal, como por exemplo argilas bentoníticas (montmorilonita) naturais ou ativadas (tratadas quimicamente). O processo de liofilização é eficiente em características como contração do produto, perda de voláteis, decomposição térmica, ações enzimáticas e desnaturação de proteínas, se comparado com outros meios de desidratação, ou seja, mantém a integridade do produto. Neste trabalho objetivou-se liofilizar em diferentes parâmetros de congelamento uma amostra de bentonita e aplicá-la para adsorção de AFB₁. Aplicaram-se metodologias estatísticas a fim de identificar o melhor parâmetro de congelamento para a amostra liofilizada na adsorção de AFB₁ e seu comportamento e possíveis alterações foram avaliados antes e após o processo de liofilização, por fluorescência de raios X (FRX), análise elementar (CHNS), difratometria de raios X (DRX), análises térmicas de ATD+TG com espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplado, área superficial e número de poros por (BET), teor de umidade, inchamento, capacidade de troca catiônica (CTC) e adsorção de AFB₁, aplicando-se 0,5% da amostra como AAM para suco gástrico e suco intestinal pelo método imunoenzimático Elisa e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Observou-se uma redução no teor de umidade de 46%, redução de 47% de sua área superficial e 7,12 % de sua porosidade total em comparação ao padrão, bem como também uma alteração estrutural em seu espaçamento basal que reduziu 7,34%. No entanto quanto a sua capacidade de adsorção para AFB₁ foi observado um aumento de 4% para suco intestinal em pH

6,0 pelo método Elisa sendo que nos ensaios de HPLC foi obtida quase 100% de adsorção para pH 3,0 (99,96%) e pH 6,0 (99,94%), sendo considerados valores promissores para aplicação como AAM em ensaios *in vitro*.

Palavras-chave: Micotoxina, Aflatoxina B₁, Adsorção, Bentonita, Liofilização.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by a variety of filamentous fungi of different strains. The *Aspergillus* fungus is responsible for producing the aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is considered the most toxic mycotoxin with the highest natural carcinogenic potential among the mycotoxins classified as "Group 1" by the International Agency for Research on Cancer. Due to constant contamination of commercial feed by mycotoxins there is chronic exposure of animals to these toxins that significantly affect the profitability of their production, as well as causes indirect contaminations to humans. Methods for detoxification Foods contaminated with. Large-scale, practical and economical AFB₁ are currently of great interest. Among the most promising and practical approaches to reducing aflatoxicosis is the addition of non-nutritive adsorbent materials to contaminated food intended for animal feed, such as natural or activated (chemically treated) bentonitic (montmorillinite) clays. The freeze-drying process is efficient in characteristics such as product contraction, loss of volatiles, thermal decomposition, enzymatic actions and protein denaturation, when compared with other means of dehydration, that is, it maintains the integrity of the product. In this work the aim was to freeze a sample of bentonite in different freezing parameters and apply it to adsorption of AFB₁. Statistical methodologies were applied to identify the best freezing parameter for the lyophilized sample in the adsorption of AFB₁ and its behavior and possible alterations were evaluated before and after the lyophilization process, by X-ray fluorescence (FRX), elemental analysis (CHNS), X-ray diffractometry (XRD), thermal analysis of ATD + TG with coupled Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR), surface area and number of pores per BET, moisture content, swelling, cation exchangeability (CTC) and AFB₁ adsorption, applying 0.5% of the sample as AAM to gastric juice and intestinal juice by the Elisa enzyme-linked immunosorbent assay and by high-performance liquid chromatography (HPLC). A 46% reduction in moisture content, 47% reduction in surface area and 7.12% in total porosity compared to the standard was observed, as well as a structural change in basal spacing that reduced 7.34 %. However, as for its adsorption capacity for AFB₁, a 4% increase in intestinal juice at pH 6.0 was observed by the Elisa method, and in the HPLC assays were almost 100% of adsorption at pH 3.0 (99.96%). and pH 6.0 (99.94%), being considered promising values for application as AAM obtained in vitro assays.

Keywords: Mycotoxin, Aflatoxin B₁, Adsorption, Bentonite, Lyophilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas de contaminação por micotoxinas em alimentos.	29
Figura 2 - Fases do crescimento fúngico e localização da síntese de micotoxinas.	31
Figura 3 - Condições de atividade de água e temperatura para desenvolvimento dos fungos.	34
Figura 4 - Principais aflatoxinas e metabólitos.	36
Figura 5 - Estrutura de uma esmectita (montmorilonita).	42
Figura 6 - Mecanismo de adsorção entre as camadas de esmectita.	43
Figura 7 - Diagrama de fases da água mostrando as condições para a sublimação.	46
Figura 8 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.	48
Figura 9 - Ultrafreezer UFR30 Liotop.	52
Figura 10 - Liofilizador L101 Liotop.	53
Figura 11 - Superfície de resposta para interação (1) Temperatura por (2) Massa para adsorção de AFB ₁ a pH 3,0.	58
Figura 12 - Curva de nível para a interação (1) Temperatura por (2) Massa para adsorção de AFB ₁ a pH 3,0. Erro! Indicador não definido.	
Figura 13 - Superfície de resposta para interação (1) Temperatura por (3) Tempo para adsorção de AFB ₁ a pH 3,0.	59
Figura 14 - Curva de nível para a interação (1) Temperatura por (3) Tempo para adsorção de AFB ₁ a pH 3,0. Erro! Indicador não definido.	
Figura 15 - Superfície de resposta para interação (1) Temperatura por (2) Massa para capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g.	62
Figura 16 - Curva de nível para a interação (1) Temperatura por (2) Massa para capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g. Erro! Indicador não definido.	
Figura 17 - Superfície de resposta para interação (1) Temperatura por (3) Tempo para capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g.	63
Figura 18 - Curva de nível para a interação (1) Temperatura por (3) Tempo para capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g. ... Erro! Indicador não definido.	
Figura 19 - DRX das amostras de bentonita (a) bruta, (b) liofilizada LBS 07 e (c) comparativo do pico de difração do plano (001) para as duas amostras.	66
Figura 20 - Espectro de DTA/TG + FTIR acoplado para bentonita bruta (a) 3D, (b) 2D.	70

Figura 21 - Espectro de DTA/TG + FTIR acoplado para bentonita liofilizada LBS 07 (a) 3D, (b) 2D.....	71
Figura 22 - Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ para a amostra (a) bruta e (b) liofilizada (LBS 07).	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais micotoxinas com seus respectivos fungos produtores, substratos e efeitos no homem e nos animais.....	30
Tabela 2 - Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para Aflatoxinas.....	37
Tabela 2 - Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para Aflatoxinas.....	38
Tabela 3 - Matriz de dados do planejamento fatorial 2 ³	53
Tabela 4 - Percentual de adsorção de AFB ₁ utilizando bentonita liofilizada para pH 3,0 e pH 6,0.	56
Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores percentuais de adsorção de AFB ₁ em pH 3,0 das amostras liofilizadas. Legenda: SQ = Soma dos quadrados; GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F = Estatística F; p = Valor p.	57
Tabela 6 - Capacidade de troca catiônica para amostras liofilizadas. ...	60
Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores de capacidade de troca catiônica total para amostras liofilizadas.	61
Tabela 8 - Análise química de FRX das bentonitas bruta e liofilizada LBS 07.....	64
Tabela 9 - Resultados de quantificação dos elementos C, H, N e S da amostra em estudo.....	65
Tabela 10 - Capacidade de inchamento e teor de umidade para as amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07).....	68
Tabela 11 - Resultados da capacidade de troca catiônica para as amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07).....	69
Tabela 12 - Área superficial e porosidade total das amostras bruta e liofilizada (LBS 07)	72
Tabela 13 - Resultados da análise de adsorção de micotoxina <i>in vitro</i> para as amostras bruta e liofilizada (LBS 07).	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM. Aditivo Antimicotoxina

AFB₁. Aflatoxina B₁

AFB₂. Aflatoxina B₂

AFG₁. Aflatoxina G₁

AFG₂. Aflatoxina G₂

AFs. Aflatoxinas

AlB₂. Diboreto de alumínio

A_w. Atividade de água

CTC. Capacidade de Troca Catiônica

DNPM. Departamento Nacional de Produção Mineral

FRX. Fluorescência de raios X

HSCAS. Aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado

IARC. International Agency for Research on Cancer

LabRePI. Laboratório de Reatores e Processos Industriais

LabValora. Laboratório de Valoração de Resíduos

LAEC. Laboratório de Análises e Ensaio de Carvão

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SAMITEC. Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas

ZEA. Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1	MICOTOXINAS	29
3.1.1	Fatores que Favorecem o Crescimento das Micotoxinas	32
3.2	PRINCIPAIS MICOTOXINAS	34
3.2.1	Aflatoxinas	35
3.3	LEGISLAÇÃO PARA MICOTOXINAS	37
3.4	ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS	39
3.4.1	Bentonita	40
3.5	PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO	44
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE BENTONITA	48
4.2	PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DA AMOSTRA DE BENTONITA	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO À LIOFILIZAÇÃO DA ARGILA BENTONÍTICA	56
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ARGILAS BENTONÍTICAS	64
5.2.1	Análises químicas	64
5.2.2	Difratometrias de Raios X	65
5.2.3	Capacidade de troca catiônica, inchamento e teor de umidade 67	
5.2.4	Análises térmicas (DTA/TG/FTIR)	69
5.2.5	Porosidade total, área superficial e isoterma de adsorção e dessorção (BET)	72
5.3	ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B ₁ <i>in vitro</i> PELOS MÉTODOS ELISA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	73
6	CONCLUSÃO	76
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	78
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO A	91
	ANEXO B	99

1 INTRODUÇÃO

Na dieta de seres humanos e animais, os cereais se encontram dentre os seus principais constituintes. Responsáveis por manter uma boa saúde, eles fornecem os nutrientes essenciais, como carboidratos, proteínas, gorduras, importantes minerais, vitaminas e micronutrientes (ALIM et al., 2018).

Cerca de dois bilhões de toneladas de cereais são produzidas anualmente, sendo o trigo o responsável pela principal safra estratégica do mundo, com uma produção global de 729 milhões de toneladas no ano de 2014. Na sequência, encontram-se o milho e o arroz, que são os cereais com a maior incidência de contaminação por micotoxinas (STANCIU et al., 2017). A contaminação dos alimentos por micotoxinas é um problema de saúde pública e gera grande impacto econômico, sendo responsável pela perda substancial na qualidade dos produtos, tornando-os impróprios para o consumo (PATRIARCA; FERNÁNDEZ PINTO, 2017).

A infecção por fungos e a produção de micotoxinas pelos cereais ocorre devido à composição desses alimentos, que é majoritariamente de substâncias orgânicas, e pode ocorrer durante as fases de crescimento, colheita e armazenamento dos produtos agrícolas. Grande parte das micotoxinas apresenta estabilidade química significativa, que lhe permite permanecer nos alimentos mesmo após a remoção dos fungos através de processos industriais de produção e embalagem a nível doméstico. Aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona (ZEA), desoxinivalenol e ocratoxina A são micotoxinas que trazem grandes riscos à alimentação e à saúde humana (AL-TAHER et al., 2017; KHARAYAT; SINGH, 2018). Entretanto, embora possa trazer prejuízos à saúde animal, toneladas de ração são produzidas com cereais de entrada contaminados e, em seu processamento (fermentação e peletização), dificilmente as concentrações de micotoxinas, por sua estabilidade, são reduzidas (ZACHARIASOVA et al., 2014).

Quando a ração contaminada é fornecida aos animais, tem-se a possibilidade de contaminação direta, como a micotoxicose no animal, e a contaminação indireta dos seres humanos através do leite, ovos e até mesmo da carne. Portanto, é necessário prevenir a contaminação desses alimentos (ZACHARIASOVA et al., 2014).

Em países onde há predominância de clima úmido e quente, essas medidas se tornam muito difíceis e são complementadas pela desintoxicação, caminho esse que, apesar de novo, mostra resultados

favoráveis na proteção dos animais contra as toxinas fúngicas (PATRIARCA; FERNÁNDEZ PINTO, 2017).

O uso de aditivos antimicotoxinas é uma alternativa para solução desse problema. Em 2009, a União Européia (386/2009 / EC) aprovou o uso de agentes desintoxicantes de micotoxinas como aditivos alimentares para prevenir micotoxicoses em animais criados em fazendas. Eles são incluídos na dieta dos animais como medida corretiva, reduzindo a absorção gastrointestinal das micotoxinas. Vale ressaltar que o uso de tais produtos não libera a utilização de alimentos que ultrapassem os limites permitidos de micotoxinas em rações (VILA-DONAT et al., 2018). Dependendo do seu modo de ação, os aditivos atuam ligando as micotoxinas à sua superfície (adsorção) ou degradando-as e/ou transformando-as em metabolitos menos tóxicos (biotransformação). Assim, definem-se pelo menos duas categorias principais: agentes adsorventes e agentes de biotransformação (VILA-DONAT et al., 2018).

Dentre os aditivos antimicotoxinas, destacam-se as bentonitas, que apresentam a característica de adsorver micotoxinas específicas. Elas são relativamente baratas e inertes a níveis nutricionais, o que as tornam um suplemento alimentar atrativo (ROSSI et al., 2010). Neste contexto, melhorar as características de adsorção das bentonitas é uma alternativa de grande interesse para indústria agropecuária, a fim de diminuir as perdas nas criações de animais de corte.

O presente trabalho teve como objetivo potencializar a ação adsorvente de bentonitas sódicas aplicando-se a técnica de liofilização com o intuito de melhorar as suas características estruturais e a potencialização de seu poder de sorção para micotoxinas (Aflatoxina B₁). Embora a liofilização seja um processo de alto custo, sua utilização é justificada no objetivo de promover melhorias na capacidade de adsorção de micotoxinas, vislumbrando a aplicação da bentonita como aditivo antimicotoxinas em rações animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de remoção da micotoxina “aflatoxina B₁” por uma argila bentonítica liofilizada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a influência dos parâmetros tempo de congelamento, temperatura de congelamento e massa de argila bentonítica no processo de liofilização;
- Identificar as principais características físico-químicas das argilas bentoníticas antes e após o processo de liofilização;
- Avaliar a capacidade de remoção da micotoxina “aflatoxina B₁” pela argila liofilizada *in vitro* em sistemas que simulam o trato gastrointestinal dos animais através do método imunoenzimático (ELISA) e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por uma variedade de fungos filamentosos de diferentes linhagens, sendo os principais gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Alternaria*. Alguns desses metabólitos secundários, que são compostos não essenciais para o crescimento vegetativo em cultivo puro (WATKINSON, 2016), são explorados por sua atividade como antibióticos utilizados em fármacos e outros estão envolvidos em doenças, no contato dos fungos com plantas e animais (LOPES, 2011). Os fungos filamentosos (bolores) são os principais responsáveis pela produção de micotoxinas (MONEY, 2016) e os principais contribuintes na contaminação de cadeias nas culturas alimentares (Figura 1), desde o plantio, colheita, estocagem até o transporte (AL-TAHER et al., 2017; LUO; LIU; LI, 2018).

Figura 1 - Etapas de contaminação por micotoxinas em alimentos.



Fonte: Adaptado de VALMORBIDA (2016).

A palavra micotoxina é derivada do grego “Mikes”, que significa fungo e do latim “Toxicum”, que significa veneno ou toxina, e o termo micotoxina possui o significado de fungo venenoso ou tóxico (BULLERMAN, 1979; SCUSSEL, 1998). Historicamente, as micotoxinas vêm sendo responsáveis por grandes epidemias, afetando tanto humanos como animais. Apesar de existirem excelentes estudos

sobre doenças causadas por fungos em alimentos e rações na primeira metade do século XX, o entendimento das micotoxinas e seus efeitos à saúde humana e animal vieram apenas recentemente. O termo micotoxicose foi usado pela primeira vez em 1952, a fim de identificar doenças resultantes do crescimento de fungos em alimentos e rações (PITT, 2014). A Tabela 1 apresenta uma versão geral das mais importantes micotoxinas, bem como seus efeitos nos animais e seres humanos (PITT, 2014; SANTURIO, 2000; SCUSSEL, 2008).

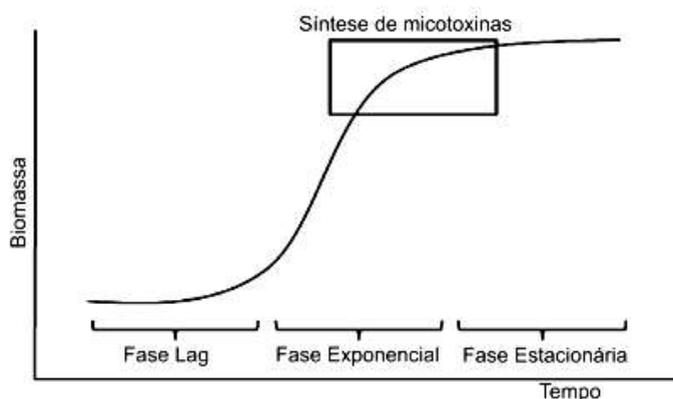
Tabela 1 - Principais micotoxinas com seus respectivos fungos produtores, substratos e efeitos no homem e nos animais.

Principais substâncias	Principais fungos produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim e milho.	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1	Hepatotóxica, nefrotóxica e cancerígena.
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz.	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrina	Nefrotóxica para suínos.
Centeio e grãos em geral.	<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidades ou convulsões.
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago.
Cevada, café e vinho.	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio.	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Myrothecium sp.</i> , <i>Stachybotrys sp</i> e <i>Trichothecium sp</i>	Tricocenos: T2, neosolaniol, fusanona x, nivalenol, deoxivalenol.	Hemorragias, vômitos e dermatites.
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxicidade, síndrome de masculinização e feminização em suínos.

Fonte: Fani, 2009.

Aparentemente, as micotoxinas não possuem significado bioquímico sobre o crescimento de fungos e podem ser produzidas para proporcionar um sistema de defesa contra insetos, microrganismos, animais e seres humanos. Normalmente, são formadas numa parte intermediária que se localiza ao final da fase exponencial e início da fase estacionária do crescimento fúngico, estando associadas à fase de diferenciação e esporulação (Figura 2) (CASTILLO, 2007).

Figura 2 - Fases do crescimento fúngico e localização da síntese de micotoxinas.



Fonte: Adaptado de CASTILLO (2007).

Mais de 100 fungos toxigênicos são conhecidos e cerca de 300 destes compostos são identificados como micotoxinas. No entanto, não há estimativa da quantidade de pessoas afetadas por micotoxicoses, visto que pode haver casos não relatados (LUO; LIU; LI, 2018).

O coletivo de enfermidades conhecidas como micotoxicoses ocorre quando há ingestão de alimentos contaminados por toxinas, caracterizadas por serem síndromes difusas, que podem desencadear desde uma doença aguda a doenças crônicas. Possuem afinidades por determinados órgãos dependendo do tipo de toxina, sendo estes fígado, rins, tecido epitelial e sistema nervoso central. Podem levar a uma morte rápida ou lenta com a formação de tumores (câncer). Os sintomas e a gravidade da micotoxicose dependem de alguns fatores como a toxicidade da micotoxina, quantidade (ingerida ou inalada), duração, via de exposição, sexo, idade, estado de saúde e estado nutricional do indivíduo exposto.

É possível também a contaminação com mais de uma micotoxina, o que potencializa os efeitos das micotoxicoses no organismo atingido. No Brasil, as micotoxinas que frequentemente ocorrem e trazem maior risco são as aflatoxinas e as fumonisinas (SCUSSEL, 2008; VILADONAT et al., 2018).

Micotoxinas se desenvolvem principalmente em grãos como amendoim, pistache, nozes, castanha, sementes de algodão, milho, trigo, soja, arroz, feijão, cacau, sorgo, centeio, café e cevada. No entanto também podem ser encontradas em frutas secas, chás e pimentas (DINIZ, 2002; KAMALA; KUMAR, 2018).

A contaminação na cadeia alimentar humana e animal pode ocorrer de forma direta e indireta. A contaminação indireta dos alimentos ocorre quando um dos ingredientes foi previamente contaminado por determinado gênero de fungo toxigênico. Ainda que ocorra eliminação do fungo no processamento, as micotoxinas apresentam estabilidade química, permanecendo, assim, no produto final. Já a contaminação direta ocorre quando o alimento ou ração é contaminado por um fungo toxigênico, que em condições favoráveis produz a micotoxina e contamina os produtos (SHI et al., 2018).

As micotoxinas são responsáveis por perdas de milhões de dólares anuais, afetando a saúde pública e a agroeconomia (LEITÃO et al., 2017). Os impactos econômicos oriundos da contaminação por micotoxinas estão diretamente ligados à baixa produtividade no campo, redução da produção animal, que reflete em grandes prejuízos para países que exportam produtos agrícolas, principalmente países em desenvolvimento, afetando, por fim, a saúde humana desestabilizando a segurança alimentar (SOUZA, 2014)

3.1.1 Fatores que Favorecem o Crescimento das Micotoxinas

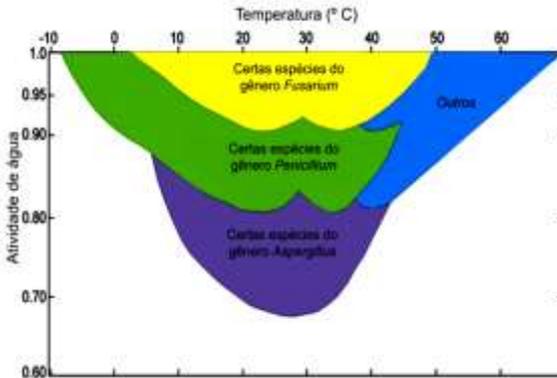
Há uma série de fatores que influenciam o início do processo de produção das micotoxinas. Dentre eles, destaca-se a predisposição do substrato à colonização pelo fungo produtor da toxina, o que demonstra porque determinados fungos crescem melhor em determinados substratos (SANTOS et al., 2016). É importante salientar que a presença do fungo toxigênico nos substratos não necessariamente confirma que exista a produção de micotoxinas, pois a produção desta substância está ligada à capacidade de biossíntese do fungo, bem como as condições ambientes com variação nas temperaturas diurnas e noturnas (PINTO, 2001).

Dentre os fatores que influenciam a produção de micotoxinas existem os fatores físicos e biológicos. Destacam-se nos físicos a temperatura ambiente, umidade, atividade de água (A_w) pH, umidade relativa do ar durante o processo de estocagem, aeração, danos mecânicos no processo de carga e descarga dos produtos, bem como o tempo de estocagem. Os fatores físicos estão diretamente ligados à alimentação dos fungos com a presença de macro e micronutrientes.

Os fatores biológicos estão ligados à capacidade genética do fungo em produzir essas micotoxinas. Destacando-se a quantidade de esporos, a interação com outros tipos de fungos no mesmo substrato, a interação entre as micotoxinas geradas e a presença de parasitas como insetos, roedores e ácaros (CIEGLER, 1978; WAWRZY尼亚K; WASKIEWICZ; RYNIECKI, 2018).

Dos fatores físicos e biológicos descritos acima destacam-se com maior grau de importância a temperatura, umidade, A_w , o tipo de fungo contaminante bem como sua interação microbiana (SCUSSEL, 1998). É importante salientar que a A_w se trata da quantidade de água que está livre no sistema, ou seja, não está ligada de nenhuma forma (física ou química) à substância e, portanto, está totalmente disponível ao metabolismo do fungo. Assim, o crescimento dos fungos está diretamente relacionado com a A_w presente no alimento. Na Figura 3 é possível observar as condições de A_w e as temperaturas ideais para o desenvolvimento de algumas espécies de fungos geradores de micotoxinas (SOUZA, 2014).

Figura 3 - Condições de atividade de água e temperatura para desenvolvimento dos fungos.



Fonte: Souza, (2014).

Para climas tropicais, como no Brasil, esta gama de fatores influencia diretamente. Isso dificulta o controle na fase de prevenção, pois os regimes pluviométricos não facilitam os processos de secagem dos grãos, principalmente do milho. Sendo assim, o Brasil apresenta condições ambientais excelentes para o crescimento das micotoxinas, como as aflatoxinas, contaminantes rotineiros das culturas no Brasil e em países que apresentam clima semelhante ou igual (VALMORBIDA, 2016).

Embora os tratamentos aplicados na etapa de processamento (moagem, tratamento térmico para retirada de umidade) tentem à minimizar os níveis de micotoxinas, eles não são capazes de eliminá-las por completo (AL-TAHER et al., 2017).

3.2 PRINCIPAIS MICOTOXINAS

Mais de 400 micotoxinas já foram relatadas na literatura, porém apenas alguns grupos no ponto de vista da segurança são considerados importantes (SHI et al., 2018). As mais significativas, que possuem propriedades tóxicas acentuadas e que são largamente distribuídas nos alimentos são as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, a zearalenona, a ocratoxina A, os alcaloides do esporão de centeio e a patulina (RAIOLA et al., 2015).

Além das principais micotoxinas relatadas, vale salientar as toxinas do gênero *Stachybotrys* e *Alternaria*. São fortes candidatas para

a inclusão na lista das principais micotoxinas, por ser identificadas em contaminações que prejudicam a qualidade do ar, podendo chegar ao organismo por inalação (CAST, 2003). No processo de armazenagem e secagem, as principais micotoxinas encontradas estão associadas a um grupo de espécies de fungos: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Claviceps* (SMITH et al., 2016).

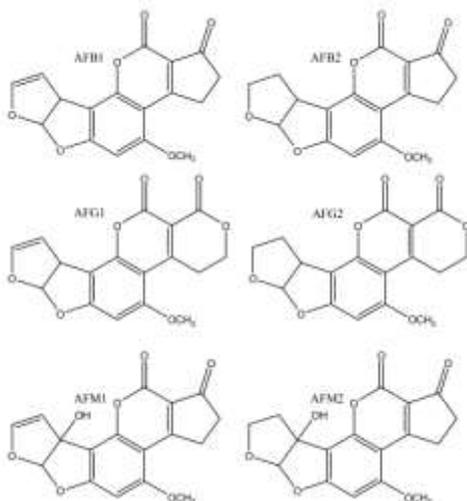
3.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são as micotoxinas mais conhecidas e estudadas e foram as primeiras a serem isoladas no início dos anos 1960. O nome “aflatoxina” possui origem da combinação de três palavras “a” de *Aspergillus*, “fla” da espécie *flavus* e toxina que significa veneno (BOSCO; MOLLEA, 2012).

Por um tempo julgou-se que *Aspergillus flavus* fosse o único fungo capaz de produzir a aflatoxina, mas sabe-se, atualmente, que existem outras espécies de *Aspergillus* e mesmo outros gêneros produtores desta toxina, tais como: *Aspergillus parasiticus* (predominante nos países tropicais), *A. níger*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. ostianum*, *A. fumigatus* e *A. frenesii*. Do gênero *Penicillium* tem-se o *P. puberulum*, *P. citrinum*, *P. variable* e *P. frequentans* (SCUSSEL, 1998).

Quatro são os principais tipos de aflatoxinas produzidas (Figura 4): aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂). Estas são classificadas com base em sua fluorescência sob a luz ultravioleta e na sua mobilidade durante a realização do ensaio de cromatografia de camada delgada (IARC, 2012) São produzidas principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus*, que produzem apenas aflatoxinas tipo B, enquanto *A. nomius* e *A. parasiticus* produzem as toxinas do tipo B e G (BOSCO; MOLLEA, 2012; JAMES; ZIKANKUBA, 2018).

Figura 4 - Principais aflatoxinas e metabólitos.



Fonte: BOSCO E MOLLEA (2012).

Por conta de sua estrutura, as aflatoxinas são quimicamente classificadas como bisfuranocumarinas (Figura 4), possuem relativa estabilidade ao calor, sendo inativadas apenas em temperaturas acima de 250 °C e possuem alta solubilidade em água, sendo insolúveis em solventes não polares e bastante solúveis em solventes de polaridade moderada como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. Apresentam relativa instabilidade como substâncias puras à luz e ao ar. Em condições normais de cozimento não são destruídas, porém em tratamentos fortemente alcalinos com amônia e hipoclorito são eliminadas (BUTLER, 1973; DIAZ, 2005).

A AFB₁ é considerada a micotoxina de maior toxicidade e com maior poder carcinogênico natural dentre as micotoxinas classificada como “Grupo 1” pela International Agency for Research on Cancer (IARC), seguida pela AFG1, AFB2 e AFG2 (JAMES; ZIKANKUBA, 2018; SHI et al., 2018). Na natureza, a AFB₁ ocorre principalmente em alguns produtos alimentares como amendoim, milho, arroz, soja, leite e óleos (DAI et al., 2017).

Por possuírem componentes lipofílicos, as aflatoxinas apresentam uma facilidade em serem absorvidas pelo trato gastrointestinal (MOSTROM; JACOBSEN, 2011). Ao passar pela circulação porta-hepático, a aflatoxina B₁ pode ligar-se reversivelmente à albumina,

liberando-se da circulação para os tecidos, mas não sendo acumulada nos mesmos. No entanto repetidas exposições a micotoxina podem produzir efeitos tóxicos. A aflatoxina pode ser eliminada por meio da bile, fezes, urina, no leite e em ovos. Na maioria das espécies animais a toxina é totalmente eliminada 24 horas após a exposição (POZZO, 2015). É importante salientar que crianças e animais jovens absorvem aflatoxinas de forma mais eficiente que animais e seres humanos adultos (RAIOLA et al., 2015).

Além da hepatotoxicidade da AFB₁ mencionada acima, outras reações adversas causam efeitos em vários órgãos, incluindo os rins (ABDEL-HAFIZ; HORWITZ, 2015), coração (AMEEN ABDULMAJEED, 2011), epidídimo (AGNES; AKBARSHA, 2001), testículos (FAISAL et al., 2008), cérebro (BAHEY; ELAZIZ; GADALLA, 2015) e ovários (IBEH; SAXENA; URAIH, 2000) foram relatados.

Não há uma dose letal de aflatoxinas estabelecidas para humanos. Porém, casos de envenenamentos por esta toxina vêm sendo relatados na literatura em alguns países como Uganda, Taiwan, Tailândia, Índia e Quênia (SCUSSEL, 1998).

3.3 LEGISLAÇÃO PARA MICOTOXINAS

No Brasil, os alimentos comercializados devem respeitar os limites máximos para a presença de micotoxinas determinados pela resolução RDC 07/2011 da ANVISA, que estabelece os limites máximos para aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisinas (B₁ e B₂) e zearalenona em alimentos prontos para consumo ou matérias-primas (Tabela 2). A legislação estabelece limites em 14 categorias de alimentos, como leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros conforme apresentado no anexo A.

É importante salientar que o descumprimento da RDC 07/2011 é considerado uma infração sanitária, ou seja, se ao longo da implementação da norma forem identificadas irregularidades, os produtores ou empresas podem receber sanções que variam desde notificações a multas de R\$ 1,5 milhão (ANVISA, 2011).

Tabela 2 - Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para Aflatoxinas.

(continua)

Micotoxinas	Alimentos	LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxina M ₁	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluída cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanhas-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas e cacau	10

Tabela 2 - Limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para Aflatoxinas.

		(conclusão)
Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta); Myristica fragrans (noz-moscada); Zingiber officinale (gingibre); Curcuma longa (cúrcuma).	20
	Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	
	Amendoim (com casca), (descascado, cru	20

ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho.	20

Fonte: Anvisa, 2011.

É importante ressaltar que existe uma diferença significativa nas concentrações autorizadas para diferentes países, conforme o anexo B (LAMIC, [s.d.]).

3.4 ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS

Os aditivos antimicotoxinas (AAM) são substâncias adicionadas às dietas a fim de reduzir a absorção de micotoxinas no trato gastrointestinal e impedir a sua distribuição pelo sangue e ataques a órgãos alvos, evitando e reduzindo as micotoxicoses (WANG et al., 2018a).

O uso dos métodos disponíveis para a desintoxicação de produtos agrícolas já contaminados com micotoxinas é restrito devido a problemas associados às questões de segurança, possíveis perdas na qualidade nutricional e palatabilidade dos produtos tratados, juntamente com eficácia limitada e suas implicações de custo (ALBERTS et al., 2017; WANG et al., 2018a). Uma alternativa atraente para reduzir a exposição dos animais às micotoxinas é o uso de substâncias que podem suprimir ou reduzir a absorção das mesmas quando produtos contaminados são utilizados para alimentação animal (CHKUASELI et al., 2016), promovendo a excreção de micotoxinas ou modificando seu modo de ação na alimentação (KOLOSOVA; STROKA, 2012).

A adição de adsorventes às rações é uma estratégia que visa reduzir a exposição dos animais às contaminações por micotoxinas. Estes adsorventes possuem capacidade de ligar às micotoxinas em sítios específicos em suas estruturas internas ou de superfície e são removidos a partir das fezes. A adsorção das micotoxinas no trato gastrointestinal reduz a absorção sanguínea e conseqüentemente a distribuição aos órgãos alvos (CHKUASELI et al., 2016; POZZO, 2015) e, portanto, diminuem a biodisponibilidade das micotoxinas e inibem a sua absorção *in vivo*. Vários materiais foram testados para este fim. Dependendo do seu modo de ação, eles atuam ligando as micotoxinas à sua superfície por adsorção, degradando-as ou transformando-as em metabólitos menos tóxicos por biotransformação (KOLOSOVA; STROKA, 2012).

No mercado há uma ampla e bem diversificada gama de adsorventes que podem ser utilizados para remoção das micotoxinas, contudo nem todos apresentam resultados satisfatórios. Por isso, dois critérios são levados em consideração na escolha de um adsorvente para micotoxinas, os testes de adsorção *in vitro* e *in vivo*. Os resultados *in vitro* devem apresentar a máxima capacidade de adsorção no suco gástrico e intestinal. Já nos ensaios *in vivo*, o grupo de animais alimentados com ração contaminada com adição de adsorvente devem apresentar ganho de peso elevado quando comparado estatisticamente aos animais alimentados apenas com ração contaminada (ZHAO et al., 2015). Todavia, mesmo os testes apresentando resultados positivos, para que estes produtos possam ser comercializados no Brasil é necessário possuir registro no MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MALLMANN et al., 2006).

Os adsorventes para micotoxinas (AAM) podem ser separados em dois grupos: os que possuem origem orgânica e os de origem inorgânica. Os mais utilizados são à base de aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratado (HSCAS), que possuem moléculas de água aderidas a um metal e permitem um maior sequestro das micotoxinas; carvão ativado; colestiramina; glucomanano; e argilas de origem vulcânica como as bentonitas com alta capacidade de troca catiônica. O bom funcionamento depende tanto das características estruturais das micotoxinas como também dos AAM (MALLMANN et al., 2007; PERALI, 2016).

O uso de AAM à base de argila mostrou-se uma alternativa muito eficaz na redução dos efeitos tóxicos causados pela contaminação por aflatoxinas nos alimentos para consumo animal. Em especial, as argilas bentoníticas possuem a capacidade de adsorver a aflatoxina dentro de suas camadas, ou seja, quando alimentos contaminados são ingeridos, não há absorção da toxina pelo trato gastrointestinal (FOWLER; LI; BAILEY, 2015).

3.4.1 Bentonita

Bentonita é uma rocha composta de argilas altamente coloidais e plásticas, formadas por alterações de cinzas vulcânicas *in situ*. Possuem como principal componente a montmorilonita, argilomineral pertencente ao grupo esmectita. O termo bentonita surgiu em Fort Benton, nos Estados Unidos, quando geólogos americanos, em 1917, encontraram uma argila com características coloidais e plásticas, com predominância

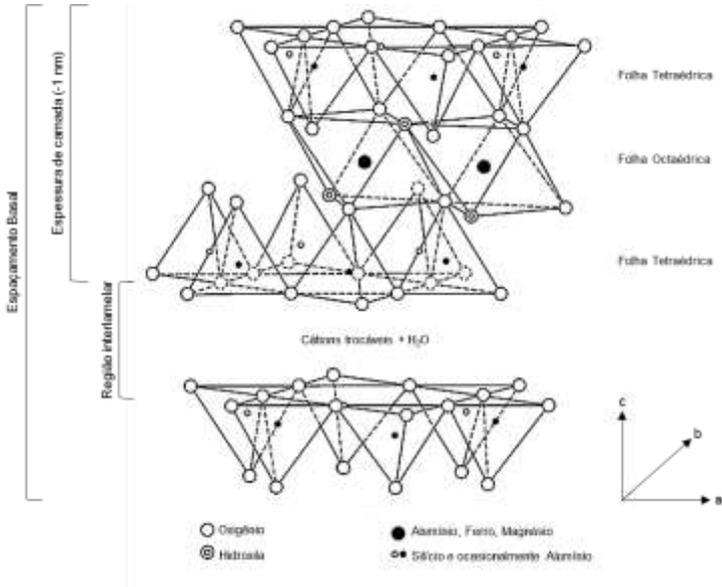
de minerais iguais de argilas pertencentes ao grupo esmectita (PUSCH, 2015).

Atualmente, 90% da produção de bentonita mundial é concentrada em 22 países: África do Sul, Alemanha, Armênia, Austrália, Azerbaijão, Bielorrússia, Búlgaria, Cazaquistão, Estados Unidos, Grécia, Itália, Japão, México, Moldávia, Quirguízia, República Checa, Rússia, Tadjiquistão, Turcomenistão, Turquia, Ucrânia e Uzbequistão (WHO, 2005).

Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), no ano de 2013 o Brasil produziu 434 mil t/ano de bentonita, o equivalente a 4,3% da produção mundial deste minério. Das reservas nacionais medidas foram estimadas 35,7 Mt, distribuídas nos estados do Paraná (44,7%), São Paulo (24,2%), Paraíba (20,8%), Bahia (8,4%) e Rio Grande do Sul (2%) (SILVA, 2014).

As esmectitas são composta principalmente pelo argilomineral montmorilonita, um aluminossilicato lamelar que possui três camadas formadas pela junção de duas folhas tetraédricas de sílica unidas a uma folha octaédrica central de alumínio que compartilha átomos de oxigênio (SULZBERGER; MELNICHENKO; CARDOSO, 2017). Assim, compõe-se de uma unidade estrutural 2:1 apresentada na Figura 5. As unidades de sílica-alumina-sílica são contínuas nas direções cristalográficas “a” e “b” e são empilhadas umas sobre as outras na direção “c”. Outra característica notável neste tipo de estrutura argilosa é que a água e outras moléculas polares podem entrar entre as camadas e fazer com que a rede se expanda na direção do eixo “c” fazendo-a variar de tamanho (BHATTACHARYYA; GUPTA, 2008; MURRAY, 2006).

Figura 5 - Estrutura de uma esmectita (montmorilonita).



Fonte: Adaptado de MURRAY (2006).

Pode ocorrer a substituição dos átomos de silício no tetraedro por átomos trivalentes como Fe^{3+} ou Al^{3+} , também podendo ocorrer a substituição dos átomos de alumínio no octaedro pelos átomos bivalentes Fe^{2+} e Mg^{2+} . Essas substituições tendem a criar um déficit de carga, que pode ser balanceado por cátions de metais alcalinos e alcalinos terrosos, comumente cálcio, sódio, potássio e magnésio. Esses cátions são permutáveis entre as camadas adsorvidas nas unidades e nas bordas, denominados cátions trocáveis. Sendo assim, a bentonita balanceada com cálcio é denominada bentonita cálcica, já a balanceada com sódio é denominada bentonita sódica (MAGNOLI et al., 2014).

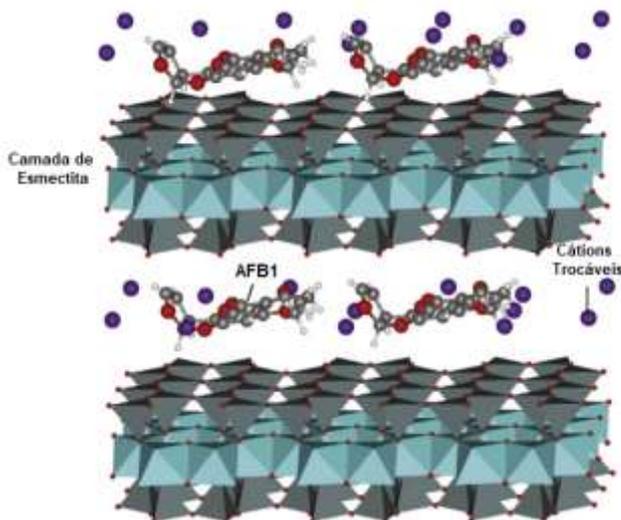
A classificação industrial é, geralmente, embasada no comportamento e propriedades físico-químicas, que estabelecem tipos de bentonitas em função da sua capacidade de inchamento quando em contato com água, sendo elas bentonitas altamente incháveis ou sódicas, bentonitas pouco incháveis ou cálcicas e bentonitas moderadamente incháveis ou intermediárias (VIOTTI, 2006).

As bentonitas possuem características de grande interesse para diferentes áreas de aplicação, dentre as principais características específicas deste tipo de argila se destaca seu poder de adsorção e a

capacidade de troca catiônica (CHKUASELI et al., 2016). As principais aplicações das bentonitas brutas, com qualquer tipo de tamanho são nas fundições, extração de petróleo e gás natural, graxas e lubrificantes, refratários, construção civil e cosméticos. Já as bentonitas ativadas, que passam por algum tipo de tratamento, possuem como principais aplicações a pelotização do minério de ferro (49,5%), fundição (26%), ração animal (11,3%), construção civil (4,3%), fertilizantes (3,2%), extração de petróleo e gás (0,27%) e outros produtos químicos (4,3%) (SILVA, 2014).

As bentonitas também são comumente aplicadas no setor agroindustrial na forma de aditivos alimentares, que visam reduzir a biodisponibilidade e toxicidade das aflatoxinas pela sua adsorção no trato gastrointestinal (NONES et al., 2017). Vários trabalhos na literatura discutem a importância mineralógica e propriedades químicas de bentonitas relacionadas a este tipo de adsorção (DIXON et al., 2008). De acordo com Sulzberger, Melnichenko e Cardoso (SULZBERGER; MELNICHENKO; CARDOSO, 2017), as bentonitas permitem a adsorção de AFB₁ na superfície entre as suas camadas em sua estrutura interlamelar, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Mecanismo de adsorção entre as camadas de esmectita.



Fonte: Adaptado de DENG et al. (2010).

Desheng et al. (2005) em sua pesquisa mostraram que a quantidade máxima de adsorção de AFB₁ em solução aquosa a pH 2,0 e 8,0 foi de 613,5 mg (80%) e 628,9 mg (90%) por g de montmorilonita, respectivamente. Spotti et al. (2005) verificaram que 100% da AFB₁ foram adsorvidas em um experimento *in vitro* com líquido ruminal com AFB₁ (200 ng/mL) e também bentonita (25 mg/mL). Num estudo *in vitro* realizado por Kong, Shin e Kim (2014), foram apresentados resultados favoráveis, onde a percentagem média dos cinco pontos de adsorção de AFB₁ por argilas bentoníticas foi de 92,32%. Vekiru et al. (2015) em seu estudo realizou ensaios *in vitro* e *in vivo* com diferentes amostras de bentonitas e carvão ativado e demonstrou que, para ensaios *in vitro*, a adsorção de AFB₁ foi afetada negativamente quando o adsorvido foi testado em conteúdos intestinais para algumas amostras de bentonita. O autor salienta também que o bom desempenho *in vitro* serve apenas como indicativo, não sendo suficiente como critério para a escolha de um adsorvente e ensaios *in vivo* devem verificar a eficácia de um adsorvente. É importante salientar que nenhum tipo de tratamento realizado nas amostras de bentonitas foi especificado pelos autores em suas pesquisas.

Ensaio clínicos recentes de uma bentonita NovaSil adicionada a dietas humanas mostrou resultados promissores na redução das concentrações de AFB₁ em amostras de sangue e urina (DENG et al., 2010).

Diversos são os tipos de tratamentos que podem ser aplicados em argilas bentoníticas com o objetivo de incrementar suas propriedades de adsorção (PATRICIO; HOTZA; NONI JÚNIOR, 2014). Dentre esses processos destacam-se a ativação (ácida, alcalina, orgânica ou neutra) e reações com sais quaternários de amônia para a formação de bentonitas organofílicas. Essas alterações melhoram propriedades como aumento do espaçamento basal que resulta em elevados valores de inchamento, maiores áreas superficiais e em alguns tratamentos para formação de derivados porosos (COELHO; SANTOS; SANTOS, 2007). Neste sentido, a aplicação de processos mais tecnológicos, como processo de liofilização, pode trazer resultados interessantes e não tão agressivos à estrutura do argilomineral.

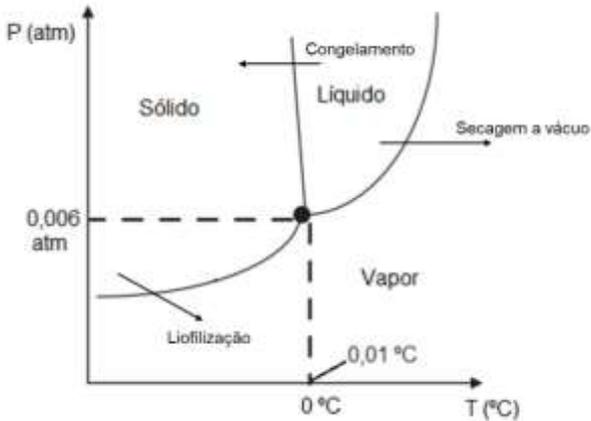
3.5 PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é uma operação unitária usualmente empregada como uma das tecnologias de secagem, também conhecida como criossecação ou criodesidratação (BERK, 2013). Caracteriza-se como um processo diferenciado, pois ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, permitindo que a água já previamente congelada em estado sólido passe diretamente para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido, em um processo de sublimação (WANG et al., 2018b). Como no processo de evaporação, a sublimação acontece quando a molécula recebe um ganho de energia suficiente para se desprender das outras moléculas que se encontram ao redor (GREEN, 2005).

A definição de liofilização está no termo “estabilização”, ou seja, um processo de estabilização é aquele em que o relógio cinético natural de uma substância não sofre muitas alterações (JENNINGS, 1999). Tem como o objetivo estabilizar o material diminuindo a atividade de água através de uma série de operações, como congelamento, sublimação, secagem a vácuo (dessorção) e armazenagem do produto, ao qual o material a ser liofilizado é submetido durante seu processamento (BERK, 2013).

Para que este fenômeno ocorra, a temperatura e a pressão parcial de vapor d'água devem ser inferiores às do ponto triplo. A partir do diagrama de fase apresentado na Figura 7, é possível observar que se for fornecido calor a um material congelado com valores de pressão acima de 0,006 atm, a água contida neste se tornará líquida.

Figura 7 - Diagrama de fases da água mostrando as condições para a sublimação.



Fonte: Adaptado de BERK (2018).

Já se for retirado calor do sistema, esta irá evaporar. Sendo assim, quando se fornece calor a este material congelado, porém a uma pressão menor que 0,006 atm, a água presente passa para o estado de vapor pelo processo de sublimação. Na prática, no processo de liofilização a temperatura do produto congelado deve ser mantida abaixo de 0 °C. Assim, para ser possível a realização de uma liofilização, é preciso que o produto seja previamente congelado e que haja uma fonte de calor, câmara de vácuo e um sistema de condensação que opere a temperaturas inferiores à do produto congelado (BERK, 2018; POLAK; PITOMBO, 2011).

Para que o processo de liofilização aconteça é necessário o cumprimento de três etapas. A primeira consiste no congelamento do produto a ser seco e pode ocorrer no próprio equipamento ou ser inserido já congelado nas prateleiras do liofilizador. O sucesso do processo depende significativamente deste estágio, uma vez que esta etapa define a forma, tamanho, distribuição e conectividade dos poros na camada seca, gerada durante a sublimação. Esta etapa influencia diretamente nos parâmetros que caracterizam os fenômenos de transferência de massa e calor no produto durante as etapas de secagem primária e secundária (BERK, 2018; SCHERSCH, 2009). A segunda etapa é a secagem primária ou sublimação, que consiste de um

fenômeno endotérmico, ou seja, calor deve ser fornecido ao sistema durante todo processo e pode ocorrer através dos seguintes mecanismos: convecção/radiação ou condução/radiação. O solvente é removido da amostra através de sublimação, o que quer dizer que a pressão no liofilizador deve ser menor ou próxima à pressão de vapor de equilíbrio do solvente congelado (HUA; LIU; ZHANG, 2010; WANG et al., 2018b). A terceira e última etapa é chamada de secagem secundária ou dessorção. É responsável pela retirada de solvente que ainda está ligado ao material e acontece em uma velocidade menor do que a da segunda etapa, pois a concentração de umidade é muito menor. O tipo de fornecimento de calor é igual ao da segunda etapa, no entanto, as temperaturas são mais restritas para determinados materiais (JIN et al., 2018; MARQUES, 2008).

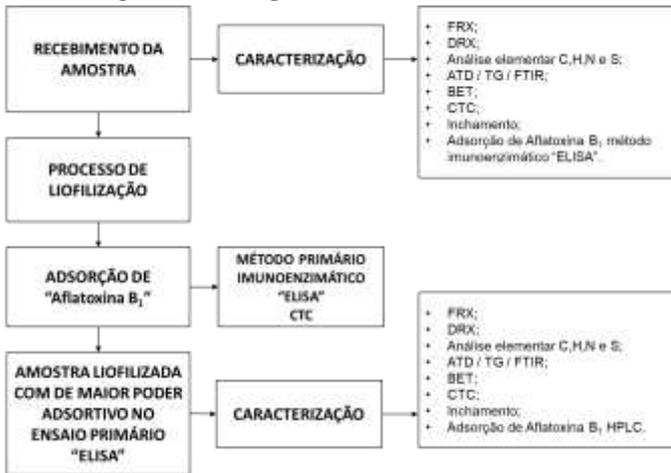
Por ser um processo que opera a baixas temperaturas e geralmente sob vácuo, a liofilização é recomendada para materiais termosensíveis como materiais biológicos (fungos, enzimas, tecidos, sangue e cobaias), materiais farmacêuticos (antibióticos, vacinas e soros), alimentos (sucos, carnes, legumes e frutas) e produtos químicos. Este método forma produtos de elevada qualidade quando comparado aos produtos produzidos por outras técnicas de secagem (MARQUES, 2008).

Em seu estudo, Machado et al. (2018) apresentaram a comparação da caracterização de amostras de bentonitas sódicas mais ativas e menos ativas antes e após o processo de liofilização. Observou-se um incremento de aproximadamente 32 % na capacidade de inchamento para a bentonita sódica mais ativa após o processo de liofilização. Guo et al. (2018) sintetizaram com auxílio do processo de liofilização pós de diboreto de alumínio (AlB_2) e obtiveram um pó com maior esfericidade e uniformidade, apresentando uma microestrutura ultrafina e boa fluidez, boa atividade antioxidante e taxa de combustão estável e um alto calor volumétrico (53,13kJ/g), quando comparado a pós produzidos pelo método convencional.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental visou a produção de uma bentonita liofilizada e a sua aplicação para adsorção de aflatoxina B₁ presente em suco gástrico artificial (pH 3,0) e suco intestinal artificial (pH 6,0). As principais etapas do procedimento experimental adotadas neste trabalho encontram-se descritas no fluxograma metodológico apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.



Fonte: A autora (2018).

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE BENTONITA

A amostra de argila bentonítica utilizada neste trabalho é de origem e jazida desconhecida, foi fornecida pela Indústria Carbonífera Rio Deserto, sob a forma de um pó passante em malha de 200 mesh. A fim de conhecer as características do material antes do processo de liofilização, realizou-se uma série de análises, que serão descritas a seguir.

Para a identificação da composição química da amostra de argila bentonítica, realizou-se a espectrometria de fluorescência de raios X (FRX) em um equipamento Panalytical, modelo Axios Max, por dispersão de comprimento de onda (WDXRF), disponível no

Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Materiais do SENAI, localizado em Criciúma. A amostra foi transformada em uma pastilha fundida de vidro, composta por uma alíquota do material e um fundente, posteriormente é levada ao equipamento onde são realizadas as leituras dos elementos previamente especificados e calibrados no equipamento para obtenção das concentrações dos elementos na amostra. Paralelo à esta análise, é determinada a perda ao fogo da amostra por calcinação à 1000 °C, cujo resultado é expresso juntamente com aos óxidos analisados.

A análise elementar da argila bentonítica foi realizada com o intuito de determinar os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre e foi realizada pelo Laboratório de Análises e Ensaio de Carvão (LAEC) SATC, localizado em Criciúma. O equipamento utilizado foi um Analisador Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio, modelo LECO °CHN628 Séries. Para esta análise não foi realizada nenhuma etapa de preparação, visto que a amostra já se encontrava na granulometria adequada para o ensaio. Neste, o material a ser analisado é pesado em duplicata, levado ao equipamento à uma temperatura de 950 °C, para queima utilizando-se os gases de hélio, oxigênio 4.0 e ar comprimido.

Para possibilitar a identificação das fases cristalinas da composição mineralógica presente na amostra, realizou-se a análise de difração de raios X (DRX) no equipamento Lab X, modelo: XRD 6000, operando à 25kV e 25 mA, com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), com ângulo de varredura (2θ) variando de 3° a 80°, passo de 0,02 e tempo de contagem de 0,6s por passo, ou seja, 2°/min., realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais (CECAM), localizado no Parque Científico e Tecnológico (IPARQUE) em Criciúma. A partir dos difratogramas, utilizando a Lei de Bragg (Equação 1), sobre o plano cristalográfico (001) foi possível calcular a distância basal e verificar possíveis modificações na estrutura da argila bentonítica.

$$n_d \lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

onde n_d é a ordem de difração, λ é o comprimento de onda dos raios X (nm), d é a distância interplanar da matriz cristalina (nm) e θ é o ângulo de difração (graus).

A determinação da capacidade de troca catiônica (CTC) foi realizada no Laboratório de Argilominerais das Empresas Rio Deserto localizado em Urussanga e possibilitou quantificar o montante de

cátions que a amostra pode adsorver ou trocar. O método utilizado para essa determinação foi desenvolvido pelo próprio laboratório. Para extração dos cátions da bentonita foi utilizada uma solução de cloreto de bário, na qual a bentonita é mantida em agitação por um tempo determinado de 2 horas. Posteriormente a amostra é filtrada, e os cátions de cálcio, sódio, magnésio e potássio são determinados por espectroscopia de absorção atômica em chama, no equipamento da marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 100.

O teor de inchamento objetivou verificar a capacidade da bentonita em aumentar o seu volume na presença de água. A análise também foi realizada no Laboratório de Argilominerais das Empresas Rio Deserto localizado em Urussanga. Foram pesados 2 g do material e este foi adicionado uniformemente sobre a superfície da água presente em uma proveta de 100 mL. Então, esperou-se que o material realize a absorção do líquido e se deposite no fundo da proveta. O material é deixado em repouso por 24h e, em seguida, foi efetuada a leitura do volume.

A caracterização textural da amostra foi realizada com o intuito de se obter os valores de área superficial e volume de poros através da análise de adsorção de N₂ pelo método BET. A análise foi realizada no Laboratório de Valoração de Resíduos (LabValora), localizado no IPARQUE, em Criciúma, com o equipamento da marca Quantachrome, modelo Nova 1200e, e que possui sistema de calibração automático com Hélio 5.0. Para a amostra não foi necessária a realização de um tratamento térmico. Porém, a amostra ficou exposta por 12 h a uma pressão de vácuo próxima a 0 mmHg para em seguida ser encaminhada para estação de análise, onde a célula fica submersa em nitrogênio líquido para manter a temperatura constante.

Para verificar o comportamento térmico da amostra, bem como os gases liberados na etapa de aquecimento, realizou-se uma análise térmica diferencial (ATD), análise termogravimétrica (ATG) e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR – do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), no Laboratório de Valoração de Resíduos (LabValora). O equipamento utilizado corresponde a um DTA/TG+FTIR acoplado, STA da marca Netzsch, modelo STA 449 F3 Jupiter e FTIR da marca Bruker com resolução de 4 cm⁻¹ e intervalo de 500 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, modelo Tensor II. As condições de análise foram em atmosfera de ar sintético, com taxa de aquecimento de 10°/min até 1000°C, com vazão de 60 cm³/min. A amostra não necessitou de nenhuma preparação prévia e foi adicionada

ao equipamento onde simultaneamente ocorreram as análises térmicas e a leitura dos gases eliminados.

Para identificar o teor de umidade do material realizou-se o ensaio de determinação do teor de umidade, no Laboratório de Argilominerais das Empresas Rio Deserto. Para este ensaio, pesou-se entre 50 e 100 g da amostra e, em seguida, a amostra foi levada para estufa com temperatura entre 105 e 130 °C, até que a massa permanecesse constante. Em seguida, o material foi retirado da estufa, resfriado em dessecador e novamente pesado. A partir da Equação 2 se calcula o teor de umidade (U), em percentual.

$$U = \frac{(M_{pf} - M_a) - (M_{pf} + M_r)}{M_a} \times 100 \quad (2)$$

onde M_{pf} é a massa do recipiente (g), M_a é a massa da amostra utilizada (g) e M_r é a massa do resíduo após a secagem (g).

Para determinar a capacidade de adsorção da micotoxina aflatoxina B₁ pela bentonita, utilizou-se o método primário *in vitro* imunoenzimático Elisa. Os testes realizados utilizaram uma solução de suco gástrico artificial em pH 3,0 e suco intestinal em pH 6,0, para simular as etapas de digestão no estômago e intestino, respectivamente. O ensaio foi realizado no Laboratório de Argilominerais das Empresas Rio Deserto.

Para o processo de extração da amostra, foram utilizadas três porções de 10 g de fubá contaminado com a micotoxina para cada pH analisado (pH 3,0 e pH 6,0), que foram transferidas para um erlenmeyer de 500 mL onde foram adicionados 50 mL de suco gástrico artificial e suco intestinal e 0,05 g (0,5%) da amostra de bentonita estudada. Em seguida, o pH do meio foi ajustado para 3,0 ou 6,0. Logo após os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e colocados em banho-maria a temperatura de 37 °C por 4 h, com agitação manual a cada 15 min. Após o tempo estimado, filtrou-se o sobrenadante e o filtrado foi analisado através do teste Elisa. O teste Elisa é feito com o auxílio de Kit Veratox[®] da Neogen, no qual a amostra a ser analisada é preparada e colocada em um leitor de microplacas e se efetua a leitura utilizando-se comprimento de onda de 650 nm.

4.2 PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DA AMOSTRA DE BENTONITA

O processo de liofilização foi realizado em duas etapas: primeiramente as amostras foram congeladas em um ultrafreezer tipo barril para baixas temperaturas -75°C e -90°C da marca Liotop, modelo: UFR30 (Figura 9) e, após o processo de congelamento, as amostras foram liofilizadas em um liofilizador da marca Liotop, modelo L101 (Figura 10), a uma pressão de 24 mmHg por 24 h. A temperatura do condensador se manteve em -51°C durante todo processo de liofilização. Após o término das etapas de liofilização as amostras foram armazenadas em embalagens secas, vedadas e armazenadas em local apropriado para não ocorrer a absorção de umidade. O processo de liofilização foi realizado no Laboratório de Reatores e Processos Industriais (LabRePI), localizado no Parque Científico e Tecnológico (IPARQUE), em Criciúma.

Figura 9 - Ultrafreezer UFR30 Liotop.



Fonte: A autora (2018).

Figura 10 - Liofilizador L101 Liotop.



Fonte: A autora (2018).

Os parâmetros massa de amostra, temperatura e tempo de congelamento foram definidos seguindo a metodologia estatística de um planejamento fatorial 2^3 e são apresentados na Tabela 3. Os valores de cada fator foram definidos com base no trabalho de Machado et al., (2018), que em sua pesquisa aplicou o processo de liofilização em argilas betoníticas a fim de verificar possíveis alterações em suas características. No entanto, a autora não aplicou a bentonita obtida para verificar seu desempenho.

Tabela 3 - Matriz de dados do planejamento fatorial 2^3 .

Experimento	Níveis	Fatores		
		Temperatura (°C)	Massa (g)	Tempo (Dias)
LBS 01	-1 -1 -1	-90	50	1,0
LBS 02	+1 -1 -1	-75	50	1,0
LBS 03	-1 +1 -1	-90	150	1,0
LBS 04	+1 +1 -1	-75	150	1,0
LBS 05	-1 -1 +1	-90	50	3,0
LBS 06	+1 -1 +1	-75	50	3,0
LBS 07	-1 +1 +1	-90	150	3,0
LBS 08	+1 +1 +1	-75	150	3,0

Fonte: A autora, 2018.

Após liofilizadas, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Argilominerais das Empresas Rio Deserto para que o teste de adsorção de AFB₁, pelo método *in vitro* Elisa, fosse realizado. Além disso, os parâmetros de capacidade de troca catiônica (CTC), teor de inchamento e umidade de cada amostra liofilizada também foram determinados.

A amostra que apresentou a maior capacidade adsorptiva de AFB₁ determinada pelo método Elisa foi novamente caracterizada pelas técnicas já descritas no item 4.1. Para comprovar a eficiência do resultado obtido através do ensaio primário Elisa, a amostra liofilizada foi encaminhada ao Instituto Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas (SAMITEC), localizado em Santa Maria (RS), onde a amostra foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*). A toxina padrão utilizada foi Aflatoxina B₁, padrão Sigma Chemical Co. em solução de acetonitrila, sendo as condições de adsorção/neutralização realizadas em triplicatas para o suco gástrico artificial em pH 3,0 e suco intestinal artificial em pH 6,0. Ambas soluções foram preparadas segundo descrito na Pharmacopeia National Formulary – USP XXII (1990) (PHARMACOPEIA, 1989), com concentração de suco gástrico de 1,0 µg/mL. O equipamento utilizado consiste de um sistema automatizado com derivação pré-coluna com ASPEC XL4, com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS), sendo a interpretação e análises de dados realizada pelo Sistema ChemStation AgilentTM.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO À LIOFILIZAÇÃO DA ARGILA BENTONÍTICA

As metodologias de avaliação *in vitro* aplicadas neste estudo foram realizadas simulando as condições em que a bentonita liofilizada se encontrará no local de sua ação, ou seja, no trato gastrointestinal. Para a realização dos testes nas amostras liofilizadas, foram testadas a adsorção no suco gástrico com pH 3,0 (estômago) e suco intestinal com pH 6,0 (intestino). A partir do planejamento experimental descrito na Seção 4.2, foram obtidas nove amostras de bentonita liofilizada, que tiveram variação nos seus parâmetros de congelamento. Essas amostras foram, então, submetidas ao ensaio de adsorção de aflatoxina B₁ e a sua capacidade foi avaliada pelo método Elisa. A Tabela 4 traz os valores em percentuais da adsorção de AFB₁, utilizando 0,5 % de bentonita liofilizada como AAM, para pH 3,0 e pH 6,0.

Tabela 4 - Percentual de adsorção de AFB₁ utilizando bentonita liofilizada para pH 3,0 e pH 6,0.

Experimento	Adsorção de AFB ₁ (%)	
	pH 3,0	pH 6,0
Bruta	98,60	96,33
LBS 01	93,69	93,52
LBS 02	97,7	95,50
LBS 03	96,24	92,78
LBS 04	96,07	92,80
LBS 05	97,37	94,40
LBS 06	97,19	95,30
LBS 07	98,34	98,27
LBS 08	96,47	95,73
LBS 09	96,80	93,24

Fonte: A autora, 2018.

Observa-se que os valores de adsorção obtidos em triplicata para cada amostra foram superiores a 90%. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Mallmann et al. (2006), tanto para o suco gástrico (pH

3,0) como para suco intestinal (pH 6,0). Isso significa que todas as amostras apresentam desempenho satisfatório quando aplicadas como AAM, para adsorção de AFB₁.

O tratamento estatístico dos dados obtidos, apresentado nas Tabelas 5 e 6, mostrou que com 90% de confiança e para o intervalo testado, apenas a adsorção de AFB₁ em pH 3,0 apresentou fatores significativos, sendo estes: (3) Tempo, interação (1) Temperatura por (2) Massa e a interação (1) Temperatura por (3) Tempo.

Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores percentuais de adsorção de AFB₁ em pH 3,0 das amostras liofilizadas. Legenda: SQ = Soma dos quadrados; GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F = Estatística F; p = Valor p.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	p
(1) Temperatura (°C)	0,39592	1	0,395920	13,5775	0,168708
(2) Massa (g)	0,17111	1	0,171112	5,8680	0,249239
(3) Tempo (Dias)	4,01861	1	4,018613	137,8118	0,054099
1 por 2	4,30711	1	4,307113	147,7055	0,052264
1 por 3	4,33651	1	4,336513	148,7137	0,052088
2 por 3	0,05611	1	0,056112	1,9243	0,397636
1*2*3	0,77501	1	0,775013	26,5778	0,121972
Erro	0,02916	1	0,029160		

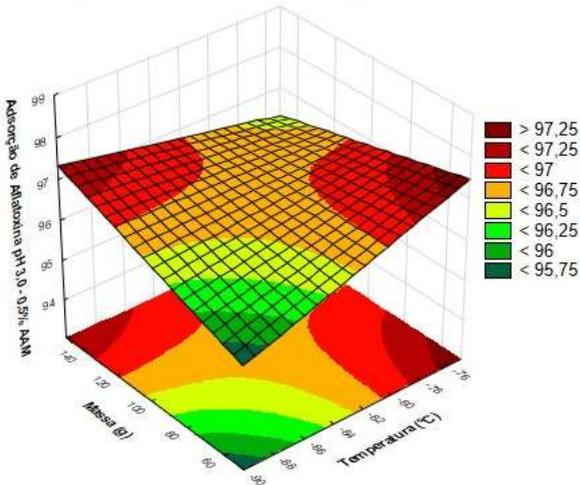
Fonte: A autora, 2018. $\alpha = 0,1$, $R^2 = 0,99793$

O modelo estatístico apresentou $R^2 = 0,99793$, mostrando que aproximadamente 99,8% da variável resposta adsorção de AFB₁ em pH 3,0 é explicada por este modelo, considerando o intervalo testado para os parâmetros de congelamento. No entanto apesar de nenhum fator ter sido significativo para a variável resposta adsorção de AFB₁ em pH 6,0, o valor de $R^2 = 0,91705$ indica que aproximadamente 91,7% da variável resposta adsorção de AFB₁ em pH 6,0 é explicada por este modelo no intervalo testado.

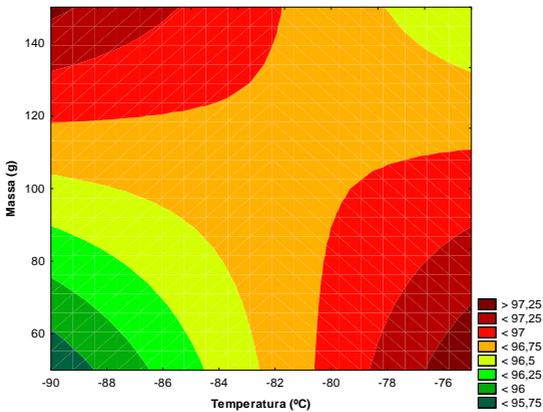
A partir dessas interações foram plotadas superfícies de resposta e curvas de nível para adsorção de AFB₁ em pH 3,0, visando identificar a melhor condição de congelamento para liofilização de argila bentonita e posterior aplicação na adsorção de AFB₁. Avaliando a Figuras 11, com

interação entre (1) Temperatura por (2) Massa, para pH 3,0, é possível observar que ambas as superfícies e curvas de nível indicam como pontos ótimos a maior massa (150 g) e os valores de temperatura mínimo e máximo estudados, respectivamente -90 °C e -75 °C.

Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para interação (1) Temperatura por (2) Massa para adsorção de AFB₁ a pH 3,0.



(a)

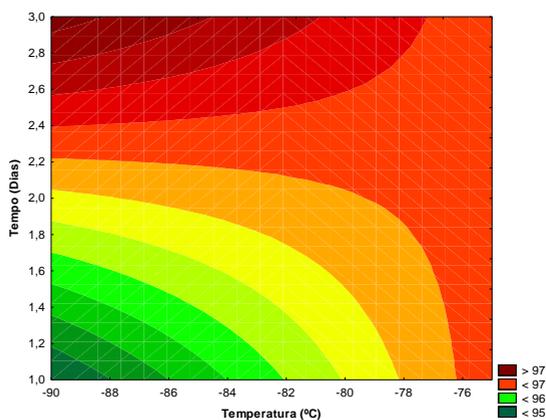
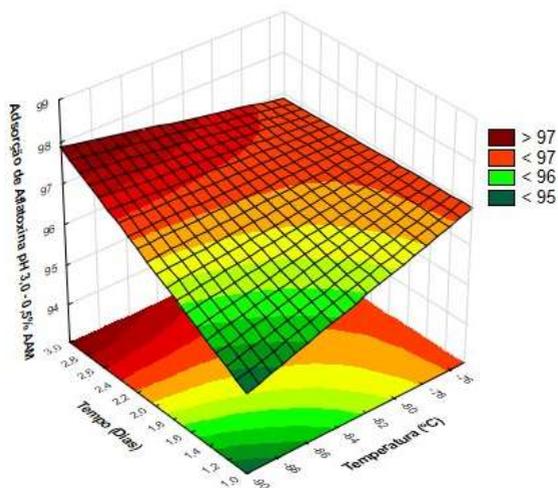


(b)

Fonte: A autora, 2018.

Com relação à curva de (1) Temperatura por (3) Tempo (Figura 12), os pontos de congelamento ótimos são obtidos para a menor temperatura (-90 °C) e tempo de congelamento de 3 dias.

Figura 12 - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para interação (1) Temperatura por (3) Tempo para adsorção de AFB₁ a pH 3,0.



Fonte: A autora, 2018.

A partir da análise estatística foi possível constatar que dois pontos apresentaram características ótimas de congelamento no processo de liofilização para posterior aplicação na adsorção de AFB₁, sendo eles a maior massa estudada (150 g) e o maior tempo de congelamento (3 dias), se diferindo apenas na temperatura de congelamento (- 90°C e - 75°C). Este resultado indica que a temperatura de congelamento dentro do intervalo testado não foi relevante no processo de liofilização da bentonita. No entanto, é importante salientar que quanto menor a temperatura, mais efetivo será o congelamento da amostra em massa maiores, evitando-se assim locais de zonas mortas.

Desta forma, optou-se por avaliar estatisticamente a capacidade de troca catiônica (CTC) das amostras para que, em conjunto com os resultados já obtidos, fosse possível determinar o ponto ótimo de congelamento. A escolha do CTC como parâmetro adicional a ser avaliado deve-se ao fato de que diversos estudos anteriores relatam a relação entre a eficácia de adsorção das bentonitas para substâncias orgânicas com as propriedades dos cátions trocáveis presentes no mineral (KOLOSOVA; STROKA, 2011; KONG; SHIN; KIM, 2014; MAGNOLI et al., 2011). A Tabela 6 traz os valores de capacidade de troca catiônica total para as amostras liofilizadas.

Tabela 6 - Capacidade de troca catiônica para amostras liofilizadas.

Experimento	CTC_{total} (mEq/100g)
LBS 01	136,96
LBS 02	132,62
LBS 03	143,54
LBS 04	133,44
LBS 05	145,05
LBS 06	133,87
LBS 07	145,89
LBS 08	142,16
LBS 09	137,43

Fonte: A autora, 2018.

O tratamento estatístico dos dados (Tabela 7) mostrou que, com 90% de confiança e para o intervalo testado, nenhum dos fatores foi significativo para a capacidade de troca catiônica total.

Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores de capacidade de troca catiônica total para amostras liofilizadas. Legenda: SQ = Soma dos quadrados; GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F = Estatística F; p = Valor p.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	p
(1) Temperatura (°C)	106,8620	1	106,8620	29,99475	0,114974
(2) Massa (g)	34,1551	1	34,1551	9,58689	0,198876
(3) Tempo (Dias)	52,0710	1	52,0710	14,61564	0,162873
1 por 2	0,3570	1	0,3570	0,10021	0,804827
1 por 3	0,0276	1	0,0276	0,00775	0,944098
2 por 3	0,3741	1	0,3741	0,10501	0,800501
1*2*3	21,8130	1	21,8130	6,12262	0,244506
Erro	3,5627	1	3,5627		

Fonte: A autora, 2018. $\alpha = 0,1$; $R^2 = 0,98375$

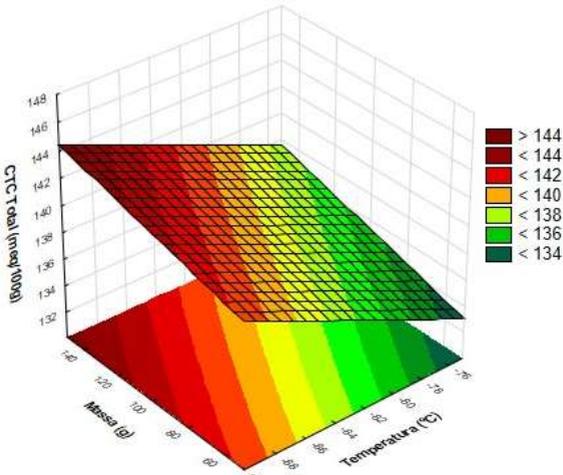
Apesar de nenhum dos fatores se mostrarem significativos para a variável resposta CTC_{total} , o valor de $R^2 = 0,98375$ indica que aproximadamente 98,4% da variável resposta CTC_{total} é explicada por este modelo no intervalo testado. Assim, optou-se por gerar superfícies de respostas e curvas de nível (Figura 13), capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g. Com as interações (1) Temperatura por (2) Massa e (1) Temperatura por (3) Tempo, a fim de identificar os parâmetros ótimos de congelamento.

Avaliando a Figura 13, com interação entre (1) Temperatura por (2) Massa, é possível observar que a superfície indica que o ponto ótimo de congelamento se situa na região de maior massa (150 g) e para menor temperatura (-90°C), resultado semelhante ao já observado na Figura 11. Já para a interação entre (1) Temperatura por (3) Tempo (Figura 14), observa-se o mesmo comportamento apresentado na Figura 12, sendo a condição ótima também para menor temperatura (-90°C) e maior tempo de congelamento (3 dias).

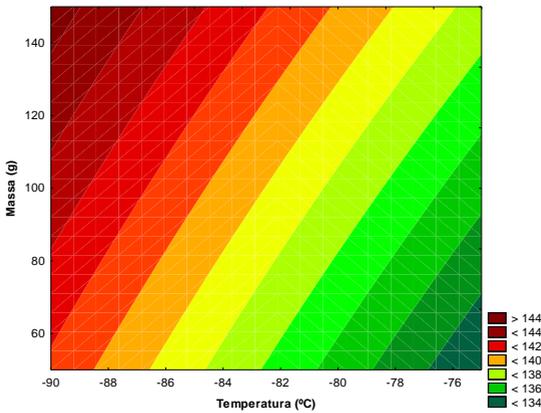
Com base nos dados estatísticos apresentado pelas superfícies de resposta e curvas de nível, concluiu-se que a melhor condição de congelamento é dada pela amostra do ensaio LBS 07, que foi obtida aplicando-se os parâmetros ótimos de congelamento e apresentou a maior capacidade de adsorção de AFB₁ nos meios testados. Esta

amostra, então, foi caracterizada e os resultados foram comparados aos obtidos para argila bentonítica não liofilizada.

Figura 13 - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para interação (1) Temperatura por (2) Massa para capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g.



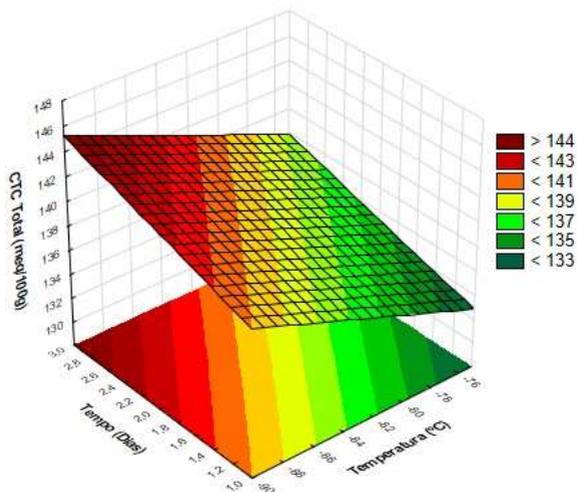
(a)



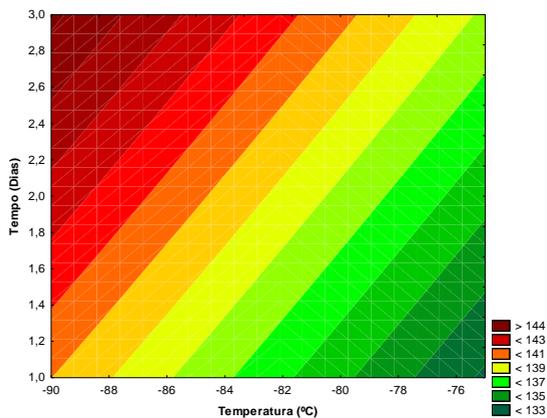
(b)

Fonte: A autora, 2018.

Figura 14 - Superfície de resposta para interação (1) Temperatura por (3) Tempo para capacidade de troca catiônica total da argila bentonítica liofilizada, em mEq/100 g.



(a)



(b)

Fonte: A autora, 2018.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ARGILAS BENTONÍTIICAS

5.2.1 Análises químicas

A análise química das amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07), obtidas por FRX, é apresentada na Tabela 8. É possível observar que o processo de liofilização não provocou mudanças significativas na composição do material, visto que os principais óxidos estão presentes na composição química das duas amostras. A ausência de uma alteração drástica da composição do material já era um resultado esperado, visto que o processo de liofilização não apresenta energia suficiente para remover ou alterar os óxidos presentes na amostra.

Dentre os óxidos, destaca-se a considerável quantia de óxido de silício, que pode estar presente tanto na forma de sílica livre como também na constituição do argilomineral. Da mesma forma ocorre com os óxidos de sódio e potássio, que estão presentes não somente na composição dos íons interplanares, mas encontram-se também na constituição dos minerais associados.

Tabela 8 - Análise química de FRX das bentonitas bruta e liofilizada LBS 07.

Elementos	Bentonita Bruta	Bentonita Liofilizada LBS 07
	Teor (%)	Teor (%)
Al ₂ O ₃	7,69	7,64
CaO	< 0,05	< 0,05
Fe ₂ O ₃	3,69	3,67
K ₂ O	0,53	0,52
MgO	18,80	18,75
MnO	0,13	0,12
Na ₂ O	< 0,05	< 0,05
P ₂ O ₅	0,06	0,06
SiO ₂	62,90	62,66
TiO ₂	0,49	0,49
Perda Fogo	5,68	6,06

Fonte: A autora, 2018.

As amostras apresentam baixos valores de perda ao fogo, que podem estar associados às hidroxilas presentes no argilomineral, às moléculas de água intercaladas nos espaços interlamelares e/ou ao baixo

teor de matéria orgânica presente nas amostras. A Tabela 9 mostra um comparativo da quantificação para os elementos C, H, N e S das amostras de bentonita bruta e liofilizada LBS 07. É possível observar que o processo de liofilização não provocou alteração significativa no percentual dos elementos testados, o que comprova que mesmo em vácuo quase absoluto, que poderia ser responsável por alterar as quantias de matéria orgânica presente na amostra, o processo de liofilização manteve as características do material.

Tabela 9 - Resultados de quantificação dos elementos C, H, N e S da amostra em estudo.

	Bentonita Bruta	Bentonita Liofilizada LBS 07
Elementos	% em massa	% em massa
C	1,12	1,10
H	1,18	1,36
N	0,41	0,44
S	1,09	1,02

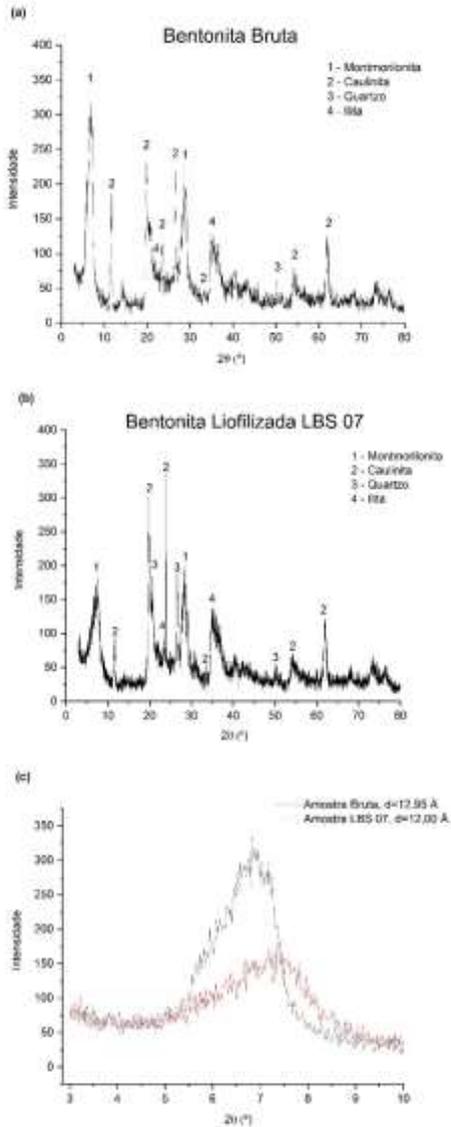
Fonte: A autora, 2018.

5.2.2 Difratométrias de Raios X

A Figura 15 traz o comparativo dos resultados de DRX para identificação das fases mineralógicas presentes nas amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07). De acordo com o difratograma, tanto a amostra de bentonita bruta (Figura 15a) quanto a LBS 07 (Figura 15b) são constituídas mineralogicamente pelas seguintes fases: montmorilonita (JCPDS 13-259), caulinita (JCPDS 5-586), quartzo (JCPDS 46-1045) e illita (JCPDS 35-652). No entanto, apesar de a amostra se tratar de uma argila bentonítica, uma quantidade alta da fase caulinita é identificada pelo difratograma. Esta observação também foi citada no trabalho escrito por De Resende et al. (2012), e este fenômeno ocorre devido ao grau de cristalização e ordenação da caulinita, sendo esta facilmente identificada pelo equipamento.

A análise mineralógica realizada por difração de raios X também foi aplicada a fim de verificar as possíveis alterações provocadas pelo processo de liofilização sobre a amostra. Através da Equação 1, referente à Lei de Bragg, foi possível calcular o espaçamento basal da bentonita no plano cristalográfico (001) para a amostra bruta e após o processo de liofilização (LBS 07).

Figura 15 - DRX das amostras de bentonita (a) bruta, (b) liofilizada LBS 07; e (c) comparativo do pico de difração do plano (001) para as duas amostras.



Fonte: A autora, 2018.

Cada mineral apresenta sua própria estrutura, bem como um modelo de difração distinto, e a partir deste é possível realizar a sua identificação. Dentro dos diversos planos cristalinos (h, k, l) que podem ser definidos, para a ciência e tecnologia de argilas e argilomineiras, destaca-se o plano cristalográfico (001) como sendo o de maior importância, visto que fornece a reflexão basal característica de cada grupo de argilomineral. Montmorilonitas pertencem ao grupo de argilominerais que possuem distância interplanar basal na faixa de 12 Å a 15 Å (DO ROSÁRIO, 2010).

Na Figura 15c é possível identificar que o processo de liofilização provoca uma modificação na estrutura da argila com o adiantamento do ângulo $2\theta = 6,82^\circ$ (bruta) para $2\theta = 7,36^\circ$ (liofilizada) e, conseqüentemente, tem-se diminuição do espaçamento basal de $d(001) = 12,95 \text{ \AA}$ para $d(001) = 12 \text{ \AA}$, equivalente a uma redução de 7,34 %. Ainda sim ambas as amostras possuem valores característicos de argilominerais esmectíticos. Esta redução muito provavelmente está ligada ao fato de o processo de liofilização ter a característica de reduzir o teor de água e a atividade de água (CASSANELLI; NORTON; MILLS, 2018). Desta forma, as moléculas de água intercaladas nos espaços interlamelares podem ter sido removidas. A diminuição de intensidade, bem como o alargamento do pico de difração basal (001), demonstra que esta remoção de água provocou um possível desfolhamento e colapso da estrutura lamelar, o que ocasiona uma diminuição no tamanho do cristalito.

5.2.3 Capacidade de troca catiônica, inchamento e teor de umidade

A Tabela 10 apresenta os valores da capacidade de inchamento para a amostra bruta e liofilizada (LBS 07), bem como seu teor de umidade. É importante salientar que o comportamento chamado de inchamento interlamelar é controlado pelo cátion associado à estrutura da argila, ou seja, a espessura da camada de água interlamelar varia com a natureza do cátion adsorvido e com a quantia de água disponível. Se a maior quantia de cátions presente é de sódio, o inchamento pode progredir desde 9,8 Å (para argilas expostas ao ar) ou 40 Å (quando a argila é totalmente dispersa em meio líquido). No entanto, para argilas cálcicas ou policatiônicas, a quantidade de água adsorvida é limitada e as partículas continuam unidas umas às outras pelas interações eletrostáticas e de massa. A diferença no inchamento das

montmorilonitas sódicas e cálcicas deve-se à força de atração entre as camadas, que é acrescida pela presença do cálcio, reduzindo a quantidade de água que poderá ser adsorvida, enquanto que o cátion de sódio provoca uma menor força atrativa, permitindo que uma maior quantidade de água penetre entre as camadas, e seja então adsorvida (BRINDLEY, 1952; LUMMUS; AZAR, 1986).

Tabela 10 - Capacidade de inchamento e teor de umidade para as amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07).

	Capacidade de inchamento (mL/2g)	Teor de Umidade (%)
Bentonita Bruta	25	11,85
Bentonita Liofilizada LBS 07	20	6,35

Fonte: A autora, 2018.

Em seu trabalho Do Rosário (2010), apresenta uma classificação para teores de inchamento, onde valores inferiores a 2,0 mL/g são considerados como “não inchamentos”, valores de 3,0 a 5,0 mL/g como “baixos”, valores de 6,0 a 8,0 mL/g como “médio” e acima de 8,0 mL/g como “alto”. A partir dessa classificação, é possível observar que ambas as amostras podem ser classificadas como de “alto” inchamento, podendo ser caracterizadas como bentonitas de caráter sódico. Entretanto, a capacidade de inchamento após o processo de liofilização sofreu uma diminuição de 20 % quando comparada com a amostra bruta. Esta diminuição pode estar ligada à remoção da água da estrutura da amostra, visto que houve uma diminuição de 46 % no teor de umidade após o processo de liofilização, o que possivelmente gerou um desfolhamento e o colapso da estrutura lamelar, já observado nas análises de FRX.

A Tabela 11 apresenta os valores comparativos da capacidade de troca catiônica das amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07). Verifica-se que o processo de liofilização não provocou alteração significativa na capacidade de troca catiônica e que ambas as amostras apresentam uma quantidade maior de sódio trocável, seguido pelo cálcio. Com base nas composições apresentadas, é possível afirmar que a amostra em estudo se trata de uma bentonita de caráter sódico. Como a origem da amostra disponibilizada para este estudo é de caráter desconhecido, o que se pode inferir é que a amostra apresenta características de uma bentonita policatiônica tratada para obtenção de

uma bentonita sódica, pois os dois cátions trocáveis principais (sódio e cálcio) apresentam-se predominantemente.

Tabela 11 - Resultados da capacidade de troca catiônica para as amostras de bentonita bruta e liofilizada (LBS 07).

	Bentonita Bruta	Bentonita Liofilizada LBS 07
Íons	Concentração (meq/100g)	Concentração (meq/100g)
Na ⁺	81,3	84,26
K ⁺	0,67	0,68
Mg ²⁺	8,12	6,35
Ca ²⁺	58,19	54,60
Total	148,28	145,89

Fonte: A autora, 2018.

5.2.4 Análises térmicas (DTA/TG/FTIR)

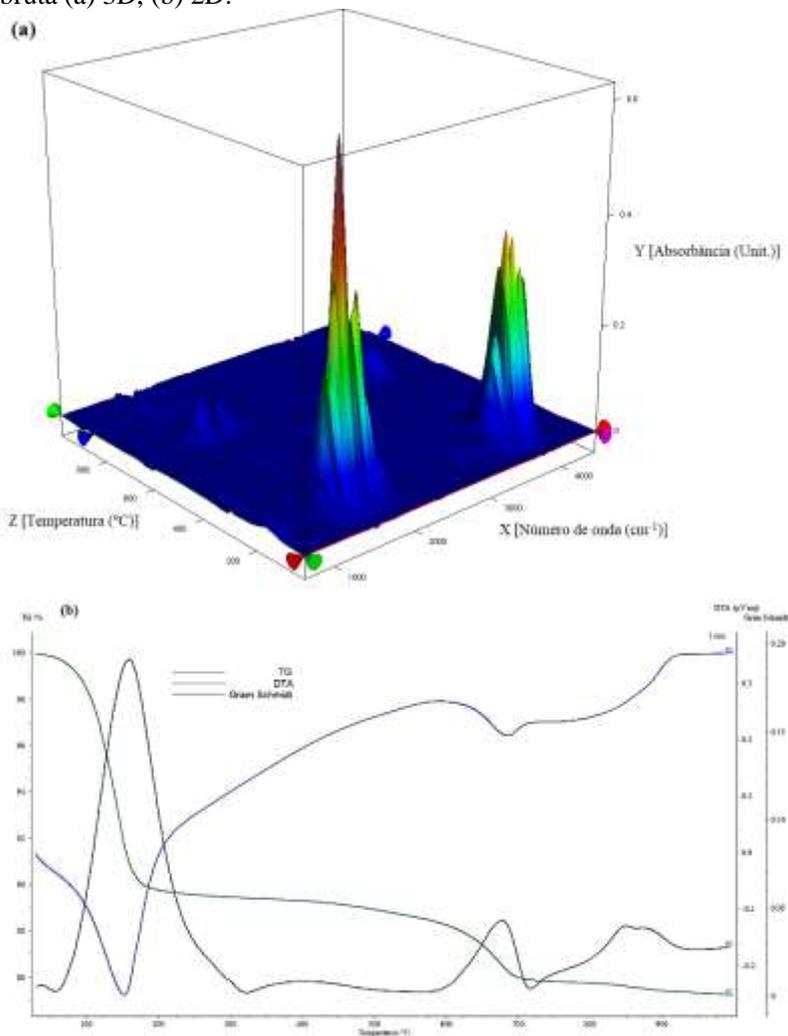
As Figuras 16 e Figura 17 correspondem às análises térmicas DTA/TG+FTIR acoplado para as amostras estudadas. Para a amostra bruta (Figura 20), é possível observar a queda de massa, bem como o aparecimento da reação endotérmica na faixa de temperatura que vai de 100 °C a 200 °C, que ocorre devido à perda de água adsorvida entre as camadas estruturais da argila. Partindo da posição de 200 °C a 500 °C, aproximadamente, a massa da amostra se mantém praticamente constante e nenhuma reação endotérmica é detectada, o que confirma a caracterização da amostra como uma bentonita sódica. O não aparecimento do pequeno ombro característico a 220° C correspondente à perda de água coordenada aos cátions trocáveis nas intercâmbios, principalmente Ca²⁺ e Mg²⁺, e confirma que esta amostra não apresenta natureza policatiônica, como possivelmente indicava a análise de capacidade de troca catiônica (Amorin et al., 2006).

O comportamento de decomposição se repete na posição 550 °C a 700 °C, onde também é marcado o aparecimento de um pico de reação endotérmica, referente à saída da água de constituição liberada em altas temperaturas. A amostra, então, novamente apresenta caráter de estabilidade até 1000 °C. É importante salientar que acima da temperatura de 850°C as esmectitas normalmente iniciam o processo de destruição do seu retículo cristalino.

No espectro de FTIR acoplado (Figura 16a) foi possível identificar que a saída de água de adsorção ocorre na temperatura de 161

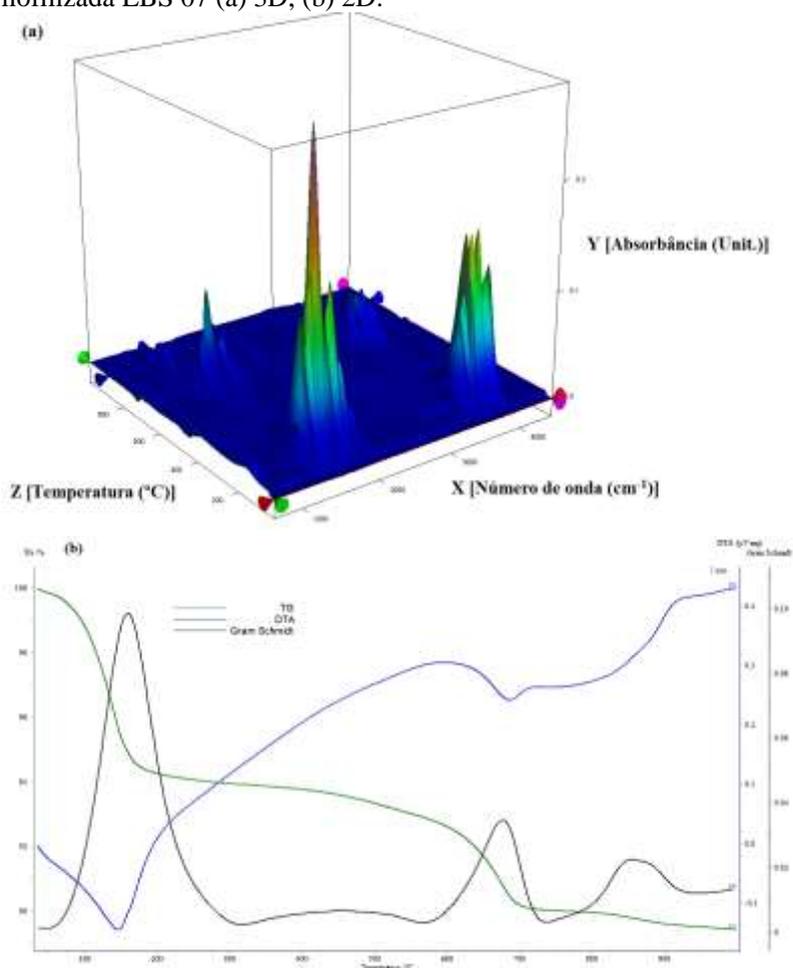
°C, com número de onda que varia de 1200 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} , e que o pico se repete na temperatura de 679 °C em 3000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} para remoção da água de constituição.

Figura 16 - Espectro de DTA/TG + FTIR acoplado para bentonita bruta (a) 3D, (b) 2D.



Fonte: A autora, 2018.

Figura 17 - Espectro de DTA/TG + FTIR acoplado para bentonita liofilizada LBS 07 (a) 3D, (b) 2D.



Fonte: A autora, 2018.

Para a amostra liofilizada (Figura 17), observa-se comportamento similar ao da amostra bruta. A principal alteração observada está relacionada à diminuição na intensidade da perda de massa, que pode ser justificada pelo fato de o processo de liofilização já remover uma quantia considerável de água da estrutura do material.

5.2.5 Porosidade total, área superficial e isoterma de adsorção e dessorção (BET)

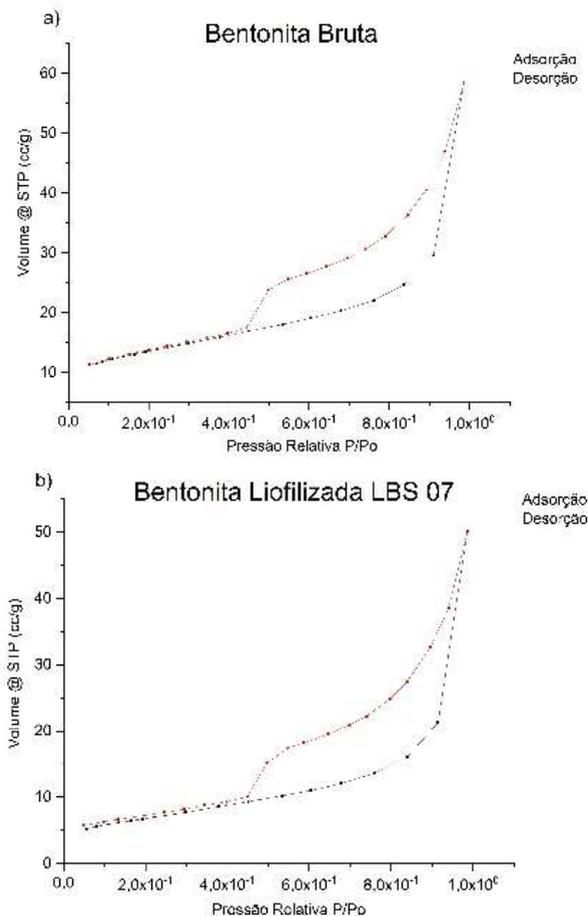
A Tabela 12 apresenta os resultados de porosidade total e área superficial específica para as amostras bruta e liofilizada (LBS 07). É possível verificar que o processo de liofilização provocou uma redução de 47 % na área superficial da amostra e uma redução de 14,2 % na sua porosidade total. Essas alterações são resultado, muito provavelmente, das alterações na estrutura cristalina observada anteriormente na análise de FRX. A remoção de água presente na estrutura do material pelo processo de liofilização acarretou em um possível desfolhamento e o colapso da estrutura lamelar, alterando consideravelmente os parâmetros de área superficial e porosidade total da amostra em estudo. Entretanto, embora a área superficial tenha sido afetada pelo processo de liofilização, é importante ressaltar que a capacidade de troca catiônica e de adsorção de AFB₁ não foram negativamente afetadas.

Tabela 12 - Área superficial e porosidade total das amostras bruta e liofilizada (LBS 07)

	Área superficial (m ² /g)	Porosidade total (cm ³ /g)
Bentonita Bruta	45,5	0,090
Bentonita Liofilizada LBS 07	24,1	0,077

A Figura 18 corresponde ao comparativo das isotermas de adsorção e dessorção para amostra (a) bruta e (b) liofilizada. É possível observar que ambas as amostras apresentam o mesmo comportamento, classificado como isotermas do tipo V pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (IUPAC, 1985). Esse tipo de isoterma é relativamente incomum e pode aparecer com certos adsorventes porosos. A curva em vermelho apresentada na Figura 18 são características do fenômeno de histerese, que ocorre devido às pressões de saturação não serem iguais para a condensação e para evaporação no interior dos poros, isto é, as isotermas de adsorção e dessorção não coincidem (ALOTHMAN, 2012).

Figura 18 - Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ para a amostra (a) bruta e (b) liofilizada (LBS 07).



Fonte: A autora, 2018.

5.3 ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B₁ *in vitro* PELOS MÉTODOS ELISA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Comparando-se os percentuais de adsorção da micotoxina, apresentados na Tabela 13, foi possível observar que para os ensaios *in vitro* em suco gástrico artificial (pH 3,0) não houve diferença

significativa entre os resultados obtidos com as amostras bruta e liofilizada, ou seja, apesar de todas as alterações estruturais causadas pela remoção da água no processo de liofilização, o material não perde suas propriedades quando aplicado como adsorvente de micotoxinas, sendo capaz de adsorver uma quantidade interessante de AFB₁. Já para os ensaios realizados em suco intestinal (pH 6,0) foi possível verificar um aumento de 4% na capacidade de adsorção de AFB₁ pelo teste Elisa, obtendo-se valores próximos aos obtidos para a adsorção em pH 3,0.

Com base no estudo desenvolvido por Mallmann et al, (2006), é recomendado como critério de aceitação que o adsorvente testado tenha capacidade de adsorção igual ou superior a 90 % em suco gástrico pH 3,0 e suco intestinal pH 6,0 para avaliações *in vitro*, sendo que entende-se como resultado satisfatório quando o produto tem comportamento similar nos dois compartimentos do sistema digestório.

Tabela 13 - Resultados da análise de adsorção de micotoxina *in vitro* para as amostras bruta e liofilizada (LBS 07).

Amostra	Teste Elisa (%)		HPLC (%)	
	pH 3,0	pH 6,0	pH 3,0	pH 6,0
Bentonita Bruta (0,5%)	98,6	96,33	-	-
Bentonita Liofilizada LBS 07 (0,5%)	98,34	98,27	99,96	99,94

Fonte: A autora, 2018.

Para comprovar a eficiência da amostra liofilizada no processo de adsorção de AFB₁, a amostra liofilizada (LBS 07) foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência e os resultados apresentados foram muito satisfatórios, com adsorção de quase 100% de AFB₁. Com este resultado, pode-se considerar que a bentonita liofilizada é um forte candidato a adsorvente de micotoxinas para aplicação de rações para aves em fase inicial, onde a contaminação deve ser zero. No entanto, vale lembrar que testes *in vitro* são apenas uma fase do processo para garantir a eficácia de um AAM e que ensaios *in vivo* devem ser realizados para comprovar a total eficácia do material (BRASIL, 2006).

6 CONCLUSÃO

A partir da metodologia estatística aplicada nas etapas do processo de liofilização, foi possível obter os parâmetros ótimos de congelamento para bentonita, que foram de 150 g da amostra a -90 °C por 3 dias.

As propriedades físicas e químicas da bentonita não sofreram alterações significativas após o processo de liofilização, sendo que as mudanças mais relevantes ocorreram na sua estrutura devido à remoção de água presente no material. Essas mudanças causaram a diminuição no teor de umidade para 46 %, confirmada também pelas análises térmicas ATD/TG +FTIR. Houve também a diminuição da capacidade de inchamento em 20 % e a diminuição do espaçamento basal de 7,34%. O material apresentou uma redução de 47 % na sua área superficial e de 14,2 % na sua porosidade total. Em contrapartida apresentou o mesmo comportamento nas isotermas de adsorção e dessorção de N₂, ambas com o fenômeno de histerese.

Com os resultados da análise de troca catiônica foi possível identificar que a amostra se tratava de um argilomineral policatiônico, tendo como principais cátions trocáveis o sódio e o cálcio. Assim, os baixos teores de inchamento foram justificados visto que o cálcio limita a adsorção de água nos espaços lamelares.

Apesar das alterações estruturais que o processo de liofilização causou na amostra, seu comportamento para adsorção de AFB₁ nos ensaios *in vitro* não foram alterados. Para o pH 6,0, pelo método Elisa, houve um aumento de 4 % na capacidade de adsorção e os ensaios em cromatografia líquida de alta eficiência deram uma representatividade de quase 100% na adsorção da micotoxina em estudo. Os ensaios *in vitro*, no entanto, são apenas o primeiro indicativo de uma possível aplicação de bentonitas liofilizadas para adsorção de micotoxinas, que só poderá ser confirmada após a realização de ensaios *in vivo*.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com os dados obtidos neste trabalho, sugere-se para trabalhos futuros:

- Avaliação de testes *in vivo* para comprovação da eficácia na adsorção de AFB₁;
- Estudo do mecanismo de adsorção de AFB₁ para bentonita liofilizada;
- Verificação do tipo de colapso estrutural causado pela remoção de água através do processo de liofilização
- Combinar o processo de liofilização juntamente com qualquer tratamento já consolidado para ativação de bentonitas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFIZ, H. A.; HORWITZ, K. B. Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. **Epigenomics**, v. 7, n. 5, p. 847–862, ago. 2015.

AGNES, V. F.; AKBARSHA, M. A. Pale vacuolated epithelial cells in epididymis of aflatoxin-treated mice. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 629–641, 1 out. 2001.

AL-TAHER, F. et al. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, v. 72, p. 27–35, 2017.

ALBERTS, J. F. et al. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. **Food Control**, v. 73, p. 101–109, 2017.

ALIM, M. et al. Survey of mycotoxins in retail market cereals, derived products and evaluation of their dietary intake. **Food Control**, v. 84, p. 471–477, 2018.

ALOTHMAN, Z. A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. **Materials**, v. 5, n. 12, p. 2874–2902, 17 dez. 2012.

AMEEN ABDULMAJEED, N. Therapeutic ability of some plant extracts on aflatoxin B1 induced renal and cardiac damage. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2011.

AMORIM, L. V. et al. Estudo comparativo entre variedades de argilas bentoníticas de Boa Vista, Paraíba. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 11, n. 1, p. 30–40, 2006.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução de Diretoria Colegiada nº. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos.** Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_CO MP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966>. Acesso em: 3 jun. 2018.

BAHEY, N. G.; ELAZIZ, H. O. A.; GADALLA, K. K. E. S. Toxic effect of aflatoxin B1 and the role of recovery on the rat cerebral cortex and hippocampus. **Tissue and Cell**, v. 47, n. 6, p. 559–566, 2015.

BERK, Z. Chapter 23 - Freeze Drying (Lyophilization) and Freeze Concentration BT - Food Process Engineering and Technology (Second Edition). In: **Food Science and Technology**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 567–581.

BERK, Z. Chapter 23 - Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration BT - Food Process Engineering and Technology (Third Edition). In: **Food Science and Technology**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 567–581.

BHATTACHARYYA, K. G.; GUPTA, S. SEN. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, n. 2, p. 114–131, 2008.

BOSCO, F.; MOLLEA, C. **Micotoxins in Food**. Rijeka, Croatia: In Tech, 2012.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 130, de 24 de maio de 2006. Estabelece protocolos para reavaliação do uso de adsorventes de micotoxinas como aditivo autorizado na alimentação animal**. [s.l.] Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

BRINDLEY, G. W. **Clays and Clay Minerals, Part I: Geology and Mineralogy of Clays Structural Mineralogy of Clays**. [s.l: s.n.].

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 1, p. 65–86, 1979.

BUTLER, W. H. REVIEW OF THE TOXICOLOGY OF AFLATOXIN A2 - KROGH, P. BT - Control of Mycotoxins. In: [s.l.] Butterworth-Heinemann, 1973. p. 217–222.

CASSANELLI, M.; NORTON, I.; MILLS, T. Role of gellan gum microstructure in freeze drying and rehydration mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 51–61, 2018.

CAST. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Ames-Iowa-USA: Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

CASTILLO, J. M. S. DEL. **Micotoxinas en Alimentos**. Espanha: Diaz de

Santos, 2007.

CHKUASELI, A. et al. Application of new mycotoxin adsorbent-bentonite clay “Askangel” in poultry feed. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, n. 4, p. 295–298, 2016.

CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: Conditions and occurrence. **Mycopathologia**, v. 65, n. 1, p. 5–11, jan. 1978.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. DE S.; SANTOS, H. DE S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas - uma revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1282–1294, 2007.

DAI, Y. et al. Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 683–689, 2017.

DE RESENDE, E. I. P. . et al. Estudo espectroscópico de composto obtido da reação no estado sólido entre um complexo mononuclear de vanádio (IV) e caulinita. **Química Nova**, v. 35, p. 257–261, 2012.

DENG, Y. et al. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. **Applied Clay Science**, v. 50, n. 1, p. 92–98, 2010.

DESHENG, Q. et al. Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. **Poultry science**, v. 84, n. 6, p. 959–961, jun. 2005.

DIAZ, D. **The Micotoxin Blue Book**. Nottingham: Context Products, 2005.

DINIZ, S. P. S. DE S. **Micotoxinas**. Maringá: Livraria e Editora Rural, 2002.

DIXON, J. B. et al. Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: An introductory plan. **Applied Clay Science**, v. 40, n. 1, p. 201–208, 2008.

DO ROSÁRIO, J. D. A. **Obtenção de material antimicrobiano a partir de bentonita nacional tratada com prata**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2010.

FAISAL, K. et al. Spermatotoxic effect of aflatoxin B1 in rat: extrusion of outer dense fibres and associated axonemal microtubule doublets of sperm flagellum. **Reproduction**, v. 135, n. 3, p. 303–310, 1 mar. 2008.

FANI, M. As Micotoxinas. **Food Ingredients Brasil**, p. 32–40, 2009.

FOWLER, J.; LI, W.; BAILEY, C. **Effects of a Calcium Bentonite Clay in Diets Containing Aflatoxin when Measuring Liver Residues of Aflatoxin B1 in Starter Broiler Chicks** *Toxins*, 2015.

GREEN, J. D. SUBLIMATION A2 - Worsfold, Paul. In: TOWNSHEND, A.; POOLE, C. B. T.-E. OF A. S. (SECOND E. (Eds.). . Oxford: Elsevier, 2005. p. 410–415.

GUO, D. et al. Vacuum freeze-drying assisted preparation of spherical AIB2 powders with ultrafine microstructure. **Ceramics International**, v. 44, n. 6, p. 6451–6455, 15 abr. 2018.

HUA, T.-C.; LIU, B.-L.; ZHANG, H. 2 - Fundamentals of Freeze Drying. In: HUA, T.-C.; LIU, B.-L.; ZHANG, H. B. T.-F.-D. OF P. AND F. P. (Eds.). . **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2010. p. 18–67.

IARC, I. A. FOR R. ON C. Aflatoxins. In: **Chemical Agents and Related Occupations**. 100F. ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012. p. 225–248.

IBEH, I. N.; SAXENA, D. K.; URAIH, N. Toxicity of aflatoxin: effects on spermatozoa, oocytes, and in vitro fertilization. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 19, n. 4, p. 357–361, 2000.

IUPAC. **REPORTING PHYSISORPTION DATA FOR GAS/SOLID SYSTEMS with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity (Recommendations 1984)**. Vol. 57, N ed. Great Britain: [s.n.].

JAMES, A.; ZIKANKUBA, V. L. Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in sub-Sahara Africa. **Food Control**, v. 90, p. 372–381, 2018.

JENNINGS, T. A. **Lyophilization: Introduction and Basic Principles**. [s.l.] Taylor & Francis, 1999.

JIN, J. et al. Improved freeze drying efficiency by ice nucleation proteins

with ice morphology modification. **Food Research International**, v. 106, p. 90–97, 2018.

KAMALA, K.; KUMAR, V. P. Chapter 1 - Food Products and Food Contamination A2 - Holban, Alina Maria. In: GRUMEZESCU, A. M. B. T.-M. C. AND F. D. (Ed.). . **Handbook of Food Bioengineering**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 1–19.

KHARAYAT, B. S.; SINGH, Y. Chapter 13 - Mycotoxins in Foods: Mycotoxicoses, Detection, and Management A2 - Holban, Alina Maria. In: GRUMEZESCU, A. M. B. T.-M. C. AND F. D. (Ed.). . **Handbook of Food Bioengineering**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 395–421.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 4 (3), p. 225–256, 2011.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardised methods for the determination of mycotoxins in feed. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 29, n. 12, p. 1959–1971, 2012.

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

LAMIC, L. DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS. **Legislação**. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacao/legislacao-americas>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

LEITÃO, D. F. et al. Efficacy of a yeast additive to mitigate the effects of zearalenonecontaminated feed in gilts. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 30, n. 4, p. 299–307, 2017.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2011.

LUMMUS, J. L. .; AZAR, J. J. **Drilling Fluids Optimization a Practical Field Approach**. **PennWell Publishing Company**, 1986.

LUO, Y.; LIU, X.; LI, J. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. **Food Control**, v. 89, p. 123–132, 2018.

MACHADO, M. C. P. et al. Estudo do comportamento e caracterização de argilas bentoníticas após processo de liofilização. **Cerâmica**, v. 64, n. 370, p. 207–213, jun. 2018.

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, n. 1, p. 48–58, 2011.

MAGNOLI, A. P. et al. Negligible effects of tryptophan on the aflatoxin adsorption of sodium bentonite. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 12, p. 2063–2070, 2014.

MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. **CONFÊRENCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCULAS**, p. 213–224, 2006.

MALLMANN, C. A. et al. Comparação de metodologias analíticas e de amostragens para micotoxinas. p. 11, 2007.

MARQUES, L. G. **liofilização de frutas tropicais**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2008.

MONEY, N. P. Chapter 1 - Fungal Diversity BT - The Fungi (Third Edition). In: Boston: Academic Press, 2016. p. 1–36.

MOSTROM, M. S.; JACOBSEN, B. J. Ruminant Mycotoxicosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 2, p. 315–344, 2011.

MURRAY, H. H. Chapter 1 Introduction. In: MURRAY, H. H. B. T.-D. IN C. S. (Ed.). . **Applied Clay Mineralogy**. [s.l.] Elsevier, 2006. v. 2p. 1–6.

NONES, J. et al. Bentonite modified with zinc enhances aflatoxin B1 adsorption and increase survival of fibroblasts (3T3) and epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2). **Journal of Hazardous Materials**, v. 337, p. 80–89, 2017.

PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Prevalence of mycotoxins in

foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 50–60, 2017.

PATRICIO, J. S.; HOTZA, D.; NONI JÚNIOR, A. DE. Argilas adsorventes aplicadas à clarificação de óleos vegetais. **Cerâmica**, v. 60, n. 354, p. 171–178, jun. 2014.

PERALI, C. **Avaliação do Desenpenho da parede celular de leveduras como aditivo anti-micotoxinas na intoxicação experimental por Aflatoxina, Zearalenona ou Fumonisina**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016.

PHARMACOPEIA, U. S. **USP XXII-NF XVII: The 1990 U. S. Pharmacopeia and the National Formulary**. [s.l.] United States Pharmacopeia, 1989.

PINTO, N. F. J. DE A. No Title. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 4, p. 433–436, 2001.

PITT, J. I. Mycotoxins: Mycotoxins – General A2 - Motarjemi, Yasmine BT - Encyclopedia of Food Safety. In: Waltham: Academic Press, 2014. p. 283–288.

POLAK, R.; PITOMBO, R. N. M. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: A comparative study. **Cryobiology**, v. 63, n. 2, p. 61–66, 2011.

POZZO, M. DAL. **Impacto da aflatoxina B1, montmorilonita e b-glucano na fermentação ruminal In vitro**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

PUSCH, R. **Bentonite Clay: Environmental Properties and Applications**. [s.l.] CRC Press, 2015.

RAIOLA, A. et al. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 169–180, 2015.

ROSSI, P. et al. Effect of sterified glucomannan adsorbent on growth performance and visceral characterization of broilers chickens. **Revista de Agrociência**, v. 16, n. 1–4, p. 91–100, 2010.

SANTOS, R. G. DOS et al. Identification of cancer producing fungi Mycotoxins bread sandwiches sold in the commercial center of Macapa-AP. **RASBRAN - Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, v. 7, n. 2, p. 50–55, 2016.

SANTURIO, J. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 01–12, abr. 2000.

SCHERSCH, K. B. **Effect of Collapse on Pharmaceutical Protein Lyophilizates**. [s.l.] Ludwig-Maximilians-Universität München, 2009.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SCUSSEL, V. M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos II**. Florianópolis: Imprensa Universitária, 2008.

SHI, H. et al. Mycotoxin contamination of food and feed in China: Occurrence, detection techniques, toxicological effects and advances in mitigation technologies. **Food Control**, v. 91, p. 202–215, 2018.

SILVA, T. H. C. **Bentonita**. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/dnpm/sumarios/bentonita-sumario-mineral-2014/view>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

SMITH, M.-C. et al. **Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects** , 2016.

SOUZA, D. M. **Micotoxinas em matrizes de milho e trigo: Validação de método analítico por UPLC-MS/MS e monitoramento em diferentes pontos da cadeia produtiva e comercial**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

SPOTTI, M. et al. Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid. **Veterinary research communications**, v. 29, n. 6, p. 507–515, ago. 2005.

STANCIU, O. et al. Occurrence and co-occurrence of Fusarium mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania. **Food Control**, v. 73, p. 147–155, 2017.

SULZBERGER, S. A.; MELNICHENKO, S.; CARDOSO, F. C. Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production,

and metabolism of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1856–1869, 2017.

VALMORBIDA, R. **Fungos e Micotoxinas em Grãos de Milho (*Zea mays* L.) e Seus Derivados Produzidos no Estado de Rondônia, Região Norte do Brasil**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

VEKIRU, E. et al. In vitro binding assessment and in vivo efficacy of several adsorbents against aflatoxin B1. **World Mycotoxin Journal**, v. 8 (4), p. 477–488, 2015.

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**, v. 114, p. 246–259, 2018.

VIOTTI, G. C. D. A. **Desenvolvimento e caracterização de argilas organofílicas para uso em alimentação animal como adsorvente inativador de micotoxinas: aflatoxina B1 e fumonisina B1**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

WANG, G. et al. Evaluation of nonionic surfactant modified montmorillonite as mycotoxins adsorbent for aflatoxin B1 and zearalenone. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 518, p. 48–56, 2018a.

WANG, W. et al. Multiphase transport modeling for freeze-drying of aqueous material frozen with prebuilt porosity. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 122, p. 1353–1365, 2018b.

WATKINSON, S. C. Chapter 5 - Physiology and Adaptation BT - The Fungi (Third Edition). In: Boston: Academic Press, 2016. p. 141–187.

WAWRZYŃIAK, J.; WAŚKIEWICZ, A.; RYNIECKI, A. Evaluation of critical points of mould growth and mycotoxin production in the stored barley ecosystem with a hazardous initial microbiological state of grain. **Journal of Stored Products Research**, v. 77, p. 166–176, 2018.

WHO, W. H. O. Bentonite, kaolin, and selected clay minerals. **Environmental Health Criteria**, v. 231, p. 196, 2005.

ZACHARIASOVA, M. et al. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals.

Animal Feed Science and Technology, v. 193, p. 124–140, 2014.

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.

ANEXO A



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 07, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011 (*)

(Publicada em DOU nº 37, de 22 de fevereiro de 2011)

(Republicada em DOU nº 46, de 09 de março de 2011)

Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.

A **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº. 354 da Anvisa, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 15 de fevereiro de 2011,

adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente Substituto, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aprovado o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, nos termos desta Resolução.

Art. 2º Este Regulamento possui o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas, conforme os Anexos I, II, III e IV desta Resolução.

Parágrafo único. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo Codex Alimentarius.

Art. 3º Este Regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem as seguintes categorias de bebidas, alimentos e matérias-primas:

I - amendoim e seus derivados;

II - alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância);

III - café torrado (moido ou em grão) e solúvel;

IV - cereais e produtos de cereais;

V - especiarias;

Este texto não substitui o(s) publicado(s) em Diário Oficial da União.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

- VI - frutas secas e desidratadas;
- VII - nozes e castanhas;
- VIII - amêndoas de cacau e seus derivados;
- IX - suco de maçã e polpa de maçã;
- X - suco de uva e polpa de uva;
- XI - vinho e seus derivados;
- XII - fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância;
- XIII - leite e produtos lácteos, e
- XIV - leguminosas e seus derivados.

Art. 4º Os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido.

Art. 5º No caso de produtos não previstos no art. 3º desta Resolução e que sejam produzidos a partir de ingredientes com limites estabelecidos na forma dos Anexos deste Regulamento, que forem desidratados ou secos, diluídos, transformados e compostos, os limites máximos tolerados devem considerar as proporções relativas dos ingredientes no produto, concentração e diluição em relação aos limites estabelecidos para os ingredientes.

§ 1º Na hipótese do "caput" deste artigo, o interessado será notificado para fornecer informações relativas à proporção dos ingredientes no produto, bem como aos fatores específicos de concentração e diluição, caso seja necessário.

§ 2º A não apresentação das informações mencionadas no § 1º no prazo de 10 (dez) dias, ou sua inadequação, ensejará conclusão com base nos dados disponíveis.

Art. 6º Os limites máximos tolerados se aplicam à parte comestível dos produtos alimentícios em questão, salvo especificação em contrário.

Art. 7º O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Art. 8º Ficam revogadas a Resolução CNNPA nº 34, de 1976, publicada no D.O.U. de 19/01/1977, e a Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002.

Art. 9º São concedidos prazos para aplicação dos limites máximos tolerados estabelecidos nos anexos desta Resolução, tendo em vista a necessidade de adequação do setor produtivo, com exceção dos limites estabelecidos no Anexo I.

Art. 10. Os Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para as Micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos especificadas no Anexo II entrarão em vigor em 1º de janeiro de 2012.

Art. 11. Os Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para as Micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos especificadas no Anexo III entrarão em vigor em 1º de janeiro de 2014, **(Prazo prorrogado até 1º de janeiro de 2017, pela Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013)**

Art. 12. Os Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para as Micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos especificadas no Anexo IV entrarão em vigor em 1º de janeiro de 2016, **(Prazo prorrogado até 1º de janeiro de 2017, pela Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013)**

Art. 13. Esta Resolução e seu Anexo I entram em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU BRÁS APARECIDO BARBANO

ANEXO I – Aplicação Imediata

LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxina M1	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moido), farinhas ou sémolas de milho	20
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Ferrião	10
	Café torrado (moido ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão- doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas.	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10
Desoxinivalenol (DON)	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Fumonisinás (B1 + B2)	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Zearalenona	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã	50



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

ANEXO II – Aplicação em janeiro de 2012

LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Fumonísinas (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
	Arroz beneficiado e derivados	200
	Arroz integral	800
	Farelo de arroz	1000
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

ANEXO III – Aplicação em janeiro de 2014 (Prazo prorrogado até 1º de janeiro de 2017, pela Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013)

LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Desoxinivalenol (DON)	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
Fumonisinás (B1 + B2)	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400

ANEXO IV – Aplicação em janeiro de 2016 (Prazo prorrogado até 1º de janeiro de 2017, pela Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013)

LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750
Fumonisinhas (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

(* Republicada por ter saído, no DOU nº 37, de 22-2-2011, Seção 1, pág. 72, com incorreção no original.

ANEXO B

ARGENTINA:

- Alimentos infantis: $AFB_1 = \text{zero}$;
- Amendoim, milho e subprodutos: $B_1 = 5 \text{ ppb}$; $B_1, B_2, G_1, G_2 = 20 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Farelo de soja = $B_1 = 30 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Leite fluido e em pó: $M_1 = 0,05 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Produtos lácteos: $M_1 = 0,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$.

URUGUAI:

Aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2 :

- Alimentos e especiarias = $20 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Produtos de soja, amendoim, frutas secas = $30 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Cacau em grão = $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Alimentos infantis, industrializados = $3 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Leite e produtos lácteos: Aflatoxina $M_1 = 0,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$.

CHILE:

- Rações: $B_1 = 20 \text{ ppb}$;
- $B_1, B_2, G_1, G_2 = 50 \text{ } \mu\text{g/kg}$.

COLÔMBIA:

- Alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 20 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Cereais (sorgo, milheto): $B_1, B_2, G_1, G_2 = 30 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Sementes oleaginosas: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 10 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Rações para gado: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 50 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Sementes de gergelim: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 20 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Alimentos para aves: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 20 \text{ } \mu\text{g/kg}$.

ALEMANHA:

- Alimentos: $B_1 = 2 \text{ ppb}$; $B_1, B_2, G_1, G_2 = 4 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Preparações de enzimas para produção de alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 0,05 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Alimentos para crianças e jovens: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 0,05 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Leite: $M_1 = 0,05 \text{ } \mu\text{g/kg}$;
- Alimentos para crianças e jovens: $M_1 = 0,01 \text{ } \mu\text{g/kg}$.

ÁUSTRIA:

- Desoxinivalenol em rações para porcos = 500 µg/kg;
- Desoxinivalenol em rações para gado de corte, poedeiras e matrizes = 1000 µg/kg;
- Aves para corte = 1500 µg/kg;
- Rações para porcas matrizes = Zearalenona: 50 µg/kg.

BÉLGICA:

- Amendoim: $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$;
- Leite: $M_1 = 0,05 \mu\text{g/kg}$.

DINAMARCA:

- Amendoim e produtos: Aflatoxina $B_1 = 2 \mu\text{g/kg}$; $B_1, B_2, G_1, G_2 = 4 \mu\text{g/kg}$;
- Castanha do Brasil, figo sêco: $B_1 = 2 \mu\text{g/kg}$; $B_1, B_2, G_1, G_2 = 4 \mu\text{g/kg}$;
- Rins de suínos: Ocratoxina A = 25 µg/kg;
- Cereais e produtos: Ocratoxina A = 5 µg/kg.

ESPANHA:

- Todos alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 10 \mu\text{g/kg}$; $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$.

FRANÇA:

- Todos alimentos: Aflatoxina $B_1 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Amendoim, pistache, amêndoas, oleaginosas, alimentos infantís: $B_1 = 1 \mu\text{g/kg}$;
- Farelo de trigo: $B_1 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Óleos vegetais, cereais: $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$;
- Suco de maçã (produtos): Patulina = 50 µg/kg;
- Cereais, óleos vegetais: Zearalenona = 200 µg/kg;
- Cereais: Ocratoxina A = 5 µg/kg;
- Leite, leite em pó (calculado no produto reconstituído): Aflatoxina $M_1 = 0,05 \mu\text{g/kg}$;
- Leite, leite em pó, (crianças menores que 3 anos calc. no produto reconstituído): $M_1 = 0,03 \mu\text{g/kg}$.

GRÉCIA:

- Amendoim, avalãs, nozes, castanha de caju, pistache, amêndoas, sementes de abóbora, sementes de girassol, sementes de pinus,

sementes de damasco, milho, figo seco, damasco seco, ameixa seca, tâmaras, uva passas: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 10 \mu\text{g/kg}$; $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$;

- Café cru, suco de maçã, produtos de maçã: Ocratoxina A = $20 \mu\text{g/kg}$; Patulina = $50 \mu\text{g/kg}$.

IRLANDA:

- Todos os alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 30 \text{ ppb}$; $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$.

ITÁLIA:

- Alimentos: Aflatoxina $B_1 = 5 \text{ ppb}$; $B_1+B_2+G_1+G_2 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Figos secos: Aflatoxina $B_1 = 5 \text{ ppb}$; $B_1+B_2+G_1+G_2 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Especiarias: Aflatoxina $B_1 = 10 \text{ ppb}$; $B_1+B_2+G_1+G_2 = 20 \mu\text{g/kg}$;
- Ervas para chás: Aflatoxina $B_1 = 5 \text{ ppb}$; $B_1+B_2+G_1+G_2 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Alimentos para crianças (Baby foods): $0,1 \text{ ppb}$; Aflatoxina $M_1 = 0,01 \text{ ppb}$; Zearalenona = $20 \mu\text{g/kg}$;
- Café cru: Ocratoxina A = 8 ppb ;
- Café torrado e solúvel = $4 \mu\text{g/kg}$;
- Cacau e produtos derivados: Ocratoxina A = $0,5 \mu\text{g/kg}$;
- Carne de porco e derivados: Ocratoxina A = $1 \mu\text{g/kg}$;
- Cereais e produtos: Ocratoxina A = 3 ppb ; Zearalenona = $100 \mu\text{g/kg}$;
- Cerveja: Ocratoxina A = $0,2 \mu\text{g/kg}$;
- Sucos de frutas: Patulina = $50 \mu\text{g/kg}$.

LUXEMBURGO:

- Amendoim e seus produtos: $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$.

NORUEGA:

- Todos alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 5 \mu\text{g/kg}$;
- Suco de maçã concentrado: Patulina = $50 \mu\text{g/kg}$.

PORTUGAL:

- Todos alimentos: $B_1 = 20 \mu\text{g/kg}$;
- Amendoim: $B_1 = 25 \mu\text{g/kg}$;
- Alimentos infantis: $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$.

SUÉCIA:

- Todos alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 5 \mu\text{g/kg}$;
- Bagas, frutas, sucos: Patulina = $50 \mu\text{g/kg}$;

- Produtos de leite líquidos: $M_1 = 0,05 \mu\text{g/kg}$;
- Ingredientes para ração: $B_1 = 50 \mu\text{g/kg}$;
- Ingredientes para ração para gado leiteiro: $M_1 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Grãos de cereais e forragens como ingrediente para ração de gado leiteiro: $B_1 = 1 \mu\text{g/kg}$;
- Rações misturadas (exceto forragens) para gado leiteiro: $B_1 = 3 \mu\text{g/kg}$;
- Rações completas: $B_1 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Rações completas para gado de engorda, ovinos, caprinos, exceto gado leiteiro e animais jovens: $B_1 = 50 \mu\text{g/kg}$;
- Rações completas para porcos e aves, exceto animais jovens: $B_1 = 20 \mu\text{g/kg}$;
- Rações completas para gado leiteiro, incluindo forragens: $B_1 = 1,5 \mu\text{g/kg}$;
- Rações completas para aves: Ocratoxina A = $200 \mu\text{g/kg}$;
- Rações completas para porcos: Ocratoxina A = $100 \mu\text{g/kg}$.

ÁFRICA DO SUL:

- Todos os alimentos: $B_1 = 5 \mu\text{g/kg}$; $B_1, B_2, G_1, G_2 = 10 \mu\text{g/kg}$.

AUSTRÁLIA:

- Todos alimentos: $B_1, B_2, G_1, G_2 = 5 \mu\text{g/kg}$; Fomopsina = $5 \mu\text{g/kg}$;
- Manteiga de amendoim, nozes em geral = $15 \mu\text{g/kg}$;
- Castanha-do-Brasil: aflatoxinas = $15 \mu\text{g/kg}$.

CHINA:

- Arroz, óleos comestíveis: $B_1 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Trigo, cevada, aveia, feijão, sorgo, outros grãos e alimentos fermentados: $B_1 = 20 \mu\text{g/kg}$;
- Leite flúido e produtos lácteos (calculados na base de leite flúido): $B_1 = 0,5 \mu\text{g/kg}$;
- Ração para frangos: $B_1 = 10 \mu\text{g/kg}$;
- Ração para poedeiras e suínos de engorda: $B_1 = 20 \mu\text{g/kg}$;
- Milho, farelo de amendoim e outros resíduos de amendoim (para ração): $B_1 = 50 \mu\text{g/kg}$.