



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Ana Paula Capelezzo

Desenvolvimento e caracterização de um compósito a base de bentonita e acetato de geranila com propriedade antimicrobiana e capacidade de adsorção da Aflatoxina B1

Florianópolis

2022

Ana Paula Capelezzo

Desenvolvimento e caracterização de um compósito a base de bentonita e acetato de geranila com propriedade antimicrobiana e capacidade de adsorção da Aflatoxina B1

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Engenharia Química

Orientador: Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.

Coorientador: Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Capelezzo, Ana Paula

Desenvolvimento e caracterização de um compósito a base de bentonita e acetato de geranila com propriedade antimicrobiana e capacidade de adsorção da Aflatoxina B1 / Ana Paula Capelezzo ; orientador, Humberto Gracher Riella, coorientador, . Márcio Antônio Fiori, 2022.

154 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Bentonita organofílica. 3. Material antimicrobiano. 4. Adsorvente. 5. Micotoxinas. I. Riella, Humberto Gracher. II. Fiori, . Márcio Antônio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Ana Paula Capelezzo

Desenvolvimento e caracterização de um compósito a base de bentonita e acetato de geranila com propriedade antimicrobiana e capacidade de adsorção da Aflatoxina B1

O presente trabalho em nível de Tese de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Adriana Dervanoski, Dra.

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Profa. Elita Fontenele Urano de Carvalho, Dra.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

Profa. Josiane Maria Muneron de Mello, Dra.

Universidade Comunitária da Região de Chapecó – Unochapecó

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Profa. Débora de Oliveira, Dra.

Coordenador(a) do Programa

Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.

Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Poder chegar ao final de mais um ciclo e agradecer a todos os envolvidos é uma alegria imensa. Primeiramente agradeço à Deus, aquele que sabe de todas as coisas e me fez estar onde eu estou. Pelo dom da vida e pela saúde, por nunca me deixar desanimar e sempre olhar com entusiasmo meu objetivo.

À minha família e ao meu namorado, por partilhar deste sonho comigo, por sempre me apoiarem, incentivarem, pelo amor e carinho incondicionais. Essa conquista também é de vocês, não chegaria onde cheguei, sem o apoio e auxílio de vocês. Obrigada por fazerem do meu sonho o seu sonho e agora sim temos uma doutora na família.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Humberto Gracher Riella e Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori pelos ensinamentos e experiências compartilhados, auxiliando na orientação e construção deste trabalho. Por toda a troca, aprendizado e entrega sempre que solicitados. De forma muito especial agradecer ao professor Márcio por conduzir este trabalho de forma leve e proveitosa, sou muita grata por tudo que me ensinaste como profissional e pessoa.

Aos professores Josiane Maria Muneron de Mello, Liz Girardi Müller, João Paulo Bender, Rubieli Carla Frezza Referino e Micheli Zanetti por terem contribuído de forma ímpar na realização dos experimentos e discussão dos resultados desta tese.

Aos demais colegas professores e técnicos de laboratório da Unochapecó pela troca de experiências e auxílio ao longo do trabalho. Em especial a Débora, Adriana, Natascha e Adriano, obrigada por estarem sempre dispostos a contribuir com o andamento da pesquisa, vocês são grandes profissionais.

Aos meus colegas e amigos do LABMAC, obrigado pela ajuda e conhecimentos compartilhados, vocês fizeram meus dias em Florianópolis mais leves e alegres. Em especial ao Domingos Lusitâneo por fornecer a bentonita usada no desenvolvimento deste trabalho e a Ana Paula, amiga que o LABMAC me proporcionou e que levo para sempre comigo.

As minhas amigas da vida, Laura e Jaqueline, obrigada por dividirem comigo tantos momentos, por me ouvirem, aconselharem, me auxiliarem, pelas risadas, troca de experiências vividas, é muito bom poder contar com vocês, são minha alegria diária. Em especial a você Laura, que me acompanhou durante toda a jornada acadêmica, sou grata por Deus ter colocado uma pessoa tão especial em meu caminho, que me faz crescer e ser uma pessoa melhor, como sempre falamos somos melhores juntas. Sem você não teria a mesma graça, certamente esse caminho teria sido muito difícil, você traz leveza e dedicação em tudo o que faz.

À Unochapecó pela infraestrutura fornecida.

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pelos ensinamentos e experiências trocados.

Ao Edevilson e Liziane, secretários da pós-graduação da Engenharia Química da UFSC, pela sua alegria e disposição em me auxiliar sempre que necessário;

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo auxílio financeiro durante o primeiro ano deste trabalho.

A todos meu muito obrigado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” (Marthin Luther King)

RESUMO

As commodities agrícolas são a base para a alimentação animal e a qualidade destas é uma preocupação que permeia desde o campo até sua entrega final como um produto. O ataque fúngico e a incidência de micotoxinas nas mais diversas matrizes agrícolas chamam atenção devido aos inconvenientes que estas causam tanto em animais quanto em seres humanos e o desenvolvimento de metodologias que visem mitigar os efeitos negativos da contaminação fúngica e das micotoxinas produzidas por fungos é um desafio para a academia e indústria. Dentre as micotoxinas, a Aflatoxina B1 (AFB1) é considerada a micotoxina mais tóxica e com maior potencial de contaminação da ração animal. Diversas técnicas têm sido empregadas a fim de reduzir a concentração desses contaminantes, a níveis aceitáveis por legislação, sendo a adsorção amplamente utilizada. Dentre os materiais adsorventes a bentonita é um dos mais utilizados no segmento de ração animal, apresentando potencial capacidade de adsorção de diversas micotoxinas, além da possibilidade de ativação e incorporação de compostos capazes de agregar outras funcionalidades, a exemplo da atividade antimicrobiana. O octadecilamônio é um sal de amônio quaternário utilizado para aumentar o espaço lamelar da bentonita, a fim de potencializar sua capacidade adsorvente. Já o acetato de geranila é um éster oriundo do geraniol, o qual apresenta propriedade antimicrobiana, estabilidade térmica e atoxicidade, o que o torna interessante para inserção na bentonita organofílica. Neste contexto, o objetivo desta tese parte da hipótese de que é possível obter um compósito antibacteriano, antifúngico e capaz de adsorver Aflatoxina B1, através da ativação da bentonita com octadecilamônio e posterior incorporação do acetato de geranila. Análises químicas e térmicas foram conduzidas a fim de caracterizar o material desenvolvido. A atividade antibacteriana dos compósitos foi avaliada pela técnica de difusão em meio sólido para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, enquanto a atividade antifúngica foi atestada contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. A capacidade de adsorção da Aflatoxina B1 em diferentes pHs foi avaliada por meio da cinética de adsorção e a determinação da toxicidade foi realizada em camundongos por meio de testes *in vivo*. Os resultados antibacterianos e antifúngicos mostraram que o compósito desenvolvido possui efetiva atividade principalmente contra bactérias Gram-positivas e fungos produtores de Aflatoxina B1 e que esta atividade se deve a presença no acetato de geranila, que foi confirmada pelas análises de FTIR, DRX e TGA, as quais mostraram que de fato o éster foi incorporado à bentonita organofílica. Através de ensaios de adsorção verificou-se uma redução superior a 90% na concentração de Aflatoxina B1 em apenas 45 min atendendo o limite máximo estabelecido por legislação e, que após a incorporação do acetato de geranila, houve uma pequena redução na capacidade adsorvente, o que foi validado pela análise de BET/BJH, as quais mostram uma redução na área superficial e volume de poros. Os ensaios *in vivo* realizados em camundongos mostraram que o compósito desenvolvido é atóxico em doses inferiores a 2000 mg·kg⁻¹, sendo classificado como um material de baixa toxicidade. A liberação do acetato de geranila em diferentes pHs e temperatura de 41 °C também foi estudada, não sendo verificada a liberação de quantidades superiores a 0,03 mg·mL⁻¹ em um período de 75 h, o que possivelmente indica que a atividade antimicrobiana será mantida, por no mínimo, esse período. Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o compósito desenvolvido é promissor para aplicação em nutracêuticos e rações destinados à alimentação animal, atuando concomitantemente como material antimicrobiano e adsorvente de Aflatoxina B1.

Palavras-chave: Material antimicrobiano. Organofilização. Adsorvente. Micotoxinas. AFB1.

ABSTRACT

Agricultural commodities are the basis for animal feed and their quality is a concern that permeates from the field to their final delivery as a product. The fungal attack and the incidence of mycotoxins in the most diverse agricultural matrices draw attention due to the inconveniences they cause both in animals and in human beings and the development of methodologies that aim to mitigate the negative effects of fungal contamination and mycotoxins produced by fungi is a challenge for academia and industry. Aflatoxin B1 (AFB1) is considered the most toxic mycotoxin with the greatest potential for contamination of animal feed. Several techniques have been used in order to reduce the concentration of mycotoxins, to levels acceptable by legislation, with adsorption being widely used. Among the adsorbent materials, bentonite is one of the most used in the animal feed segment, presenting potential mycotoxin adsorption capacity, in addition to the possibility of activation and incorporation of compounds capable of adding other functionalities, such as antimicrobial activity. Octadecylammonium is a quaternary ammonium salt used to increase the lamellar space in order to enhance the adsorptive capacity of this clay mineral. Geranyl acetate is an ester derived from geraniol, which has excellent antimicrobial properties, thermal stability and non-toxicity, which makes it interesting for insertion into organophilic bentonite. In this context, the objective of this thesis starts from the hypothesis that it is possible to obtain an antibacterial, antifungal and adsorbent composite of Aflatoxin B1, through the activation of bentonite with octadecylammonium and subsequent incorporation of geranyl acetate. Chemical and thermal analyzes were carried out in order to characterize the material developed. The antibacterial activity of the composites was evaluated by the diffusion in solid medium technique for the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, while the antifungal activity was attested against the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. The adsorption capacity of Aflatoxin B1 in different pH was evaluated through adsorption kinetics and the determination of toxicity was performed in mice through in vivo tests. The antibacterial and antifungal results showed that the developed composite has effective activity mainly against Gram-positive bacteria and fungi producing Aflatoxin B1 and that this activity is due to the presence in geranyl acetate, which was confirmed by FTIR, XRD and TGA analyses, which showed the ester was incorporated into the organophilic bentonite. Through adsorption tests, there was a reduction of more than 90% in the concentration of Aflatoxin B1 in just 45 min, meeting the maximum limit established by legislation and, after the incorporation of geranyl acetate, there was a small reduction in the adsorbent capacity, which was validated by the BET/BJH analysis, which show a reduction in surface area and pore volume. The in vivo assays carried out in mice showed that the composite developed is non-toxic at doses below 2000 mg·kg⁻¹, being classified as a material of low toxicity. The release of geranyl acetate in different pH was also studied, with no release of amounts greater than 0.03 mg·mL⁻¹ at both evaluated pH of 3.5 and 6.5, in a period of 75 h, which possibly indicates that the antimicrobial activity will be maintained for at least this period. Based on the results presented, it is concluded that the composite developed is promising for application in nutraceuticals and animal feed, acting simultaneously as an antimicrobial material and adsorbent of Aflatoxin B1.

Keywords: Antimicrobial material. Organophilization. Adsorbent. Mycotoxins. AFB1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Aflatoxina B1 (AFB1).....	30
Figura 2 - Estratégias para descontaminação de micotoxinas.	31
Figura 3 - Estrutura da montmorilonita.	36
Figura 4 - Estrutura química do acetato de geranila.....	44
Figura 5 - Fluxograma com as principais etapas de pesquisa.....	48
Figura 6 - Esquema ilustrativo do ensaio experimental da técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício.....	52
Figure 4.1 - Diffusion in solid medium for Bent-ODA against (a) <i>Staphylococcus aureus</i> and (b) <i>Escherichia coli</i> bacteria and Bent-ODA-0.75GA against (c) <i>Staphylococcus aureus</i> and (d) <i>Escherichia coli</i> bacteria with inoculum 10^4 CFU·mL ⁻¹	64
Figure 4.2 - Antifungal activity of Bent-ODA against (a) <i>Aspergillus flavus</i> and (b) <i>Aspergillus niger</i> and Bent-ODA-0.75GA against (c) <i>Aspergillus flavus</i> and (d) <i>Aspergillus niger</i>	66
Figure 5.1 - XRD diffractogram of the organophilic bentonite (Bent-ODA) and of the organophilic bentonite with geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA). (a) from 1 to 45° and b) from 0 to 9°. Montmorillonite (M), Cristobalite (Cr), Muscovite (Mk) and Quartz (Q).....	79
Figure 5.2 - FTIR spectra obtained with the Bent-ODA-1.0GA for wavenumber between 4000 to 400 cm ⁻¹	81
Figure 5.3 - a) Thermogravimetric and b) Derivative thermogravimetric curves of organophilic bentonite and organophilic bentonite with geranyl acetate from 30 °C to 900 °C.....	83
Figure 5.4 - a) N ₂ adsorption and desorption isotherm for I) the compound Bent-ODA and for II) the compound Bent-ODA-1.0GA and b) pore size distribution for the compound Bent-ODA and for the compound Bent-ODA-1.0GA by the BJH method.....	85
Figure 5.4 - Antifungal results for the Bent-ODA against (a) <i>Aspergillus flavus</i> and (b) <i>Aspergillus niger</i> and for the Bent-ODA/GA against (c) <i>Aspergillus flavus</i> and (d) <i>Aspergillus niger</i>	88
Figure 5.5 - Adsorption kinetics diagrams of AFB1 in simulated gastric (1400 µg·kg ⁻¹ for AFB1, at 41 °C) and intestinal fluids (1800 µg·kg ⁻¹ for AFB1, at 41 °C). a) Bent-ODA pH 3.5; b) Bent-ODA-1.0GA pH 3.5; c) Bent-ODA pH 6.5 and d) Bent-ODA-1.0GA pH 6.5.....	90
Figure 6.1 - Diffusion in solid medium for Bent-ODA against (a) <i>Staphylococcus aureus</i> , (b) <i>Escherichia coli</i> and (c) <i>Salmonella typhimurium</i> bacteria and for Bent-ODA-1.0GA against	

(d) <i>Staphylococcus aureus</i> , (e) <i>Escherichia coli</i> and (f) <i>Salmonella typhimurium</i> bacteria, with inoculum 10^4 CFU·mL ⁻¹	110
Figure 6.2 - Effect of the organophilic bentonite activated with geranyl acetate acute treatment (300 mg·kg ⁻¹ , p.o. and 2000 mg·kg ⁻¹ , p.o.) on mice relative body weight (%).....	114
Figure 6.3 - Effect of the organophilic bentonite activated with geranyl acetate acute treatment (300 mg·kg ⁻¹ , p.o. and 2000 mg·kg ⁻¹ , p.o.) on mice food intake (g food intake·g mice ⁻¹ ·day ⁻¹).....	115
Figure 6.4 - Effect of the organophilic bentonite activated with geranyl acetate acute treatment (300 mg·kg ⁻¹ p.o. and 2000 mg·kg ⁻¹ p.o.) on the relative weight of female mice organs. I) Brain; II) Heart; III) Thymus; IV) Spleen; V) Adrenals glands; VI) Kidney e VII) Liver.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do crescimento fúngico nas placas inoculadas com fungos.....	53
Table 4.1 - Inhibition zone mean values generated by the Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA from the diffusion test in solid medium against the bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i>	65
Table 4.2 - Classification of fungal growth according to ASTM G21-15.....	67
Table 5.1 - Results of X-Ray Fluorescence analysis of in natura bentonite.....	77
Table 5.2 - Thermogravimetric analysis data from the organophilic bentonite and from the organophilic bentonite with geranyl acetate.....	85
Table 5.1 - Surface area, diameter and pore volume values determined by BET and BJH, respectively, for the compounds Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA.....	86
Table 5.4 - Classification of fungal growth according to ASTM G21-15.....	89
Table 6.1 - Mean values of Inhibition halo generated by the Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA, from the diffusion test in solid medium against the bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella typhimurium</i>	111
Table 6.2 - General appearance and behavioral observations of acute toxicity study (Bent-ODA-1.0GA acutely administered at 300 mg·kg ⁻¹ , p.o. and 2000 mg·kg ⁻¹ p. o.).....	113
Table 6.3 - Results for the amount of GA released of organophilic bentonite after 75 h.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULA QUÍMICA

HCl	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
AFB1	Aflatoxina B1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bent/ODA	Bentonita organofílica
BHI	<i>Brain Hearth Infusion</i>
BET/BJH	Brauner, Emmett e Teller/Barrett Joyner Halenda
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTC	Capacidade de troca catiônica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
BAC	Cloreto de benzalcônio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
Cl ₂	Cloro
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DON	Desoxinivalenol
DRX	Difração de Raios X
DMSO	Dimetilsulfóxido
TiO ₂	Dióxido de titânio
DL50	Dose Letal
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EO	<i>Essential oil</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
FB1	Fumonisina B1
GA	Geranyl acetate

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LP	Luz pulsada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCs-Zn	Microcápsulas de zinco dopadas com zinco iônico
Mt	Montmorilonita
NPs-ZnO	Nanopartículas de óxido de zinco
OTA	Ocratoxina A
ODA	Octadecilamônio
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
CaO	Óxido de cálcio
CuO	Óxido de cobre
MgO	Óxido de magnésio
ZnO	Óxido de zinco
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
P. A.	Puro analiticamente
TGA	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
UFC·mL ⁻¹	Unidades formadoras de colônias por mililitro
ZEA	Zearalenona
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 Objetivo Geral	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 NUTRACÊUTICOS E A ALIMENTAÇÃO ANIMAL	23
2.2 MICOTOXINAS	25
2.1.1 Aflatoxinas	29
2.1.1.1 <i>Estratégias para descontaminação de Aflatoxinas</i>	31
2.3 BENTONITA COMO ADSORVENTE DE MICOTOXINAS	35
2.4 MATERIAIS ANTIMICROBIANOS – Antibacterianos e Antifúngicos.....	41
2.5 ACETATO DE GERANILA.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DO COMPÓSITO	49
3.1.1 Fluorescência de Raios-X (FRX) bentonita bruta	49
3.2 ORGANOFILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BENTONITA pós processamento	49
3.2.1 Organofilização da bentonita utilizando um sal	49
3.2.2 Avaliação do potencial antibacteriano	50
3.2.2.1 <i>Preparo do inóculo microbiano</i>	50
3.2.2.2 <i>Difusão em meio sólido a partir de orifício</i>	51
3.2.3 Avaliação do potencial antifúngico	52
3.2.3.1 <i>Preparo do inóculo</i>	52
3.2.3.2 <i>Determinação da atividade antifúngica da bentonita</i>	53
3.2.4 Difração de Raios-X (DRX)	54
3.2.5 Termogravimetria	54
3.2.6 BET/BJH	54

3.2.7 Ensaio de adsorção.....	54
3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO.....	55
3.3.1 Incorporação do acetato de geranila à bentonita organofílica.....	55
3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	56
3.3.3 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.....	56
3.3.4 Difração de Raios-X (DRX).....	56
3.3.5 Termogravimetria.....	56
3.3.6 BET/BJH.....	57
3.3.7 Ensaio de adsorção.....	57
3.3.8 Liberação de acetato de geranila em diferentes pHs.....	57
3.3.9 Avaliação da toxicidade.....	58
CAPÍTULO 4.....	60
4.1 INTRODUCTION.....	60
4.2 METHODOLOGY.....	61
4.2.1 Materials.....	61
4.2.2 Obtaining the composite.....	62
4.2.3 Antimicrobial analysis for bacteria.....	62
4.2.4 Antimicrobial analysis for fungi.....	63
4.2.5 Adsorption Experiments.....	63
4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	64
4.3.1 Antibacterial activity.....	64
4.3.2 Antifungal activity.....	65
4.3.3 Adsorption Experiments.....	67
4.4 CONCLUSION.....	67
4.5 REFERENCES.....	67
CAPÍTULO 5.....	70
5.1 INTRODUCTION.....	71

5.2 MATERIALS AND METHODS	73
5.2.1 Composite preparation	73
5.2.2 Composite characterization	74
5.2.2.1 <i>FRX analysis</i>	74
5.2.2.2 <i>XRD analysis</i>	74
5.2.2.3 <i>FTIR analysis</i>	75
5.2.2.4 <i>Thermal Behavior</i>	75
5.2.2.5 <i>BET/BHJ analysis</i>	75
5.2.2.6 <i>Antifungal activity</i>	75
5.2.2.7 <i>Adsorption experiments</i>	76
5.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	77
5.3.1 XRF characterization	77
5.3.2 XRD characterization	78
5.3.3 FTIR characterization.....	80
5.3.4 Thermogravimetric analysis.....	82
5.3.5 BET/BJH analysis.....	85
5.3.6 Antifungal analysis	88
5.3.7 Adsorption experiments of the AFB1	89
5.4 CONCLUSION	94
5.5 REFERENCES	95
CAPÍTULO 6.....	103
6.1 INTRODUCTION.....	104
6.2 MATERIALS AND METHODS	106
6.2.1 Composite preparation	106
6.2.2 Antibacterial activity.....	106
6.2.3 In Vivo Assays.....	107
6.2.3.1 <i>Animals</i>	107

<i>6.2.3.2 Treatments</i>	107
<i>6.2.3.3 Acute Toxicity</i>	108
<i>6.2.3.4 Statistical Analysis</i>	108
6.2.4 Geranyl acetate release	109
6.3 RESULTS AND DISCUSSION	110
6.3.1 Antibacterial analysis	110
6.3.2 Acute toxicity	113
6.3.3 Geranyl acetate release	121
6.4 CONCLUSION	122
6.5 REFERENCES	123
CAPÍTULO 7	129
CAPÍTULO 8	133
CAPÍTULO 9	135
CAPÍTULO 10	136

APRESENTAÇÃO DO DOCUMENTO

Este documento de tese está organizado em 10 capítulos, dos quais no Capítulo 1 apresenta-se a introdução ao tema, motivação para o estudo, o objetivo geral e os objetivos específicos. No Capítulo 2 tem-se a revisão bibliográfica, a qual aborda a base teórica para o desenvolvimento deste trabalho. O capítulo 3 apresenta o fluxograma de trabalho, bem como a metodologia adotada de uma forma detalhada. Os Capítulos 4, 5 e 6 são apresentados na forma de artigos científicos, estando o primeiro já publicado, e os demais submetidos e no processo de revisão em periódicos científicos.

No Capítulo 4, está apresentado o artigo publicado na revista *Research, Society and Development* (Vol 11, nº 2, 2022) intitulado como: “**Antimicrobial bentonite by the addition of geranyl acetate for aflatoxin B1 adsorption**”. Neste capítulo, a bentonita passou pelo processo de organofilização (Bent-ODA) e foi incorporada com 0,75 g de acetato de geranila para cada 2,5 g de Bent-ODA, sendo o compósito denominado Bent-ODA-0.75GA.

No Capítulo 5, tem-se o estudo de caracterização e a avaliação da capacidade adsorvente de Aflatoxina B1 do compósito antimicrobiano a base de bentonita organofílica incorporado com acetato de geranila o qual foi submetido e está em avaliação, com o título “**Obtaining and characterization of bentonite organophilic incorporated with geranyl acetate and its application as mycotoxins’ binder in simulated gastrointestinal fluids**”. Nesta etapa da pesquisa a bentonita organofilizada (Bent-ODA) e foi incorporada com 1,0 g de acetato de geranila para 2,5 g de Bent-ODA, sendo denominada Bent-ODA-1.0GA.

No Capítulo 6, estudou-se a toxicidade aguda in vivo do compósito Bent-ODA-1.0GA, bem como avaliou-se a liberação do acetato de geranila da bentonita organofílica em diferentes pH, o qual foi submetido e está em avaliação, cujo título é “**Acute toxicity study of antibacterial organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate in mice and geranyl acetate liberation in different pH**”.

No capítulo 7, são apresentados os principais resultados obtidos no decorrer deste trabalho de tese de doutorado, tecendo uma conexão entre os artigos elaborados. No Capítulo 8, tem-se as principais conclusões, enquanto que no Capítulo 9 são apresentadas sugestões de trabalhos futuros, as quais são motivadas por lacunas e inquietações acerca do tema, abrindo possibilidade de outras pesquisas compatíveis, as quais ampliarão o conhecimento nesta área. O Capítulo 10, apresenta as referências da literatura utilizadas ao longo deste estudo.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil figura como um dos maiores produtores de rações animais do mundo e, cada vez mais, vem se modernizando a fim de se adequar às novas exigências e necessidades do mercado (ALLTECH, 2020), sendo o segmento que mais produz ração àquele destinado à alimentação de aves, seguido de suínos e bovinos. Cerca de 80% das matérias-primas empregadas para a fabricação de ração correspondem ao milho e a soja e uma ração de qualidade é de suma importância, uma vez que esta representa em média 70% do custo de produção de carne (bovina, suína e frangos), leite e ovos. Alimentos seguros para os animais são essenciais a fim de prevenir e reduzir que perigos relacionados à segurança alimentar entrem na cadeia de alimentação (CAPUTI, 2019).

A alimentação animal normalmente inclui uma combinação de alimentos que são elencados para atender suas necessidades nutricionais, para manutenção de sua saúde, bem-estar e produção, tudo isso atrelado ao menor custo possível. A qualidade das matérias-primas utilizadas para tal finalidade deve ser avaliada antes de seu uso para garantir que não representem qualquer perigo para saúde animal, humana ou ao meio ambiente (PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019; LIU et al., 2021). Ainda, no segmento de alimentação animal, tem-se disponíveis os nutracêuticos, que são compostos bioativos naturais ou químicos que possuem atividade biológica e benefícios fisiológicos, atuando na melhoria da saúde, prevenindo ou tratando doenças (SANTINI e NOVELLINO, 2017; HOTI et al., 2022).

Atualmente, há uma tendência no aumento da demanda global de milho, trigo, soja e seus derivados devido ao crescimento constante e fortalecimento da pecuária. Entretanto, em função das mudanças climáticas e outros fatores preponderantes muitas dessas culturas estão sujeitas ainda no campo à contaminação por micotoxinas, dentre as quais destacam-se as Aflatoxinas, Fumonisinias, Ocratoxinas, Tricotecenos e Zearalenona (PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019; ELLIOTT, CONNOLLY e KOLAWOLE, 2020).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que apresentam um risco eminente à saúde humana e animal e estão relacionadas com diversas doenças e patologias, podendo levar até a morte dependendo da quantidade e reincidência, além de causarem grandes prejuízos econômicos à indústria alimentícia (NONES, NONES e SCUSSEL, 2014; ZAIN, 2011; RAIOLA et al., 2015; OPLATOWSKA-STACHOWIAK et al., 2016; LI et al., 2018a).

Devido ao impacto negativo das micotoxinas na economia e na saúde, é essencial que exista uma gestão adequada de sua ocorrência em alimentos e rações, a fim de manter os níveis de contaminação os mais baixos possíveis. No sentido de mitigar estes efeitos negativos, algumas medidas de aditivação de alimentos com agentes antimicrobianos têm sido propostas, além de métodos físicos, químicos e biológicos de descontaminação, melhorias nas práticas agrícolas, a utilização da engenharia genética e condições adequadas de armazenamento (PANKAJ, SHI, e KEENER, 2018; LIU et al., 2021).

Diversos trabalhos têm mostrado a capacidade de adsorção de micotoxinas promovida por bentonitas (BETTIOL et al., 2022; BARRIENTOS-VELAZQUEZ et al., 2022). Incluindo nestes, a adsorção de Aflatoxina B1 (AFB1), que figura como uma das mais tóxicas dentre as Aflatoxinas, tendo sido relatada como causadora de alterações bioquímicas e estruturais em diversos órgãos, incluindo fígado, pulmões, rins e coração, além de ser carcinogênica (JALILI, 2016; NONES et al., 2016; GAN et al., 2019).

A fim de potencializar o efeito adsorptivo de bentonitas naturais, agregar novas funcionalidades e reduzir a toxicidade causada pelas micotoxinas, diversos materiais orgânicos e inorgânicos têm sido adicionados a bentonita como óleos essenciais, zinco, cobre, prata, sais de cloreto de benzalcônio (BAC) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (DAKOVIC et al., 2008; DAKOVIC et al., 2012; NONES et al., 2016; NONES et al., 2017; BERNARDOS et al., 2019; ROSÁRIO et al., 2020; RASHEED et al., 2020; KHANSILI e KRISHNA, 2022).

Os ésteres são compostos orgânicos encontrados nos óleos essenciais de diversas plantas, porém em quantidades relativamente baixas, o que inviabiliza a sua extração e torna necessário sua produção por meio de reações de esterificação. Grandes volumes de ésteres são obtidos através de rotas sintéticas enzimáticas ou químicas controladas e, por isso, apresentam elevado grau de pureza. Esses compostos orgânicos possuem estabilidade química e térmica, apresentam potencial atividade antimicrobiana e reduzido grau de toxicidade (BEZBRADICA et al., 2017).

Um importante éster é o acetato de geranila, classificado como monoterpeneo, que se apresenta como um líquido levemente amarelado, com agradável sabor floral ou frutado, aroma de rosa e lavanda. O acetato de geranila é insolúvel em água, mas solúvel em álcool e outros solventes orgânicos, apresenta propriedade antimicrobiana, e é amplamente utilizado em indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (GONÇALVES et al., 2012; GUPTA et al., 2013; ZEFERINO et al., 2021). Ressalta-se que ainda não foi encontrado na literatura científica trabalhos acerca da utilização de um compósito a base de bentonita e acetato de geranila com

concomitante ação antimicrobiana e adsorvente de micotoxinas. Este fator torna este tema original e inovador para o segmento de materiais multifuncionais e para o potencial uso no segmento de alimentação animal. Neste âmbito, pretende-se com esta tese obter um compósito que apresente atividade antimicrobiana e adsorvente de micotoxinas, empregando como adsorvente a bentonita organofílica e como agente antimicrobiano o acetato de geranila.

Associando a capacidade adsorvente da bentonita com a atividade antimicrobiana do acetato de geranila é possível, em tese, obter um compósito capaz de eliminar ou controlar o crescimento de bactérias e fungos e, simultaneamente, adsorver micotoxinas. Por serem atóxicos tanto a bentonita quanto o acetato de geranila, acredita-se que o novo composto também apresente tal característica e poderá ser amplamente empregado, de forma multifuncional, na produção de formulações nutracêuticas de uso animal. Dentre as vantagens de utilizar a bentonita como veículo do acetato de geranila, estão a maior estabilidade conferida ao éster e a facilidade de dispersão, o que contribuirá na distribuição do éster na matriz de aplicação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar um compósito a base de bentonita organofílica e acetato de geranila que apresente propriedade antibacteriana e antifúngica e capacidade de adsorver Aflatoxina B1.

1.1.2 Objetivos Específicos

Realizar a caracterização química da bentonita bruta usada para a preparação do compósito;

Obter e caracterizar um compósito a base de bentonita organofílica e diferentes concentrações de acetato de geranila;

Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do compósito desenvolvido;

Avaliar a capacidade de adsorção da Aflatoxina B1 em diferentes pH utilizando o compósito desenvolvido e comparar com a bentonita organofílica;

Estudar a liberação do acetato de geranila presente no compósito desenvolvido em diferentes pH;

Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* em camundongos do compósito desenvolvido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NUTRACÊUTICOS E A ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Os nutracêuticos são compostos bioativos naturais que conferem benefícios medicinais e promoção à saúde dos humanos e animais, podendo ser derivados de plantas (por exemplo, fitoquímicos e vitaminas), animais (por exemplo, polissacarídeos), microrganismos (por exemplo, poliaminoácidos) e de fontes marinhas (por exemplo, glucosamina e quitosana). O consumo de nutracêuticos vem sendo crescente uma vez que estes compostos podem ser associados à prevenção de doenças como depressão, inflamação, artrite, osteoporose, doenças gastrointestinais e cardiovasculares, diabetes e câncer, incluindo o envelhecimento das células causado pelo estresse oxidativo (DAS et al., 2012; WANG et al., 2016b).

O mercado dos nutracêuticos movimentava milhões de dólares, entretanto limitações associadas às dificuldades de extração de fontes naturais, como plantas, animais ou fungos, restringem o uso em larga escala, o que impulsiona o estudo de materiais de fácil obtenção e ampla disponibilidade para este fim (WANG et al., 2016b). Os nutracêuticos podem ser consumidos como suplementos ou ainda serem adicionados à ração como aditivos por exemplo, promovendo a saúde dos animais.

O abastecimento de ração é fundamental para todos os sistemas de produção animal e qualquer fator que afete a segurança do fornecimento desta é uma restrição significativa à produção. Conforme descrito pela Comissão Europeia (2011), a ração é tida como qualquer substância ou produto, incluindo aditivos, quer processados, parcialmente processados ou não processados, destinados à alimentação oral de animais (BRYDEN, 2012).

De acordo com a Instrução Normativa nº 110 de 24 de novembro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que trata sobre a lista de matérias-primas aprovadas como ingredientes, aditivos e veículos para uso na alimentação animal, a bentonita é tida como um aditivo autorizado para uso na alimentação animal, atuando como adsorvente, antiumectante, aglomerante e antiaglomerante (BRASIL, 2020).

Evidencia-se o constante aumento da demanda global pelos commodities agrícolas milho, trigo, soja e seus derivados devido ao crescimento e fortalecimento da produção de animais. A maior parte da produção de milho no mundo (aproximadamente 55%) vai para a alimentação animal e, em relação ao trigo presente na ração este representa cerca de 20% do trigo total produzido, sendo o restante usado para consumo humano. Além disso, fontes de

proteína vegetal, como subprodutos da extração de óleo de oleaginosas, estão regularmente presentes na alimentação animal, além do caroço de algodão, girassol, gergelim e palma (PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019).

Em relação a produção de ração, as complicações de segurança que surgem no processo produtivo incluem aspectos como a prática de misturar diferentes lotes de ingredientes crus distintos, o que cria uma nova matriz com um novo perfil de risco e o fato de que a maioria das micotoxinas são compostos estáveis, não sendo destruídos durante o armazenamento, moagem ou processo de fabricação de ração em alta temperatura. Por isso, o conhecimento da ocorrência e distribuição de fungos e micotoxinas em alimentos destinados à animais é de extrema importância e fornece uma oportunidade de determinar o risco direto apresentado aos animais (PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019).

Os fungos são onipresentes e todos os alimentos podem estar contaminados com micotoxinas, as quais têm implicações econômicas e comerciais significativas para a saúde humana e animal, tendo em vista que o fornecimento de carne, leite e ovos, pode ser adversamente afetado pelas mesmas (BRYDEN, 2012; ELLIOTT, CONNOLLY e KOLAWOLE, 2020). A qualidade e segurança dos produtos destinados a alimentação animal deve ser avaliada antes de seu uso para garantir que não representem perigo algum para a saúde animal, saúde humana ou meio ambiente, pois de acordo com Pitt e Hocking (2009) entre 5 a 10% da produção mundial de alimentos é perdida como resultado de deterioração fúngica.

Streit et al. (2013) estudaram a contaminação de micotoxinas em 17.316 amostras de rações e matérias-primas para rações em todo o mundo durante um período de 8 anos. Os resultados mostraram que 72% das amostras tiveram resultado positivo para pelo menos uma micotoxina e 38% apresentaram co-contaminação, ou seja, duas ou mais micotoxinas estavam presentes na amostra. A grande maioria das amostras contaminadas não excederam os limites previstos em legislação, contudo deve-se voltar a devida atenção principalmente em relação a co-contaminação, a qual traz diversos riscos associados.

Keller et al. (2016) estudaram a ocorrência de micotoxinas na alimentação de bovinos leiteiros e a ocorrência de Aflatoxina M1 (AFM1) no leite, em condições de campo em fazendas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os autores observaram que 67% das amostras de rações ultrapassaram o limite recomendado em relação a contagem total de fungos que é de 1.10^4 UFC·g⁻¹. Em relação a presença de AFM1 no leite, 26,7% das amostras apresentaram concentrações variando de 0,010 a 1,500 µg·kg⁻¹. Este estudo demonstrou que se deve dispor da devida atenção quanto a presença de fungos em ração para alimentação de gado leiteiro, bem

como da presença de Aflatoxina M1 no leite *in natura*, tendo em vista, que de acordo com a legislação brasileira o limite máximo tolerado para esse tipo de micotoxina é de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de leite.

Mesmo não sendo possível erradicar a presença de patógenos nas instalações de processamento, bem como no produto final, é fundamental minimizá-los. Diferentes estratégias de preservação são aplicadas na indústria a fim de mitigar os efeitos negativos desses contaminantes. Os métodos físicos e químicos aparecem em destaque, entretanto, muitas das metodologias empregadas apenas diminuem as infecções fúngicas e ficam aquém da eliminação de contaminantes (OLIVEIRA, ZANNINI e ARENDT, 2014).

Em relação à alimentação animal, Aflatoxinas, Desoxinivalenol, Zearalenona, Fumonisinias e Ocratoxina A são as micotoxinas mais incidentes e os seus efeitos tóxicos em animais dependem do tipo, quantidade ingerida, tempo de exposição, raça, idade, sexo, estado de saúde do animal e outros fatores de estresse (ZAKI et al., 2012; KHATOON et al., 2016; OSTRY et al., 2017; DELLAFIORA e DALL'ASTA, 2017). Os prejuízos observados após sua ingestão variam desde a redução na produtividade animal (ganho de peso corporal reduzido, fertilidade reduzida), supressão imunológica, resultando em maior suscetibilidade a doenças e parasitas, até casos clínicos mais graves como diarreia, danos ao fígado e rins, edema pulmonar, vômitos, hemorragias e tumores, podendo até em casos mais extremos levar a morte (STREIT et al., 2012).

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são um grupo relativamente grande e quimicamente diverso de metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular, produzidos normalmente por fungos filamentosos, principalmente os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que atacam commodities agrícolas, causando perdas econômicas significativas associadas ao seu impacto na saúde humana e animal e na produtividade de culturas. Plantações são acometidas por micotoxinas devido a condições adversas de clima, danos causados por pragas ou insetos, colheita e armazenamento inadequados e, chegam normalmente aos animais e humanos através da cadeia produtiva (MADBOULY et al., 2012; RAIOLA et al., 2015; SUN et al., 2018; PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019; LIU et al., 2021).

Os metabólitos primários dos fungos, como os de outros organismos, são aqueles essenciais ao seu crescimento. Já os secundários, são formados no final da fase exponencial de

crescimento e não possuem significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor. O desenvolvimento de fungos é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos como atividade da água, temperatura e umidade, pH, disponibilidade de oxigênio, potencial de oxirredução, composição do substrato, danos mecânicos e à presença de impurezas (JAY, 2005).

O desenvolvimento de micotoxinas está relacionado principalmente à temperatura, umidade, grau de dano físico, composição química do alimento e a presença de esporos de fungos. A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, na produção de micotoxina, assim como, a micotoxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo, isso se deve principalmente devido a termoestabilidade das micotoxinas (MAZIERO e BERSOT, 2010; PLEADIN, FRECE e MARKOV, 2019).

Outros fatores como localização geográfica, práticas agrícolas, ano de colheita e condições de armazenamento afetam a contaminação dos cereais pelas micotoxinas. Portanto, é muito importante aplicar estratégias de controle pré-colheita, manejo adequado da colheita, bem como condições de armazenamento que visem reduzir o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (KOSICKI et al., 2016; PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019).

Além de estarem presentes em frutas, sementes ou grãos, as micotoxinas também podem estar presentes em rações e alimentos de origem animal como carne, leite, ovos e queijo (NONES et al., 2017; PANKAJ, SHI e KEENER, 2018; LI et al., 2018a; ELLIOTT, CONNOLLY e KOLAWOLE, 2020). Dentre os produtos cárneos mais consumidos, os que se apresentam mais sensíveis às micotoxinas são aqueles oriundos de frangos, seguido por suínos, ovinos e bovinos. Geralmente, os ruminantes conseguem metabolizar alguns tipos de micotoxinas com quase 100% de eficácia, tornando-os mais resistentes do que a maioria dos animais. Isso se deve provavelmente à população microbiana do rúmen que desempenha um papel na desintoxicação, sendo essa carga microbiana ingesta do solo, que contém materiais argilosos capazes de contribuir para a redução dos efeitos negativos causados por estas aos ruminantes (JAYNES, ZARTMAN e HUDNALL, 2007; HORKY et al., 2018).

Uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de micotoxina, bem como diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina. Frequentemente a contaminação ocorre por mais de uma micotoxina, recebendo o nome de co-contaminação e seus efeitos tóxicos podem ser amplificados devido à interação sinérgica entre as mesmas. Estudos relataram que de 75% a 100% das mais diversas matrizes avaliadas contêm mais de

uma micotoxina que pode afetar os animais (HUSSEIN e BRASSEL, 2001; STREIT et al., 2012; LI et al., 2018a).

Madbouly et al. (2012) estudaram a co-contaminação de Aflatoxina e Fumonisina em amostras de milho comercial e grãos de arroz coletados em diferentes zonas comerciais do Cairo no Egito. Os resultados mostraram que houve a presença concomitante de ambas as micotoxinas, sendo as médias de Aflatoxinas totais e Fumonisinas detectadas no milho e arroz de 9,75 e 33 mg·kg⁻¹ e 5,15 e 1014 mg·kg⁻¹, respectivamente. Os resultados despertaram atenção que deve ser dispendida frente a estes contaminantes em função de que o milho e o arroz são grãos amplamente consumidos e requerem cuidados para que não promovam contaminações ao consumi-los.

Sun et al. (2011) estudaram dentre outras coisas a co-contaminação de Aflatoxina B1 (AFB1) e a Fumonisina B1 (FB1) em 209 amostras de alimentos de três áreas diferentes da China. Os níveis médios de AFB1 foram 13,5, 2,3 e 1,3 mg·kg⁻¹ e os níveis médios de FB1 foram 2,6, 0,4 e 0,3 mg·kg⁻¹ em amostras de milho colhidas em Huaian (área de alto risco para câncer de esôfago), Fusui (área de alto risco para câncer de fígado) e Huantai (área de baixo risco para câncer de esôfago e fígado), respectivamente. Os autores verificaram a co-contaminação destas duas micotoxinas em milho, arroz e farinha de trigo, e concluíram que a co-exposição de AFB1 e FB1 em alto nível em populações de alto risco de câncer no esôfago e fígado podem contribuir no papel da etiologia da carcinogênese humana.

A determinação desses contaminantes é bastante complexa, uma vez que representam grupos químicos estruturalmente diversos que frequentemente aparecem em baixas concentrações, em uma vasta gama de matrizes e, às vezes, em várias combinações. No entanto, são conhecidos métodos suficientemente confiáveis, precisos, sensíveis e seletivos para a análise qualitativa e quantitativa desses metabólitos secundários (PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas a fim de quantificar micotoxinas, dentre as mais usuais destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e métodos analíticos baseados em imunoenaios tais como ensaios imunoenzimáticos do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

A separação cromatográfica acoplada a um sistema de detecção adequado, podendo ser este ultravioleta, fluorescência ou massas, é a estratégia mais usada para analisar quantitativamente a contaminação por micotoxinas, sendo esse método altamente seletivo, preciso e reproduzível, apresentando boa resolução mesmo em amostras com baixas

concentrações de micotoxinas, entretanto a maioria dos ensaios cromatográficos são onerosos e dispendiosos e requerem equipamentos caros, procedimentos de limpeza adequados e experiência cromatográfica (ROSEANU et al., 2010; SHIM et al., 2014; PEREIRA, CUNHA e FERNANDES, 2019).

Técnicas imunoenzimáticas baseiam-se na interação entre anticorpos e antígenos, que permite a detecção de determinado agente pela análise na variação de coloração. O kit ELISA disponibiliza um anticorpo específico que se ligará a este antígeno. O anticorpo normalmente está vinculado a uma enzima, o que é chamado de conjugado. Quando o anticorpo se liga ao antígeno, a enzima reagirá com um substrato gerando uma coloração de intensidade relacionada a concentração de micotoxina presente. O kit ELISA apresenta vantagens frente a outros métodos de quantificação de micotoxinas, simples, rápido, específico, sensível, portátil, requerer pequeno volume de amostra e a etapa de extração e limpeza menos laboriosa se comparado aos métodos de HPLC. Normalmente, o kit ELISA é usado principalmente para monitoramento rápido na indústria, enquanto os métodos cromatográficos são mais aplicáveis para fins de pesquisa (ROSEANU et al., 2010; SHIM et al., 2014).

A contaminação frequente de commodities agrícolas por micotoxinas exige o desenvolvimento de métodos práticos e viáveis para a desintoxicação de alimentos contaminados, sendo este tema de grande interesse atual em virtude de que os consumidores estão cada vez mais conscientes em relação aos produtos que consomem e preocupados com a saúde em geral. Portanto, as estratégias para eliminar ou inativar as micotoxinas presentes em alimentos para animais e humanos são foco importante de pesquisa nas últimas décadas. É necessário o desenvolvimento de métodos simples e altamente eficientes para a remediação segura da contaminação causada por micotoxinas (SUN et al., 2018).

Independente da medida utilizada para a redução ou eliminação das micotoxinas, esta deve preservar os valores nutricionais e a palatabilidade dos alimentos e possuir viabilidade econômica tanto no processo produtivo quanto no produto acabado (BOVO, CORASSIN e OLIVEIRA, 2010; CARÃO et al., 2010).

As Aflatoxinas estão entre as micotoxinas mais tóxicas e presentes e são produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, fungos que são especialmente encontrados em áreas com climas quentes e úmidos, os quais causam uma grande preocupação na produção animal e na saúde pública devido a graves perdas econômicas e problemas de saúde (GAN et al., 2019).

2.1.1 Aflatoxinas

Entre as micotoxinas mais amplamente estudadas, as Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) são as mais tóxicas, produzidas pelas espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) e *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*), porém, em menor escala, podem ser produzidas também por *Aspergillus niger* (*A. niger*). As espécies de *Aspergillus* são aeróbicas e encontradas em quase todos os ambientes ricos em oxigênio, onde elas geralmente crescem na superfície de um substrato, rico em carbono, como monossacarídeos e polissacarídeos (COSTANZO et al., 2015; JALILI, 2016; NONES et al., 2016; GAN et al., 2019).

A espécie *Aspergillus* compreende um grupo diversificado de fungos com base em características morfológicas, fisiológicas e filogenéticas, que impactam significativamente a biotecnologia, a produção de alimentos e saúde humana, contando com mais de 200 espécies. Este microrganismo foi identificado pela primeira vez pelo micologista Micheli, em 1729, e apresenta um aspeto de camurça, tem crescimento rápido, inicialmente apresentando coloração branca ou amarela e posteriormente apresenta coloração escura (JAYAPRAKASH et al., 2019).

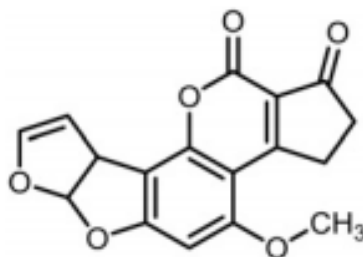
O fungo *Aspergillus niger* consegue crescer em diversos locais que apresentam uma variedade de nutrientes, o que mostra que esta espécie apresenta uma grande versatilidade metabólica e flexibilidade nutricional, é utilizado como hospedeiro e permite a produção de diversos produtos com utilização em diferentes indústrias, apresentando um impacto a nível industrial e biomédico muito positivo. Ganhou importância em 1919, quando sua capacidade de produzir ácido cítrico foi explorada industrialmente e desde 1960, vem sendo estudado como fonte de uma série de enzimas de interesse no processamento de frutas, panificação e nas indústrias de amidos. Já, o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* apresenta colônias com coloração esverdeada, foi definido por Link em 1809 e é considerado o patógeno saprófito mais virulento, potencial produtor de Aflatoxinas (SCHUSTER et al., 2002; JAYAPRAKASH et al., 2019).

A Aflatoxina foi descoberta pela primeira vez na Inglaterra em 1961 e figura como uma das mais tóxicas dentre as micotoxinas, conforme já mencionado anteriormente. Em testes realizados com roedores, macacos, aves e peixes o valor da dose letal (DL50) variou de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ até 5300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Em humanos, a aflatoxicose aguda se manifesta causando vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsões e morte com edema cerebral e envolvimento gorduroso do fígado, rim e coração (RAWAL, KIM e COULOMBE JR., 2010).

De acordo com Nones et al. (2017), a exposição aguda a Aflatoxinas pode causar hepatotoxicidade grave, gerando até 25% da mortalidade animal. Ainda, alimentos contaminados com AFB1 podem causar efeitos mais sutis, como supressão do sistema imunológico, taxas de crescimento reduzidas e perdas na eficiência alimentar de animais domésticos e de aves.

A Aflatoxina B1 é composta por dois furanos e um anel cumarínico, sua massa molar é de $312,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, é uma molécula polar, sua solubilidade em água é de 10 a $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo solúvel em solventes como metanol, clorofórmio, acetonitrila e dimetilsulfóxido, o tamanho da molécula varia de $5,18 \text{ \AA}$ a $6,50 \text{ \AA}$ (COLELLA, 2007; DAKOVIC et al., 2008; JALILI, 2016; NONES et al., 2016; GAN et al., 2019). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da Aflatoxina B1 (AFB1)



Fonte: Luo et al. (2013).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) os limites aceitáveis dessa micotoxina em ração animal são de $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para gado de confinamento, bovinos, suínos ou aves e $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para animais de estimação (cães, gatos, coelhos, etc) de todas as idades e animais leiteiros e outras espécies animais, incluindo animais selvagens (FDA, 2019). No Brasil a Portaria n.º 7, de 9 de novembro de 1988, fixa os padrões de tolerância para Aflatoxinas em alimentos para consumo animal, tanto para as matérias-primas quanto para as rações, sendo que estes não podem ultrapassar $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para Aflatoxinas (BRASIL, 1988).

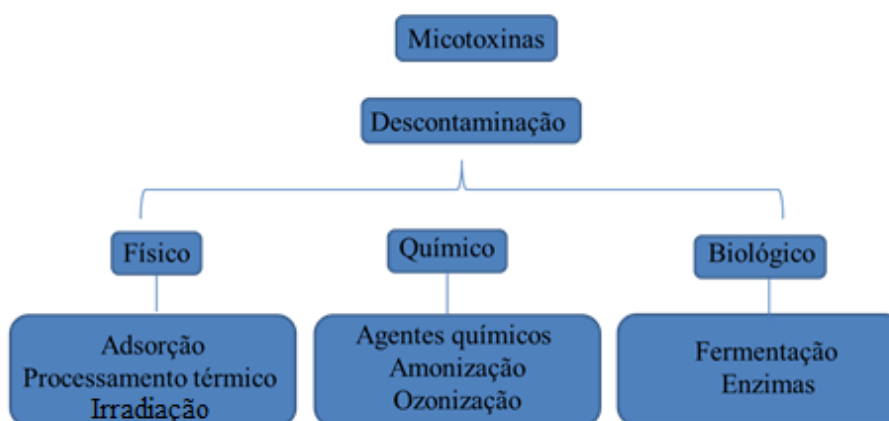
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os limites máximos de Aflatoxina B1 admissíveis em cereais, amendoim e derivados, especiarias, produtos de cacau e chocolate, frutas secas e desidratadas, castanhas, feijão, cevada, no milho em grão, na farinha ou sêmola de milho para consumo humano, sendo que os valores máximos tolerados variam de $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BRASIL, 2011).

As Aflatoxinas possuem ponto de fusão de aproximadamente 220 °C, sendo inviável sua inativação ou morte através de processos térmicos. Diferentes estratégias de descontaminação têm sido propostas a fim de minimizar os efeitos dessas toxinas, como métodos físicos, químicos e biológicos.

2.1.1.1 Estratégias para descontaminação de Aflatoxinas

A descontaminação de Aflatoxinas tem sido um desafio contínuo para a indústria médica, veterinária química e de alimentos. Existem muitas abordagens relatadas para a desintoxicação de micotoxinas, incluindo métodos físicos, químicos e biológicos, conforme pode ser observado através da Figura 2 (AWAD et al., 2010; XIONG et al., 2012).

Figura 2 - Estratégias para descontaminação de micotoxinas.



Fonte: Adaptado Pankaj, Shi e Keener (2018).

De acordo com Colovic et al. (2019), um método eficiente para a redução de micotoxinas deve ser capaz de inativar ou remover as mesmas sem produzir resíduos tóxicos e afetar as propriedades tecnológicas, valor nutritivo e palatabilidade dos produtos.

De forma geral, métodos físicos incluem adsorção, inativação por calor e irradiação (luz ultravioleta, UV ou radiação gama) (HWANG e LEE, 2006, MARKOV et al., 2015); os métodos químicos geralmente dependem de um grande número de agentes químicos, incluindo ácidos, bases e agentes oxidantes (MÉNDEZ-ALBORES, DEL RÍO-GARCÍA e MORENO-MARTÍNEZ, 2007; MÉNDEZ-ALBORES et al., 2008), e os métodos biológicos são função de diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e algas, os quais degradam as micotoxinas

e as convertem em compostos atóxicos ou compostos menos tóxicos (BAPTISTA et al., 2002; JERMNAK et al., 2013; JALILI, 2016; LIU et al., 2021).

Tripathi e Mishra (2009) aplicaram diferentes métodos de tratamento físicos (irradiação UV, aquecimento, microondas); químicos (oxidação, branqueamento, amonização, sulfitação) e biológicos (enzimáticos) para tratar pó de pimenta vermelha contaminada com $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Aflatoxina B1 (AFB1). Entre os métodos físicos selecionados, o aquecimento direto em forno à $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h foi o método que apresentou os melhores resultados, cuja degradação de AFB1 foi de 83,3%, seguido da exposição a irradiação UV por 60 min que degradou 59,6% de AFB1. Em relação aos tratamentos químicos, o melhor resultado encontrado foi para a oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que alcançou uma eficiência de 58,3%. O tratamento biológico foi conduzido utilizando a enzima peroxidase isolada do alho e mostrou um percentual de eficiência na remoção de AFB1 de 66,2%. Desta forma, pode-se concluir que os métodos físicos foram mais eficazes na degradação de AFB1.

No entanto esses métodos possuem algumas desvantagens como por exemplo, elevar a temperatura para inativar ou matar micotoxinas pode causar mudanças indesejáveis nos alimentos; os métodos químicos, os quais fazem o uso de produtos químicos podem alterar o valor nutricional e a palatabilidade dos alimentos e ainda, produzir resíduos tóxicos e, quanto aos tratamentos biológicos, por se tratarem de organismos vivos e seus constituintes, esses podem sofrer alterações durante o tratamento como pigmentação da cultura e ainda demandarem elevados tempos de degradação (JALILI, 2016; LI et al., 2018a).

Algumas alternativas têm sido pensadas a fim de minimizar esses impactos negativos das técnicas supracitadas e ainda potencializar os resultados de descontaminação. A exemplo, pode-se citar as técnicas de ozônio, luz pulsada, água eletrolisada e adsorção.

Embora não se tenha muitos relatos da utilização do ozônio para inativação ou morte de micotoxinas, essa técnica tem se mostrado promissora, principalmente após seu uso ter sido aprovado pela FDA como agente antimicrobiano para tratamento, armazenamento e processamento de alimentos. O ozônio é um oxigênio triatômico e seu mecanismo de degradação contra Aflatoxina inicia com um ataque eletrofilico na dupla ligação C8-C9 do anel de furano, causando a formação de ozonídeos primários, seguido de rearranjo em derivados monozonídeos, como aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos (JALILI, 2016; PANKAJ, SHI e KEENER, 2018).

Alencar et al. (2012) investigaram os efeitos fungicidas e desintoxicantes do ozônio sobre Aflatoxinas em amendoim. Os grãos de amendoim foram ozonizados nas concentrações

de 13 e 21 mg·L⁻¹, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Na condição mais extrema de 21 mg·L⁻¹ e 96 h, os resultados mostraram uma redução nas concentrações de Aflatoxinas totais e AFB1 de aproximadamente 30,0 e 25,0%, respectivamente. Entretanto, esta redução não foi capaz de atender o limite de tolerância estabelecido pela legislação brasileira que é de 20 µg·kg⁻¹, sendo esta tecnologia a menos eficaz na descontaminação de AFB1 dentre as apresentadas até o presente momento.

A tecnologia de luz pulsada (LP), que normalmente faz o uso de uma lâmpada de xenônio, cria flashes curtos e de alta intensidade de luz branca de amplo espectro, incluindo ultravioleta, visível e infravermelho. Quando em se tratando de microrganismos, com a sinergia desses espectros, a estrutura da parede celular e do ácido nucléico é destruída em poucos segundos. Entretanto, uma das principais limitações desta técnica é a profundidade que ela alcança em amostras opacas, sendo mais utilizada para tratamentos de superfície (WANG et al., 2016a; ABUAGELA et al., 2018).

Wang et al. (2016a) fizeram o uso da LP para degradar Aflatoxinas presentes em arroz. As Aflatoxinas acumulam-se principalmente nas camadas de casca e farelo do arroz tornando estes subprodutos de moagem inadequados para alimentação animal ou consumo humano. O arroz em flocos foi inoculado com *Aspergillus flavus* para produzir contaminação por AFB1 e AFB2, seguida por tratamento de LP de 0,52 J·cm⁻²·pulso por várias durações⁻¹. Um tempo de 80 s de LP foi suficiente para reduzir AFB1 e AFB2 presentes em arroz em cerca de 75% e 39,2%, respectivamente; enquanto um tempo de tratamento de 15 s reduziu AFB1 e AFB2 em farelo de arroz em 90,3% e 86,7%, respectivamente. Como os tratamentos com LP resultam na degradação das Aflatoxinas *in situ*, a toxicidade e a atividade mutagênica dos subprodutos residuais de AFB1 e AFB2 após o tratamento com LP também foram avaliadas. A atividade mutagênica de AFB1 e AFB2 foi completamente eliminada pelo tratamento com LP e, em relação a toxicidade de ambas as Aflatoxinas estas foram significativamente reduzidas.

A água eletrolisada tem sido usada como desinfetante para redução microbiana em produtos alimentícios e superfícies de equipamentos. É gerada pela eletrólise da solução diluída de cloreto de sódio (NaCl) ou cloreto de potássio-cloreto de magnésio (KCl-MgCl₂) em uma célula de eletrólise. No ânodo, íons cloreto e moléculas de água são transformados em oxidantes de cloro, como ácido hipocloroso (HOCl), íons de hipoclorito (ClO⁻) e cloro (Cl₂). No processo, dois tipos de água são gerados, água eletrolisada neutra e água eletrolisada ácida. O mecanismo antimicrobiano de ambos os produtos depende principalmente de três propriedades físico-

químicas: pH, potencial de oxirredução e concentração de cloro disponível (JARDON-XICOTENCATL et al., 2015; PANKAJ, SHI e KEENER, 2018).

Xiong et al. (2012) investigaram a eficácia da água oxidante para a descontaminação de Aflatoxinas presentes em amendoins, tanto em pH neutro quanto em pH ácido. Através de uma análise de HPLC os autores verificaram que a concentração inicial de AFB1 era de $95,9 \pm 2,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Os resultados mostraram essa tecnologia válida para a descontaminação de AFB1 presente em amendoins, sendo o percentual restante de Aflatoxina B1 foi inferior a 10% quando utilizou-se um tempo de tratamento 10 min para água oxidante neutra e 15 min para água oxidante ácida.

No entanto, a maioria dessas tecnologias relatadas tem algumas limitações, incluindo baixa eficiência, tratamento prolongado, perdas no valor nutricional e na palatabilidade dos alimentos, além de alto custo operacional. Atualmente, a adição de adsorventes foi identificada como uma tecnologia promissora para remover micotoxinas de rações destinadas a alimentação animal (SUN et al., 2018; LIU et al., 2021).

O método de adsorção envolve tanto forças químicas quanto físicas, que podem não apenas reduzir efetivamente o impacto tóxico das micotoxinas, mas também evitar resíduos destas e se tornar a maneira mais amplamente utilizada de proteger os animais. Diversos estudos têm sido feitos, os quais exploram a capacidade de certos materiais como adsorventes, como carvão ativado, terras diatomáceas, argila, bentonita, silicatos, zeólitas, entre outros. Dentre esses materiais pode-se destacar os argilominerais devido ao seu desempenho na adsorção, naturalmente abundantes, atóxicos, possuem alta estabilidade química, elevada área superficial, potencial capacidade de troca catiônica, baixo custo e vantagens de biocompatibilidade (JARD et al., 2011; JALILI, 2016; NONES et al., 2017; LI et al., 2018a; SUN et al., 2018; LIU et al., 2021).

Os materiais adsorventes podem ser empregados para a adsorção de uma infinidade de contaminantes como agrotóxicos (DURÁN et al., 2019), corantes (TOOR e JIN, 2012), metais pesados (STAGNARO, VOLZONE e RUEDA, 2012; LI et al., 2012; TOHDEE, KAEWSICHAN e ASADULLAH, 2018) e em especial as micotoxinas (PASHA et al., 2007; SANTOS et al., 2011; RASHEED et al., 2020; SAEED et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

A contaminação de alimentos e rações por diferentes tipos de micotoxinas leva ao desenvolvimento cada vez mais acelerado de materiais e métodos que sejam capazes de reduzir seus níveis, tornando-os aceitáveis perante as legislações e não prejudiciais à saúde. Dentre

esses materiais, a bentonita, tem sido considerada como adsorvente promissor para remoção de micotoxinas tóxicas (LI et al., 2018a).

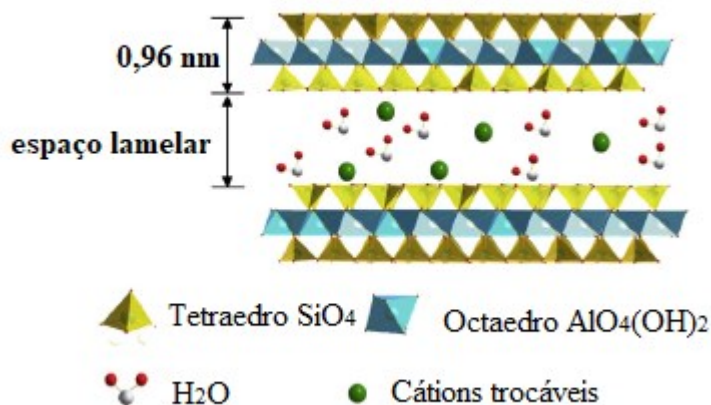
2.3 BENTONITA COMO ADSORVENTE DE MICOTOXINAS

A bentonita é um argilomineral, amplamente versátil, uma vez que possui inúmeras aplicações em diferentes áreas como adsorção de poluentes, preparação de nanocompósitos poliméricos, aplicações biomédicas, como espessante e extensor para tintas, como material de ligação (para fundições), como suporte e agente lubrificante (na construção e engenharia civil), como material vedante (na engenharia ambiental), aditivo em cerâmica, cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos devido às suas características estruturais, baixo custo e disponibilidade (JAYNES, ZARTMAN e HUDNALL, 2007; NONES et al., 2015; NONES et al., 2016; NONES et al., 2017; MACUVELE et al., 2019).

Trabalhos científicos indicam que as bentonitas podem ser utilizadas tanto como excipiente farmacêutico quanto ingrediente em suspensões, emulsões, cremes, pomadas, em cápsulas, comprimidos e em pós para administração tópica ou oral (SHAH et al., 2013; PARK et al., 2016). Sua utilização também já foi testada no preparo de emulsões eficientes na cicatrização de feridas de ratos, atestando o seu efeito terapêutico (DÁRIO et al., 2014). Na indústria alimentícia, tanto humana quanto animal, a bentonita já é utilizada como material adsorvente de micotoxinas, comprovando a sua eficácia contra uma ampla gama de micotoxinas (MAGNOLI et al., 2008; CHKUASELI et al., 2016; PAPPAS et al., 2016; HASSAN et al., 2019; WANG, HEARON e PHILLIPS, 2020).

As bentonitas são formadas por argilas coloidais altamente plásticas, constituídas principalmente pela montmorilonita (Mt), um argilomineral do grupo esmectita, podendo apresentar composição variável de quartzo, feldspato, muscovita, calcita, caulinita, ilita e mica. São produzidas pelo intemperismo e desvitrificação de materiais vítreos de origem vulcânica. Possuem configuração 2:1, com dois tetraedros de silicato imprensando um octaedro de alumínio-oxigênio (DAKOVIC et al. 2008; NONES et al., 2015; ZHU et al., 2016; LIU et al., 2021). Na Figura 3 é apresentada a estrutura da Mt.

Figura 3 - Estrutura da montmorilonita.



Fonte: Liu et al. (2021).

Segundo Silveira (2016), as bentonitas são classificadas de acordo com o elemento químico dominante, se o cátion predominante for o cálcio (Ca^{2+}), a bentonita será cálcica, se sódio (Na^+) for o íon predominante a bentonita será chamada de sódica, e assim por diante. As bentonitas cálcicas ou sódicas podem ter seu volume aumentado em até vinte vezes em relação ao volume da argila seca quando em contato com a água, sendo essa propriedade chamada tecnicamente de inchamento, gerando uma substância gelatinosa e muito viscosa. Os cátions trocáveis geralmente são cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+) e hidrogênio (H^+) e em menor escala os cátions de potássio (K^+) e lítio (Li^+).

De modo geral, pode-se dizer que as bentonitas possuem caráter polar, elevada capacidade de troca catiônica (CTC) e área superficial, o que resulta em elevada atividade adsorvente. A CTC das bentonitas possui duas origens, uma oriunda das cargas negativas permanentes, causadas pela substituição isomórfica nas camadas tetraédricas e octaédricas da montmorilonita e outra que é função do pH, causada pela protonação e desprotonação nos sítios laterais (BERGAYA, THENG e LAGALY, 2006; JAREK et al., 2009).

Em outras palavras, a CTC de uma bentonita nada mais é do que a troca de íons fixados em sua superfície, entre as camadas e dentro dos canais da estrutura cristalina da bentonita por íons presentes em uma solução através de interações físico-químicas, sem que haja qualquer alteração estrutural no retículo cristalino. Em contrapartida, cada cátion adsorvido pelo argilomineral provoca a liberação de um cátion equivalente anteriormente “fixado” (ROSÁRIO, 2010).

Geralmente a difusão é a etapa limitante da cinética de troca e ela ocorre em duas etapas, na primeira tem-se a “difusão no filme”, onde a espécie iônica externa transita da solução até a camada que circunda a partícula argilosa; na sequência, acontece a “difusão na partícula”, em que o cátion é transportado para o interior da partícula, permeando os poros até atingir o centro da mesma e substituir o cátion residente nos sítios (CROOKS et al., 1993).

Explorando a capacidade adsorvente deste material, ele é amplamente utilizado devido a características como alta seletividade e poder de troca, baixo custo, abundantes na natureza, inércia química, atoxicidade, boas propriedades reológicas, estabilidade térmica e capacidade de troca catiônica (RODRIGUES, SILVA e SILVA, 2004; YU et al., 2012; PARK et al., 2016; YU et al., 2017; ALEXANDER et al., 2019). Mesmo que de forma natural, as bentonitas são tidas como bons adsorventes, sejam de metais pesados (AKPOMIE e DAWODU, 2015), corantes (LIAN, GUO e GUO, 2009) ou micotoxinas (DAKOVIC et al., 2012; VILA-DONAT et al., 2019).

Bhatti et al. (2017) investigaram as alterações imunopatológicas induzidas pelas micotoxinas Aflatoxina B1 (AFB1) ou Ocratoxina A (OTA) na dieta de frangos de corte e as melhorias causadas pela inserção de bentonita. Os resultados obtidos mostraram-se promissores, uma vez que a bentonita ajuda a melhorar a imunotoxicidade mediada por AFB1, porém, em relação à OTA, esta não oferece tal proteção contra danos imunes induzidos.

Entretanto, quando utilizada de forma natural como material adsorvente, a bentonita pode trazer alguns inconvenientes como destruir ou reduzir a palatabilidade dos alimentos, pode conter elevado conteúdo de impurezas, como argilominerais de outros grupos, composições químicas e mineralógicas heterogêneas e inconstantes, impedindo a reprodutibilidade de suas características principais. Ainda há relatos de que sua eficiência de adsorção foi insatisfatória para micotoxinas polares e hidrofóbicas, como Zearalenona (ZEA), Ocratoxina A (OTA) e Tricotecenos (ROSÁRIO, 2010; LI et al., 2018a).

Diante desta problemática e devido às características estruturais deste material, as propriedades físicas e químicas que são facilmente controladas e melhoradas, pode-se utilizar de diferentes modificadores ou técnicas, a fim de ampliar seu poder adsorvente, através do aumento do espaço lamelar. Essas modificações podem ser alcançadas através da inserção de cátions inorgânicos e orgânicos ou por moléculas neutras na camada intermediária a fim de estender a área de superfície específica e aumentar a reatividade. A inserção de moléculas orgânicas faz com que ocorra expansão entre os planos d(001) da argila, e sua natureza muda de hidrofílica para hidrofóbica. A incorporação de cátions orgânicos por intercalação no espaço

interlamelar da bentonita reduzirá sua energia superficial e resultará no aumento deste espaço (PAIVA, MORALES e DÍAZ, 2008; LI et al., 2018a; MACUVELE et al., 2019).

A organofilização, ativação química e o tratamento térmico são técnicas que podem ser utilizadas para aumentar o espaço lamelar. A organofilização refere-se à modificação realizada na bentonita utilizando moléculas orgânicas, íons orgânicos ou polímeros as quais são intercaladas entre as camadas estruturais (LI et al., 2018a). Esta técnica refere-se à transformação das argilas inorgânicas em argilas organofílicas, fazendo com que seus cátions naturais inorgânicos sejam trocados na presença de água, por cátions orgânicos, estando esses contidos em sais quaternário de amônio.

Os compostos quaternários de amônio são usados como germicidas por sua capacidade de destruir microrganismos e desnaturar proteínas. São os responsáveis pela transformação das argilas hidrofílicas para hidrofóbicas. Esses compostos geralmente possuem um ou dois grupos de hidrocarbonetos de cadeia longa ligados direto ao átomo de nitrogênio (N) onde está localizada a parte catiônica da molécula. Assim, adicionando-se uma solução de sal quaternário de amônio a dispersão aquosa de argilas, os cátions orgânicos substituem os cátions inorgânicos, os quais se acomodarão entre as camadas 2:1 do argilomineral e também sobre a superfície do mesmo, tornando-o, organofílico (VIOTTI, 2006).

Nones et al. (2016) realizaram um tratamento organofílico visando aumentar a capacidade de adsorção das bentonitas brasileiras, utilizando para tal, os sais orgânicos de cloreto de benzalcônio (BAC) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) nas concentrações de 2 e 6% e temperaturas de 30 e 60 °C, testando sua capacidade de adsorver Aflatoxina B1 (AFB1) em meio aquoso na concentração de 30 µM. Os autores verificaram que as condições que promoveram maiores percentuais de remoção de AFB1 foram a temperatura de 30 °C e a concentração de sal de 2%, sendo os percentuais de remoção de 76,9% e 55,2% respectivamente, para BAC e CTAB.

Wang et al. (2018) utilizaram dois compostos a base a amônio para organofilizar a bentonita e testar sua atividade como adsorvente de Aflatoxina B1 (AFB1) e Zearalenona (ZEA). Os surfactantes catiônicos utilizados foram monoalquil brometo de octadeciltrimetilamônio (OTAB) e dialquil cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC). Os resultados mostraram que as capacidades de adsorção foram aumentadas após organofilização, sendo estas de 0,51, 3,00 e 3,35 mg·g⁻¹ para Mt, OTAB-Mt e DODAC-Mt, respectivamente.

O tratamento ácido de bentonitas é um processo que depende consideravelmente da natureza e concentração do ácido e do tempo e temperatura do tratamento (FOLETTI et al.,

2001; HUSSIN, AROUA e DAUD, 2011; KOOLI et al., 2015; ZHU et al., 2016). É realizada principalmente através da utilização do ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H₂SO₄), resultando em uma mudança de área superficial e porosidade, aumentando suas propriedades de adsorção (ARUS et al., 2018). A ativação ácida serve para substituir os cátions de sódio, potássio, cálcio e mais raramente o magnésio, pelo íon hidrogênio (BERTELLA et al., 2010). A ativação alcalina também pode ser utilizada, fazendo o uso do carbonato de sódio (Na₂CO₃) ou hidróxido de sódio (NaOH) nas concentrações de 2,0-4,0% (KARAGÜZEL et al., 2010).

Além destes tratamentos já citados, o tratamento térmico pode ser uma alternativa interessante que permite minimizar os inconvenientes causados pela utilização da bentonita *in natura*. Este tipo de tratamento pode levar à dessorção de água livre, água entre camadas e perda de hidroxilas (OH), o que reduz a resistência adsortiva do filme de água à matéria orgânica, propiciando uma maior adsorção de micotoxinas. Esse tipo de tratamento pode causar a delaminação da montmorilonita, o que levaria a um aumento do espaço lamelar disponível para as micotoxinas ficarem absorvidas entre as camadas (LI et al., 2018a).

Outra possibilidade, de aumento de espaço lamelar, é a utilização de compostos inorgânicos, conforme trabalho desenvolvido por Nones et al. (2017), que modificaram bentonita brasileira através da incorporação de íons zinco (Zn), a fim de aumentar a capacidade de adsorção e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade das Aflatoxinas. Os resultados mostraram que após o tratamento houve um acréscimo na capacidade de adsorção de AFB1 e que o aumento na concentração de Zn apresentou efeito negativo. Em conclusão, a bentonita modificada com Zn, representa uma ferramenta melhorada para prevenir a aflatoxicose em animais alimentados com ração contaminada com AFB1.

A fim de atribuir outras propriedades a bentonita, além da capacidade de adsorção, por exemplo, atividade antimicrobiana, é preciso tratá-la com compostos de natureza biocida. Biocida designa substâncias ativas que eliminam, neutralizam, previnem ou impedem a ação de microrganismos indesejados, como fungos e bactérias, sendo aplicado em desinfetantes, esterilizantes químicos, antissépticos e conservantes. Pode atuar quimicamente ou fisicamente, deve ser eficaz mesmo em baixas concentrações, persistir ao longo do tempo e ter toxicidade reduzida para os animais e seres humanos. Geralmente atua penetrando nas membranas celulares para interromper as reações bioquímicas do metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento dos microrganismos, levando à morte das células após um determinado tempo (MORAGAS e SCHNEIDER, 2003; POLYORGANIC TECNOLOGIA LTDA, 2021).

Clegg et al. (2019) avaliaram as propriedades antimicrobianas, de barreira e de dispersão de bentonitas prata/sódio quando incorporadas a um revestimento de amido-plastificante-argila usado para embalagem. As bentonitas prata/sódio demonstraram atividade antimicrobiana muito forte em relação a *Escherichia coli*, *Kocuria rhizophila* e *Aspergillus niger* na concentração de 2,5 a 10×10^5 células·mL⁻¹. Mesmo a menor concentração de argila contendo prata (0,03% em peso) ainda exibiu um forte efeito antimicrobiano em relação a *Escherichia coli*.

Rosário et al. (2020) mostraram o desempenho de bentonitas previamente tratadas com carbonato de sódio e impregnadas com prata, resultando em um material com potencial antibacteriano. Entretanto, o uso de compostos a base de prata em inúmeros produtos de consumo, leva a sua liberação para o ambiente aquático, tornando-os fonte de prata dissolvida, exercendo efeitos tóxicos em organismos aquáticos, incluindo bactérias, algas e peixes (NAVARRO et al., 2008).

Krishnan e Mahalingam (2017) verificaram a atividade antibacteriana do nanocompósito Ag/TiO₂/bentonita contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* na concentração de 10^6 UFC·mL⁻¹ pelo método de difusão em poço. Além disso, a citotoxicidade do material de nanocompósito Ag/TiO₂/bentonita foi determinada pelo ensaio de brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os resultados da atividade antimicrobiana mostraram que o nanocompósito apresentou halos de inibição de 10 e 15 mm para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Estudos *in vitro* mostraram que o nanocompósito Ag/TiO₂/bentonita exibiu efeito não tóxico em baixas concentrações (0,25–50,0 mg·mL⁻¹) contra a linha celular HEK 293 (células de rim humano). Os resultados sugerem que o nanocompósito Ag/TiO₂/bentonita além de apresentar característica antibacteriana, pode ser explorado devido a sua característica de biocompatibilidade, como um transportador biológico para entrega celular direcionada, em cosméticos, biossensores e agente de contraste na bioimagem.

A ativação de bentonita com compostos inorgânicos como zinco, cobre e prata já é bem consolidada na literatura abrindo espaço para o estudo da inserção de materiais orgânicos, como é o caso dos ésteres. O acetato de geranila é um éster que pode ser extraído de diversas partes de plantas ou ser produzido por síntese química ou enzimática. É amplamente utilizado na indústria devido principalmente à suas propriedades organolépticas, apresenta ainda, efetiva atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos (ZEFERINO et al., 2021).

2.4 MATERIAIS ANTIMICROBIANOS – Antibacterianos e Antifúngicos

O controle dos agentes deteriorantes e/ou patogênicos torna-se indispensável, garantindo que alimentos de qualidade, seguros, saudáveis e nutritivos cheguem aos consumidores. Aditivos naturais são preconizados, por serem menos agressivos ao organismo humano e animal se comparados aos aditivos sintéticos que, normalmente, apresentam efeitos colaterais indesejáveis (CAPELEZZO et al., 2018; KHANEGHAH, HASHEMI e LIMBO, 2018).

Os conservantes sintéticos são comumente usados para controlar microrganismos deteriorantes ou patogênicos, no entanto, devido a seus efeitos nocivos à saúde, contribuem para o desenvolvimento de espécies resistentes de microrganismos e toxicidade residual. Alguns conservantes à base de plantas são reconhecidos como conservantes verdes ou amigos do meio ambiente (*eco friendly*) e apresentam-se como soluções mais seguras se comparadas aos conservantes sintéticos, apresentando ainda propriedades antimicrobianas de amplo espectro (RAJKUMAR et al., 2019; DAS et al., 2019).

Um composto sintético que tem sido utilizado para impregnação de argilominerais para os mais diversos fins é o triclosan[®] (SOARES et al., 2012; POREBSKA, RYBAK e RAPACZ-KMITA, 2020). O triclosan[®] é um éter bifenílico clorado, comprovado agente antibacteriano de amplo espectro e usado em produtos para cuidados pessoais, veterinários, industriais e domésticos. Entretanto, há fortes evidências de que espécies aquáticas, como algas, invertebrados e certos tipos de peixes, são sensíveis aos efeitos tóxicos do triclosan[®], o qual também gera bioacumulação (ORVOS et al., 2002; DANN e HONTELA, 2011; BEDOUX et al., 2012).

Epidemias causadas por fungos e bactérias foram acompanhadas durante toda a história da humanidade, e desde então diversos agentes antimicrobianos foram descobertos e utilizados. O uso de antibióticos foi um grande marco na eliminação de microrganismos, todavia, sua utilização demasiada e inconsciente, provocou o surgimento de cepas altamente resistentes, o que tornou seu uso ineficaz em muitos casos. Assim, se preconiza o desenvolvimento de novos materiais antimicrobianos, principalmente aqueles naturais, atóxicos e de baixo custo.

Os agentes antimicrobianos podem ser biocidas ou biostáticos, sendo os biostáticos capazes de impedir o crescimento de microrganismos (mantendo os mesmos na fase estacionária), impedindo desta forma a sua proliferação, mas sem provocar morte imediata. Já,

os biocidas são aqueles que causam a morte de bactérias através de danos irreversíveis às células (PANKEY e SABATH, 2004).

De forma geral, os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos são diferentes, todavia, estes estão associados a fatores essenciais para a sobrevivência da célula, os quais atuam de forma a danificar a parede celular ou alterar a permeabilidade da membrana celular, desnaturar as proteínas, inibir a atividade enzimática ou a síntese de lipídeos ou proteínas (SALGUEIRO et al., 2017).

Quando se fala em aditivos antimicrobianos sintéticos, diversos materiais inorgânicos, tais como óxidos metálicos, principalmente óxido de zinco (ZnO), óxido de cobre (CuO), dióxido de titânio (TiO₂), óxido de magnésio (MgO) e o óxido de cálcio (CaO), tem sido o foco de pesquisas, devido serem seguros tanto para humanos, animais e meio ambiente em baixas concentrações. Estes óxidos apresentam capacidade de resistir a rigorosas condições de processamento e possuem propriedades químicas e físicas únicas (SAWAI, 2003; RAI, YADAV e GADE, 2009; NAFCHI et al., 2012).

Capelezzo et al. (2018) estudaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) e microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico (MCs-Zn) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na concentração de 10⁴ UFC·mL⁻¹, sendo os halos de inibição de 7,3±0,6 mm e 2,0±1,0 mm, 7,0±1,0 mm e 4,7±2,1 mm, respectivamente, o que mostra a efetiva capacidade destes agentes em causar a inibição ou morte de bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas.

Ramyadevi et al. (2012) sintetizaram nanopartículas de óxido de cobre e testaram sua atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e antifúngica frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* na concentração de 1x10⁴ células·mL⁻¹. Os halos de inibição obtidos através da técnica de difusão foram 16±0,781 mm, 21±1,612 mm, 26±0,985 mm, 15±0,689 mm, 5±1,136 mm, 13±0,577 mm, 16±0,354 mm e 23±1,258 mm, respectivamente para os microrganismos citados acima. As maiores zonas de inibição foram observadas para *Escherichia coli* quando considerado as bactérias avaliadas e *Candida albicans* quando avaliados os fungos.

Todavia, o uso de materiais em escala nano ainda possuem um pré-conceito acerca de sua utilização, por não se conhecer o real efeito desses agentes nos organismos e no meio ambiente. Assim, os produtos naturais, aqueles oriundos de metabólitos secundários derivados de plantas, animais, insetos e microrganismos, incluindo alcalóides, terpenos, esteróides,

ésteres, dentre outros estão sendo preconizados (LI et al., 2018b). Uma classe específica de produtos naturais são os óleos essenciais (OEs), que são um grupo de metabólitos secundários, na forma de líquidos aromáticos e voláteis, extraídos de diferentes partes das plantas, como flores, raízes, cascas, folhas, sementes e frutas (SHARIFI-RAD et al., 2017).

Dentre os principais compostos dos óleos essenciais, os terpenos, como álcoois e ésteres, merecem destaque em função de suas características, principalmente no que concerne a atividade antimicrobiana e conforme descrito anteriormente, sua aplicação é preconizada em diversas áreas, o que oferece uma grande oportunidade para o desenvolvimento de aditivos antimicrobianos de origem natural, uma vez que geralmente não são tóxicos e possuem propriedades para preservação de alimentos (ZANETTI et al., 2018).

2.5 ACETATO DE GERANILA

Os ésteres oriundos de monoterpenos de ácidos graxos de cadeia curta, como geraniol, linalol, citronelol ou mentol, contribuem para o bom cheiro de muitos óleos essenciais e devido à suas propriedades organolépticas são amplamente aplicados em fragrâncias, aromas, cosméticos, produtos farmacêuticos, perfumes e também na indústria de alimentos como agente aromatizante e por suas atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana ou anti-inflamatória (GUPTA et al., 2007; BADGUJAR e BHANAGE, 2014; ROSA et al., 2017; BOURKAIB et al., 2018; CORRÊA et al., 2019; BHAVSAR e YADAV, 2019).

O geraniol é um álcool monoterpênico ligado a um grupo hidroxila, e é comercialmente muito importante porque está presente na grande maioria dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas. É, portanto, um dos álcoois mais importantes na indústria de aromas e fragrâncias, possui propriedades anti-infecciosas, imunoestimulantes e bactericidas (MURCIA et al., 2018).

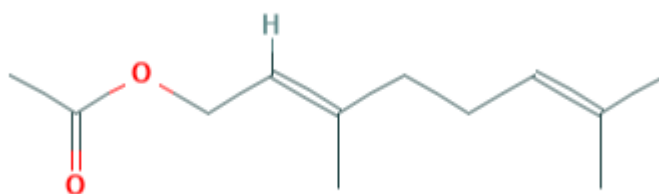
Porém, este álcool apresenta certo grau de toxicidade, o que limita seu uso na aplicação direta em diversos produtos, com destaque para os alimentos e cosméticos. Uma alternativa, frente a esta problemática é transformar este álcool no seu éster, o acetato de geranila que poderá ser utilizado na indústria sem maiores empecilhos (TANG et al., 2012; XIONG et al., 2014).

Ésteres à base de geraniol, como acetato de geranila, são componentes importantes presentes em vários óleos essenciais, podendo ser encontrado nas espécies *Callitris* ou *Eucalyptus* e em menor quantidade também ocorre nos óleos de gerânio, citronela e lavanda, ou ainda em óleos essenciais de limão, amêndoas ou gengibre. Apresenta um sabor frutado doce

e aroma de rosa e lavanda, classificado como aroma comestível sendo seu uso também permitido na indústria de alimentos (ROSA et al., 2017; MURCIA et al., 2018; BOURKAIB et al., 2018; BHAVSAR e YADAV, 2019).

O acetato de geranila é um composto orgânico, do grupo dos ésteres, apresenta-se na forma líquida, com leve coloração amarelo claro. Possui fórmula molecular $C_{12}H_{20}O_2$, massa molecular de $196,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, densidade relativa de 0,907 e ponto de ebulição de $245 \text{ }^\circ\text{C}$. Solúvel em diversos solventes orgânicos como álcool e éter e insolúvel em glicerol e água. Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura química do acetato de geranila.



Fonte: PUBCHEM (2019).

Tradicionalmente, esses compostos são isolados de óleos essenciais extraídos de matrizes vegetais ou produzidos através de sínteses químicas. Quando isolado de óleos essenciais extraídos de fontes vegetais, é obtido em uma quantidade limitada devido a demanda de matéria-prima, presença de vários outros componentes, exibe variabilidade na composição, pois é dependente dentre outros fatores das condições climáticas e sazonalidade, tornando necessários métodos de produção que garantam a qualidade deste éster e a obtenção em grande escala, no caso de aplicações industriais (BADGUJAR e BHANAGE, 2014; BOURKAIB et al., 2018; CORRÊA et al., 2019; BHAVSAR e YADAV, 2019).

O óleo essencial de partes aéreas de *Thapsia minor* Hoffmanns & Link (Apiaceae), obtido por hidrodestilação, foi analisado por cromatografia que revelou o acetato de geranila como o principal constituinte (82,3-83%), tornando esta planta uma boa fonte desse composto. A atividade biológica do óleo essencial foi avaliada em relação a várias linhagens de fungos na concentração de $1-2 \times 10^3$ células·mL⁻¹ para leveduras e $1-2 \times 10^4$ células·mL⁻¹ para fungos filamentosos. A atividade mais efetiva foi encontrada contra cepas de dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida guilliermondii*, com valor de concentração inibitória mínima variando de $0,32 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1,25 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. De acordo com os autores

a atividade antifúngica pode estar associada à contribuição significativa do acetato de geranila (GONÇALVES et al., 2012).

Além disso, este óleo essencial demonstrou ter potencial atividade anti-inflamatória *in vitro*, em concentrações que não afetaram a viabilidade de macrófagos (células do tecido conjuntivo) e queratinócitos (células do tecido epitelial), atividade esta proveniente do acetato de geranila presente no óleo. Assim, esses resultados favoráveis enfatizam as habilidades antifúngicas e anti-inflamatórias do acetato de geranila e indicam ainda mais a exploração do óleo de *T. minor* na indústria farmacêutica, a fim de encontrar novos fitofarmacêuticos (GONÇALVES et al., 2012).

Quando obtidos por síntese química ou enzimática, por ser um processo controlado, as chances de variabilidade de lotes são reduzidas e, desta forma, consegue-se produzir grandes volumes de modo a atender a demanda da indústria (BADGUJAR e BHANAGE, 2014; BOURKAIB et al., 2018; CORRÊA et al., 2019; BHAVSAR e YADAV, 2019).

O emprego de enzimas como catalisadores ainda é economicamente inviável, em virtude de estas apresentarem um custo elevado, principalmente quando imobilizadas e ainda, devido a serem reutilizadas por uma quantidade de ciclos ínfima, tornam o processo ainda mais oneroso. Tendo em vista essa problemática, o desenvolvimento de tecnologias alternativas mais limpas, seguras e menos agressivas ao meio ambiente é impulsionado, buscando a redução no gasto energético e uma produção mínima de resíduos. A substituição de rotas homogêneas clássicas por novas rotas catalíticas são o ponto chave para o sucesso na obtenção desses compostos, uma vez que minimizam a quantidade de resíduos gerados e ainda permitem a reutilização do catalisador, melhorando a separação do produto, redução da corrosão e problemas ambientais (TISCHER et al., 2019).

Embora se obtenham elevadas eficiências de conversão fazendo o uso da catálise enzimática, este tipo de reação apresenta grande dificuldade de controle, requerendo o monitoramento e domínio de diversos parâmetros reacionais, o que torna o processo dispendioso. Assim, as rotas químicas, as quais utilizam resinas de troca catiônica como catalisadores podem ser uma alternativa interessante para substituir àquelas enzimáticas (CHEN et al., 2016).

Nos últimos anos, a utilização de resinas para a catálise heterogênea de reações de esterificação tem sido extensivamente estudada (TISCHER et al., 2019; ZARE, GOLMAKANI e SARDARIAN, 2020; PASA et al., 2020; ZEFERINO et al., 2021). Além das vantagens já citadas, os catalisadores heterogêneos são fáceis de manusear e armazenar, possibilidade de

reutilização por vários ciclos, podem ser usados em diferentes configurações de reator e modos de operação, permitindo melhor controle e economia de processo e, em se tratando das resinas de troca iônica geralmente apresentam alta seletividade e baixa perda de atividade catalítica, podem ser usadas quando o processo requer temperaturas mais elevadas, tendo em vista que a maioria das resinas comerciais são termicamente estáveis até a faixa de 120-150 °C (PASA et al., 2020; ZEFERINO et al., 2021).

Estudos sobre a toxicidade do acetato de geranila ainda são escassos na literatura, o que abre caminho para o desenvolvimento de trabalhos acerca do tema. Em 1987 o U.S. *Department of Health and Human Services* do *National Institute of Environmental Health Sciences*, realizaram um estudo de toxicidade de um óleo essencial composto por acetato de geranila (79,0%) e acetato de citronelila (21,0%). Os testes foram realizados através de exposição aguda com grupos de 5 ratos machos e fêmeas F344/N e camundongos B6C3F1, os quais receberam uma dose única de acetato de geranila de grau alimentício (500, 1000, 2000, 4000 ou 8000 mg·kg⁻¹ de peso corporal) em óleo de milho por gavagem. No teste de exposição subaguda, grupos de 5 ratos machos e fêmeas F344/N e camundongos B63F1 foram administrados com doses de 0, 62, 125, 250, 500 ou 1000 mg·kg⁻¹ ou 0, 125, 250, 500, 1000 ou 2000 mg·kg⁻¹ de acetato de geranila de qualidade alimentar em óleo de milho por gavagem durante 14 dias consecutivos. Os resultados mostraram toxicidade baixa para ingestão na dose 2000 mg·kg⁻¹.

Ribeiro et al. (2015) realizaram testes toxicológicos em roedores utilizando óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* (EsEO) e uma nanoemulsão deste mesmo óleo (EsNano), cujo percentual de acetato de geranila foi de 9,2%. O teste de toxicidade aguda revelou que as doses de EsNano e EsEO necessárias para matar 50% dos camundongos (DL50) foram de 1603,9 e 3495,9 mg·mL⁻¹, respectivamente.

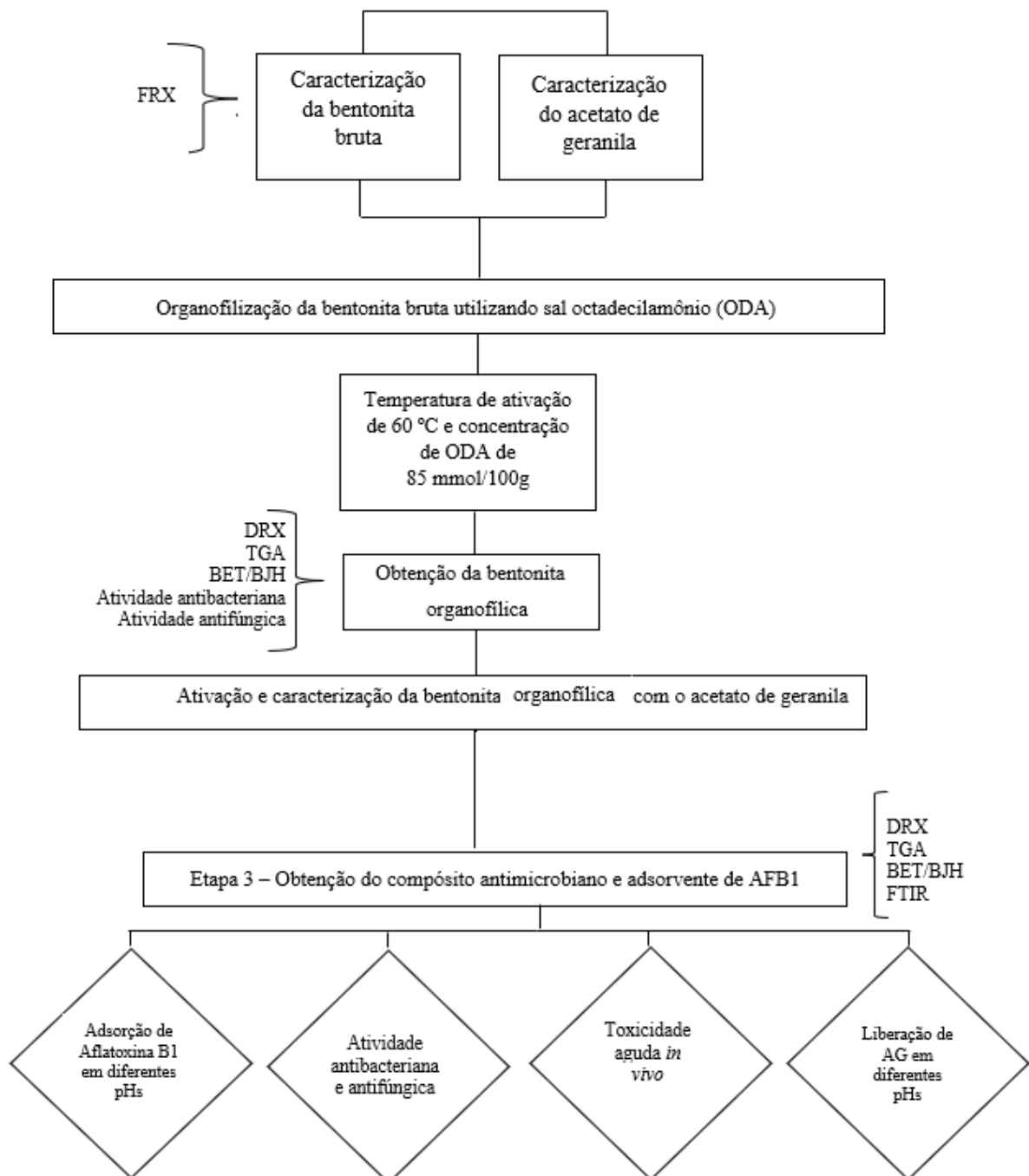
Na literatura não se tem registros de trabalhos que associem a bentonita ativada com sal quaternário de amônio e posterior incorporação de acetato de geranila para atuar concomitantemente como agente antimicrobiano e adsorvente de Aflatoxina B1. O que se conhece é o estudo realizado por Das et al. (2019), os quais prepararam uma formulação de óleo essencial de *Apium graveolens* com seus principais componentes acetato de linalil e acetato de geranila na concentração de 1: 1: 1 e o utilizaram como um novo conservante verde para proteção de produtos alimentares pós-colheita contra infestações por fungos e AFB1. Os resultados mostraram que esta nova formulação apresentou ação inibitória considerável contra catorze fungos responsáveis pela deterioração dos produtos alimentares armazenados, além da

cepa mais toxigênica de *Aspergillus flavus*. Os autores sugerem essa eficácia fúngica ao efeito sinérgico do óleo essencial e de seus dois principais componentes, sendo o possível local alvo de ataque, a membrana plasmática do fungo; os resultados mostraram também um forte efeito inibidor de Aflatoxina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto está organizado em três etapas fundamentais, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma com as principais etapas de pesquisa.



3.1 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DO COMPÓSITO

A bentonita utilizada neste trabalho foi fornecida gentilmente pela Mina de Boane-Moçambique. A capacidade de troca catiônica desta bentonita foi determinada por Silva (2010) e por Massiga et al. (2010) que obtiveram o valor de 67 mmol·100 g⁻¹ de bentonita (MACUVELE et al., 2017).

O acetato de geranila foi sintetizado através da catálise heterogênea utilizando a resina de troca iônica Lewatit[®]GF 101 a partir da reação de esterificação do geraniol com hidreto de acetona, conforme descrito por Zeferino et al. (2021).

3.1.1 Fluorescência de Raios-X (FRX) bentonita bruta

A Fluorescência de Raios X é uma técnica analítica utilizada para identificação e quantificação relativa dos elementos químicos presentes em uma amostra. Nesta pesquisa, a técnica foi empregada a fim de determinar a composição química da bentonita bruta. Os experimentos de FRX foram realizados através do Espectrômetro de Raio- X marca Panalytical modelo Axios Max por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) no Instituto Senai de Tecnologia Cerâmica, Criciúma – SC.

3.2 ORGANOFILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BENTONITA PÓS PROCESSAMENTO

3.2.1 Organofilização da bentonita utilizando um sal

A bentonita foi desaglomerada utilizando um almofariz e em seguida uma dispersão aquosa contendo 100 g de bentonita em um volume de água destilada de 1000 mL foi agitada por 24 h com velocidade de 180 rpm em um shaker (Dist, DST 01). Após o processo de desaglomeração a dispersão foi seca em estufa (Logen, LSDHG-9140A) a temperatura de 90 °C±2 °C durante 48 h, conforme metodologia descrita por Macuvele (2018). A bentonita foi novamente desagregada utilizando um almofariz e acondicionada em um frasco fechado, armazenada a temperatura ambiente, sendo esta denominada bentonita bruta (BB). Com o intuito de aumentar o espaço lamelar da bentonita, visando potencializar a adsorção de Aflatoxina B1, utilizou-se um sal denominado octadecilamônio (ODA).

A bentonita foi submetida ao processo de organofilização conforme metodologia descrita por Macuvele et al. (2017), fazendo o uso das melhores condições de temperatura e concentração testadas pelos autores, empregando octadecilamônio (ODA) oriundo da octadecilamina (Merck), protonada com ácido clorídrico P.A. (Êxodo Científica). Inicialmente preparou-se uma suspensão de octadecilamina na concentração de $85 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de bentonita. Adicionou-se gota a gota uma quantidade estequiométrica de ácido clorídrico, o qual reage com a octadecilamina formando como produto desta reação o octadecilamônio, a mistura foi então aquecida a uma temperatura de $60 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h em um agitador magnético com aquecimento (Quimis, Q261). Após a organofilização, o material obtido foi filtrado a vácuo (Logen, PCP1312VC) e lavado por 5 vezes com água ultrapura, com o objetivo de remover quaisquer traços de ODA não reagente, sendo encaminhado para secagem em estufa (Logen, LSDHG-9140A) a $80 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h e, na sequência desaglomerado em almofariz e armazenado em frascos devidamente identificados, armazenados à temperatura ambiente, sendo esta denominada bentonita organofilizada (Bent-ODA).

3.2.2 Avaliação do potencial antibacteriano

3.2.2.1 Preparo do inóculo microbiano

Usando uma alça de inoculação estéril descartável (Cral), os microrganismos que estavam em um tubo contendo Ágar Nutriente a uma temperatura de aproximadamente $2 \text{ }^\circ\text{C}$ foram transferidos para tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck) e incubados em estufa bacteriológica (Logen, LSDHG-9140A) a temperatura de $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 24 h.

Algumas colônias bacterianas foram isoladas afim de garantir que a absorbância lida no espectrofotômetro seja única e exclusivamente referente à concentração do microrganismo. Para tal, verteu-se o meio *Plate Count Agar* (PCA, Merck) em uma placa de petri estéril, e deixou-se em repouso até a solidificar. Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril retirou-se uma alíquota da suspensão bacteriana e através da técnica de esgotamento isolou-se algumas colônias. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 24 h.

Novamente, utilizando uma alça de inoculação retirou-se algumas colônias bacterianas isoladas as quais foram colocadas em solução salina estéril 0,9% (cloreto de sódio, Merck), as

quais foram ajustadas até que se obtivesse uma concentração de 10^4 UFC·mL⁻¹. Para tal, utiliza-se um espectrofotômetro (Merck, Pharo 300 Spectroquant®) com leitura no comprimento de onda de 619 nm.

Os ensaios foram realizados utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

3.2.2.2 Difusão em meio sólido a partir de orifício

A técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício foi utilizada com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana da bentonita organofílica e do compósito desenvolvido. Esta técnica foi realizada conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

O meio de cultura ágar PCA foi vertido nas placas de petri estéreis (90 x15 mm) e deixado solidificar. Os microrganismos de interesse foram semeados em forma de estrias sobre o ágar com o auxílio de um *swab* estéril (Absorve), sendo a semeadura realizada em três direções garantindo a total deposição dos mesmos.

Em cada placa foram feitos três orifícios equidistantes, utilizando uma ponteira de 1000 µL estéril, com diâmetro de aproximadamente 8 mm, sendo que em cada orifício foi completamente preenchido pelo material em teste. Nas tampas das placas de petri foi fixado um papel filtro estéril para evitar que gotículas de água gotejassem sobre o ágar durante a incubação, prejudicando a visualização do halo de inibição. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C em estufa bacteriológica por 24 h e, após decorrido este tempo, o halo de inibição de crescimento microbiano formado foi mensurado, com auxílio de uma régua milimétrica. A Equação 1 apresenta a expressão usada para o cálculo do halo de inibição.

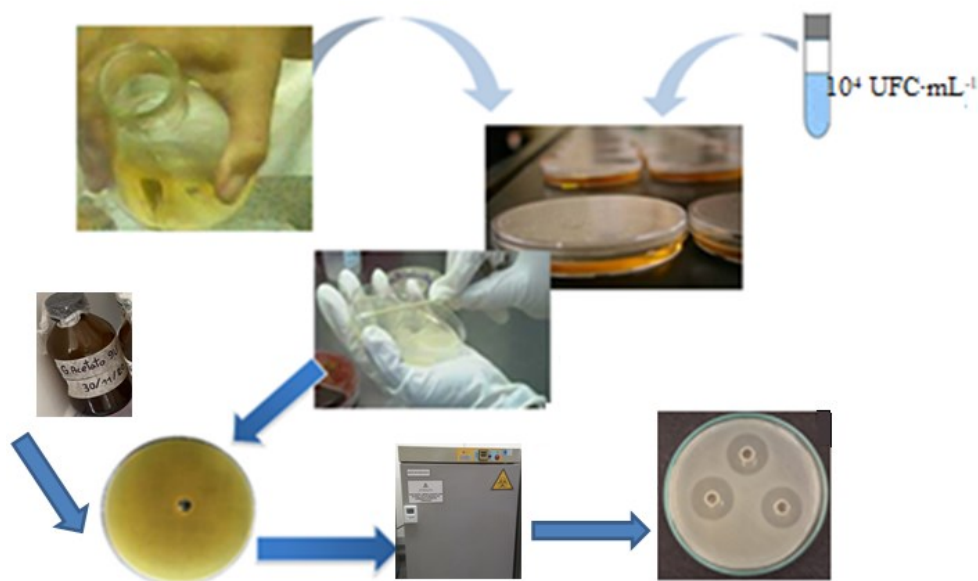
$$\text{Halo de inibição} = D_{\text{ex}} - D_{\text{in}} \quad (1)$$

Onde: Dex: diâmetro externo formado pela ação do agente antimicrobiano sobre os microrganismos (mm). Din: diâmetro ocupado pelo agente antimicrobiano (mm).

Os ensaios de difusão em meio sólido a partir do orifício foram avaliados quanto as significâncias estatísticas utilizando o software Excel® através da análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% entre as médias das amostras.

O esquema representativo da técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício é apresentado na Figura 6. Os ensaios de Difusão em meio sólido a partir de orifício foram realizados no Laboratório de Materiais Multifuncionais – LMF da Universidade Comunitária de Chapecó – Unochapecó.

Figura 6 - Esquema ilustrativo do ensaio experimental da técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício



Fonte: a autora (2017).

3.2.3 Avaliação do potencial antifúngico

3.2.3.1 Preparo do inóculo

As cepas de *Aspergillus niger* (ATCC 6275) e *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), inicialmente sob a forma de *pellets*, foram hidratadas em caldo BHI, agitadas em vórtex (Quimis, q220) por aproximadamente 1 min e incubadas a 28 ± 2 °C em estufa bacteriológica (J. Prolab, B3). Após 48 h, verificou-se a turbidez no meio, sendo que se o meio estiver turvo indica o crescimento fúngico, estando pronto para ser repicado em tubo inclinado contendo meio de cultura *Sabourand* com cloranfenicol (Kasvi), permanecendo em temperatura ambiente pronto para a utilização. Para os ensaios, a concentração de fungos foi ajustada em solução salina estéril (0,9%) até uma concentração de 10^5 esporos·mL⁻¹, sendo realizada a contagem

pelo método da câmara de Neubauer (HBG, 9030-01) em microscópio óptico (Olympus, CX21FS1).

3.2.3.2 Determinação da atividade antifúngica da bentonita

Os ensaios antifúngicos foram conduzidos de acordo com o descrito pela ASTM G21-15, com algumas modificações. Pesou-se $0,200 \pm 0,05$ g da bentonita organofílica (Bent-ODA) em um tubo de ensaio estéril e inoculou-se 80 μ L da suspensão fúngica na concentração de 10^5 esporos·mL⁻¹ ajustada conforme descrito no item 3.2.3.1. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C por 7 dias, sendo este ensaio realizado em duplicata. Após os 7 dias de incubação a cada tubo de ensaio adicionou-se 10 mL de solução salina 0,9%, homogeneizou-se em vórtex por aproximadamente 1 min e retirou-se uma alíquota de 1 mL a qual foi semeada em profundidade juntamente com aproximadamente 20 mL de ágar *Sabourand* com cloranfenicol. As placas foram homogeneizadas e incubadas a 28 ± 2 °C em estufa bacteriológica por mais 7 dias, sendo posteriormente feita a análise visual das placas, indicando se houve o crescimento, a redução ou o não crescimento de fungos, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação do crescimento fúngico nas placas inoculadas com fungos.

Crescimento observado	Classificação
Nenhum	0
Traços de crescimento (menos que 10%)	1
Crescimento leve (10 a 30%)	2
Crescimento médio (10 a 60%)	3
Forte crescimento (60% até cobertura completa)	4

Fonte: ASTM G21-15.

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia da Universidade Comunitária de Chapecó – Unochapecó.

3.2.4 Difração de Raios-X (DRX)

A técnica de DRX (Difração de Raios-X) foi aplicada para avaliar a estrutura cristalina da bentonita organofílica e ainda, verificar a ocorrência de intercalação, a partir da Lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram, característicos de cada fase cristalina. Ainda se tornou possível avaliar o espaçamento interlamelar da bentonita após o processo de organofilização. Os experimentos de DRX foram realizados um equipamento de difração de raios-x modelo D8 Advance da Bruker AXS GmbH com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) localizado no Laboratório Central de Microscopia Professor Israel Baumvol da Universidade de Caxias do Sul – RS.

3.2.5 Termogravimetria

A curva termogravimétrica para o Bent-ODA foi obtida usando um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 com programa de temperatura de 25 °C a 900 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ e vazão de 50 mL·min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio, sendo este ensaio realizado no Laboratório Central de Microscopia Professor Israel Baumvol da Universidade de Caxias do Sul – RS.

3.2.6 BET/BJH

O composto Bent-ODA foi analisado por BET (Brunauer, Emmett e Teller) e BJH (Barrett, Joyner e Halenda) a fim de determinar a área de superfície, volume de poros e distribuição de tamanho de poros de o adsorvente, utilizando-se para tal, o equipamento Quantachrome Instruments – Autosorb-1. As amostras foram previamente secas a temperaturas na faixa de 100-300 °C sob vácuo (10⁻⁷ torr) e então a adsorção de nitrogênio gasoso foi medida a 77 K, em valores de pressão relativa na faixa de 0 a 1,0, esse ensaio foi realizado na Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

3.2.7 Ensaios de adsorção

A cinética de adsorção foi conduzida conforme descrito por Zahoor e Khan (2018), Wang et al. (2020) e Rasheed et al. (2020) com algumas modificações. Pesou-se 5,00±0,01 mg

de Bent-ODA e preparou-se 25 mL de uma solução aquosa de Aflatoxina B1 na concentração de $1,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH de 3,5 (equivalente à condição do estômago) e concentração de $1,40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para pH de 6,5 (equivalente à condição do intestino), sendo estes valores de pH ajustados com soluções de NaOH ou HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As amostras foram mantidas em shaker (Solab, SL 222) a 180 rpm a $41 \text{ }^\circ\text{C}$, e as coletas foram realizadas nos tempos de análise de 0, 15, 45, 100, 120 e 150 min. As misturas de reação pós-adsorção foram centrifugadas em tubos Falcon utilizando uma centrífuga (Fanen, Baby[®] I 206-BL) com uma rotação de 5000 rpm por 15 min. As amostras foram ainda filtradas através de um filtro com tamanho de poro de $0,22 \mu\text{m}$ (Merck).

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas soluções-padrão de Aflatoxina B1 nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,0625, 0,125 e $0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que a curva de calibração para AFB1 foi determinada com base nas concentrações em função da área de pico. O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas (LCMS – 2020). Utilizou-se uma coluna NST C18, $4,6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{L}$ (MS/LABCEN). A fase móvel utilizada era composta por uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1%:acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% (30:70), a qual foi bombeada sem rampa em modo isocrático, com fluxo de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com uma temperatura no forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A análise foi realizada na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Chapecó – SC.

3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO

3.3.1 Incorporação do acetato de geranila à bentonita organofílica

A incorporação do acetato de geranila foi realizada na bentonita organofílica, sendo essa etapa realizada com o objetivo de se obter um material capaz de inibir e/ou causar a morte de microrganismos. Preparou-se compósitos com diferentes quantidades de acetato de geranila, sendo estas de 2,5 g de bentonita organofílica: 40 mL de acetona: 0,75 g de acetato de geranila (Bent-ODA-0,75GA) e 2,5 g de bentonita organofílica: 40 mL de acetona: 1,0 g de acetato de geranila (Bent-ODA-1,0GA). A acetona atua como agente solubilizante da mistura acetato de geranila/bentonita, foi escolhida por se tratar de um solvente comum para ambos os materiais. A mistura foi mantida sob agitação por 24 h utilizando um shaker (Dist, DST 01) a 180 rpm, em temperatura ambiente de aproximadamente $25\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após decorrido este período

de mistura, as amostras foram secas em estufa (Logen, LSDHG-9140A) a 50 ± 2 °C por 24 h. Após secagem o material foi armazenado e resguardado da luz, à temperatura ambiente.

3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foi aplicada para avaliar os grupos funcionais característicos existentes no compósito de modo a caracterizá-lo quimicamente. Esta avaliação é importante para o acompanhamento da integridade molecular das matérias-primas, bentonita organofílica e acetato de geranila, após obtenção do compósito. A análise de FTIR foi realizada em espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies, modelo Cary 600 Series FTIR) por refletância total atenuada com cristal de diamante. Os espectros foram obtidos em uma faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Esta análise foi realizada na Universidade de Caxias do Sul – UCS.

3.3.3 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Os ensaios microbiológicos realizados foram conduzidos conforme descrito no item 3.2.2 para bactérias e item 3.2.3 para fungos. Os ensaios antibacterianos foram avaliados quanto as significâncias estatísticas utilizando o software Excel[®] através da análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% entre as médias das amostras.

3.3.4 Difração de Raios-X (DRX)

Após a incorporação da maior concentração de acetato de geranila a bentonita organofílica, o compósito desenvolvido foi analisado pela técnica de DRX, conforme metodologia descrita no item 3.2.4, com o intuito de verificar aspectos do espaçamento lamelar basal e compará-lo com o valor obtido apenas para bentonita organofílica.

3.3.5 Termogravimetria

O compósito desenvolvido com a maior concentração de acetato de geranila também foi submetido ao ensaio de TGA, com o objetivo de quantificar o éster que foi efetivamente incorporado a bentonita organofílica, analogamente ao descrito no item 3.2.5.

3.3.6 BET/BJH

Esse ensaio também foi realizado com o compósito Bent-ODA-1.0GA a fim de avaliar a área de superfície, volume de poros e distribuição de tamanho de poros de o adsorvente após a inserção do acetato de geranila a bentonita organofílica, seguindo o que foi descrito no item 3.2.6.

3.3.7 Ensaio de adsorção

Com o intuito de comprar a capacidade adsorvente do compósito Bent-ODA-1.0GA com a Bent-ODA os ensaios de adsorção foram conduzidos de acordo com o item 3.2.7.

3.3.8 Liberação de acetato de geranila em diferentes pHs

Assim como nos ensaios de adsorção, o teste de liberação também foi conduzido em pH de 3,5 (equivalente à condição do estômago) e pH de 6,5 (equivalente à condição do intestino) de acordo com o citado no item 3.2.7. Levando em consideração que o material desenvolvido seja incorporado em rações para alimentação de frangos e que estes devem ter em média 3 kg para o abate, consomem cerca de 100 g ração por dia e que o sistema digestivo dessas aves libera em torno de 8,8 mL de suco gástrico por quilograma por hora e ainda observando que de acordo com a literatura é incorporado até 0,5% (p/p) de bentonita bruta, e considerando um fator de correção após a inserção do acetato de geranila à bentonita estipulou-se uma concentração de Bent-ODA-1.0GA de $1 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (BANKS, 1992; SOUZA, 2003; LOPES et al., 2006; LUPATINI, 2015).

Para determinar o comprimento de onda de absorção do acetato de geranila, 1,5 mL deste padrão (Sigma Aldrich, pureza $\geq 97\%$) juntamente com 1,5 mL de uma mistura de acetona:solução aquosa pH 3,5 (1:0,77 v/v) foram colocados em uma cubeta de vidro com um caminho óptico de 10 mm e escaneado entre comprimentos de onda de 200 a 800 nm em um espectrofotômetro (Merck, Pharo 300 Spectroquant®). O mesmo procedimento foi realizado para solução de pH 6,5 que simula o pH do intestino.

A quantidade de acetato de geranila liberada foi investigada por espectroscopia UV-vis (Pereira et al., 2022) em $\lambda = 314 \text{ nm}$, usando uma curva de calibração com $R^2 = 0,9845$ e obtida para a faixa de concentração entre $0,03 - 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em pH 3,5 e usando uma curva de

calibração com $R^2 = 0,9935$ e obtida para a faixa de concentração entre $0,004 - 0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 6,5.

O ensaio de liberação do acetato de geranila presente na bentonita organofílica foi realizado pesando-se 0,25 g de Bent-ODA-1.0GA dispostos em 250 mL de solução aquosa pH 3,5 que simula o pH do estômago, a uma temperatura de 41 °C que simula a temperatura corporal de aves adultas (WELKER et al., 2008). Os erlenmeyers foram agitados em shaker (Solab Científica, SL-222) a 150 rpm e alíquotas de 3 mL do sobrenadante foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3, 18, 24, 27, 48, 51, 72 e 75 h, sendo este ensaio realizado em duplicata. Segundo Mendes (2001), em condições normais de abate e processamento, a retirada de ração é feita de 6 a 8 h antes da apanha das aves, resultando em um período total de jejum de 8 a 12 h antes do abate, para esvaziar o intestino e com isso minimizar a contaminação no abatedouro, logo extrapolou-se o tempo total de análise para 75 h considerando a ração que contenha o compósito não fique no trato gastrointestinal da ave por um tempo superior a este. As amostras coletadas foram colocadas em tubos Falcon e centrifugadas em centrífuga (Fanen, Baby® I 206-BL) a 5000 rpm por 15 min e analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 314 nm. O mesmo foi feito para o pH 6,5, que simula o pH do intestino.

3.3.9 Avaliação da toxicidade

Visando viabilizar a utilização do compósito desenvolvido para aplicações em nutracêuticos ou rações para alimentação animal, as análises de toxicidade são de fundamental importância. Desta forma, será avaliada a toxicidade oral dos compósitos em modelos animais através da toxicidade oral aguda em camundongos, com base na diretriz N° 423 da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA UNOCHAPECÓ) através dos Protocolos n° 015/2021 e n° 002/2022. Os cuidados com os animais e os experimentos foram conduzidos de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2008) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018).

Utilizou-se camundongos Swiss fêmeas com massa corporal entre 25 – 35 g, oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os animais foram mantidos em jejum por 1 h, procedimento este que antecede a administração dos compósitos por via oral.

A solubilização do compósito desenvolvido a base de bentonita e acetato de geranila (Bent-ODA-1.0GA) foi realizada em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% em água destilada e ultrassom a 40 °C por 30 min. Nos estudos de toxicidade aguda, o Bent-ODA-1.0GA foi administrado oralmente a camundongos na dosagem de 300 mg·kg⁻¹ (n=6) e 2000 mg·kg⁻¹ (n=6), os quais foram comparados ao grupo que recebeu apenas o veículo (solução de Dimetilsulfóxido - DMSO a 1% em água destilada e ultrassom a 40 °C por 30 min) (n=6). Todos os tratamentos respeitaram a administração de 10 mL·kg⁻¹ de peso corporal. Após a administração, os animais foram observados com atenção especial durante as primeiras 4 h e 12 h depois, e todos os dias durante 15 dias.

O ganho de peso corporal e a ingestão alimentar foram registrados a cada dois dias durante o período experimental. Foram consideradas observações do comportamento anormal de camundongos fêmeas como piloereção, tônus muscular, contorções abdominais, ptose palpebral, atividade motora, hipotermia, tremores, paralisia da pata posterior, salivação, secreção brônquica, letargia, diarreia e convulsões. Além disso, o número de óbitos foi registrado.

A eutanásia foi realizada com tiopental sódico (50 mg·kg⁻¹, intraperitoneal - i.p.) precedido por cloridrato de lidocaína (10 mg·kg⁻¹, i.p.) (CONCEA, 2018). Os órgãos (cérebro, coração, timo, baço, glândulas supra-renais, rim e fígado) foram removidos e pesados para análise estatística. O peso relativo do órgão foi calculado considerando o peso corporal do camundongo usando a seguinte Equação 2.

$$\text{Peso relativo do órgão (\%)} = \frac{\text{Peso órgão} \times 100}{\text{Peso do camundongo}} \quad (2)$$

Foi utilizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas para avaliar o peso corporal relativo e a ingestão alimentar dos camundongos. Os resultados do peso relativo dos órgãos foram analisados por ANOVA de uma via. O teste post hoc de Tukey foi utilizado em todas as análises. Os dados foram expressos como média±Desvio Padrão. O nível de significância adotado foi p < 0,05 O software GraphPad Prism[®] 8.0.1 (GraphPad Software Inc, EUA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

Os ensaios serão realizados no Laboratório de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ.

CAPÍTULO 4

Neste capítulo está apresentado o artigo publicado na *Research, Society and Development* (Vol 11, nº 2, 2022) intitulado como: “**Antimicrobial bentonite by the incorporation of geranyl acetate for Aflatoxin B1 adsorption**”.

Abstract

The bentonite was organophilized using octadecylamine at a concentration of 85 mmol·100g⁻¹ of bentonite protonated with hydrochloric acid, heated at 60±5 °C for 1 h, washed repeatedly with distilled water and dried in an oven at 80±2 °C for 24 h. Incorporation of geranyl acetate was carried out using 0.75 g GA to 2.5 g of Bent-ODA using acetone as solvent. The mixture was stirred for 24 h at 180 rpm and room temperature and then oven dried at 50±2 °C for 24 h. This material was then characterized for its antibacterial against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, respectively. Moreover, the adsorption capacity of Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA was evaluated using Aflatoxin B1 in the concentration of 107 µg·L⁻¹. After 17 h, the composite removed a significant amount of mycotoxin, being below 20 µg·L⁻¹. The results showed that this composite has a good adsorption capacity, can be effective in the removal of mycotoxin in aqueous media and antibacterial and antifungal activity.

Keywords: Bentonite; Geranyl acetate; Antimicrobial activity; Aflatoxin B1 adsorption.

4.1 INTRODUCTION

Animal nutrition usually includes a mix of foods that are listed in order to meet the nutritional needs of animals, also to provide what they need to maintain their health, well-being and production, and all this linked to the lowest possible cost (Pereira, Cunha & Fernandes 2019; Liu et al., 2021). About 80% of the raw materials used to manufacture feed revolve around the use of corn, soybeans and their derivatives. However, due to climate change and other prevailing factors, many of these crops are subject to contamination by mycotoxins, among which stand out aflatoxins, produced by fungi of the genus *Aspergillus* that present an imminent risk to human and animal health and are related to several diseases and pathologies,

in addition to causing great economic damage to the food industry (Zain, 2011; Nones et al., 2014; Raiola et al., 2015; Oplatowska-Stachowiak et al., 2016; Li et al., 2018).

Several studies have shown the ability of adsorption of mycotoxins promoted by bentonites, recognized as a promising and effective food additive due to its cost-effectiveness and absence of significant side effects (Magnoli et al., 2008; Carraro et al., 2014; Gan et al., 2019; Liu et al., 2021). In order to maintain or enhance the adsorptive effect and still add other properties to bentonite, the insertion of organic compounds can be explored, which is still little explored, opening the way for the study of geranyl acetate, an important ester widely used in industries food, pharmaceutical and cosmetics (Gonçalves et al., 2012; Gupta et al., 2013; Zeferino et al., 2021; Liu et al., 2021).

The objective of this work was to obtain a composite with antimicrobial and adsorbent activity, using organophilic bentonite and geranyl acetate. By associating the adsorption properties of bentonite with the antifungal and antibacterial activity of geranyl acetate it is possible to obtain a compound capable of eliminating or controlling the growth of bacteria and fungi and, simultaneously, adsorb mycotoxins, which is not yet available on the market according to a bibliographic survey.

4.2 METHODOLOGY

4.2.1 Materials

The bentonite used in this work was from a Boane deposit in Mozambique, with cation exchange capacity (CEC) of $67 \text{ mmol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ determined by Silva (2010) and Massiga et al. (2010) (Macuvele et al., 2017). The geranyl acetate was synthesized through heterogeneous catalysis using the ion exchange resin Lewatit[®]GF 101 from the geraniol esterification reaction with acetic anhydride, as described by Zeferino et al. (2021). Intercalation with octadecylammonium cations was carried out using octadecylamine (ODA), $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{NH}_2$ (Merck, 90%), protonated by treating it in situ with hydrochloric acid (Êxodo Científica). The culture media used in the microbiological tests were Plate Count Agar (PCA, Merck) and Sabourand with chloramphenicol (Kasvi).

4.2.2 Obtaining the composite

The organophilization step was based on the methodology suggested by according to Macuvele et al. (2017). The reaction mixtures were stirred vigorously at constant temperature for 1 h. Synthesis conditions were performed, considering the temperature of 60 ± 5 °C and concentration of surfactant the $85 \text{ mmol}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. After intercalation, all ODA-bentonite samples were washed, and separated by filtration, all samples were dried in an oven at 80 ± 2 °C for 24 h. After organophilization, a composite was prepared in the following proportions: 2.5 g organophilic bentonite: 40 mL acetone: 0.75 g geranyl acetate (Bent-ODA-0.75GA). The mixture was kept under agitation for 24 h using a shaker at 180 rpm, at room temperature. After this mixing period, the samples were dried in an oven at 50 ± 2 °C for 24 h.

4.2.3 Antimicrobial analysis for bacteria

The antimicrobial activity was evaluated for Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 35218), according to methodologies previously described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). For inoculum preparation, some bacterial colonies were selected and transferred to a sterile 0.9% saline. The solution turbidity was adjusted using a Spectrophotometer with a wavelength reading of 619 nm, yielding the equivalent concentration of about $10^4 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

In this technique, we seeded the microorganism of interest in Petri dishes with a culture medium Plate Count Agar (PCA) using a swab. Three equidistant holes were made in each plate, with 8.0 mm diameter approximately. In each hole was deposited a composite and incubated at 36 ± 1 °C for 24 h. This antimicrobial analysis was performed in triplicate and the diameters of the inhibition halos were measured and associated with the antimicrobial actions according Eq. 4.1, in methodology proposed by Fiori et al. (2009), the inhibition halos diameter measurements were subjected to the Tukey test in order to assess the significant differences existence at the 5% significance level ($p < 0.05$).

$$D_{\text{bac}} = D_{\text{ex}} - D_{\text{in}} \quad (4.1)$$

where D_{bac} is the sum of the bactericide diameters and represents the bactericide action of the materials, D_{ex} is the inhibition halo diameter of the microorganism and the D_{in} is the diameter occupied by the composite.

3.2.4 Antimicrobial analysis for fungi

The antimicrobial activity was evaluated for fungi *Aspergillus niger* (ATCC 6275) and *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), according methodologies described previously by American Society for Testing and Materials (ASTM) G21-15, with some modifications. For the tests, the fungus concentration was adjusted in sterile saline solution (0.9%) to a concentration of 10^5 spores·mL⁻¹, being counted by the Neubauer chamber method under an optical microscope.

An amount of 0.20 ± 0.05 g of Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA were weighed into a sterile test tube and 80 μ L of the fungal suspension was inoculated. The test tubes were incubated in a bacteriological incubator at 28 ± 2 °C for 7 days, this assay being performed in duplicate. After 7 days of incubation, 10 mL of 0.9% saline solution was added to each test tube, homogenized by vortexing for approximately 1 min and a 1 mL aliquot was removed and seeded in depth along with approximately 20 mL of Sabourand agar with chloramphenicol. The plates were homogenized and incubated at 28 ± 2 °C in a bacteriological incubator for 7 days, after which a visual analysis of the plates was performed, indicating whether there was growth, reduction or non-growth of fungi, as shown in ASTM G21-15 standard.

4.2.5 Adsorption Experiments

Batch adsorption experiments were performed according methodology proposed by Vila-Donat et al. (2019), with some modifications. Using a homogenized suspension of 5.00 ± 0.01 mg of Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA and 25 mL of an Aflatoxin B1 solution at a concentration of $107 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The adsorption experiments were conducted in a thermostat shaker at 180 rpm and 37 ± 1 °C for 17 h. Post-adsorption reaction mixtures were centrifuged in centrifuge with a rotation of 3600 rpm for 20 min and filtered through 0.22 μm syringe. Filtered samples were then analyzed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS) regimentations.

For the construction of the calibration curve, standard solutions of AFB1 were prepared in ultrapure water at concentrations of 0.02, 0.10, 0.20, 1.00 and 2.00 mg·L⁻¹, and the

calibration curve for AFB1 was determined based on the concentrations versus the peak area. Analyzes were performed using an Agilent chromatograph coupled to a mass detector. A 3.0x100 mm 2.7 Poroshell Sb C18 column (Agilent, PN 685975-302) was used. The mobile phase used was composed of methanol:ultrapure water with 0.1% formic acid (50:50), which was pumped without a ramp in isocratic mode, with a flow of 0.850 mL·min⁻¹, with an oven temperature 40 °C.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Antibacterial activity

To evaluate antimicrobial activity the Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA, diffusion tests were carried out in solid medium. Figure 4.1 show tests performed images with the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively. The inhibition halos diameter values are shown in Table 4.1.

Figure 4.6 - Diffusion in solid medium for Bent-ODA against (a) *Staphylococcus aureus* and (b) *Escherichia coli* bacteria and Bent-ODA-0.75GA against (c) *Staphylococcus aureus* and (d) *Escherichia coli* bacteria with inoculum 10⁴ CFU·mL⁻¹.

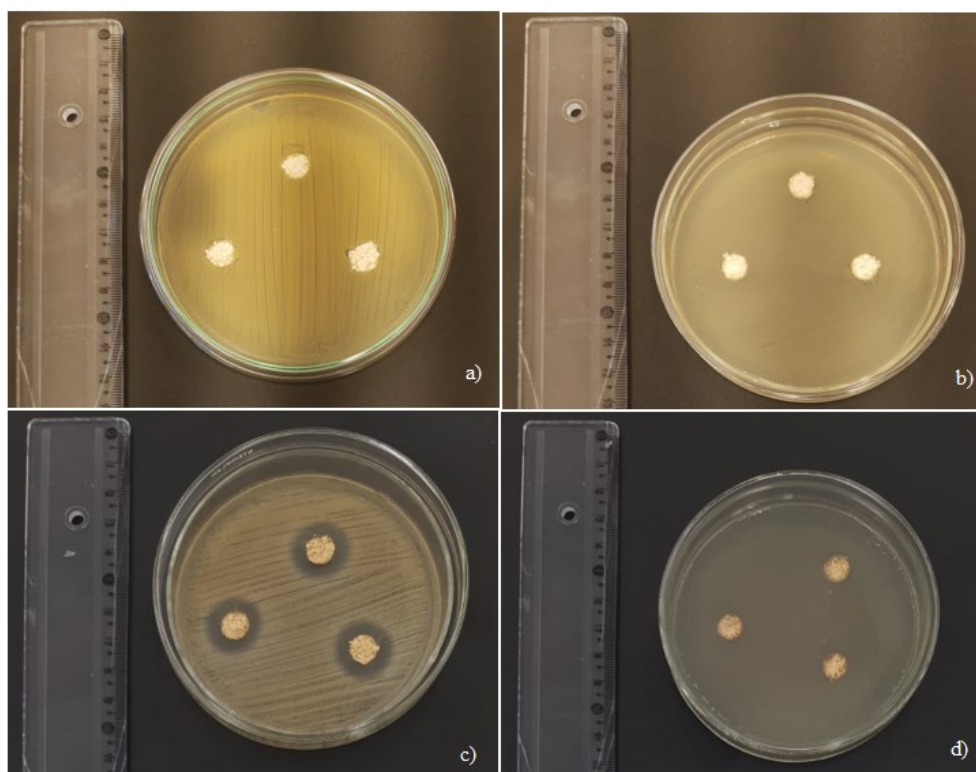


Table 4.2 - Inhibition zone mean values generated by the Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA from the diffusion test in solid medium against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Samples	Inhibition zone average diameter (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Bent-ODA	0,0±0,0 ^{Aa}	0,0±0,0 ^{Aa}
Bent-ODA-0.75GA	8,0±0,0 ^{Bb}	0,0±0,0 ^{Aa}

* Equal lowercase letters represent that there are no significant differences between rows ($p < 0.05$) and equal uppercase letters represent that there are no significant differences between columns ($p < 0.05$).

It is possible to observe through the Figure 4.1 that for the organophilic bentonite there was no formation of an inhibition halo for both tested bacteria, which once again reinforces that the bentonite does not present antimicrobial activity by itself and that the organophilization process does not changed this feature. After the insertion of geranyl acetate to the organophilic bentonite, it was verified the formation of an inhibition halo, only for the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, this difference is due to the fact that the Gram-positive bacterial cells have only one outer layer as a plasma membrane, which facilitates the penetration of antimicrobial compounds and the interaction with the bacterial cytoplasm. When the structure of Gram-negative bacteria is evaluated, they have an additional membrane, forming a more resistant phospholipid bilayer structure that increases the cytoplasmic protection of antimicrobial agents (Muñoz-Bonilla & Fernández-García, 2012).

4.3.2 Antifungal activity

After organophilization and insertion of geranyl acetate, the composite was tested for its antifungal activity. Figure 4.2 shows the antifungal activity of Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA against fungi producing Aflatoxin B1, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* at a concentration of 10^5 spores·mL⁻¹.

Figure 4.7 - Antifungal activity of Bent-ODA against (a) *Aspergillus flavus* and (b) *Aspergillus niger* and Bent-ODA-0.75GA against (c) *Aspergillus flavus* and (d) *Aspergillus niger*.

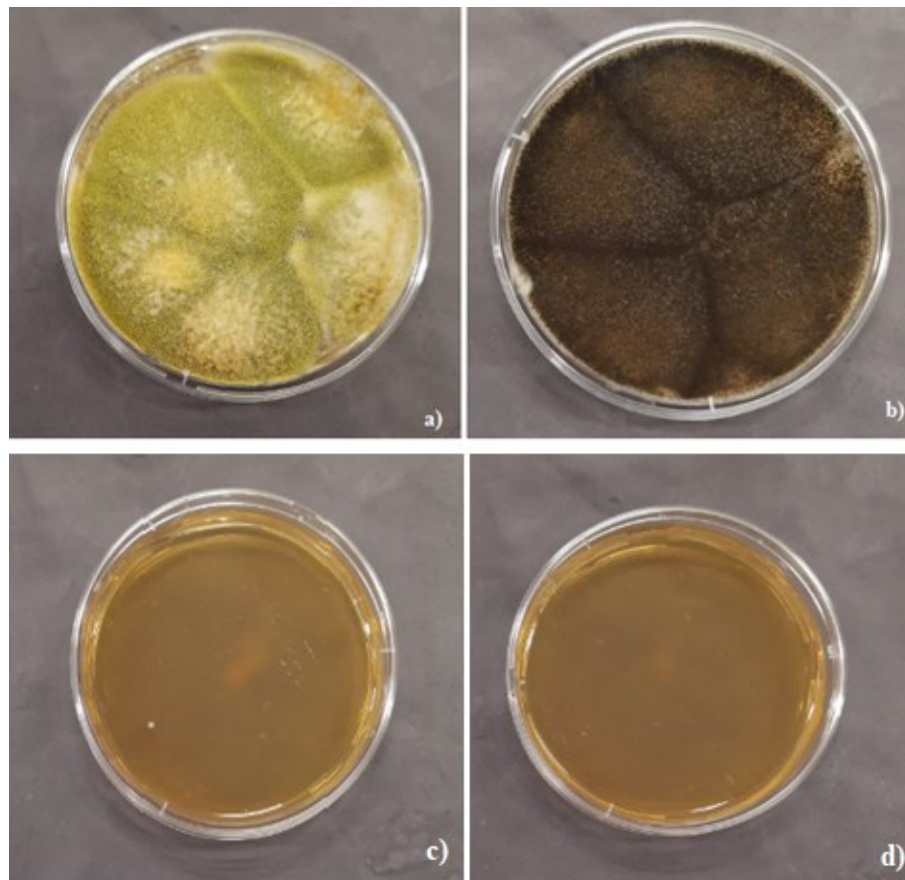


Figure 4.2 shows the results obtained for the antifungal analysis for Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA, where once again it was found that organophilic bentonite does not have the ability to inhibit the growth or kill microorganisms in test, fungal growth when evaluated this material occurred abundantly, receiving the maximum rating on the growth scale, completely filling the surface of the plate. After the insertion of the antimicrobial agent geranyl acetate, there was a marked decrease in cell density. When the composite Bent-ODA-0.75GA was evaluated against *Aspergillus flavus* it was noticed the presence of growth traces and for *Aspergillus niger* no growth was observed. The classification of each of the tested composites can be seen in Table 4.2.

Table 4.3 - Classification of fungal growth according to ASTM G21-15.

Samples	Rating	
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
Bent-ODA	4	4
Bent-ODA-0.75GA	1	0

4.3.3 Adsorption Experiments

Through the analyzes carried out in LCMS it was verified that the initial concentration of Aflatoxin B1 was $107 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and that after 17 h of contact with Bent-ODA and Bent-ODA-0.75GA this concentration was below the limit of quantification of the equipment, which is $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, thus ensuring that the final concentration of Aflatoxin B1 is below $50 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, which is what the Brazilian feed legislation provides (Brasil, 1988).

4.4 CONCLUSION

The results obtained indicate that composite based bentonite and geranyl acetate is antibacterial, antifungal and Aflatoxin B1 adsorbent, which can be used concomitantly in the elimination of fungi that produce Aflatoxins, as well as adsorbing them if they are present. This result is very interesting, as it allows the use of this material for applications in animal feed. Future works suggest the study of in vivo toxicity, release of geranyl acetate present in bentonite and incorporation of the material developed in the feed.

Acknowledgments

This work was supported by the Research and Innovation Support Foundation of the State of Santa Catarina (FAPESC, Brazil). We also thank Unochapecó to provide its laboratory structure.

4.5 REFERENCES

ASTM. (2015). ASTM G21-15 Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi. AMERICAM SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM.

Brasil. (1988). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria n.º 7, de 9 de novembro de 1988. Fixa padrões de tolerância para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias primas e rações. Diário Oficial da União, Brasília.

Carraro, A., De Giacomo, A., Giannossi, M. L., Medici, L., Muscarella, M., Palazzo, L., Quaranta, V., Summa, V. & Tateo, F. (2014). Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M1 from contaminated milk and effects on milk quality. *Applied Clay Science*, 88–89, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.028>.

CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptible tests; Approved standard – Eleventh Edition. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute document M02-A11. Wayne, Pennsylvania.

Fiori, M. A., Paula, M. M. S., Bernardin, A. M., Riella, H. G. & Angioletto, E. (2009). Bactericide glasses developed by Na⁺/Ag⁺ ionic exchange. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1569–1573. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.014>.

Gan, F., Hang, X., Huang, Q. & Deng, Y. (2019). Assessing and modifying China bentonites for aflatoxin adsorption. *Applied Clay Science*, 168, 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.12.001>.

Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J. & Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030>.

Gupta, A., Dhakate, S. R., Pahwa, M., Sinha, S., Chand, S. & Mathur, R. B. (2013). Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. *Process Biochemistry*, 48, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.028>.

Li, Y., Tian, G., Dong, G., Bai, S., Han, X., Liang, J., Meng, J. & Zhang, H. (2018). Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. *Applied Clay Science*, 163, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.032>.

Liu, J. H., Cai, W. K., Khatoon, N., Yu, W. H. & Zhou, C. H. (2021). On how montmorillonite as an ingredient in animal feed functions. *Applied Clay Science*, 202, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105963>.

Macuvelo, D. L. P., Nones, J., Matsinhe, J. V., Bezerra, A. T., Lima, M. M., Santos, E. S. W., Fiori, M. A. & Riella, H. G. (2017). Simultaneous effect of reaction temperature and concentration of surfactant in organo-bentonite synthesis. *Materials Science Forum*, 899, 42–47. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42>.

Magnoli, A. P., Tallone, L., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M., Chiacchiera, S. M. & Sanchez, R. M. T. (2008). Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. *Applied Clay Science*, 40 (1–4), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.07.007>.

- Muñoz-Bonilla, A. & Fernández-García, M. (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, 37 (2), 281-339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>.
- Nones, J., Nones, J. & Scussel, V. M. (2014). Analysis of the presence of mycotoxins in swine feed and its possible effects on semen quality in a rural property of Santa Catarina. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 13 (1), 7-13. <https://revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5168/3355>.
- Oplatomska-Stachowiak, M., Sajic, N., Xu, Y., Haughey, S. A., Mooney, M. H., Gong, Y.Y., Verheijen, R. & Elliott, C. T. (2016). Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. *Food Control*, 63, 239-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.041>.
- Pereira, C. S., Cunha, S. C. & Fernandes, J. O. (2019). Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 11 (5), 1-62. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>.
- Raiola, A., Tenore, G. C., Manyes, L., Meca, G. & Ritieni, A (2015). Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.023>.
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V. & Ramos, A. J. (2019). New mycotoxin adsorbents based on tri-octahedral bentonites for animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 255, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114228>.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15 (2), 129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>.
- Zeferino, R. C. F., Piaia, V. A. A., Orso, V. T., Pinheiro, V. M., Zanetti, M., Colpani, G. L., Padoin, N., Soares, C., Fiori, M. A. & Riella, H. G. (2021). Synthesis of geranyl acetate by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. *Chemical Engineering Research and Design*, 168, 156-168. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.01.031>.

CAPÍTULO 5

O estudo de caracterização e a avaliação da capacidade adsorvente de Aflatoxina B1 do compósito antimicrobiano a base de bentonita organofílica incorporado com acetato de geranila foi submetido e está em avaliação, com o título “**Obtaining and characterization of bentonite organophilic incorporated with geranyl acetate and its application as mycotoxins’ binder in different pHs**”, conforme apresentado a seguir.

Abstract

One of the major problems linked to the animal feed industry is the presence of mycotoxins, substances produced by fungi, which even in low concentrations can cause health-related inconveniences and serious economic losses. This study reports the production of organophilic bentonite incorporated geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA). The synthesized composite was employed for the removal of carcinogenic mycotoxins Aflatoxin B1 (AFB1). The bentonite was organophilized using octadecylamine at a concentration of 85 mmol·100g⁻¹ of bentonite protonated with hydrochloric acid, heated at 60±5 °C for 1 h, washed repeatedly with distilled water and dried in an oven at 80±2 °C for 24 h. Incorporation of geranyl acetate was carried out using 1.0 g GA to 2.5 g of Bent-ODA using acetone as solvent. The mixture was stirred for 24 h at 180 rpm and room temperature and then oven dried at 50±2 °C for 24 h. The product was characterized by FRX, XRD, FTIR, TGA and BET/BJH techniques, while quantification of toxins was performed using HPLC/LC-MS. The effect of different pHs (pH 6.5 the average pH of intestine or pH 3.5 the average pH of stomach) on the adsorption performance of Bent-ODA-1.0GA was systematically investigated. This new material was evaluated for its antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. The composite was able to reduce fungal growth, which allows only traces of fungal growth in its surface, filling less than 10% of plate. The adsorption kinetics showed that to Bent-ODA, 45 min is enough time of contact with AFB1 to reduce it to acceptable levels by legislation, regardless of the pH used, while for Bent-ODA-1.0GA the time necessary to reach levels that are according to the legislation it is 120 min for a pH of 3.5 and 100 min for a pH of 6.5. Therefore, attributed to the advantages of being efficient, Bent-ODA-1.0GA could be envisaged as a promising adsorbent for the enhanced sequestration of mycotoxins.

Keywords: Composite; Organophilic bentonite; Antifungal activity; Mycotoxins adsorption.

5.1 INTRODUCTION

Brazil stands out worldwide in the poultry and pig farming sectors and is one of the largest producers of animal feed (ALLTECH, 2020; ABPA, 2021). Therefore, studies and new technologies dedicated to the elimination or mitigation of adverse effects caused by contaminants, especially by mycotoxins, must be carried out, paying attention to the fact that the technique used is not toxic, nor does it reduce the nutritional value of food.

Different physical, chemical and biological methods can be used in order to detoxify and decontaminate rations affected by mycotoxins, by eliminating them in contaminated ingredients, reducing bioavailability in the gastrointestinal tract of animals or with the direct degradation of mycotoxins in the ration (GHAZALAH et al., 2021). Adsorption is a physical method of decontamination and stands out for being an effective, low-cost and widely available technique. Among the adsorbents cited in the literature, bentonite is overlap against other adsorbents in reducing the levels of different mycotoxins in diverse matrices (CARRARO et al., 2014; SENTURK e KARACA, 2021).

Bentonite is a versatile, available and low-cost clay mineral and can be applied to foods because it is Generally Recognized As Safe - (GRAS) when used at concentrations below 2% by mass (European Union Commission, 2010). It has particular structural characteristics, rheological properties, chemical composition and cation exchange capacity, which provide several possibilities of application such as in biomedical devices acting to improve mechanical properties and as a phase compatibilizer (Balakrishnan et al., 2014; Macuvele et al., 2019), as an anticorrosive for paints (Granizo et al., 2011), as part of controlled drug delivery systems (Kalav, Göcek and Kayaoğlu, 2021), as an additive in ceramics to increase plasticity (Matei et al., 2021), for shielding against gamma radiation (Asal, Erenturk and Hacıyakupoglu, 2021; El-Sharkawy et al., 2022), in cosmetics (Favero et al., 2019) to stabilize dispersed systems and adjust rheological patterns of preparations, in polymers to improve physical and mechanical properties, in reducing vapor permeability (Iamareerat et al., 2018; Monteiro et al., 2018; Koosha and Hamedi, 2019) and as mycotoxin adsorbents (PASHA et al., 2007; JAYNES, ZARTMAN e HUDNALL, 2007; JARD et al., 2011; SANTOS et al., 2011; PAPPAS et al., 2014; NONES et al., 2016; NONES et al., 2017; VILA-DONAT et al., 2019; RASHEED et al., 2020a; SAEED et al., 2020; ZHANG et al., 2020; ABDELNABY et al., 2022).

Mycotoxins are a group of secondary metabolites of toxigenic substances produced by fungi that exert harmful effects on human and animal health, such as Aflatoxin B1 (AFB1)

(ZAIN, 2011). AFB1 is produced by fungi of *Aspergillus* genus and is one of the most important among mycotoxins, as it causes biochemical and structural changes in several organs, including liver, lungs, kidneys and heart. It can influence at the early embryonic development stages in mammals, in addition to being carcinogenic and bioaccumulating in edible animal tissues, resulting in its transfer to the human food chain (KHAN et al., 2013; NONES et al., 2015a; JALILI, 2016; NONES et al., 2016; GAN et al., 2019).

Due to their deleterious effects, the Food and Drug Administration (FDA) has established maximum allowable levels for Aflatoxins present in animal feed and ingredients used as raw materials, ranging from $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ to $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (FDA, 2019). In Brazil, Ordinance No. 7 of November 9th, 1988, sets tolerance standards for aflatoxins in raw materials and rations for animal feed, and these cannot exceed $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

In order to enhance the adsorptive effect of bentonite, several molecules have been used in order to increase the lamellar spaces, through an organophilization process. This process consists of modifying the structure of bentonite through the intercalation of these compounds between the structural layers of the clay mineral, allowing inorganic cations to be exchanged in the presence of water for organic cations (DAKOVIC et al., 2008; DAKOVIC et al., 2012; LI et al., 2018; NONES et al., 2016).

Nones et al. (2016) performed an organophilic treatment to increase the adsorption capacity of Brazilian bentonites, using organic salts of benzalkonium chloride (BAC) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at concentrations of 2 and 6% and temperatures of 30 and 60 °C, testing its ability to adsorb Aflatoxin B1 (AFB1) in an aqueous medium at a concentration of 30 μM . The authors found that the conditions that promoted the highest percentages of AFB1 removal were a temperature of 30 °C and a salt concentration of 2%, with removal percentages of 76.9% and 55.2%, respectively, for BAC and CTAB.

Saeed et al. (2020) they used organomodified bentonite with benzyl-tri-n-butyl ammonium bromide (BTB), benzethonium chloride (BTC) and dioctyl sodium sulfosuccinate (DSS) for the adsorption of mycotoxins (Aflatoxin B1, citrinin, Patulin and Zearalenone). The results showed the high detoxification efficiency ($\approx 99\%$) of the modified clays for the removal of mycotoxins under optimized conditions (pH 5, time: 30 min, amount of adsorbent: 50 mg).

Aiming to expand the use in several areas and add new functionalities to bentonite, organic and inorganic compounds such as essential oils (Bernardos et al., 2019; Rasheed et al., 2020a), zinc species (Nones et al., 2017), titanium dioxide (Khansili e Krishna, 2022) and silver species (Rosário et al., 2020) can be incorporated.

Among the main compounds present in essential oils, monoterpene esters of short-chain fatty acids, such as geraniol, linalool, citronellol or menthol, contribute to the good smell of many essential oils. Due to their organoleptic properties, these oils are widely applied in fragrances, flavors, cosmetics, pharmaceuticals, perfumes and also in foods as flavoring, antioxidants, antimicrobial or anti-inflammatory agents (GUPTA et al., 2007; BADGUJAR e BHANAGE, 2014; ROSA et al., 2017; BOURKAIB et al., 2018; ZANETTI et al., 2018; CORRÊA et al., 2019; BHAVSAR e YADAV, 2019).

An important ester is geranyl acetate, classified as a monoterpene, which appears as a slightly yellowish liquid, with a pleasant floral or fruity flavor, rose and lavender aroma. Geranyl acetate is insoluble in water, but soluble in alcohol and other organic solvents, has antimicrobial properties, and is widely used in food, pharmaceutical and cosmetic industries (GONÇALVES et al., 2012; GUPTA et al., 2013; ZEFERINO et al., 2021; CAPELEZZO et al., 2022).

In studies reported by Capelezzo et al. (2022) antibacterial and antifungal activity was added to an organophilic bentonite. The authors incorporated of geranyl acetate into the organophilic bentonite and obtained antifungal activity against AFB1 producing fungi, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, significantly reducing their growth. Antibacterial activity was observed for the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*. For the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, no inhibition halo formation was observed. This shows that organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate can inhibit the growth or eliminating the AFB1 producing fungi, which is a great potential of the material developed.

In view of the above, this work aims to associate the adsorptive property of bentonite with the antifungal and antibacterial activities of geranyl acetate and obtain a compound capable of eliminating or controlling the growth of bacteria and fungi, simultaneously with the adsorption process of Aflatoxin B1 (AFB1).

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Composite preparation

Bentonite samples were collected from a Boane deposit in Mozambique, with cation exchange capacity (CEC) of de 67.53 meq·100 g⁻¹ determined by Silva (2010). The samples were washed with distilled water to remove any impurities, stirred for 24 h at a speed of 180

rpm on a shaker bench (Dist, DST 01) and were dried in an electric oven at $90 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h (Logen, LSDHG-9140A).

The bentonite was submitted to the organophilization process according to the methodology described by Macuvele et al. (2017). An octadecylammonium (ODA) suspension was used at a concentration of $85 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$ of bentonite. The mixture was heated to a temperature of $60 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h on a magnetic stirrer with heating (Quimis, Q261). After organophilization, the compost was washed with ultrapure water, repeatedly, in order to remove any residual traces of ODA, and then vacuum filtered (Logen, PCP1312VC), being dried in an oven at $80 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. This compound was called Bent-ODA.

Geranyl acetate was synthesized through heterogeneous catalysis using Lewatit[®]GF 101 ion exchange resin from the esterification reaction of geraniol with acetone hydride, as described by Zeferino et al. (2021). Was incorporated into organophilic bentonite ($0.4 \text{ g ester} \cdot \text{g bentonite}^{-1}$) using acetone as solvent, this material being called Bent-ODA-1.0GA. The mixture was kept under stirring for 24 h using a shaker at 180 rpm, at a room temperature of approximately $25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. After this mixing period, the samples were dried in an oven at $50 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. This material was de-agglomerated using mortar and then stored in a closed vial.

5.2.2 Composite characterization

5.2.2.1 FRX analysis

Natural bentonite's composition was determined by X-ray fluorescence analysis (XRF) using X-Ray fluorescence analysis (Panalytical Axios Max Model by Wavelength Scattering – WDXRF) instrument.

5.2.2.2 XRD analysis

The XRD analysis of the bentonite samples was made with $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=0.154178 \text{ nm}$) (Bruker AXS GmbH, D8 Advance). Then, the interlayer spacing of each sample was calculated using Bragg's law:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (5.1)$$

where n is the path differences between the reflected waves which equal an integral number of wavelength (λ) and d is the interlayer spacing (nm), θ the angle of diffraction ($^\circ$), λ the wavelength (nm).

5.2.2.3 FTIR analysis

Chemical characteristics of the compound based on bentonite and geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA) was analyzed by infrared absorption assay (FTIR). The FTIR analysis was performed in an infrared spectrophotometer with Fourier transform (Agilent Technologies, model Cary 600 Series FTIR) by attenuated total reflectance with diamond crystal. The spectra were obtained in a range of 400 to 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} .

5.2.2.4 Thermal Behavior

The thermogravimetric curves for the Bent-ODA and for the Bent-ODA-1.0GA were obtained using a Shimadzu TGA-50 thermogravimetric analyzer with a temperature program from 25 $^\circ\text{C}$ to 900 $^\circ\text{C}$, with a heating rate of 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and flow rate of 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ under nitrogen atmosphere.

5.2.2.5 BET/BHJ analysis

The Bent-ODA and the Bent-ODA-1.0GA was analyzed by BET (Brunauer, Emmett, and Teller) and BJH (Barrett, Joyner, and Halenda) tests, to determine the surface area, pore volume, and pore size distribution of the adsorbent using Quantachrome Instruments – Autosorb-1. The samples were previously dried at temperatures in the range of 100-300 $^\circ\text{C}$ under vacuum (10⁻⁷ torr) and then the adsorption of nitrogen gas was measured at 77 K, at relative pressure values in the range of 0 to 1.0.

5.2.2.6 Antifungal activity

The antifungal activity was evaluated for fungi *Aspergillus niger* (ATCC 6275) and *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), according methodologies described previously by American

Society for Testing and Materials (ASTM) G21-15, with some modifications. For the tests, the fungus concentration was adjusted in sterile saline solution (0.9%) to a concentration of 10^5 spores·mL⁻¹, being counted by the Neubauer chamber method under an optical microscope.

An amount of 0.20 ± 0.05 g of Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA were weighed into a sterile test tube and 80 μ L of the fungal suspension was inoculated. The test tubes were incubated in a bacteriological incubator at 28 ± 2 °C for 7 days, this assay being performed in duplicate. After 7 days of incubation, 10 mL of 0.9% saline solution was added to each test tube, homogenized by vortexing for approximately 1 min and a 1 mL aliquot was removed and seeded in depth along with approximately 20 mL of Sabourand agar with chloramphenicol. The plates were homogenized and incubated at 28 ± 2 °C in a bacteriological incubator for 7 days, after which a visual analysis of the plates was performed, indicating whether there was growth, reduction or non-growth of fungi, as shown in ASTM G21-15 standard.

5.2.2.7 Adsorption experiments

The study of the adsorption of Aflatoxin B1 using as adsorbent material Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA was carried out through adsorption kinetics, based on the work carried out by Zahoor e Khan (2018), Wang et al. (2019) and Rasheed et al. (2020a), with some modifications. As Bent-ODA-1.0AG can be used as raw material to produce animal feed, the tests were conducted simulating the gastrointestinal system of chickens.

In the tests, a mass of 5.00 ± 0.01 mg of Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA and 25 mL of an aqueous solution of Aflatoxin B1 at the concentration of $1400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ with pH 3.5 (equivalent to stomach condition) and concentration of $1800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ with pH 6.5 (equivalent to the condition of the intestine), these pH values being adjusted with solutions of NaOH or HCl $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The samples were kept under agitation in a shaker (Solab, SL 222) at 180 rpm and at a temperature of 41 °C (broiler body temperature). At times 0 (control), 15, 45, 100, 120 and 150 min, aliquots of 0.6 mL were collected for the quantification of Aflatoxin B1. The collected samples were centrifuged in Falcon tubes using a centrifuge (Fanen, Baby[®] I 206-BL) at 5000 rpm for 15 min, then filtered using a durapore[®] filter with a pore size of 0.22 μm (Merck) and then subjected to concentration analysis in a High-Performance Liquid Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (LCMS).

To obtain the calibration curve of AFB1 in the LCMS, standard solutions of Aflatoxin B1 (R-Biopharm) were prepared at concentrations of 0.005, 0.010, 0.020, 0.030, 0.062, 0.125

and $0.250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The equipment used was a High-Performance Liquid Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (Shimadzu, LCMS-2020). An NST C18 column, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 5 \text{ }\mu\text{L}$ (MS/LABCEN) was used. As mobile phase used, an aqueous solution of formic acid 0.1%: acetonitrile acidified with formic acid 0.1% (30:70) was used, which was pumped without ramp in isocratic mode, with a flow of $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, with an oven temperature of $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Considering a possible application of the compound Bent-ODA-1.0GA as an animal feed additive, it is important to note that the FDA (2019) recommends and understands as safe aflatoxin levels between 20 and $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for raw materials used in animal feed and rations and that in Brazil, in particular, Ordinance No. 7, of November 9th, 1988, indicates levels not exceeding $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for aflatoxins in food for animal consumption (BRASIL, 1988). A dashed line on the adsorption kinetics diagram represents the limit for the allowable value of AFB1 concentration in animal feed, being $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Also, as some AFB1 concentration values could not be determined, due to the sensitivity of the equipment used, they were estimated by adjusting the concentration and time data.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 XRF characterization

Table 5.1 presents the results obtained with the XRF technique for raw bentonite. The results indicate that bentonite is mainly constituted by SiO_2 and Al_2O_3 , with $76.312 \text{ wt}\%$ and $13.446 \text{ wt}\%$, respectively. Traces of K ($0.301 \text{ wt}\%$), Fe ($2.028 \text{ wt}\%$), Mg ($2.329 \text{ wt}\%$), Na ($0.724 \text{ wt}\%$), Ca ($0.463 \text{ wt}\%$) and Ti ($0.219 \text{ wt}\%$) can also be observed. The fire loss (FL) of raw bentonite samples, determined by heating has revealed a value of $4.162 \text{ wt}\%$.

Table 5.1 - Results of X-Ray Fluorescence analysis of in natura bentonite.

Elements	Al_2O_3	CaO	Fe_2O_3	K_2O	MgO	MnO	Na_2O	P_2O_5	SiO_2	TiO_2	FL
% in the sample	13.446	0.463	2.028	0.301	2.329	<0.05	0.724	<0.05	76.312	0.219	4.162

FL – Fire loss

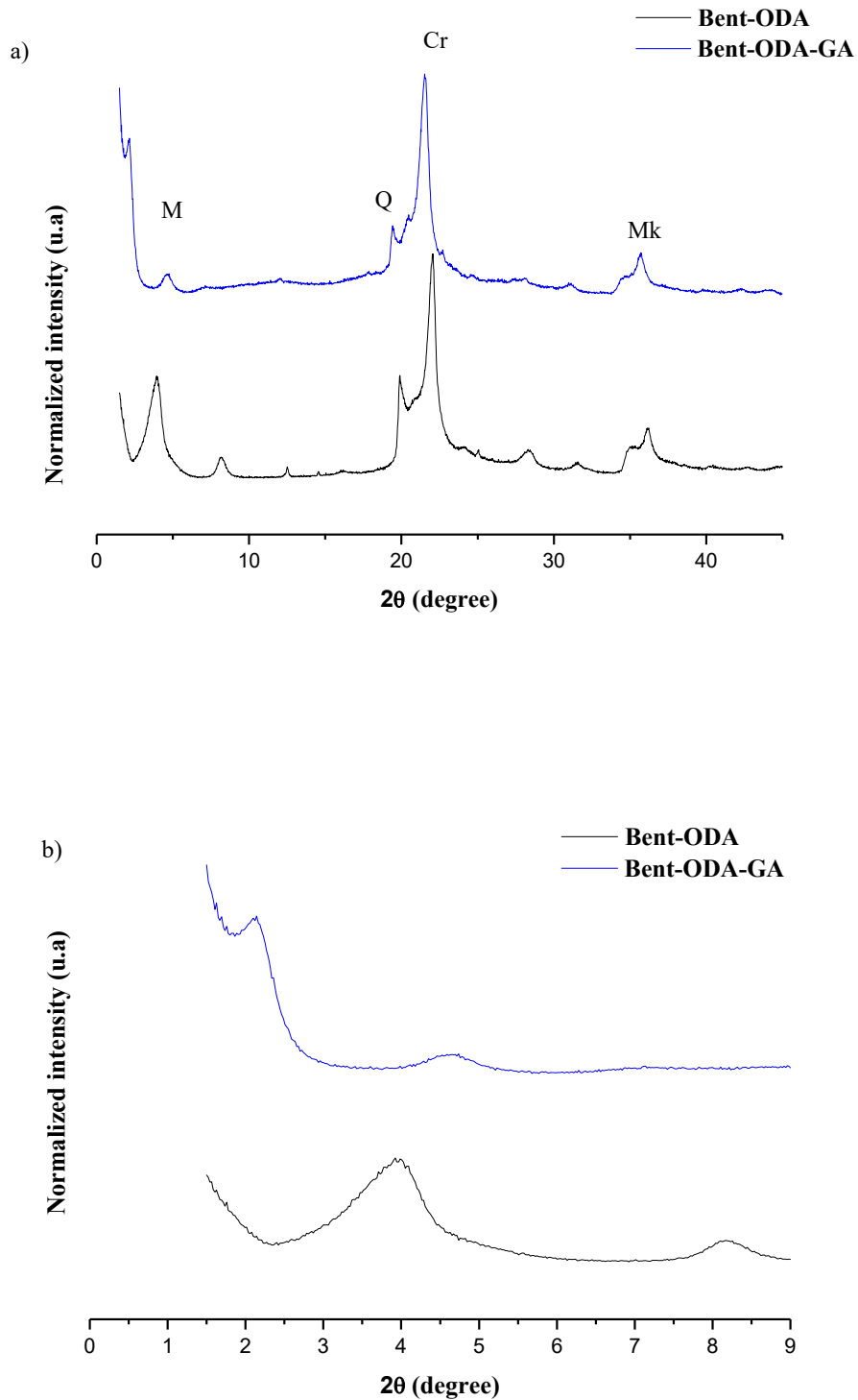
The constituent compound of raw bentonite in greater quantity is silicon dioxide (SiO_2), characteristic of silicates (clay minerals, micas and feldspar). This composition is in agreement with results reported by Oliveira et al. (2011) and Nones et al. (2015b), who evaluated the compositions of bentonites collected in other regions. The authors reported the majority presence of SiO_2 in the composition of the studied raw bentonites.

It is possible to verify that the sodium content present in raw bentonite is higher than the calcium content, showing that is sodium bentonite. The significant presence of magnesium in the composition stands out, indicating that in addition to the sodium species, it is possible that magnesium species are present in the lamellar spaces of the clay mineral and available for the ion exchange processes. The value associated with fire loss can be attributed to the release of water molecules interspersed in the interlamellar space and to the hydroxyls present in the clay mineral, which may also be related to the small amount of organic matter and the high content of free silica (SILVA, 2010). On the other hand, the presence of the other oxides in trace amounts, indicates that these are possible contaminants from the bentonite extraction deposits.

5.3.2 XRD characterization

Figure 5.1 shows the diffractograms obtained for Bent-ODA and for Bent-ODA-1.0GA. Massinga et al. (2010) and Macuvele (2018) performed a complete characterization with x-ray diffraction for raw bentonite, and reported the presence of a characteristic peak at 2θ equal to 5.88° and at 6.00° , respectively, corresponding to diffraction by the defined planes (001) by the basal spacings of the clay mineral. Using Braag's Law, the authors determined the characteristic spacing of raw bentonite and obtained the values $d(001) = 1.50 \text{ nm}$ and $d(001) = 1.47 \text{ nm}$, respectively.

Figure 5.1 - XRD diffractogram of the organophilic bentonite (Bent-ODA) and of the organophilic bentonite with geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA). (a) from 1 to 45° and b) from 0 to 9°. Montmorillonite (M), Cristobalite (Cr), Muscovite (Mk) and Quartz (Q).



The interlamellar space (basal) is one of the structural parameters of organophilic clays that must be considered when it comes to the development of an adsorbent material. The size of the basal spacing of a bentonite can be increased through organophilization processes, employing molecules that have physical affinity with the sites of the lamellar structure. This process can provide the intercalation of these molecules and/or the exfoliation of the lamellae, changing the size of the lamellar space. These changes will influence the clay mineral adsorption capacity (MACUVELE et al., 2017).

It is noticeable from the diffractograms that the presence of geranyl acetate affects the basal spacing of the ODA-treated bentonite. The displacement of the diffraction angle corresponding to the plane (001) of the montmorillonite is verified for values of smaller angles. This effect can be attributed to the probable intercalation of geranyl acetate molecules in the basal spacing and their expansion to larger values.

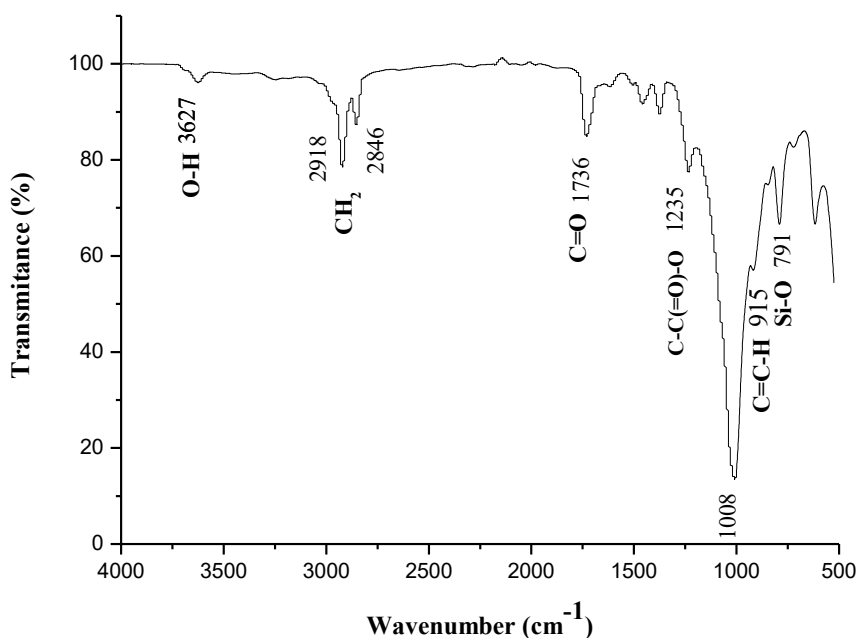
For organophilic bentonite (Bent-ODA) the angle associated with montmorillonite diffraction occurs at $2\theta = 3.93^\circ$, while for organophilic bentonite with geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA) it occurs at $2\theta=2.13^\circ$ (Figure 5.1b). This shift to smaller angle values can be related to the intercalation effect of geranyl acetate molecules, which promote the increase of the lamellar space $d(001)$.

Using Bragg's Law, the basal spacing for Bent-ODA was calculated as 2.25 nm, and 4.14 nm for Bent-ODA-1.0GA, a nearly twice increase in the size of the basal spacing. Macuvele (2018) obtained in his work a lamellar space of 2.65 nm for organophilic bentonite under the same treatment conditions – 60 °C and ODA concentration of 85 mmol·100 g⁻¹. According to Silva (2010), due to the salt structure having several carbons, that is, because it is a long chain, the incorporation of molecules in the interlamellar spaces is ordered, preserving the structure of the crystalline lattice even when the clay is subjected to the organophilization process with a high concentration of salt.

5.3.3 FTIR characterization

FTIR analysis of the organophilic bentonite and of the organophilic bentonite with geranyl acetate were performed in a range from 4000 cm⁻¹ to 400 cm⁻¹, according to Figure 5.2. Regarding the chemical characterization of geranyl acetate and organophilic bentonite, these have already been carried out in works developed by Zeferino (2021) and Macuvele et al. (2017), respectively.

Figure 5.2 - FTIR spectra obtained with the Bent-ODA-1.0GA for wavenumber between 4000 to 400 cm^{-1} .



Through the analysis of the FTIR spectrum, it is possible to infer that the characteristic bands of bentonite, ODA and geranyl acetate are maintained in the compound Bent-ODA-1.0GA, an indicator that there are no significant chemical interactions between the constituents.

The band at 3627 cm^{-1} is associated with the vibrational stretching mode of the structural OH group of bentonites and the bands at 2918 cm^{-1} and 2846 cm^{-1} correspond to CH_2 groups, present both in the structure of ODA and of geranyl acetate. These results corroborate those presented by Macuvele et al. (2017), where the authors reported that the band at 3630 cm^{-1} corresponds to the stretching vibration mode of the structural OH group of bentonites and the two intense bands are observed in 2918 cm^{-1} and 2849 cm^{-1} , corresponding to the vibrational modes of the CH_2 groups. Leite, Raposo and Silva (2008) and Massinga et al. (2010) also reported in their studies a band close to 3626 cm^{-1} which must be attributed to the vibrational stretching mode of the hydroxyl structural group of clay and the bands at 2920 and 2853 cm^{-1} are associated with the asymmetric and symmetrical vibration modes of the CH_2 group respectively.

The transmittance band at 1736 cm^{-1} is characteristic of the carbonyl vibrational modes ($\text{C}=\text{O}$), which corroborates what was reported by Zeferino (2021). Therefore, the presence of

the band at 1736 cm^{-1} is an indicator of the presence of geranyl acetate in the compound Bent-ODA-1.0GA. This finding, which was consistent with the above XRD results, indicated that geranyl acetate was grafted onto organophilic bentonite.

The band at 1466 cm^{-1} also refers to the vibrational modes of the CH_2 and CH_3 groups present in bentonite and geranyl acetate (MACUVELE et al., 2017; LEITE, RAPOSO and SILVA, 2008).

The C-C(=O)-O grouping is characteristic of geranyl acetate and provides the band at 1235 cm^{-1} . The band at 1008 cm^{-1} is possibly associated with the junction of the O-C-C group of geranyl acetate, which according to Zeferino (2021) is found in the band at 1021 cm^{-1} and the Si-O group belonging to bentonite, as presented by Macuvele et al. (2017) this peak is observed at 1038 cm^{-1} .

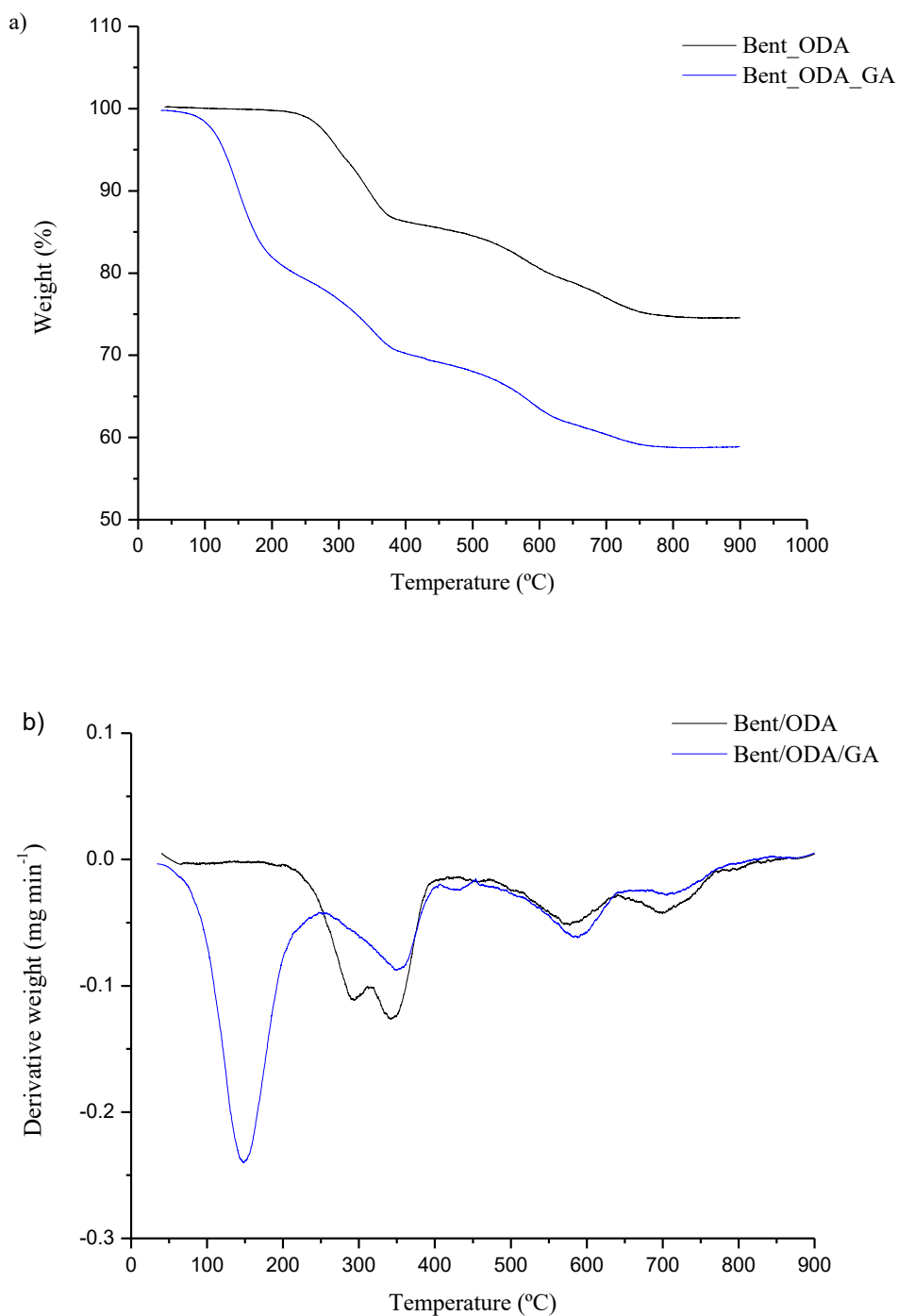
The band at approximately 915 cm^{-1} is characteristic of the C=C-H group belonging to geranyl acetate, which was shifted to the right after insertion into organophilic bentonite, and according to Zeferino (2021), for geranyl acetate pure, this peak is found at 952 cm^{-1} .

The band at 791 cm^{-1} is associated with the Si-O stretching vibrational modes of the bentonite, which is in agreement with the results presented by Macuvele et al. (2017) which shows a peak at 794 cm^{-1} for this functional group. The FTIR results also corroborate those obtained by Liu et al. (2018), who identified characteristic peaks for Si-O stretching vibrations at 798 cm^{-1} for pure bentonite. In conclusion, FTIR spectra confirmed the grafting of geranyl acetate onto the surface and into the layers of organophilic bentonite.

5.3.4 Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis curves from organophilic bentonite (Bent-ODA) and from organophilic bentonite with geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA) are shown in Figure 5.3a and the correspondent derivative analysis are shown in Figure 5.3b. For both materials, there was a gradual decrease in mass with increasing of the temperature up to about $900\text{ }^\circ\text{C}$.

Figure 5.8 - a) Thermogravimetric and b) Derivative thermogravimetric curves of organophilic bentonite and organophilic bentonite with geranyl acetate from 30 °C to 900 °C.



Bent-ODA-1.0GA lost 18% of mass up to 252 °C, with the maximum loss occurring at approximately 150 °C. This loss can be attributed to the release of geranyl acetate from the compound. According to Zeferino (2021), geranyl acetate is degraded up to 245 °C, with the maximum decomposition rate at 150 °C. Therefore, it is possible to associate the mass loss with

the thermal degradation event of geranyl acetate. The presence of this thermal event proves that 18 wt% of geranyl acetate was incorporated into the Bent-ODA-1.0GA.

In the preparation of Bent-ODA-1.0GA, a ratio of 0.4 g of geranyl acetate per gram of organophilic bentonite was used, which corresponds to 28.57 wt% of the total mass. Therefore, the results indicate that only 18 wt% remained in the compost after drying and that 10.57 wt% of geranyl acetate was lost during its production. These results allow to infer that approximately 63 wt% of the geranyl acetate used in the production process of the compound Bent-ODA-1.0GA was added and 37 wt% was possibly lost during the solvent evaporation process.

A second thermal event occurs between 187 °C and 407 °C for Bent-ODA and between 252 °C and 407 °C for Bent-ODA-1.0GA, with maximum mass loss rate around 342 °C and 351 °C, respectively. Possibly the mass loss between 250 °C and 400 °C can be attributed to the initial decomposition of octadecylammonium or the loss of physically adsorbed H₂O present in the bentonite interlayers. In this event, the Bent-ODA composite lost 14 wt%, while the Bent-ODA-1.0GA composite lost 11 wt%.

A third thermal event occurs between 407 °C and 636 °C for the Bent-ODA compound and between 407 °C and 654 °C for the Bent-ODA-1.0GA compound, with maximum mass loss rates at 575 °C and 585 °C, with loss of 5 wt% and 7 wt%, respectively. This mass loss can be associated with the final decomposition of octadecylammonium, which corroborates the results presented by Silva (2010), who used cetrimonium bromide for the organophilization of a bentonite from Mozambique – Africa.

Finally, between 636 °C and 772 °C and between 654 °C and 777 °C, there are mass losses associated with the release of structural hydroxyls belonging to bentonite (Callegaro, 2017), with maximum mass loss rates at 698 °C and 705 °C, for compound Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA, respectively, with mass loss values of 6 wt% and 7 wt%. The mass loss values and the respective temperatures for the compounds Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA are presented in Table 5.2.

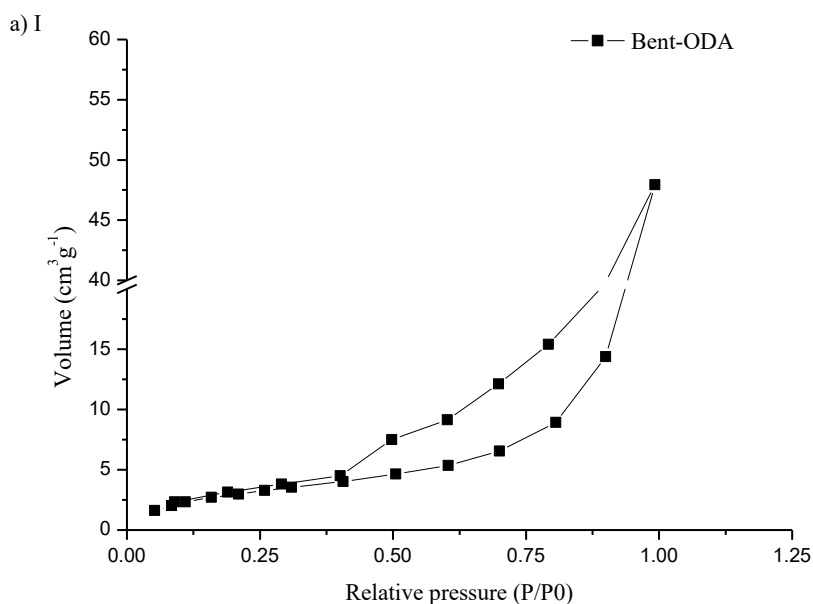
Table 5.2 - Thermogravimetric analysis data from the organophilic bentonite and from the organophilic bentonite with geranyl acetate.

Sample	Step 1			Step 2		
	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)
Bent-ODA	-	-	-	187.0 – 407.0	351.0	14.0
Bent-ODA-1.0GA	35.0 – 252.0	150.0	18.0	252.0 – 407.0	342.0	11.0
Sample	Step 3			Step 4		
	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)
Bent-ODA	407.0 – 636.0	575.0	5.0	636.0 – 772.0	698.0	6.0
Bent-ODA-1.0GA	407.0 – 654.0	585.0	7.0	654.0 – 777.0	705.0	7.0

5.3.5 BET/BJH analysis

Figure 5.4a shows the adsorption and desorption isotherms of nitrogen at 77 K obtained for the compound Bent-ODA and for the compound Bent-ODA-1.0GA, whereas Figure 5.4b shows the determined values of pore volume as a function of diameter particle, according to the BJH method (Barret, Joyner and Halenda). Table 5.3 shows the determined values of surface area, pore diameter and pore volume.

Figure 5.4 - a) N₂ adsorption and desorption isotherm for I) the compound Bent-ODA and for II) the compound Bent-ODA-1.0GA and b) pore size distribution for the compound Bent-ODA and for the compound Bent-ODA-1.0GA by the BJH method.



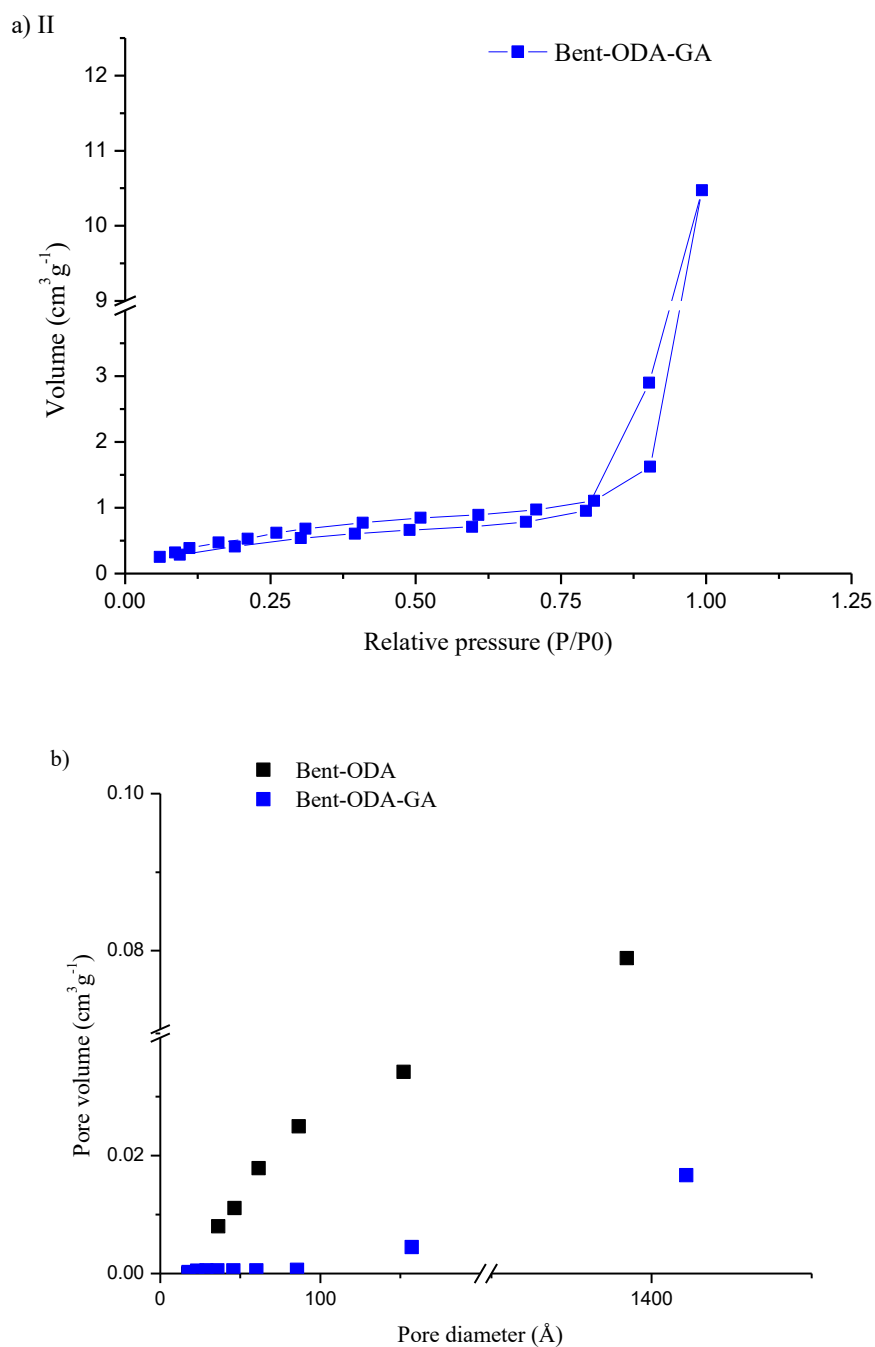


Table 5.4 - Surface area, diameter and pore volume values determined by BET and BJH, respectively, for the compounds Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA.

Samples	Surface area ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Pore size (Å)	Pore volume ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
Bent-ODA	11.92	249.6	0.0790
Bent-ODA-1.0GA	2.46	264.1	0.0167

The adsorption and desorption isotherms for the compounds Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA, show similar behavior to type IV isotherms, according to International Union of Pure and Applied Chemistry classification (IUPAC, 1985), which are typical of mesoporous materials. The low adsorbed volume of N₂ at low relative pressures is associated with the presence of small amounts of micropores in both compounds. According to Teixeira, Coutinho and Gomes (2001) in the type IV isotherm, there are two branches, the lower branch showing the amount of gas adsorbed with increasing relative pressure, while the upper branch represents the amount of gas desorbed. In the inverse process, this being characteristic of mesoporous and macroporous solids, in which the evaporation process is different from the condensation process. The hysteresis in the isotherms is more accentuated for the compound Bent-ODA, possibly associated with this material not having the insertion of geranyl acetate.

Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA compounds don't show great difference in the average diameter of the pores, 249.60 Å and 264.10 Å, respectively, but they present a difference of approximately 80% in the specific area values, 11.92 m²·g⁻¹ and 2,459 m²·g⁻¹, respectively. This suggests that the Bent-ODA-1.0GA compound has wider and shallower pores than the Bent-ODA, and consequently, a smaller amount of pores (TEIXEIRA, COUTINHO and GOMES, 2001). The lower specific area value for the sample compound Bent-ODA-1.0GA is expected, since geranyl acetate can fill some pores of organophilic bentonite during its incorporation process, resulting in lower specific area values when compared to specific area of the Bent-ODA compound. Similar results were obtained by Rasheed et al. (2020a), who reported the reduction of the specific area from 71.55 m²·g⁻¹ to 22.37 m²·g⁻¹ after the incorporation of orange peel extract in bentonite. According to authors the addition of organic compounds caused a decrease in the specific surface area of the organophilic bentonite due to the blockage of pores and voids of clay matrix, resulting in clogged pores.

Figure 5.4b shows the pore size distribution for the compound Bent-ODA and for the compound Bent-ODA-1.0GA, in the range from 17 Å to 1450 Å determined by the BJH method. The results show the predominance of mesopores, with mean diameters of 249.60 Å and 264.1 Å, respectively. According to International Union of Pure and Applied Chemistry classification, in the context of physisorption, classify pores according to their sizes, being pores of width between 20 Å a 500 Å (2 nm and 50 nm) called mesopores (IUPAC, 1985). According to Ruthven (1984), mesopores and macropores are important for the movement of adsorbate inside the adsorbent particle, in addition, when comparing the average pore size of the adsorbents, 249.60 and 264.1 Å, to the size of the adsorbent AFB1 molecule, varies from

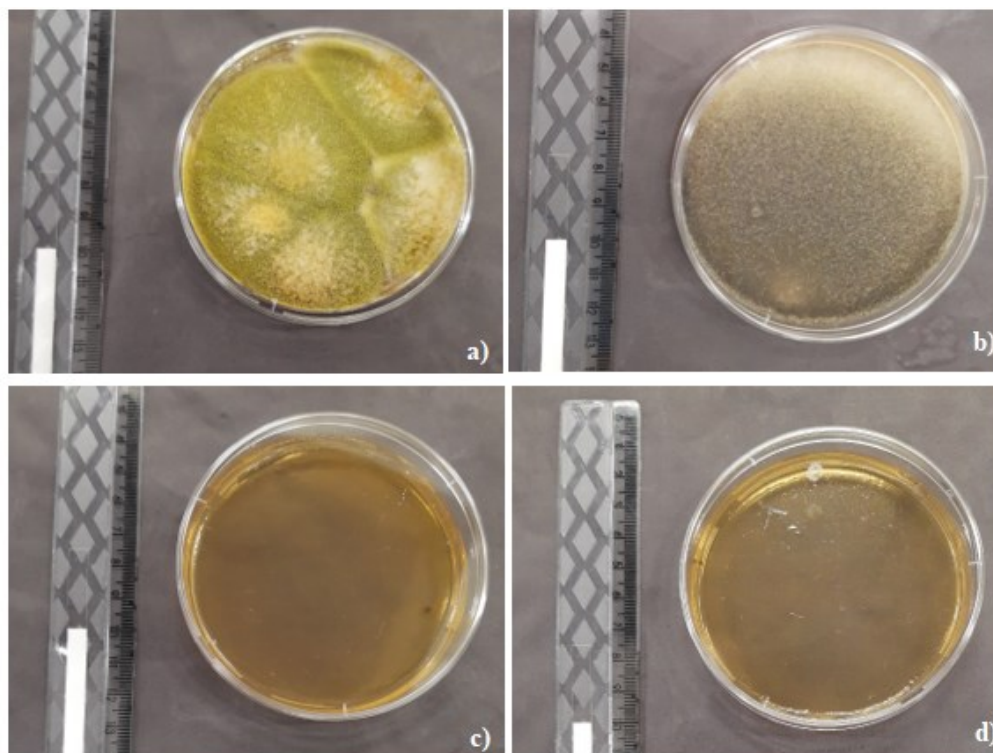
5.18 to 6.5 Å (Colella, 2007), it is very likely that AFB1 molecules will diffuse into the internal structure of the pores of Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA, since their diameter is smaller.

The pore volume was determined by BJH method being the values of $0.0790 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ and $0.0167 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, respectively for Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA, that is, a reduction of approximately 79%, possibly associated with the presence of geranyl acetate. For Rasheed et al. (2020a) the reduction in pore volume after insertion of the orange extract in the bentonite was approximately 76%, and this reduction may be associated with the presence of the extract in the bentonite, which ends up reducing both the surface area and the volume of pore.

5.3.6 Antifungal analysis

Figure 5.5 shows the antifungal results for the Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* at concentration of $10^5 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$, the fungi that producing the Aflatoxin B1.

Figure 5.9 - Antifungal results for the Bent-ODA against (a) *Aspergillus flavus* and (b) *Aspergillus niger* and for the Bent-ODA/GA against (c) *Aspergillus flavus* and (d) *Aspergillus niger*.



The Bent-ODA does not have the capacity to inhibit the growth or kill the fungal, receiving the maximum rating on the growth scale, completely filling the surface of the plate (CAPELEZZO et al., 2022). After the incorporation of the geranyl acetate there was a marked decrease in fungal cell density. When the compound Bent-ODA-1.0GA was evaluated against *Aspergillus flavus* no growth was observed and for the *Aspergillus niger* it was noticed the presence of growth traces or refers to possible contamination from the environment. The classification of each of the tested composites can be seen in Table 5.4.

Table 5.4 - Classification of fungal growth according to ASTM G21-15.

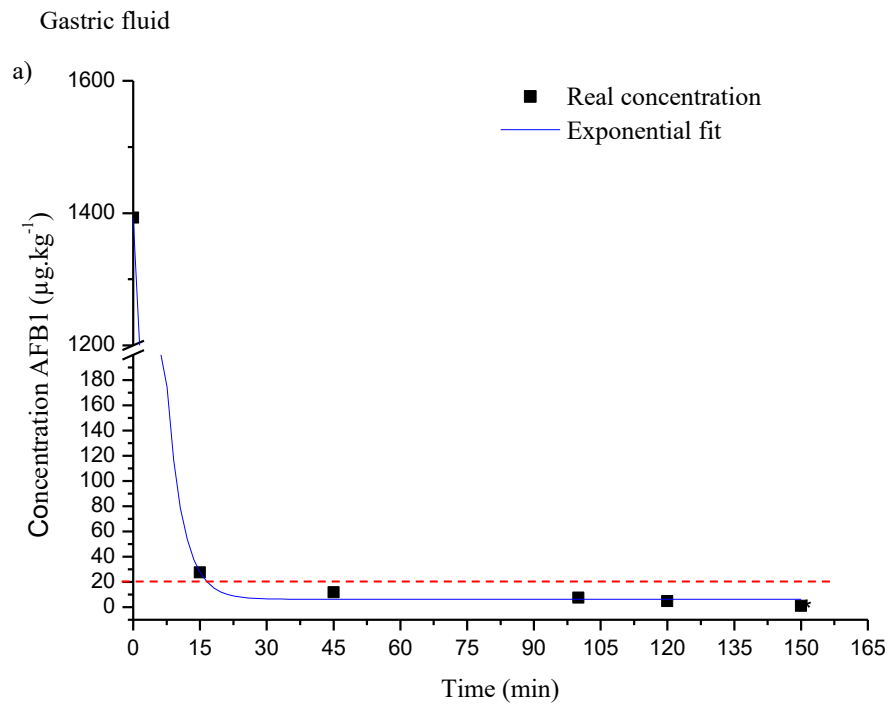
Samples	Rating	
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
Bent-ODA	4	4
Bent-ODA-1.0GA	0	1

From the results, checks that the compound Bent-ODA-1.0GA is capable of significantly inhibiting the growth and/or causing the death of Aflatoxin B1-producing fungi (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*), and according to ASTM G21-15 classification, the closer to zero the classification, the lower the fungal growth, which indicates the potential use of the material developed as an antimicrobial agent in animal feed formulations, for example. In a previous work published by Capelezzo et al. (2022) there was a similar result in relation to antifungal activity when the composite Bent-ODA-0.75GA was tested, which significantly reduced the fungal growth in relation to Bent-ODA.

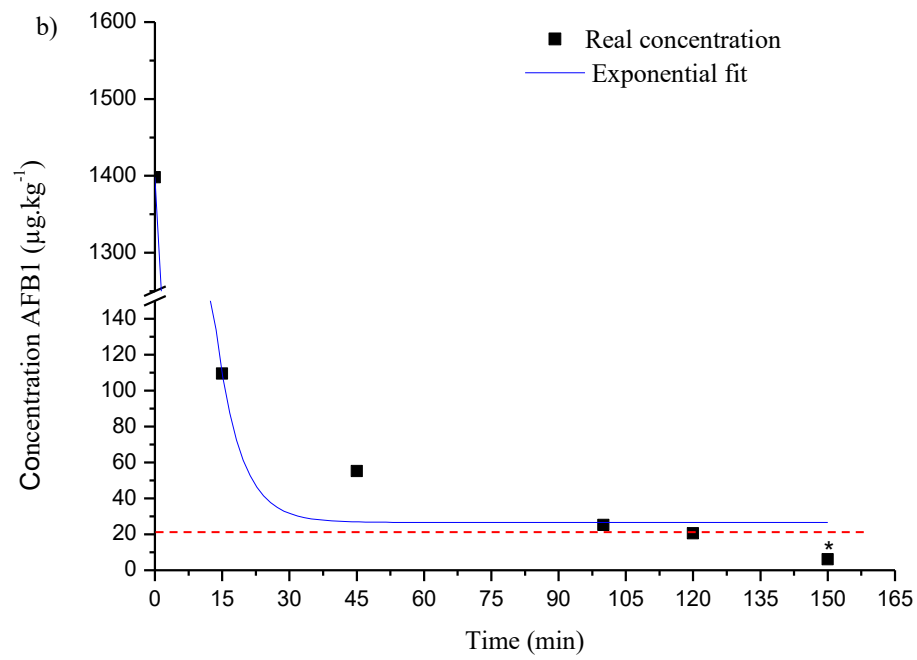
5.3.7 Adsorption experiments of the AFB1

Kinetic results of adsorption of Aflatoxin B1 by the compounds Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA are presented in curves of concentration of AFB1 in liquid phase as a function of time. The quantification of residual mycotoxins in the solutions was performed by LCMS and the results are shown in Figure 5.6.

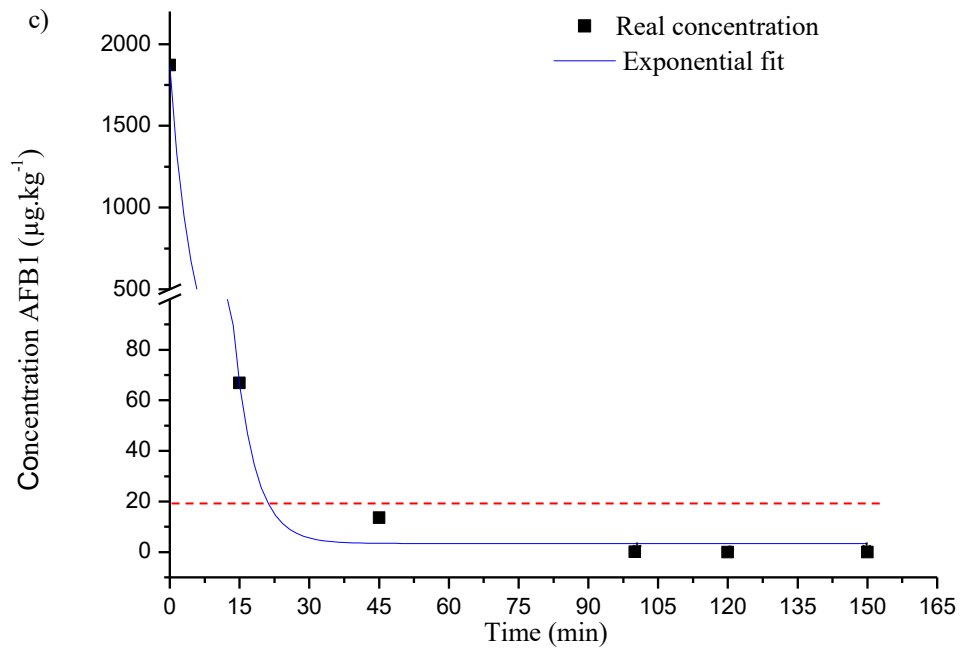
Figure 5.10 - Adsorption kinetics diagrams of AFB1 in simulated gastric ($1400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AFB1, at 41°C) and intestinal fluids ($1800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AFB1, at 41°C). a) Bent-ODA pH 3.5; b) Bent-ODA-1.0GA pH 3.5; c) Bent-ODA pH 6.5 and d) Bent-ODA-1.0GA pH 6.5.

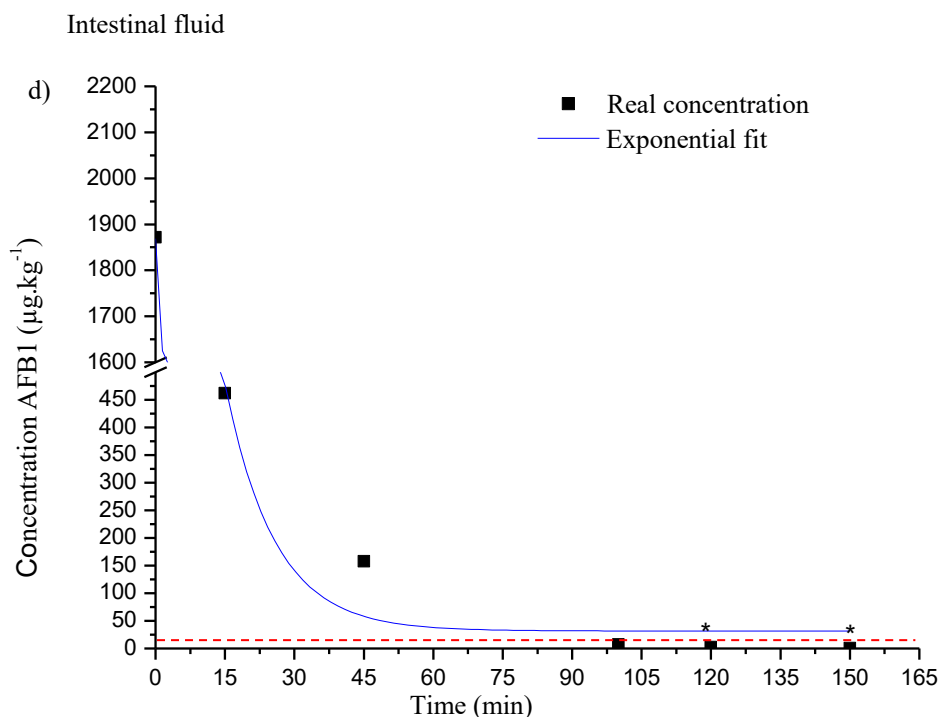


Gastric fluid



Intestinal fluid





* Estimated values

According to the results observed in Figure 5.6(a), it can be seen that with the compound Bent-ODA at pH 3.5, which simulates the pH of the stomach of chickens, and at pH 6.5, which simulates the pH of the intestine of chickens (Figure 5.6c), at 45 min the AFB1 concentration is reduced to acceptable values by the limits established by the FDA (2019), these values being below $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. With Bent-ODA-1.0GA, at pH 3.5 (Figure 5.6b) and at pH 6.5 (Figure 5.6d), the time required to define the AFB1 concentration established by the FDA (2019) was 120 min and 100 min, respectively.

Comparing the results obtained with the compound Bent-ODA and the compound Bent-ODA-1.0GA with pH 3.5, it appears that the time to reach the adsorption equilibrium was longer for the adsorbent containing geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA). The same behavior was obtained for pH 6.5. These results corroborate the values obtained for the specific area and volume of pores, indicating that after the addition of geranyl acetate to organophilic bentonite, the surface area reduces approximately 80% and the pore volume reduces 79%, which certainly influences the capacity of adsorption of AFB1 by Bent-ODA.

According to Krasilin et al. (2019) initially occurs the mass transfer of the adsorbate molecules from the bulk to the thin layer of liquid around the adsorbent surface, followed by the external diffusion of molecules to the active surface of the adsorbent, followed by the

internal diffusion to the adsorbent pore, this being the slowest step, that is, it is the one that limits the adsorption rate. Being near binding sites, according to Vila-Donat et al. (2018) several interactive forces between adsorbate-adsorbent molecules are verified and when it comes to AFB1, it can interact with the adsorbent through hydrogen bonds between its carbonyl groups and hydroxyl groups on the bentonite surface. The electron donation mechanism and electrostatic interactions between interlayer bentonite cations and AFB1 may also be a prevalent route for adsorption (BARRIENTOS-VELAZQUEZ et al., 2016).

With the Bent-ODA compound, in a medium with pH 3.5, the reduction in the concentration of AFB1 reached acceptable limits in 45 min, with a percentage reduction of 99.15%, while in the medium with pH 6.5, the reduction in the concentration of AFB1 was of 99.27% also in 45 min. Therefore, the pH did not influence the adsorption capacity of the Bent-ODA compound, which can be attributed to the presence and maintenance of strong bonds between the toxin molecules and the functional groups on the surface of the adsorbent (PALADE et al., 2021).

With the compound Bent-ODA-1.0GA, the pH value influenced the adsorption of AFB1, and with pH 3.5 in the time of 45 min the percentage of removal was 96.05%, while with pH 6.5 the removal at the same time was 91.56%. This suggests that a greater adsorption of AFB1 will take place in the animal's stomach compared to the intestine. Stomach's pH is lower than that of the intestine due to the gastric secretion of hydrochloric acid (HCl) which acts in the denaturation of proteins (facilitating their digestion). In the intestine, there is a marked increase in pH due to the duodenal secretion of alkaline bicarbonate, which will neutralize the acidity of the food bolus, ensuring the functioning of enzymes at adequate pH (KOZIOLEK et al., 2015).

According to Ma et al. (2012) the pH of the solution can significantly affect the surface functionalities and the adsorbent charges and, therefore, greatly affects the adsorption process. The reduction in adsorption efficiency at pH 6.5 for Bent-ODA-1.0GA may be due to conformational changes of the AFB1 molecule induced by pH under alkaline conditions or, eventually, it may also be a result of changes in the charge of the adsorbents themselves, also induced by the pH of the solutions (FERNANDES et al., 2019).

However, when it comes to AFB1 adsorption, the literature shows that it is not sensitive to pH variation, and the adsorption efficiencies are not affected by pH changes. For Palade et al. (2021) the optimal pH for adsorption of AFB1 using grape seed flour as adsorbent material was 5.95, however, within the pH range of 3 to 9, the adsorption of AFB1 was constant

for both adsorbents tested grape seed (GSM) and seabuckthorn (SBM) meals. For Rasheed et al. (2020b) the pH of the medium did not influence the adsorption of AFB1 using blueberry pomace as adsorbent.

The pore size must be compatible with the molecular diameter of the adsorbate for an efficient kinetic selectivity. According to Colella (2007), the kinetic diameter range of AFB1 is from 5.18 Å to 6.50 Å. Therefore, considering these conditions and the dimensions of the basal scattering of the compound Bent-ODA-1.0GA, AFB1 can be easily adsorbed, since the average diameter of the pores of the compound was greater than the diameter of the AFB1 molecule.

5.4 CONCLUSION

The batch adsorption experiments proved it as a promising adsorbent for mycotoxins sequestration. When mycotoxin producing fungi, growth was evaluated the material developed proved to be extremely efficient, since the fungal growth on the plate was less than 10%. Chemical and thermal analysis confirmed that geranyl acetate was incorporated to organophilic bentonite. The adsorption tests showed that after the incorporation of organophilic bentonite with geranyl acetate the adsorptive capacity was reduced, due to the occupation of the adsorbent pores by the ester. Furthermore, it is possible to verify that the adsorption using Bent-ODA-1.0GA is favored at low pH, which simulates the pH of the stomach. These results showed that GA was really incorporated in organophilic bentonite and the material obtained has excellent antifungal properties suggesting a potential use as raw material animal food. Thus, future prospect will be to promulgate more detailed studies about acute toxicity in vivo and different pHs release test.

Acknowledgments

This work was funded for a period by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Brazil). We also thank Unochapecó to provide its laboratory structure.

5.5 REFERENCES

- ABDELNABY, A., ABDELALEEM, N. M., ELSHEWY, E., MANSOUR, A. H., IBRAHIM, S. The efficacy of clay bentonite, date pit, and chitosan nanoparticles in the detoxification of Aflatoxin M1 and ochratoxin A from milk. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 29, p. 20305–20317, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17254-3>.
- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2021. <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2021/>.
- ALLTECH. Global Feed Survey, 2020. https://www.alltech.com/sites/default/files/GFS_Brochure_2020.pdf.
- ASAL, S., ERENTURK, S. A., HACIYAKUPOGLU, S. Bentonite based ceramic materials from a perspective of gamma-ray shielding: Preparation, characterization and performance evaluation. *Nuclear Engineering and Technology*, vol. 53, n° 5, p. 1634-1641, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.net.2020.11.009>.
- ASTM - American Society For Testing And Materials. ASTM G21-15. Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, 2015.
- BADGUJAR, K. C., BHANAGE, B. M. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: Kinetic modelling and chain length effect study. *Process Biochemistry*, vol. 49, p. 1304-1313, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.014>.
- BALAKRISHNAN, H., HUSIN, M. R., WAHIT, M. U., KADIR, M. R. A. Preparation and characterization of organically modified montmorillonite-filled high density polyethylene/hydroxyapatite nanocomposites for biomedical applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, vol. 53, p. 790–800, 2014. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.886043>.
- BARRIENTOS-VELÁZQUEZ, A. L., ARTEAGA, S., DIXON, J. B., DENG, Y. The effects of pH, pepsin, exchange cation, and vitamins on Aflatoxin adsorption on smectite in simulated gastric fluids. *Applied Clay Science*, vol. 120, p. 17-23, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.11.014>.
- BERNARDOS, A., BOZIK, M., ALVAREZ, S., SASKOVA, M., PEREZ-ESTEVE, E., KLOUCEK, P., LHOTKA, M., FRANKOVA, A., MARTINEZ-MANEZ, R. The efficacy of essential oil components loaded into montmorillonite against *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus*. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 34, p. 151–162, 2019. <https://doi.org/10.1002/ffj.3488>.
- BHAVSAR, K. V., YADAV, G. D. Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *Candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 34, p. 288–293, 2019. <https://doi.org/10.1002/ffj.3502>.

BOURKAIB, M. C., RANDRIAMALALA, H., DETTORI, L., HUMEAU, C., DELAUNAY, S., CHEVALOT, I., GUIAVARC'H, Y. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations. *Process Biochemistry*, vol. 71, p. 118-126, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria n.º 7, de 9 de novembro de 1988. Fixa padrões de tolerância para Aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias primas e rações. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1988.

CALLEGARO, R. Obtenção e caracterização de argila organofílica a partir de bentonita brasileira. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC, Florianópolis, SC, 2017.

CAPELEZZO, A. P., CELUPPI, L. C. M., CAMERINI, T., MACUVELE, D. L. P., ZEFERINO, R. C. F., MELLO, J. M. M., RIELLA, H. G., FIORI, M. A. Antimicrobial bentonite by the addition of geranyl acetate for Aflatoxin B1 adsorption. *Research, Society and Development*, vol. 11, n.º 2, e12411225647, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25647>.

CARRARO, A., DE GIACOMO, A., GIANNOSI, M. L., MEDICI, L., MUSCARELLA, M., PALAZZO, L., QUARANTA, V., SUMMA, V., TATEO, F. Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M1 from contaminated milk and effects on milk quality. *Applied clay science*, vol. 88-89, p. 92–99, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.028>.

COLELLA, C. Recent advances in natural zeolite applications based on external surface interaction with cations and molecules. *Studies in Surface Science and Catalysis*, vol. 170, p. 2063-2073, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(07\)81100-1](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(07)81100-1).

CORRÊA, L. S., HENRIQUES, R. O., RIOS, J. V., LERIN, L. A., OLIVEIRA, D., FURIGO JR, A. Lipase-catalyzed esterification of geraniol and citronellol for the synthesis of terpenic esters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03102-1>.

DAKOVIC, A., MATIJASEVIC, S., ROTTINGHAUS, G. E., LEDOUX, D. R., BUTKERAITIS, P., SEKULIC, Z. Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 66, p. 20–25, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.008>.

DAKOVIC, A., KRAGOVIC, M., ROTTINGHAUS, G. E., LEDOUX, D. R., BUTKERAITIS, P., VOJISLAVLJEVIC, D. Z., ZARIC, S. D., STAMENIC, L. Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as Aflatoxin B1 adsorbent. *Materials Chemistry and Physics*, vol. 137, p. 213-220, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.09.010>.

DURÁN, E., BUENO, S., HERMOSÍN, M. C., COX, L., GÁMIZ, B. Optimizing a low added value bentonite as adsorbent material to remove pesticides from water. *Science of the Total Environment*, vol. 672, p. 743-751, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.014>.

EL-SHARKAWY, R. M., ALLAM, E. A., EL-TAHER, A., ELSAMAN, R., MASSOUD, E. E. S., MAHMOUD, M. E. Synergistic effects on gamma-ray shielding by novel light-weight nanocomposite materials of bentonite containing nano Bi₂O₃ additive. *Ceramics International*, col. 48, n° 5, p. 7291-7303, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.11.290>.

European Union Commission. Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. European Union Commission Regulations. *Off. J. Eur. Union*, vol. 50, p. 8–12, 2010. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/165/oj>.

FAVERO, J. S., SANTOS, V., WEISS-ANGELI, V., GOMES, L. B., VERAS, D. G., DANI, N., MEXIAS, A. S., BERGMANN, C. P. Evaluation and characterization of Melo Bentonite clay for cosmetic applications. *Applied Clay Science*, vol. 175, p. 40-46, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.04.004>.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Action levels for Aflatoxins in Animal Food. 2019. <https://www.fda.gov/media/121202/download>.

FERNANDES, J-M., CALADO, T., GUIMARÃES, A., RODRIGUES, M. A M., ABRUNHOSA, L. In vitro adsorption of Aflatoxin B1, Ochratoxin A, and Zearalenone by micronized grape stems and olive pomace in buffer solutions. *Mycotoxin Research*, vol. 35, p. 243–252, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00349-9>.

GAN, F., HANG, X., HUANG, Q., DENG, Y. Assessing and modifying China bentonites for aflatoxin adsorption. *Applied Clay Science*, vol. 168, p. 348–354, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.12.001>.

GHAZALAH, A. A., ABD-ELSAMEE, M. O., MOUSTAFA, K. E. M. E., KHATTAB, M. A., REHAN, A-E. A. A. Effect of nanosilica and bentonite as mycotoxins adsorbent agent in broiler chickens' diet on growth performance and hepatic histopathology. *Animals*, vol. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11072129>.

GONÇALVES, M. J., CRUZ, M. T., TAVARES, A. C., CAVALEIRO, C., LOPES, M. C., CANHOTO, J., SALGUEIRO, L. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, vol. 35, p. 166– 171, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030>.

GRANIZO, N., VEGA, J. M., DÍAZ, I., CHICO, B., DE LA FUENTE, D., MORCILLO, M. Paint systems formulated with ion-exchange pigments applied on carbon steel: Effect of surface preparation. *Progress in Organic Coatings*, vol. 70, n° 4, p. 394-400, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2010.09.035>.

GUPTA, P., TANEJA, S. C., SHAH, B. C. A. C., SETHI, V. K., QAZI, G. N. Lipase-catalysed separation of geometrical isomers: geraniol-nerol. *Chemistry Letters*, vol. 36, p. 1110–1111, 2007. <https://doi.org/10.1246/cl.2007.1110>.

GUPTA, A., DHAKATE, S. R., PAHWA, M., SINHA, S., CHAND, S., MATHUR, R. B. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. *Process Biochemistry*, vol. 48, p. 124-132, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.028>.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Reporting physisorption data for gas/solid systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 57, n° 4, pp. 603–619, 1985. <http://publications.iupac.org/pac/pdf/1985/pdf/5704x0603.pdf>.

JALILI, M. A review on aflatoxins reduction in food. *Iranian Journal of Health, Safety and Environment*, vol. 3, p. 445–459, 2016. e-ISSN: :2345-5535.

JARD, G., LIBOZ, T., MATHIEU, F., GUYONVARCH, A., LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Journal Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 28, n° 11, 2011. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>.

JAYNES, W. F., ZARTMAN, R. E., HUDNALL, W. H. Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. *Applied Clay Science*, vol. 36, p. 197–205, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.012>.

KALAV, B., GÖCEK, I., KAYAOĞLU, B. K. Effect of hydrophilic bentonite as a filler on curing performance of pigmented UV curable polyurethane acrylate coating. *Fibers and Polymers*, vol. 22, n° 7, p. 1800-1809, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12221-021-0315-4>.

KHAN, M., HAMEED, M., HUSSAIN, T., KHAN, A., JAVED, I., AHMAD, I., HUSSAIN, A., SALEEMI, M., ISLAM, N. Aflatoxin residues in tissues of healthy and sick broiler birds at market age in Pakistan: A one-year study. *Pakistan Veterinary Journal*, vol. 33, p. 423–427, 2013. ISSN: 0253-8318.

KHANSILI, N., KRISHNA, P. M. Curcumin functionalized TiO₂ modified bentonite clay nanostructure for colorimetric Aflatoxin B1 detection in peanut and corn. *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 35, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100480>.

KOOSHA, M., HAMED, S. Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties. *Progress in Organic Coatings*, vol. 127, p. 338-347, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.11.028>.

KOZIOLEK, M., GRIMM, M., BECKER, D., IORDANOV, V., ZOU, H., SHIMIZU, J., WANKE, C., GARBACZ, G., WEITSCHIES, W. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the intellicap[®] system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, p. 2855–2863, 2015. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jps.24274>.

KRASILIN, A. A., DANILOVICH, D. P., YUDINA, E. B., BRUYERE, S., GHANBAJA, J., IVANOV, V. K. Crystal violet adsorption by oppositely twisted heat-treated halloysite and peccoraite nanoscrolls. *Applied Clay Science*, vol. 173, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.03.007>.

IAMAREERAT, B., SINGH, M., SADIQ, M. B., ANAL, A. K. Reinforced cassava starch based edible film incorporated with essential oil and sodium bentonite nanoclay as food

packaging material. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 55, n° 5, p. 1953–1959, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3100-7>.

LEITE, I. F., RAPOSO, C. M. O., SILVA, S. M. L. Caracterização estrutural de argilas bentoníticas nacional e importada: antes e após o processo de organofilização para utilização como nanocargas. *Cerâmica*, vol. 54, p. 303-308, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132008000300006>.

LI, Y., TIAN, G., DONG, G., BAI, S., HAN, X., LIANG, J., MENG, J., ZHANG, H. Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. *Applied Clay Science*, vol. 163, p. 299–311, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.032>.

LIU., XIE, S., LIAO, J., YAN, T., LIU, T., TANG, X. Novel graphene oxide/bentonite composite for uranium (VI) adsorption from aqueous solution. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 317, p. 1349–1360, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10967-018-5992-0>.

MA, J., YU, F., ZHOU, L., JIN, L., YANG, M., LUAN, J., TANG, Y., FAN, H., YUAN, Z., CHEN, J. Enhanced adsorptive removal of methyl orange and methylene blue from aqueous solution by alkali-activated multiwalled carbon nanotubes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 4, n° 11, p. 5749-5760, 2012. <https://doi.org/10.1021/am301053m>.

MACUVELE, D. L. P., NONES, J., MATSINHE, J. V., BEZERRA A. T., LIMA M. M., SANTOS E. S. W., FIORI M. A., RIELLA H. G. Simultaneous effect of reaction temperature and concentration of surfactant in organo-bentonite synthesis. *Materials Science Forum*, vol. 899, p. 42-47, 2017. [10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42).

MACUVELE, D. L. P. Compósito de polietileno de ultra alto peso molecular reforçado com hidroxiapatita e bentonita organofílica para aplicações biomédicas. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2018.

MACUVELE, D. L. P., COLLA, G., CESCO, K., RIBEIRO, L. F. B., COSTA, C. E., NONES, J., BREITENBACH, E. R., PORTO, L. M., SOARES, C., FIORI, M. A., RIELLA, H. G. UHMWPE/HA biocomposite compatibilized by organophilic montmorillonite: An evaluation of the mechanical-tribological properties and its hemocompatibility and performance in simulated blood fluid. *Materials Science & Engineering C*, vol. 100, p. 411-423, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.102>.

MASSINGA JR., P. H., FOCKE, W. W., VAAL, P. L., ATANASOVA, M. Alkyl ammonium intercalation of Mozambican bentonite. *Applied Clay Science*, vol. 49, n° 3, p. 142-148, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.04.017>.

MATEI, S., STOICANESCU, M., BELA, V., TIRON, E., CRISAN, A. Bentonite-based composites with ceramic and metallic powders additions for use as filters. *Advances in Mechanical Engineering*, vol. 13, n° 4, p. 1–15, 2021. <https://doi.org/10.1177/16878140211011888>.

MONTEIRO, M. K. S., OLIVEIRA, V. R. L., SANTOS, F. K. G., BARROS NETO, E. L., LEITE, R. H. L., AROUCHA, E. M. M., SILVA, R. R., SILVA, K. N. O. Incorporation of bentonite clay in cassava starch films for the reduction of water vapor permeability. *Food Research International*, vol. 105, p. 637-644, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.030>.

NONES, J., NONES, J., RIELLA, H. G., POLI, A., TRENTIN, A. G., KUHNEN, N. C. Thermal treatment of bentonite reduces Aflatoxin B1 adsorption and affects stem cell death. *Materials Science and Engineering C*, vol. 55, p. 530–537, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.069>. a

NONES, J., NONES, J., RIELLA, H. G., KUHNEN, N. C., TRENTIN, A. Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by Aflatoxin B1. *Applied Clay Science*, vol. 104, p. 119–127, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.11.018>. b

NONES, J., NONES, J., POLI, A., TRENTIN, A. G., RIELLA, H. G., KUHNEN, N. C. Organophilic treatments of bentonite increase the adsorption of Aflatoxin B1 and protect stem cells against cellular damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 145, p. 555–561, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.061>.

NONES, J., SOLHAUG, A., ERIKSEN, G. S., MACUVELE, D. L. P., POLI, A., SOARES, C., TRENTIN, A. G., RIELLA, H. G., NONES, J. 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*, vol. 337, p. 80–89, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.068>.

OLIVEIRA, S.V., ALVES, G. P., WANDERLEY, A. S. D., ARAÚJO, E. M. Influência de um sal quaternário de amônio na organofilização de uma argila bentonítica. 55º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Porto de Galinhas, PE, Brasil, 2011.

PALADE, L. M., DORE, M. I., MARIN, D. E., ROTAR, M. C., TARANU, I. Assessment of Food By-Products' Potential for simultaneous binding of Aflatoxin B1 and Zearalenone. *Toxins*, vol. 13, nº 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13010002>.

PASHA, T. N., FAROOQ, M. U., KHATTAK, F. M., JABBAR, M. A., KHAN A. D. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as Aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 132, p. 103–110, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.014>.

PAPPAS, A. C., TSIPLAKOU, E., GEORGIADOU, M., ANAGNOSTOPOULOS, C., MARKOGLU, A. N., LIAPIS, K., ZERVAS, G. Bentonite binders in the presence of mycotoxins: Results of in vitro preliminary tests and an in vivo broiler trial. *Applied Clay Science*, vol. 99, p. 48-53, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.06.009>.

RASHEED, U., UL AIN, Q., YASEEN, M., FAN, X., YAO, X., TONG, Z., LIU, B. Modification of bentonite with orange peels extract and its application as mycotoxins' binder in buffered solutions and simulated gastrointestinal fluids. *Journal of Cleaner Production*, vol. 267, 122105, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122105>. a

RASHEED, U., UL AIN, Q., YASEEN, M., SANTRA, S., YAO, X., LIU, B. Assessing the Aflatoxins mitigation efficacy of blueberry pomace biosorbent in buffer, gastrointestinal fluids and model wine. *Toxins*, vol. 12, n° 7, 2020. <https://doi.org/10.3390/toxins12070466>.b

ROSA, B. H., SILVA, G. S., CONCEIÇÃO, G. J. A., CARVALHO, R. A., AGUIAR-OLIVEIRA, E., MALDONADO, R. R., KAMIMURA, E. S. Application of partially concentrated *Candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 12, p. 90–95, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.005>.

ROSÁRIO, J. A., CECHINEL, M. A. P., OLIVEIRA, C. M., DE NONI, A., PETERSON, M., KUHNEN, N. C., RIELLA, H. G. Influence of sodium pretreatments on the preparation of Ag-doped polycationic bentonite for antibacterial purposes. *Bulletin of Materials Science*, vol. 43:106, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12034-020-02085-8>.

RUTHVEN, D. M. Principles of Adsorption and Adsorption Process. John Wiley & Sons: New York, 1984; p 432.

SAEED, M., FAROOQ, K., NAFEEES, M., ARSHAD, M., AKHTER, M. S., WASEEM, A. Green and eco-friendly removal of mycotoxins with organo-bentonites; isothermal, kinetic, and thermodynamic studies. *Clean – soil, air, water*, vol. 48, n° 9, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.1002/clen.201900427>.

SANTOS, R. R., VERMEULEN, S., HARITOVA, A., FINK-GREMMELS, J. Isotherm modeling of organic activated bentonite and humic acid polymer used as mycotoxin adsorbents. *Food Additives and Contaminants*, vol. 28, n° 11, p. 1578–1589, 2011. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.595014>.

SENTURK, S., KARACA, H. First report on the presence of Aflatoxins in fig seed oil and the efficacy of adsorbents in reducing Aflatoxin levels in aqueous and oily media. *Toxin Reviews*, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1937226>.

SILVA, L. A. Desenvolvimento do processo de obtenção da bentonita organofílica de Moçambique: síntese e caracterização. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC – SC, Florianópolis, 2010.

TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. *Química Nova*, vol. 24, n° 6, p. 808-818, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000600019>.

VILA-DONAT, P., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 114, p. 246-259, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>.

VILA-DONAT, P., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. New mycotoxin adsorbents based on tri-octahedral bentonites for animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, vo. 255, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114228>.

WANG, M., HEARON, S. E., PHILLIPS, T. D. A high capacity bentonite clay for the sorption of aflatoxins. *Food Additives & Contaminants: PART A*, vol. 37, nº 2, p. 332-341, 2019. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1662493>.

ZAHOOR, M., KHAN, F. A. Adsorption of Aflatoxin B1 on magnetic carbon nanocomposites prepared from bagasse. *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 11, nº 5, p. 729-738, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.025>.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 15, p. 129-144, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>.

ZANETTI, M., CARNIEL, T. K., DALCANTON, F., DOS ANJOS, R. S., RIELLA, H. C., DE ARAÚJO, P. H. H., DE OLIVEIRA, J. V., DE OLIVEIRA, D., FIORI, M. A. Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 81, p. 51-60, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.003>.

ZEFERINO, R. C. F. Síntese de acetato de geranila e acetato de nerila via catálise heterogênea com resina de troca iônica e caracterização dos ésteres para potenciais aplicações como aditivos antimicrobianos. 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2021.

ZEFERINO, R. C. F., PIAIA, V. A. A., ORSO, V. T., PINHEIRO, V. M., ZANETTI, M., COLPANI, G. L., PADOIN, N., SOARES, C., FIORI, M. A., RIELLA, H. G. Synthesis of geranyl acetate by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 168, p. 156-168, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.01.031>.

ZHANG, W., ZHANG, L. Y., JIANG, X., LIU, X., LI, Y., ZHANG, Y. G. Enhanced adsorption removal of Aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol from dairy cow rumen fluid by modified nano-montmorillonite and evaluation of its mechanism. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 259, p. 1–13, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114366>.

CAPÍTULO 6

O trabalho intitulado “**Acute toxicity study of antibacterial organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate in mice and geranyl acetate liberation in different pHs**”, foi submetido a uma revista científica e está sob avaliação.

Abstract

Bentonite is a clay mineral widely used in rations due to its ability to adsorb mycotoxins, as well as its properties, possibility of incorporation and its non-toxicity. Geranyl acetate is an effective antimicrobial agent, which has compatibility with bentonite, allowing the development of an adsorbent and antimicrobial composite with potential application as a raw material for animal feed. In the present study, the antibacterial property of the organophilic bentonite (Bent-ODA) and organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate (Bent-ODA-1.0GA) was evaluated against Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*, Gram-negative bacterium *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Oral acute toxicity of Bent-ODA-1.0GA was evaluated in mice, by a single oral dose of 300 and 2000 mg·kg⁻¹. Animals were observed individually for any toxicity clinical signs or mortality for 15 days according OECD 423 guideline. The release assay of geranyl acetate presents in organophilic bentonite in different pHs, pH 3.5 (simulates stomach pH) and pH 6.5 (simulates intestinal pH) was also performed. Bent-ODA-1.0GA composite presented antibacterial activity against *S. aureus* and *S. typhimurium* bacteria with 10.7±0.6 mm and 2.2±0.1 mm inhibition halo, respectively, which make it possible to associate the composite antimicrobial feature due to the ester presence. No inhibition zone was detected for *E. coli* bacterium which can be explained by the greater resistance of Gram-negative bacteria when compared to Gram-positive ones. For acute toxicity treatment, the composite did not reveal any toxicity signs or mortality in any animal, during the 15 days observation period. The LD₅₀ of Bent-ODA-1.0GA was estimated to be greater than 2000 mg·kg⁻¹. The compound was classified in hazard category 5 (test substances which are of relatively low acute toxicity hazard but which, under certain circumstances may present a danger to vulnerable populations). Additionally, it was also observed that geranyl acetate is released from organophilic bentonite in concentrations lower than 0.03 mg·kg⁻¹ for pH 3.5 and 0.004 mg·kg⁻¹ for pH 6.5, being these concentrations lower than those that could cause some toxic effect in animals.

Keywords: Antibacterial activity; Low toxicity material; Stability in simulated gastric fluid.

6.1 INTRODUCTION

The bentonite addition to feed is a readily available and effective method of reducing concentration of mycotoxins, as these can destroy or reduce the nutritional value and palatability of feed, causing animals to refuse to eat, grow slowly, get sick easily and cause death in more severe cases (JAYNES and ZARTMAN, 2011; CHKUASELI et al., 2016; PAPPAS et al., 2016; HASSAN et al., 2019; PEREIRA, CUNHA and FERNANDES, 2019; GHAZALAH et al., 2021; MARROQUÍN-CARDONA et al., 2022). Approximately 25-50% of cereal-based products produced globally are contaminated with mycotoxins in several degrees and 5-10% of contaminated products are unrecoverable, resulting in significant economic losses (KANORA and MAES, 2009; ABRUNHOSA et al., 2016).

Bentonites are formed by highly plastic colloidal clays, consisting mainly of montmorillonite (Mt), a clay mineral of the smectite group, which may have a variable composition of quartz, feldspar, muscovite, calcite, kaolinite, illite and mica. They are produced by weathering and devitrification of glassy materials of volcanic origin. They have a 2:1 configuration, with two silicate tetrahedra compressing an aluminum-oxygen octahedron (DAKOVIC et al., 2008; NONES et al., 2015; ZHU et al., 2016; LIU et al., 2021).

This clay mineral is widely used due to its characteristics such as cation exchange power, chemical inertness, non-toxicity, availability, thermal stability, it has interesting physicochemical and rheological properties and is economically viable (PARK et al., 2016; ALEXANDER et al., 2019; MARROQUÍN-CARDONA et al., 2022). Due to this possibility of cationic exchange, bentonite can undergo a process called organophilization, when inorganic clays are transformed into organophilic clays, causing their natural inorganic cations to be exchanged in the presence of water for organic cations, which are contained in quaternary ammonium salts, a process that increases the lamellar space of the bentonite and enhances its adsorbent characteristic.

In addition, another interesting feature of this material is the possibility of impregnation for the most diverse purposes with inorganic antimicrobial compounds, such as silver and zinc, which are well established in the literature (Santos et al., 2011; Pourabolghasem, Ghorbanpour and Shayegh, 2016; Nones et al., 2017; Taaca, Dahonog and Olegario 2019;

Rosário et al., 2020; Martsouka et al., 2021) and organic compounds, such as those found in essential oils (BERNARDOS et al., 2019; FERNÁNDEZ et al., 2020).

However, there is a gap in studies that use organic compounds, especially esters that can be obtained under controlled laboratory conditions, showing high purity, non-toxicity and associated antimicrobial activity (U.S. Department of Health and Human Services of National Institute of Environmental Health Sciences, 1987; ZEFERINO et al., 2021).

Geranyl acetate is an organic compound belonging to the group of esters, in liquid form, with a slight light-yellow color. It has a molecular formula $C_{12}H_{20}O_2$, a molar mass of $196.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, a relative density of 0.907 and a boiling point of $245 \text{ }^\circ\text{C}$. It is soluble in various organic solvents such as alcohol and ether and insoluble in glycerol and water (PUBCHEM, 2019).

It is widely used in the food industry mainly due to its organoleptic properties, classified as an edible flavoring, it also has effective antimicrobial activity against a wide range of microorganisms (ROSA et al., 2017; MURCIA et al., 2018; BOURKAIB et al., 2018; BHAVSAR and YADAV, 2019; ZEFERINO et al., 2021).

Capelezzo et al. (2022) attested in their work the antifungal activity of a composite based on organophilic bentonite and geranyl acetate (Bent-ODA-0.75GA) against *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*, potential producers of Aflatoxins. Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 stand out for their toxicity, with Aflatoxin B1 being potentially carcinogenic. The authors also indicated that this material is effective when used for the adsorption of Aflatoxin B1 in an aqueous medium.

Thus, the proposal of this work is extremely relevant since it explores the potential application of the composite developed as a raw material for the production of animal feed, being able to eliminate Aflatoxin B1 producing fungi and also, if these are produced under adverse conditions, this material acts effectively as an adsorbent, reducing the concentration of mycotoxin available in the medium.

Seeking this possible application, this work aims to study the antibacterial activity, the acute toxicity in vivo, as well as to evaluate the release of geranyl acetate present in organophilic bentonite when exposed to different pHs.

6.2 MATERIALS AND METHODS

6.2.1 Composite preparation

Bentonite samples were collected from a Boane deposit in Mozambique, with cation exchange capacity (CEC) of $67.53 \text{ meq}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ determined by Silva (2010). The samples were washed with distilled water to remove any impurities, stirred for 24 h at a speed of 180 rpm on a shaker bench (Dist, DST 01) and were dried in an electric oven at $90 \text{ }^\circ\text{C}\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h (Logen, LSDHG-9140A).

The bentonite was submitted to the organophilization process according to the methodology described by Macuvele et al. (2017). An octadecylammonium (ODA) suspension was used at a concentration of $85 \text{ mmol}\cdot 100\text{g}^{-1}$ of bentonite. The mixture was heated to a temperature of $60\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h on a magnetic stirrer with heating (Quimis, Q261). After organophilization, the compost was washed with ultrapure water, repeatedly, in order to remove any residual traces of ODA, and then vacuum filtered (Logen, PCP1312VC), being dried in an oven at $80\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. This compound was called Bent-ODA.

The geranyl acetate ester was incorporated into organophilic bentonite ($0.4 \text{ g ester}\cdot \text{g bentonite}^{-1}$) using acetone as solvent, this material being called Bent-ODA-1.0GA. The mixture was kept under stirring for 24 h using a shaker at 180 rpm, at a room temperature of approximately $25\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. After this mixing period, the samples were dried in an oven at $50\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. This material was de-agglomerated using mortar and then stored in a closed vial.

6.2.2 Antibacterial activity

The antibacterial activity of Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA was evaluated for the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and for the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 35218) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), according to methodologies previously described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). For inoculum preparation, the bacterial colonies selected were transferred to a sterile 0.9% saline. The solution turbidity was adjusted using a Spectrophotometer (Merck, Pharo 300 Spectroquant[®]) with a wavelength reading of 619 nm, yielding the equivalent concentration of about $10^4 \text{ UFC}\cdot \text{mL}^{-1}$.

In this technique, we seeded the microorganism of interest in Petri dishes with a culture medium Plate Count Agar (PCA) using a swab. Three equidistant holes were made in each plate, with 8.0 mm diameter approximately. In each hole was deposited a composite and incubated at 36 ± 1 °C for 24 h. This antimicrobial analysis was performed in triplicate and the diameters of the inhibition halos were measured and associated with the antimicrobial actions according Equation 6.1, in methodology proposed by Fiori et al. (2009). The inhibition halos diameter measurements were subjected to the Tukey test in order to assess the significant differences existence at the 5% significance level ($p < 0.05$).

$$D_{\text{bac}} = D_{\text{ex}} - D_{\text{in}} \quad (6.1)$$

where D_{bac} is the sum of the bactericide diameters and represents the bactericide action of the materials, D_{ex} is the inhibition halo diameter of the microorganism and the D_{in} is the diameter occupied by the compound.

6.2.3 In Vivo Assays

6.2.3.1 Animals

Female (nulliparous) Swiss mice (25–35 g) from Unochapecó bioterium (Chapecó - SC) were used. Animals were housed in groups of three mice in plastic cages (28.0×12.5×19.0 cm) at constant room temperature (21 ± 2 °C) and humidity (40,0–60,0%), under a 12 h light/dark cycle with free access to food (Nuvilab[®]) and water ad libitum. Experiments were approved by Animal Care Local Ethical Committee (CEUA UNOCHAPECÓ; Protocols #015/2021 and #002/2022). Animal care and experiments were conducted in accordance with Brazilian law (BRAZIL, 2008) and National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, 2018).

6.2.3.2 Treatments

The solubilization of the developed bentonite and geranyl acetate composite (Bent-ODA-1.0GA) was carried out in vehicle (1% DMSO solution in distilled water) and ultrasound at 40 °C for 30 min. In the acute toxicity studies, the Bent-ODA-1.0GA was orally administered

to mice at a dosage of 300 mg·kg⁻¹ (n=6) and 2000mg·kg⁻¹ (n=6) and vehicle (n=6). All treatments respected the administration of 10 mL·kg⁻¹ body weight. The euthanasia was performed with thiopental sodium (50 mg·kg⁻¹, intraperitoneal - i.p.) preceded by hydrochloride lidocaine (10 mg·kg⁻¹, i.p.) (CONCEA, 2018).

6.2.3.3 Acute Toxicity

The toxicity studies were based on the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The acute oral toxicity studies were performed according to Guideline 423 (OECD, 2001). These OECD guidelines are the worldwide reference for chemical testing.

Regarding the acute toxicity test (OECD 423), female mice received a single Bent-ODA-1.0GA dose (300 mg·kg⁻¹, oral administration: Gavage - p. o. and 2000 mg·kg⁻¹, p. o.). The animals were fasted before administration (food but not water was withheld for 1 h). After the administration, animals were observed with special attention during the first 4 h and 12 h later, and every day for 15 days.

The body weight gain and food intake were registered every two days during the experimental period. Observations of the abnormal behavior of female mice such as piloerection, muscular tonus, abdominal writhing, palpebral ptosis, motor activity, hypothermia, shacking, posterior paw paralysis, salivation, bronchial secretion, lethargy, diarrhea, and convulsions were considered. Moreover, the number of deaths was registered.

The organs (brain, heart, thymus, spleen, adrenals glands, kidney, and liver) were removed (after the acute study) and weighed for statistical analysis. The relative organ weight was calculated considering the body weight of the mouse by using the following Equation 6.2.

$$\text{Relative organ weight (\%)} = \frac{\text{organ weight} \times 100}{\text{mouse body weight}} \quad (6.2)$$

6.2.3.4 Statistical Analysis

It was used two-way ANOVA with repeated measures to assess the mice's relative body weight and food intake. Relative organ weight results were analyzed by one-way ANOVA. Tukey's post hoc test was used in all analyses. Data were expressed as mean±SD. The significance level adopted was p < 0.05 GraphPad Prism[®] 8.0.1 software (GraphPad Software Inc, USA) was used to perform the statistical analyses.

6.2.4 Geranyl acetate release

Considering that the composite developed may be used as a raw material for the ration intended for poultry feeding, it was necessary to confirm if the geranyl acetate could be released from the organophilic bentonite, and consequently access the biological matrix. The release assay of geranyl acetate from organophilic bentonite was carried out at pH 3.5 (equivalent to the stomach condition) and pH 6.5 (equivalent to the intestine condition), both pH values being adjusted with $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH or HCl solutions.

According to the literature, the chickens average weight ready for slaughter is 3 kg, and in the adult phase they consume about 120 g of feed per day and the stomach secretes around 8.8 mL of gastric juice per kilogram per hour and considering that up to 0.5% (w/w) of raw bentonite is incorporated into the feed, and a correction factor is calculated after the insertion of geranyl acetate into the bentonite due to the reduction in the adsorptive capacity, a concentration of Bent-ODA-1.0GA of $1 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was stipulated (BANKS, 1992; SOUZA, 2003; LOPES et al., 2006; LUPATINI, 2015).

To determine the geranyl acetate absorption wavelength, 1.5 mL of this standard (Sigma Aldrich, purity $\geq 97\%$) together with 1.5 mL of a mixture of acetone:aqueous solution pH 3.5 (1:0.77 v/v) were placed in a glass cuvette with an optical path of 10 mm and scanned between wavelength from 200 to 800 nm in a spectrophotometer (Merck, Pharo 300 Spectroquant®). The same procedure was performed for pH 6.5 solution which simulates intestine's pH.

The amount of geranyl acetate released was investigated by UV-vis spectroscopy (Pereira et al., 2022) at $\lambda = 314 \text{ nm}$, using a calibration curve with $R^2 = 0.9845$ and obtained for the concentration range between $0.03 - 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at pH 3.5 and using a calibration curve with $R^2 = 0.9935$ and obtained for the concentration range between $0.004 - 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at pH 6.5.

The assay for the release of geranyl acetate present in organophilic bentonite was carried out by weighing 0.25 g of Bent-ODA-1.0GA disposed in 250 mL aqueous solution pH 3.5 that simulates the pH of the stomach, at a temperature of $41 \text{ }^\circ\text{C}$ which simulates the body temperature of adult poultry (Welker et al., 2008). Erlenmeyer flasks were shaken (Solab Cientifica, SL-222) at 150 rpm and 3 mL aliquots of the supernatant were removed at times 0, 1, 2, 3, 18, 24, 27, 48, 51, 72 and 75 h, being this assay performed in duplicate. The collected

samples were placed in Falcon tubes and centrifuged using a centrifuge (Fanen, Baby® I 206-BL) at 5000 rpm for 15 min and analyzed in a spectrophotometer at a wavelength of 314 nm. The same was done for pH 6.5, which simulates the pH of the intestine.

6.3 RESULTS AND DISCUSSION

6.3.1 Antibacterial analysis

The results of the Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA antimicrobial activity test evaluated by the diffusion technique in solid media can be seen in Figure 6.1 and the inhibition zones in Table 6.1.

Figure 6.1 - Diffusion in solid medium for Bent-ODA against (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Escherichia coli* and (c) *Salmonella typhimurium* bacteria and for Bent-ODA-1.0GA against (d) *Staphylococcus aureus*, (e) *Escherichia coli* and (f) *Salmonella typhimurium* bacteria, with inoculum 10^4 CFU·mL⁻¹.

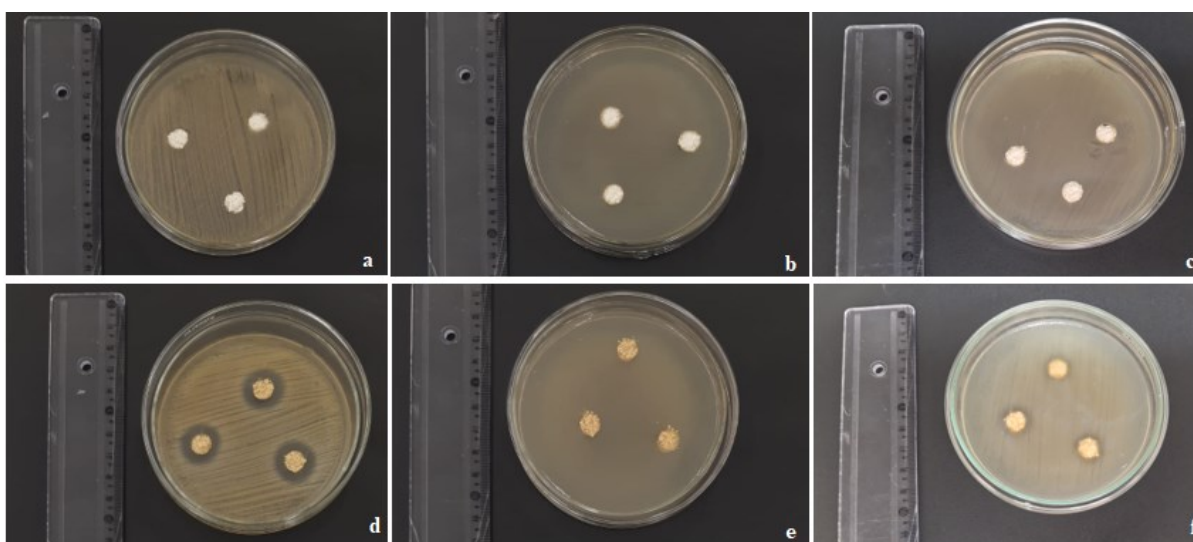


Table 6.1 - Mean values of Inhibition halo generated by the Bent-ODA and Bent-ODA-1.0GA, from the diffusion test in solid medium against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.

Samples	Mean values (\pm standard deviation) of the inhibition halo (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
Bent-ODA	0.0 \pm 0.0 ^{Aa}	0,0 \pm 0.0 ^{Aa}	0.0 \pm 0.0 ^{Aa}
Bent-ODA-1.0GA	10.7 \pm 0.6 ^{Ba}	0,0 \pm 0.0 ^{Ab}	2.2 \pm 0.1 ^{Cc}

* Equal lowercase letters represent that there are no significant differences between rows ($p < 0.05$) and equal uppercase letters represent that there are no significant differences between columns ($p < 0.05$).

It is possible observe that with the Bent-ODA compound no formed inhibition halo for the bacteria tested, an expected microbiological result considering that bentonite and ODA do not present antibacterial activity and that the organophilization process does not change this characteristic (CAPELEZZO et al., 2022). These results are in agreement with those reported by Cabuk, Alan and Unal (2017), who tested the antibacterial activity of a sodium bentonite against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, at 1×10^8 CFU·mL⁻¹ concentration, and did not observe the inhibition halos formation for any of the microorganisms studied.

With the geranyl acetate addition in organophilic bentonite (Bent-ODA-1.0GA), the inhibition halos formed for the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative bacterium *Salmonella typhimurium* is verified, with diameter values of 10.7 \pm 0.6 mm and 2.2 \pm 0.1 mm, respectively. For *Escherichia coli*, there was no halo formed.

Comparing the antibacterial results of the compound Bent-ODA and the compound Bent-ODA-1.0GA against the bacteria *S. aureus* and *S. typhimurium*, there is a statistically significant difference, which does not occur with the antibacterial results for the Gram-negative bacteria *E. coli*. From the statistical analysis, it appears that the diameters of the inhibition zones provided by the compound Bent-ODA-1.0GA are statistically different for the different bacteria *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium* with a significance level of 5%.

The greater inhibition halo observed with *S. aureus* is justified by the difference between Gram-positive and Gram-negative bacterial cells. Gram-positive bacteria, such as *S. aureus*, have only an outer layer as a plasma membrane, which facilitates the penetration of antimicrobial compounds and interaction with the bacterial cytoplasm, making Gram-positive more susceptible when compared to Gram-negative bacteria. When evaluating the structure of

gram-negative bacteria, they have an additional membrane, forming a more resistant phospholipid bilayer structure that increases cytoplasmic protection from antimicrobial agents (MUÑOZ-BONILLA and FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012).

Behbahani and Shahidi (2019) tested the antimicrobial activity using the disc diffusion and well diffusion methods of *Melissa officinalis* essential oil, which has geranyl acetate as its major component. The authors indicated that the largest inhibition halos were observed for the Gram-positive bacterium *Streptococcus pyogenes* and the smallest halos were observed for the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, corroborating the results obtained with the compound Bent-ODA-1.0GA.

According to Lopez-Romero et al. (2015) essential oils contained in plants are generally recognized as safe by the FDA demonstrating many biological activities, such as antimicrobial, antiviral, antimycotic, antiparasitic, insecticidal, antidiabetic, antioxidant and anticancer activity. The authors suggest that the molecules present in essential oils interact with cell surface constituents, such as membrane proteins and other molecules, which are essential for the growth and survival of microorganisms. When binding with the cell surface, these compounds form a monolayer around the cell, which ends up modifying the electrostatic potential and hydrophobicity and, therefore, destabilizing the membrane integrity, resulting in the release of internal cellular components.

According to Burt (2004), these compounds act to break the cell wall and cytoplasmic membrane, leading to lysis and leakage of intracellular compounds. Therefore, the results propose that GA can be a natural-based alternative to conventional synthetic antimicrobials to control bacterial infections, and it is found in several essential oils, it is possible that the cell damage is analogous to that described above, justifying its antimicrobial activity. Furthermore, the importance of inhibiting the bacterium *S. typhimurium* by the compound Bent-ODA-1.0GA is highlighted, considering that this bacterium causes serious problems in the health of poultry, resulting in important diseases with great economic impacts. These diseases affect the performance of poultry and cause their morbidity and mortality, especially in younger poultry. In addition, Salmonellosis can result in foodborne diseases in humans, due to the ability to colonize the chicken's alimentary tract and result in carcass contamination (OLIVEIRA, BERCHIERI JUNIOR and BARROW, 2000).

6.3.2 Acute toxicity

Macroscopically, mice abnormal behavior was observed during the treatment days in order to follow the toxicity signs, as shown in Table 6.2.

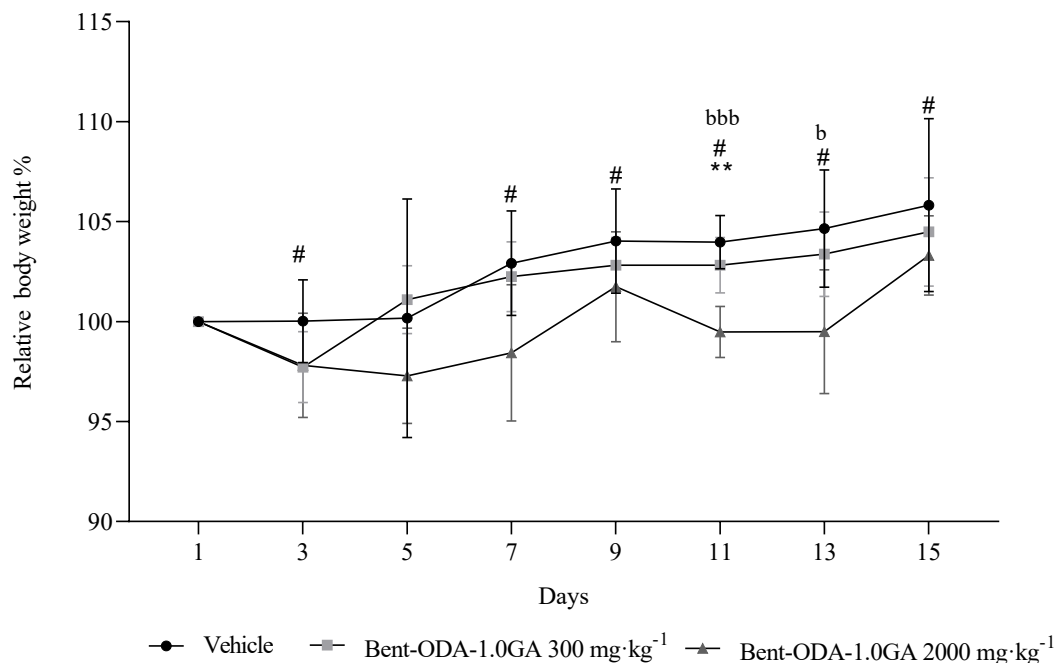
Table 6.2 - General appearance and behavioral observations of acute toxicity study (Bent-ODA-1.0GA acutely administered at 300 mg·kg⁻¹, p.o. and 2000 mg·kg⁻¹ p. o.).

Toxicity sign	Bent-ODA-1.0GA (300 mg·kg ⁻¹)	Bent-ODA-1.0GA (2000 mg·kg ⁻¹)
Piloerection	No effect	Observed 8 h and 24 h after the administration
Muscular tonus	No effect	No effect
Abdominal writhing	No effect	No effect
Palpebral ptosis	Observed 2 days after the administration	No effect
Motor activity	No effect	No effect
Hypothermia	No effect	No effect
Shacking	No effect	Observed 8 h and 24 h after the administration
Posterior paw paralysis	No effect	No effect
Salivation	No effect	No effect
Bronchial secretion	No effect	No effect
Lethargy	No effect	No effect
Diarrhoea	No effect	No effect
Convulsions	No effect	No effect
Death	No effect	No effect

When the dose of 300 mg·kg⁻¹ was applied, 1 h after the treatment, the animals presented repeated grooming, possibly because the administered composite had a characteristic odor of the geranyl acetate ester used for the incorporation of organophilic bentonite. After 4 h of administration, it was observed that one of the animals that received Bent-ODA-1.0GA (300 mg·kg⁻¹) had an unusual respiratory pattern. After 2 days of administration, eyelid ptosis and eye discharge were observed in one animal that received the treatment. When the dose of 2000 mg·kg⁻¹ was tested, it was observed that the animals showed piloerection and shacking, 8 and 24 h after administration.

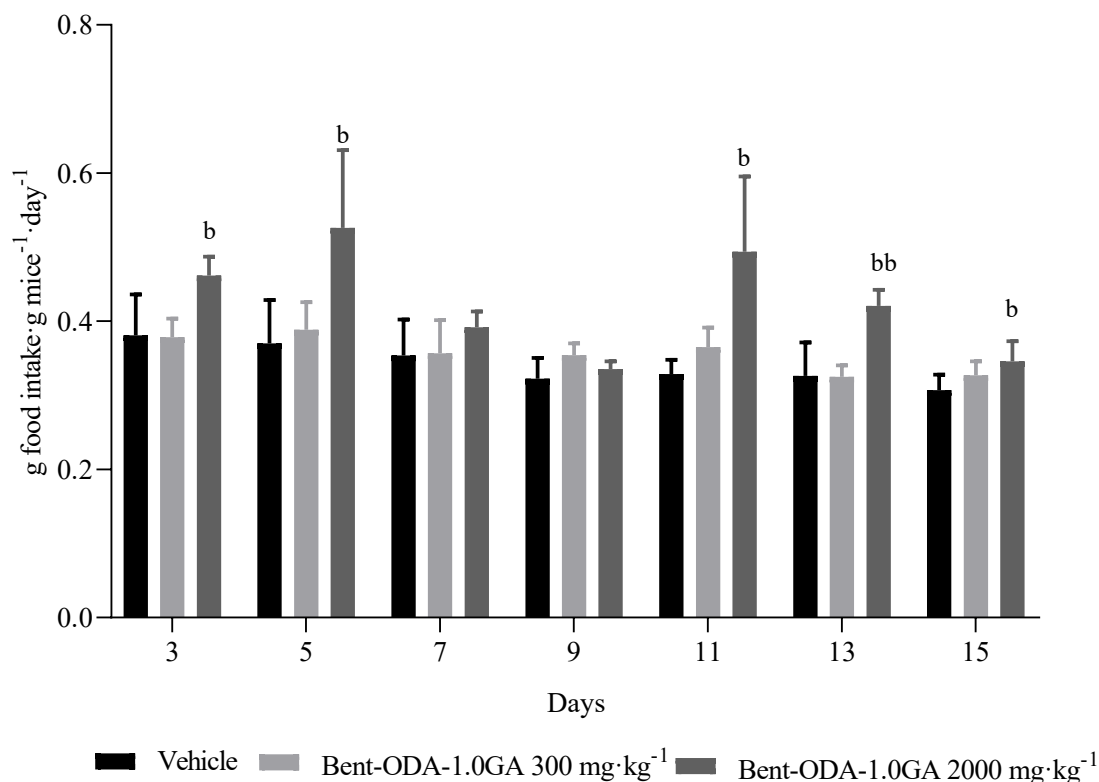
The results for the effect of the treatment with organophilic bentonite added with geranyl acetate at doses of 300 and 2000 mg·kg⁻¹ in relation to the body weight of the mice and food intake are shown in Figures 6.2 and 6.3, respectively.

Figure 6.2 - Effect of the organophilic bentonite activated with geranyl acetate acute treatment (300 mg·kg⁻¹, p.o. and 2000 mg·kg⁻¹, p.o.) on mice relative body weight (%).



Symbols represent differences from the first measurement (day 1) in the same treatment group. Vehicle treated group (% DMSO solution in distilled water): * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. Group treated with Bent-ODA-1.0GA at a dose of 300 mg·kg⁻¹: # for $p < 0.05$, ## for $p < 0.01$ and ### for $p < 0.001$. Group treated with Bent-ODA-1.0GA at a dose of 2000 mg·kg⁻¹: % for $p < 0.05$, %% for $p < 0.01$ and %%% for $p < 0.001$. Comparison between the group that received the vehicle and the group that received the lowest dose of Bent-ODA-1.0GA (300 mg·kg⁻¹): a for $p < 0.05$, aa for $p < 0.01$ and aaa for $p < 0.001$. Comparison between the group that received the vehicle and the group that received the highest dose of Bent-ODA-1.0GA (2000 mg·kg⁻¹): b for $p < 0.05$, bb for $p < 0.01$ and bbb for $p < 0.001$.

Figure 6.3 - Effect of the organophilic bentonite activated with geranyl acetate acute treatment (300 mg·kg⁻¹, p.o. and 2000 mg·kg⁻¹, p.o.) on mice food intake (g food intake·g mice⁻¹·day⁻¹).



The symbols represent differences from different treatments on the same day. Comparison between the group that received the vehicle and the group that received the lowest dose of Bent-ODA-1.0GA (300 mg·kg⁻¹): a for $p < 0.05$, aa for $p < 0.01$ and aaa for $p < 0.001$. Comparison between the group that received the vehicle and the group that received the highest dose of Bent-ODA-1.0GA (2000 mg·kg⁻¹): b for $p < 0.05$, bb for $p < 0.01$ and bbb for $p < 0.001$.

Using two-way ANOVA with repeated measures, it was verified that for the relative mice body weight there were statistically significant differences ($p < 0.001$) in relation to time, treatment and interaction between them. Through the Tukey test, when the group that received the vehicle was observed, it showed a significant increase ($p < 0.001$) in relative body weight on the 11th day and compared to the 1st day. Evaluating the group treated with Bent-ODA-1.0GA at a dose of 300 mg·kg⁻¹, a significant increase ($p < 0.05$) in relative body weight was observed on days 3, 7, 9, 11, 13 and 15 if compared to the 1st day of treatment. And in relation to the group treated with Bent-ODA-1.0GA at a dose of 2000 mg·kg⁻¹, there were no statistically significant differences between the 1st and the other days of treatment. When comparing the group that received the vehicle with the one that received Bent-ODA-1.0GA at the lowest dose (300 mg·kg⁻¹) on the same day of analysis, there were no statistically significant differences, that is, the relative body weight remained constant, within a threshold of significance.

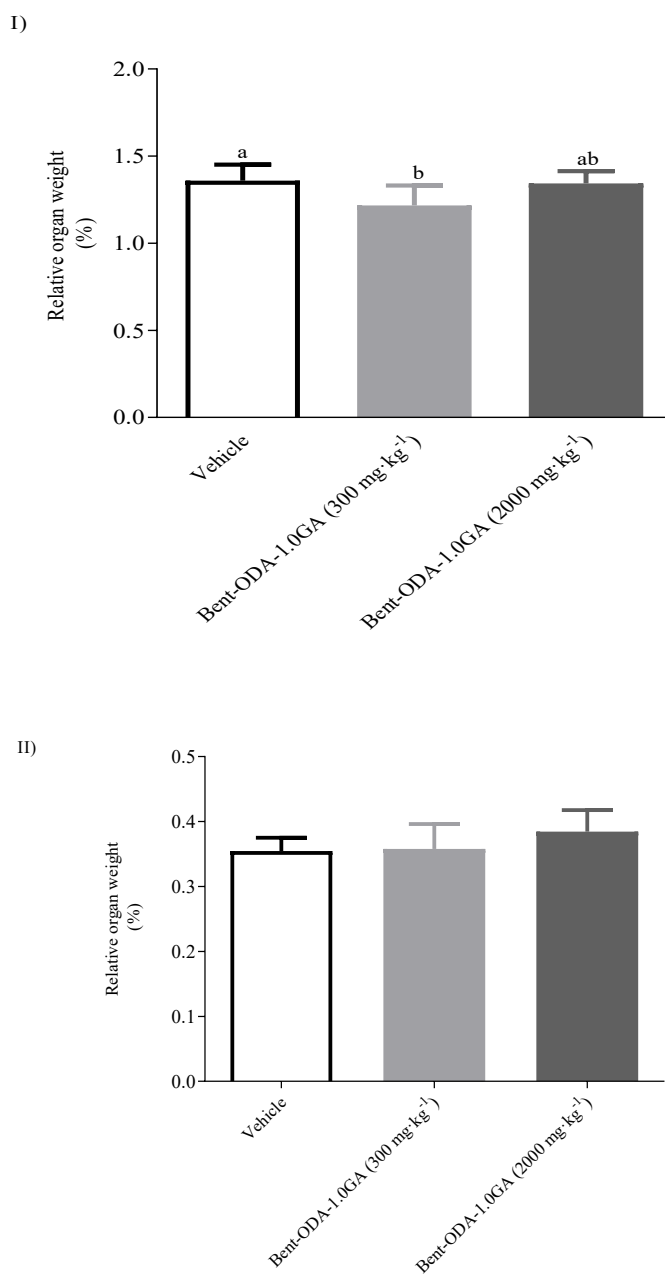
Comparing the group that received the vehicle with the one that received Bent-ODA-1.0GA at the highest dose ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) on the same day of analysis, there was a significant increase in relative body weight on the 11th day ($p < 0.001$) and 13th day ($p < 0.05$).

Using two-way ANOVA with repeated measures, it was verified that for food intake there were statistically significant differences ($p < 0.001$) in relation to time, treatment and interaction between them. Applying the Tukey test, when comparing the group of animals that received the vehicle with the one that received the lowest dose of Bent-ODA-1.0GA ($300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) there were no statistically significant differences over the days. However, for the group that received the dose of $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of Bent-ODA-1.0GA compared to the one that received the vehicle, there was a significant increase ($p < 0.05$) in food intake on days 3, 5, 11, 13 and 15.

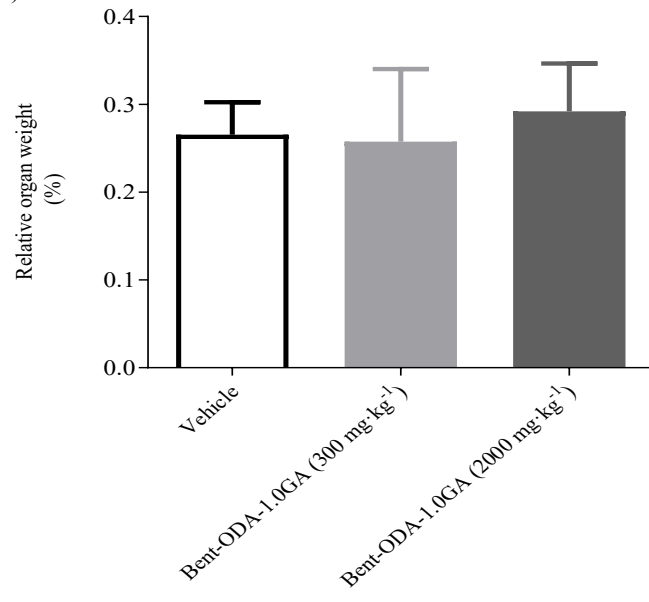
Comparing food intake with relative body weight in relation to the beginning and end of the experiment, it is noted that in relation to the control group (vehicle) and the one that received the lowest dose of Bent-ODA-1.0GA ($300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) both food intake and relative body weight gain did not show statistically significant differences, which shows that the administration of this composite at this dose does not affect the metabolism of these animals. Mice that received the highest dose of Bent-ODA-1.0GA ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) compared to those that received the vehicle ingested more food and maintained the same relative body weight, which may be associated with an orexigenic effect of the administered composite and a possible metabolic alteration, since the animals in this group ate more, but maintained their weight.

Figure 6.4 shows the effects of organophilic bentonite with geranyl acetate at doses of 300 and $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ compared to the group that received only the vehicle in relation to the relative weight of the organs.

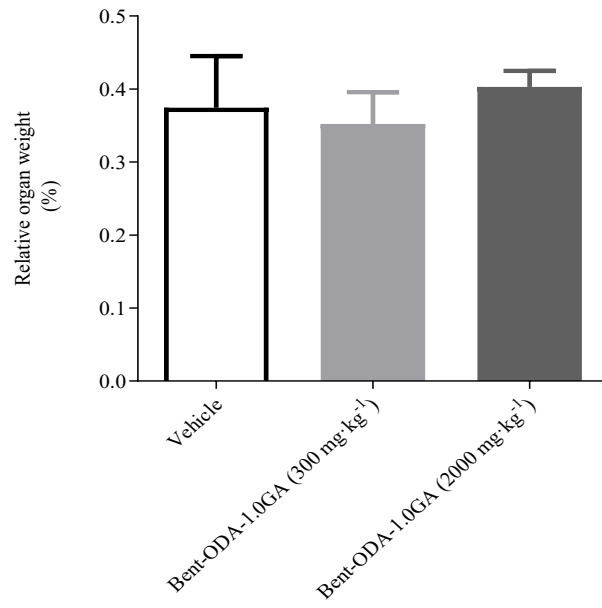
Figure 6.4 - Effect of the organophilic bentonite activated with geranyl acetate acute treatment (300 mg·kg⁻¹ p.o. and 2000 mg·kg⁻¹ p.o.) on the relative weight of female mice organs. I) Brain; II) Heart; III) Thymus; IV) Spleen; V) Adrenals glands; VI) Kidney e VII) Liver.

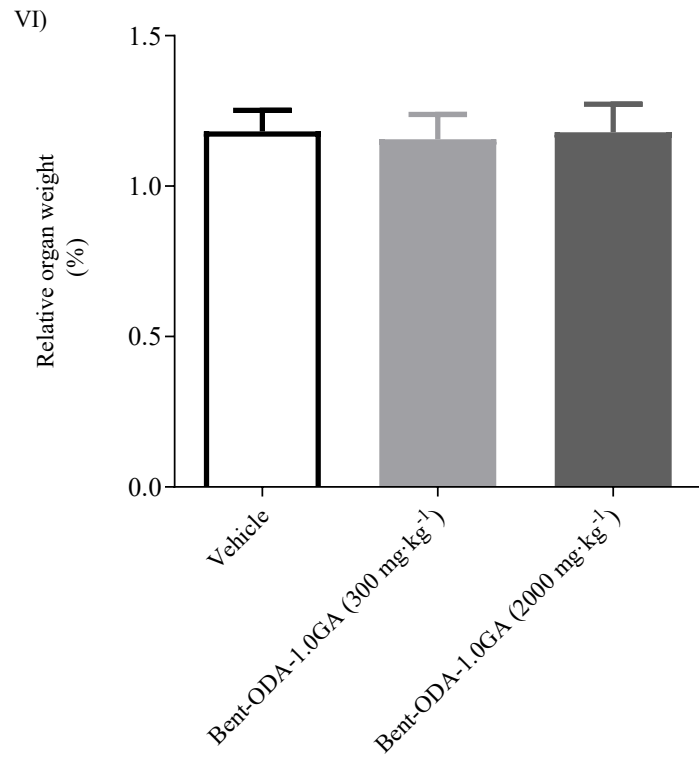
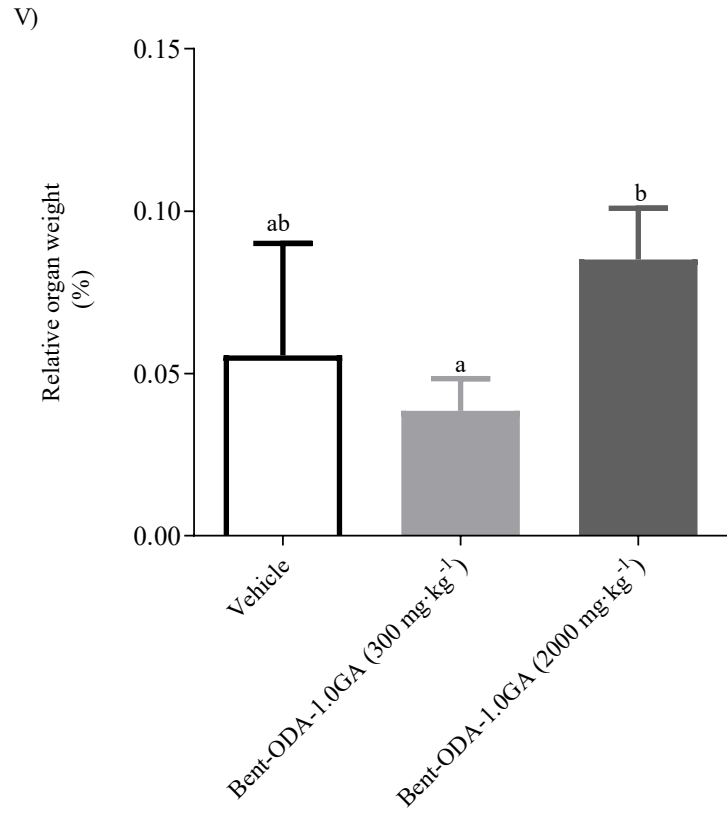


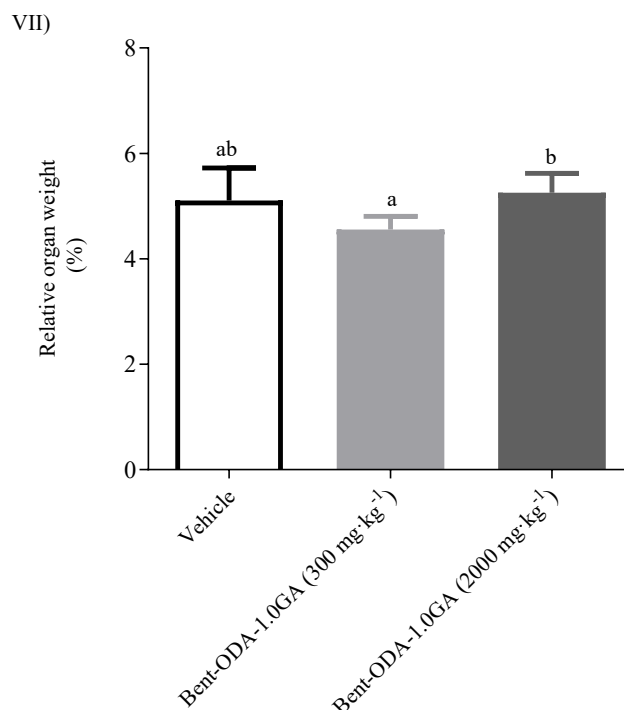
III)



IV)







Equal lowercase letters represent that there are no significant differences between treatments and different uppercase letters show that there are significant differences between treatments ($p < 0.05$). Graph that do not have letters do not differ statistically from each other.

When the relative weight of the organs was evaluated through the one-way ANOVA, followed by the Tukey test, it is verified that in relation to the relative weight of the brain there was a significant reduction ($p < 0.05$) when comparing the group that received the vehicle with the one that received Bent-ODA-1.0GA at a dose of $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. On the other hand, the animals that received the dose of $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of Bent-ODA-1.0GA did not present significant differences when compared to the animals that received the vehicle. Regarding the relative weight of the adrenal glands and liver, there were no differences in relation to the control group. For those animals that received a dose of $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of Bent-ODA-1.0GA, when a macroscopic evaluation of the liver was performed, there was a less intense coloration (fainter) when compared to the control and to the group that received the dose of $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of Bent-ODA-1.0GA, as well as some dark spots throughout the organ. These signs may indicate an initial process of hepatotoxicity, and a study of repeated administration of doses could give more accurate answers about such effects related to the administered doses.

According to a study carried out by U.S. Department of Health and Human Services of National Institute of Environmental Health Sciences (1987) that evaluated the toxicity of an

essential oil composed of geranyl acetate (79%) and citronellyl acetate (21%), cytoplasmic vacuolization was verified in the liver of male and female mice and was considered related to the compound under study, at the dose of 2000 mg·kg⁻¹. This is a result of severe systemic toxicity, that is, it refers to the toxic effects caused as a result of the absorption and distribution of a substance that affects the body. There were no significant changes in the relative weight of heart, thymus, spleen and kidneys between the groups.

Through the OECD Guideline 423 (2001) it is possible to classify the composite developed as category 5, intended for chemical products that have low acute toxicity, but present danger to vulnerable populations in certain circumstances, with its LD50 (acute lethal dose) greater than 2000 mg·kg⁻¹.

The present study demonstrates for the first time that the organophilic bentonite-based composite with geranyl acetate at the tested doses did not induce any adverse behavioral effects. Furthermore, the acute administration of Bent-ODA-1.0GA (300 and 2000 mg·kg⁻¹, p.o.) was not related to mice mortality for 15 days, which demonstrates that it is devoid of acute toxicity according to the OECD Guideline 423 (2001).

6.3.3 Geranyl acetate release

In vitro release of geranyl acetate was performed at pH 3.5, which simulates the pH of the stomach, more acidic due to the release of hydrochloric acid, aiding in the digestion of food, and at pH 6.5, which simulates the pH of the intestine, whose pH is higher, due to the bicarbonate secreted by the duodenum, which will neutralize the acidity of the fecal mass (Koziolek et al., 2015), at 41 °C, which simulates the body temperature of chickens. After 75 h of contacting the Bent-ODA-1.0GA composite with the pH 3.5 and pH 6.5 aqueous solutions, the absorbance of the samples was read, and the results are shown in Table 6.3.

Table 6.3 - Results for the amount of GA released of organophilic bentonite after 75 h.

pH aqueous solution	GA concentration in solution (mg·mL ⁻¹)
3.5	<0.03
6.5	<0.004

According to Table 6.3, for samples of Bent-ODA-1.0GA disposed in aqueous solution with pH 3.5, the concentration of geranyl acetate released is lower than $0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the limit that the equipment was able to detect. Whereas for the aqueous solution with pH 6.5 the concentration of geranyl acetate released is less than $0.004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ during the 75 h evaluation. According to an acute toxicity study conducted by Zeferino (2021), in which a concentration of $2000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of geranyl acetate was administered to a group of mice, it was found that this compound is classified as Category 5, having low acute toxicity, but may present a hazard to vulnerable populations in some circumstances (OECD, 2001). That is, the concentrations of geranyl acetate released in the assay simulating the gastrointestinal system of chickens are much lower than those that could cause some toxic effect in animals.

Rychen et al. (2017) point out that bentonites are safe for all animal species, consumers and the environment when used at a maximum level of $20000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of feed, which is much higher than that used in the present study.

Audiyana, Yuwono and Adnan (2021) aimed in their study to determine the median lethal dose of calcium bentonite in Wistar rats (*Rattus norvegicus*), which were divided into 5 groups (one control and four that received treatment at doses of 50, 300, 2000 and $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The results show that there was no death, a single oral dose of calcium bentonite has an LD50 greater than $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight and is classified as practically non-toxic materials.

Future studies should clarify the safe usage of multiple-dose of organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate to explore the prolonged toxic effect of the substance. Furthermore, it is suggested that the readings of the geranyl acetate release test in different pHs be performed using chromatography.

6.4 CONCLUSION

Organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. The acute toxicity study demonstrated that the Bent-ODA-1.0GA can be classified into safety category 5, according to the OECD acute toxicity parameters. The geranyl acetate release study, showed that if this was released from the organophilic bentonite, it was happening in amounts less than $0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for pH 3.5 and $0.004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for pH 6.5, amounts much lower than those that could cause some toxic effect in animals, ensuring the biosecurity. The results suggest that the composite

developed based on organophilic bentonite incorporated with geranyl acetate can be used as a raw material for animal feed because it has activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, without showing toxicity and if released in different pHs will be in very small quantities.

Acknowledgments

This work was funded the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Brazil). We thank Laboratório de Materiais Multifuncionais (LMF) and Laboratório de Tecnologia e Processos de Materiais (LaTEM) from Unochapecó – Chapecó (Brazil) for the structure to accomplish this work. Finally, the authors are especially grateful to Centro de Bioterismo (Unochapecó) for technical assistance with animals.

6.5 REFERENCES

- ABRUNHOSA, L., MORALES, H., SOARES, C., CALADO, T., VILA-CHÃ, A. S., PEREIRA, M., VENÂNCIO, A. A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, nº 2, p. 249-265, 2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.720619>.
- ALEXANDER, J. A., ZAINI, M. A. A., SURAJUDEEN, A., ALIYU, E. U., OMEIZA, A. U. Surface modification of low-cost bentonite adsorbents—A review. *Particulate Science and Technology*, vol. 37, nº 5, p. 538-549, 2019. <https://doi.org/10.1080/02726351.2018.1438548>.
- AUDIYANANDA, D., YUWONO, H. S., ADNAN, A. Lethal dose of calcium bentonite in Wistar Rats. *Althea Medical Journal*, vol. 8, nº 2, p. 116–20, 2021. <https://doi.org/10.15850/amj.v8n2.2227>.
- BANKS, W. J. *Histologia veterinária aplicada*. 2.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1992. 629 p.
- BEHBAHANI, B. A., SHAHIDI, F. Melissa officinalis Essential Oil: Chemical Compositions, Antioxidant Potential, Total Phenolic Content and Antimicrobial Activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, vol. 6, nº 1, p. 17-25, 2019. <http://nfsr.sbmu.ac.ir/article-1-300-en.html>.
- BHAVSAR, K. V., YADAV, G. D. Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *Candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 34, p. 288–293, 2019. <https://doi.org/10.1002/ffj.3502>.
- BERNARDOS, A., BOZIK, M., ALVAREZ, S., SASKOVA, M., PEREZ-ESTEVE, E., KLOUCEK, P., LHOTKA, M., FRANKOVA, A., MARTINEZ-MANEZ, R. The efficacy of essential oil components loaded into montmorillonite against *Aspergillus niger* and

Staphylococcus aureus. Flavour and Fragrance Journal, vol. 34, p. 151–162, 2019. <https://doi.org/10.1002/ffj.3488>.

BOURKAIB, M. C., RANDRIAMALALA, H., DETTORI, L., HUMEAU, C., DELAUNAY, S., CHEVALOT, I., GUIAVARC'H, Y. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations. Process Biochemistry, vol. 71, p. 118-126, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>.

BRAZIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Procedimentos para o uso científico de animais. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, vol. 94, nº 3, p. 223-253, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.

CABUK, M., ALAN, Y., UNAL, H. I. Enhanced electrokinetic properties and antimicrobial activities of biodegradable chitosan/organo-bentonite composites. Carbohydrate Polymers, vol. 161, p. 71-81, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.067>.

CAPELEZZO, A. P., CELUPPI, L. C. M., CAMERINI, T., MACUVELE, D. L. P., ZEFERINO, R. C. F., MELLO, J. M. M., RIELLA, H. G., FIORI, M. A. Antimicrobial bentonite by the addition of geranyl acetate for Aflatoxin B1 adsorption. Research, Society and Development, vol. 11, nº 2, e12411225647, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25647>.

CHKUASELI, A., KHUTSISHVILI-MAISURADZE, M., CHAGELISHVILI, A., NATSVALADZE, K., LASHKARASHVILI, T., CHAGELISHVILI, G., MAISURADZE, N. Application of new mycotoxin adsorbent-bentonite clay “Askangel” in poultry feed. Annals of Agrarian Science, vol. 14, p. 295-298, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aasci.2016.09.004>.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptible tests; Approved standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CONCEA - Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37 – DIRETRIZ PARA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA – Brasília, 15 de fevereiro de 2018.

DAKOVIC, A., MATIJASEVIC, S., ROTTINGHAUS, G. E., LEDOUX, D. R., BUTKERAITIS, P., SEKULIC, Z. Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 66, p. 20–25, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.008>.

FERNÁNDEZ, M. A., ROQUE, L. B., ESPINOSA, E. G., DEYÁ, C., BELLOTTI, N. Organo-montmorillonite with biogenic compounds to be applied in antifungal coatings. Applied Clay Science, vol. 184, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105369>.

FIORI, M. A., PAULA, M. M. S., BERNARDIN, A. M., RIELLA, H. G. ANGIOLETTO, E. Bactericide glasses developed by Na⁺/Ag⁺ ionic exchange. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 29, p. 1569-1573, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.014>.

GHAZALAH, A. A., ABD-ELSAMEE, M. O., MOUSTAFA, K. E. M. E., KHATTAB, M. A., REHAN, A-E. A. A. Effect of nanosilica and bentonite as mycotoxins adsorbent agent in broiler chickens' diet on growth performance and hepatic histopathology. *Animals*, vol. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11072129>.

HASSAN, A. A., HAFSA, S. H. A., ELGHANDOUR, M. M. M. Y., REDDY, P. R. K., MONROY, J. C., SALEM, A. Z. M. Dietary Supplementation with sodium bentonite and coumarin alleviates the toxicity of Aflatoxin B1 in rabbits. *Toxicon*, vol. 171, n° 5, p. 35-42, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.014>

JAYNES, W. F., ZARTMAN, R. E. Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. *Toxins*, vol. 3, n° 6, p. 551-565, 2011. <https://doi.org/10.3390/toxins3060551>.

KANORA, A., MAES, D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Veterinárni Medicína*, vol. 54, p. 565-576, 2009. <https://doi.org/10.17221/156/2009-VETMED>.

KOZIOLEK, M., GRIMM, M., BECKER, D., IORDANOV, V., ZOU, H., SHIMIZU, J., WANKE, C., GARBACZ, G., WEITSCHIES, W. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the intellicap[®] system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, p. 2855–2863, 2015. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jps.24274>.

LOPES, J. M., RUTZ, F., MALLMANN, C. A., TOLEDO, G. S. P. Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. *Ciência Rural*, vol. 36, n° 5, p. 1594-1599, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000500040>.

LOPEZ-ROMERO, J. C., GONZÁLEZ-RÍOS, H., BORGES, A., SIMÕES, M. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, p. 1-9, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/795435>.

LIU, J. H., CAI, W. K., KHATOON, N., YU, W. H., ZHOU, C. H. On how montmorillonite as an ingredient in animal feed functions. *Applied Clay Science*, vol. 202, p. 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105963>.

LUPATINI, F. Avaliação do efeito de variáveis produtivas na conversão alimentar de frangos de corte. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, 2015.

MACUVELE, D. L. P., NONES, J., MATSINHE, J. V., BEZERRA A. T., LIMA M. M., SANTOS E. S. W., FIORI M. A., RIELLA H. G. Simultaneous effect of reaction temperature and concentration of surfactant in organo-bentonite synthesis. *Materials Science Forum*, vol. 899, p. 42-47, 2017. [10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42).

MARTSOUKA, F., PAPAGIANNPOULOS, K., HATZIANTONIOU, S., BARLOG, M., LAGIOPOULOS, G., TATOULIS, T., TEKERLEKOPOULOU, A.G., LAMPROPOULOU, P., PAPOULIS, D. The Antimicrobial properties of modified pharmaceutical bentonite with zinc and copper. *Pharmaceutics*, vol. 13, nº 8, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081190>.

MARROQUÍN-CARDONA, A. G., DENG, Y., GARCIA-MAZCORRO, J. F., JOHNSON, N. M., MITCHELL, N. J., TANG, L., WANG, J-S., HARVEY, R. B., PHILLIPS, T. D. Aflatoxin B1 sorption and safety of dietary sodium bentonite in Sprague-Dawley Rats. *Clays and Clay Minerals*, 2022. <https://doi.org/10.1007/s42860-022-00173-w>.

MUÑOZ-BONILLA, A., FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, vol. 37, p. 281-339, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>.

MURCIA, M. D., GÓMEZ, M., GÓMEZ, E., GÓMEZ, J. L., HIDALGO, A. M., SÁNCHEZ, A., VERGARA P. Kinetic modelling and kinetic parameters calculation in the lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate. *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 138, p. 135–143, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.08.025>.

NONES, J., RIELLA, H. G., TRENTIN, A. G., NONES, J. Effects of bentonite on different cell types: A brief review. *Applied Clay Science*, vol. 105-106, p. 225–230, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.12.036>.

NONES, J., SOLHAUG, A., ERIKSEN, G. S., MACUVELE, D. L. P., POLI, A., SOARES, C., TRENTIN, A. G., RIELLA, H. G., NONES, J. 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*, vol. 337, p. 80–89, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.068>.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 423. Acute oral toxicity—acute toxic class method, 2001. Disponível em: https://ntp.nieh.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oece/oece_gl423.pdf.

OLIVEIRA, G. H., BERCHIERI JUNIOR, A., BARROW, P. A. Prevention of *Salmonella* infection by contact using intestinal flora of adult birds and/or a mixture of organic acids. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 31, nº 2, p. 116-120, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000200011>.

PARK, J-H., SHIN, H-J., KIM, M. H., KIM, J-S., KANG, N., LEE, J-H., KIM, K-T., LEE, J. I., KIM, D-D. Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 46, p. 363–375, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0258-8>.

PAPPAS, A. C., TSIPLAKOU, E., TSITSIGIANNIS, D. I., GEORGIADOU, M., ILIADI, M. K., SOTIRAKOGLU, K., ZERVAS, G. The role of bentonite binders in single or concomitant mycotoxin contamination of chicken diets. *British Poultry Science*, vol. 57, nº. 4, p. 551–558, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2016.1187712>.

- PEREIRA, C. S., CUNHA, S. C., FERNANDES, J. O. Prevalent mycotoxins in animal feed: occurrence and analytical methods. *Toxins*, vol. 11, nº 5, p. 1-62, 2019. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>.
- PEREIRA, N. R. L., LOPES, B., FAGUNDES, I. V., DE MORAES, F. M., MORISSO, F. D. P., PARMA, G. O. C., ZEPON, K. M., MAGNAGO, R. F. Bio-packaging based on cellulose acetate from banana pseudostem and containing *Butia catarinensis* extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 194, p. 32–41, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.179>.
- POURABOLGHASEM, H., GHORBANPOUR, M., SHAYEGH, R. Antibacterial activity of copper-doped montmorillonite nanocomposites prepared by alkaline ion exchange method. *Journal of Physical Science*, vol. 27, nº 2, p. 1–12, 2016. <http://dx.doi.org/10.21315/jps2016.27.2.1>.
- PUBCHEM. Open Chemistry Database. Geranyl acetate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549026>.
- RYCHEN, G., AQUILINA, G., AZIMONTI, G., BAMPIDIS, V., BASTOS, M. L., BORIES, G., CHESSON, A., COCCONCELLI, P. S., FLACHOWSKY, G., GROPP, J., KOLAR, B., KOUBA, M., LÓPEZ-ALONSO, M., MANTOVANI, A., MAYO, B., RAMOS, F., SAARELA, M., VILLA, R. E., WALLACE, R. J., WESTER, P., MARTELLI, G., RENSHAW, D., LÓPEZ-GÁLVEZ, G., PUENTE, S. L. Safety and efficacy of bentonite as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*, vol. 15, nº 12, 2017. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5096>.
- ROSA, B. H., SILVA, G. S., CONCEIÇÃO, G. J. A., CARVALHO, R. A., AGUIAR-OLIVEIRA, E., MALDONADO, R. R., KAMIMURA, E. S. Application of partially concentrated *Candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 12, p. 90–95, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.005>.
- ROSÁRIO, J. A., CECHINEL, M. A. P., OLIVEIRA, C. M., DE NONI, A., PETERSON, M., KUHNEN, N. C., RIELLA, H. G. Influence of sodium pretreatments on the preparation of Ag-doped polycationic bentonite for antibacterial purposes. *Bulletin of Materials Science*, vol. 43:106, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12034-020-02085-8>.
- SANTOS, M. F., OLIVEIRA, C. M., TACHINSKI, C. T., FERNANDES, M. P., PICH, C. T., ANGIOLETTI, E., RIELLA, H. G., FIORI, M. A. Bactericidal properties of bentonite treated with Ag⁺ and acid. *International Journal of Mineral Processing*, vol. 100, p. 51-53, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2011.04.012>.
- SILVA, L. A. Desenvolvimento do processo de obtenção da bentonita organofílica de Moçambique: síntese e caracterização. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC – SC, Florianópolis, 2010.
- SOUZA, A. V. C. Interpretando os Índices de Conversão Alimentar (I.C.A.) e de Eficiência Alimentar (I.E.A.). *Poli nutri alimentos*, Artigo técnico, 2003.

TAACA, K. L. M., DAHONOG, L. A., OLEGARIO, E. M. Cell viability and bacterial reduction activity of Ag-modified bentonite. *Materials Today: Proceedings*, vol. 16, p. 1782-1788, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.051>.

U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709. Carcinogenesis Studies of Food Grade Geranyl Acetate (71% Geranyl acetate, 29% Citronelly acetate) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study). Technical Report Series No. 252 (1987) NIH Publication No. 88-2508.

WELKER, J. S., ROSA, A. P., MOURA, D. J., MACHADO, L. P., CATELAN, F., UTTPATEL, R. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 37, nº 8, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000800018>.

ZEFERINO, R. C. F. Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos. 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2021.

ZEFERINO, R. C. F., PIAIA, V. A. A., ORSO, V. T., PINHEIRO, V. M., ZANETTI, M., COLPANI, G. L., PADOIN, N., SOARES, C., FIORI, M. A., RIELLA, H. G. Synthesis of geranyl acetate by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 168, p. 156-168, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.01.031>.

ZHU, R., CHEN, Q., ZHOU, Q., XI, Y., ZHU, J., HE, H. Adsorbents based on montmorillonite for contaminant removal from water: a review. *Applied Clay Science*, vol. 123, p. 239–258, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2015.12.024>.

CAPÍTULO 7

PRINCIPAIS RESULTADOS

Contemplando os resultados desta tese, tem-se três artigos científicos, sendo apresentado neste capítulo os aspectos mais relevantes de todo o trabalho desenvolvido, o qual teve por objetivo o desenvolvimento de um compósito a base de bentonita organofílica e acetato de geranila com o intuito de aplicá-lo como nutracêutico ou como matéria-prima para a produção de ração destinada a alimentação de frangos, cuja finalidade é inibir o crescimento e/ou matar fungos e bactérias e, concomitantemente adsorver Aflatoxina B1.

A organofilização da bentonita foi conduzida tomando-se por base o estudo desenvolvido por Macuvele et al. (2017), os quais testaram várias temperaturas de reação e concentrações de octadecilamina (ODA), chegando através de análises de superfície de resposta nas melhores condições de trabalho que promovessem o maior aumento do espaçamento interlamelar da bentonita, sendo estas de 60 °C e 85 mmol·100 g⁻¹, as quais foram adotadas no presente estudo.

A atividade antifúngica foi avaliada por meio da ASTM G21-15 com algumas modificações. Os fungos utilizados para esta análise foram o *Aspergillus niger* e o *Aspergillus flavus*, na concentração de 10⁵ esporos·mL⁻¹, os quais são potenciais produtores de Aflatoxina B1. Para a bentonita organofílica (Bent-ODA) não apresentou atividade antifúngica, uma vez que esta não possui a capacidade de inibir o crescimento ou eliminar os fungos avaliados, sendo que o crescimento fúngico ocorreu de forma abundante, preenchendo completamente a superfície da placa de petri, recebendo a classificação máxima na escala de crescimento segundo a norma ASTM G21-15.

Após a incorporação do agente antimicrobiano acetato de geranila na bentonita organofílica, houve um decréscimo acentuado na densidade celular fúngica. Quando avaliado o compósito Bent-ODA-0.75GA frente à *Aspergillus flavus* percebeu-se a presença de traços de crescimento e para *Aspergillus niger* nenhum crescimento foi observado. Para o compósito Bent-ODA-1.0GA frente à *Aspergillus flavus* nenhum crescimento foi observado e para *Aspergillus niger* percebeu-se a presença de traços de crescimento, o que mostra que o compósito desenvolvido é antifúngico, promovendo uma redução fúngica superior a 90%.

Conforme demonstrado anteriormente, confirmou-se a hipótese levantada inicialmente de que o compósito desenvolvido é antifúngico. O que se pretende firmar com os experimentos

de adsorção é que se houver a presença de micotoxinas, especialmente a Aflatoxina B1, que figura como umas das mais tóxicas dentre as micotoxinas, o material a base de bentonita organofílica e acetato de geranila será capaz de adsorvê-la.

Os ensaios preliminares de adsorção mostraram que após 17 h de contato da Bent-ODA e Bent-ODA-0.75GA com uma solução aquosa de $107 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AFB1, essa concentração foi reduzida a menos de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que é o limite de detecção do equipamento utilizado, apresentando uma redução na concentração de AFB1 superior a 80%.

Ensaio mais detalhados com diferentes pH que simulam o sistema gastrointestinal de frangos (pH de 3,5 condiz com o pH do estomago, enquanto que o pH 6,5 simula o pH intestinal) foram conduzidos a fim de avaliar a capacidade adsorvente de Bent-ODA e do compósito Bent-ODA-1.0GA, partindo de uma concentração de AFB1 de $1400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de AFB1 para pH 3,5 e $1800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de AFB1 para pH 6,5 (calculada levando em consideração a densidade média da ração, cujo intuito é tecer uma comparação com o recomendado pela *Food and Drug Administration* na qual a unidade de concentração é de $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Para a Bent-ODA, independente do pH, o tempo para reduzir a concentração de AFB1 a níveis aceitáveis pela legislação foi de 45 min, sendo essa redução superior a 99%. Após a inserção o acetato de geranila, verificou-se que a capacidade de adsorção foi reduzida, sendo explicada pelo fato de que o éster ocupa os sítios ativos da Bent-ODA que seriam utilizados para adsorver AFB1. Para Bent-ODA-1.0GA, em pH 3,5 e em pH 6,5, o tempo necessário para reduzir a concentração de AFB1 a níveis recomendados pela FDA (2019) foi de 120 min e de 100 min e o percentual de redução foi de 98,5% e 99,6%, respectivamente.

Comparando os resultados obtidos com o composto Bent-ODA e Bent-ODA-1.0GA em ambos os pH testados, verifica-se que o tempo para atingir os níveis aceitáveis recomendados pela FDA foi maior para o adsorvente contendo o acetato de geranila (Bent-ODA-1.0GA). Esses resultados corroboram com aqueles obtidos pela técnica de BET/BJH, os quais mostraram uma redução de aproximadamente 80% na área superficial e 79% no volume de poro após a incorporação do acetato de geranila à bentonita organofílica, o que certamente influencia na redução da capacidade de adsorção de AFB1. Mesmo apresentando um tempo maior para atingir níveis aceitáveis de AFB1 proposto por legislação, a grande vantagem do compósito Bent-ODA-1.0GA é a capacidade de inibir o crescimento ou eliminar os fungos produtores de AFB1.

A técnica de difusão em meio sólido a partir do orifício foi utilizada para avaliar a propriedade antibacteriana frente à bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* e as

bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* na concentração de 10^4 UFC·mL⁻¹. Para a bentonita organofílica verificou-se que não houve a formação de halo de inibição para ambas as estirpes bacterianas estudadas, o que mostra que a bentonita não atua como agente antimicrobiano, fato esse que já havia sido comprovado na análise antifúngica. Após a incorporação do acetato de geranila a bentonita organofílica, para Bent-ODA-0.75GA houve a formação de halo de inibição apenas para *Staphylococcus aureus*, com diâmetro médio de $8,00 \pm 0,00$ mm, para Bent-ODA-1.0GA houve a formação de halo de inibição para a *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, sendo estes de $10,7 \pm 0,6$ e $2,2 \pm 0,1$, respectivamente. Para *Escherichia coli*, os compósitos desenvolvidos não foram capazes de causar qualquer efeito antibacteriano, isso se deve ao fato de que bactérias Gram-negativas são menos susceptíveis ao ataque de agentes externos, uma vez que possuem uma bicamada fosfolipídica que as protege de forma mais intensa quando comparadas as bactérias Gram-positivas.

A partir dos resultados antibacterianos e antifúngicos foi possível inferir que o acetato de geranila foi incorporado a bentonita organofílica e com eficiência agregou a propriedade antimicrobiana, sendo o acréscimo na concentração de acetato de geranila um fator positivo quando avaliada a atividade antibacteriana, promovendo um maior halo de inibição.

Através do espectro de FTIR pode-se observar que as bandas características da bentonita, ODA e acetato de geranila foram mantidas no compósito Bent-ODA-1.0GA, não sendo encontradas evidências de interações químicas entre o acetato de geranila e a bentonita organofílica. Ainda é visível a presença de grupos particulares tanto da bentonita organofílica quanto do acetato de geranila, o que reitera o fato do acetato de geranila ter sido incorporado à bentonita organofílica.

Esse resultado corrobora com àqueles obtidos pela técnica de DRX que mostraram que houve uma redução no ângulo 2θ e consequente aumento no espaçamento basal após a incorporação do acetato de geranila a bentonita organofílica, mostrando que de fato o acetato de geranila foi incorporado efetivamente a matriz de bentonita organofílica.

Ainda considerando os resultados obtidos pela técnica de TGA foi possível constatar a presença de 18% em massa de acetato de geranila na bentonita organofílica, o que indica que foi incorporado a bentonita organofílica aproximadamente 63% do acetato de geranila adicionado inicialmente, sendo o restante perdido possivelmente durante a evaporação do solvente na fase de produção do compósito.

A finalização do trabalho se deu através de ensaios *in vivo* a fim de verificar se o material desenvolvido possui toxicidade aguda seguindo a diretriz nº 423 da *Organization for Economic Cooperation and Development*. O compósito Bent-ODA-1.0GA foi administrado via gavagem em camundongos nas doses de 300 e 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e durante 15 dias observou-se o comportamento dos animais, o consumo de ração e o peso dos mesmos. Os resultados mostraram que houveram alguns sinais adversos nos animais após administração como pelo arrepiado, ptose palpebral e *shacking*, se comparados aqueles que receberam o composto em estudo com os que receberam apenas o veículo.

Avaliando o peso corporal dos animais e a ingestão de alimentos pode-se inferir que quando comparado o grupo que recebeu o veículo com aquele administrado com a menor dose de Bent-ODA-1.0GA (300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) não houveram diferenças estatísticas significativas. Quando a dose de Bent-ODA-1.0GA foi aumentada para 2000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ houveram diferenças significativas tanto para o peso corporal quanto na ingestão de alimentos, entretanto não houve a morte de nenhum animal.

Quando avaliado o peso dos órgãos após eutanásia dos animais, verificou-se que houveram diferenças significativas no cérebro, glândulas adrenais e fígado, entretanto a massa desses órgãos foi ligeiramente menor se comparado ao controle, o que não é um motivo eminente de preocupação. O compósito desenvolvido foi classificado como categoria 5, destinada a produtos químicos que apresentam baixa toxicidade aguda, mas apresentam perigo para populações vulneráveis em determinadas circunstâncias, sendo sua DL50 (dose aguda letal) superior a 2000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

O ensaio de liberação de acetato de geranila da bentonita organofílica em diferentes pHs mostrou que se o mesmo for liberado, será em uma quantidade muito pequena, inferior a 0,03 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para pH 3,5 e inferior a 0,004 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para pH 6,5, ficando o mesmo impregnado na matriz, mantendo a atividade antimicrobiana do compósito por pelo menos 75 h que foi o tempo em que se fez a avaliação.

Os resultados obtidos nesta tese mostram que foi possível obter um material antimicrobiano e adsorvente de Aflatoxina B1 a base de bentonita organofílica e acetato de geranila, o qual pode vir a ser utilizado como nutracêutico ou como matéria-prima para a produção de ração devido a não apresentar toxicidade em doses menores que 2000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES

Levando em consideração o desafio inovador da proposta desta tese de doutorado, cujo tema consistiu no desenvolvimento de um compósito a base de bentonita organofílica e acetato de geranila que fosse antifúngico e antibacteriano, adsorvente de Aflatoxina B1 e atóxico, voltado para possíveis aplicações em nutracêuticos e ração para a alimentação animal, pode-se concluir que:

- O compósito antimicrobiano, adsorvente de Aflatoxina B1 e atóxico foi produzido através da incorporação do acetato de geranila à bentonita organofílica;
- A atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* foi bastante significativa mesmo na menor concentração de acetato de geranila estudada, promovendo uma redução superior a 90% do crescimento fúngico;
- Os compósitos desenvolvidos foram capazes de inibir o crescimento e/ou causar a morte de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e somente na maior concentração de acetato de geranila foi efetivo contra bactérias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*). Para *Escherichia coli*, não houve a formação de halo de inibição mostrando uma maior resistência dessa bactéria;
- A adsorção de Aflatoxina B1 foi comprovada, sendo a concentração final desta micotoxina inferior à recomendada pela FDA, com percentuais de redução superiores a 90% em um tempo de apenas 45 min;
- A análise DRX mostrou que a organofilização da bentonita ocorreu conforme descrito na literatura e que após a inserção do acetato de geranila houve uma redução no ângulo 2θ e consequente aumento no espaçamento basal, mostrando que de fato este éster foi incorporado efetivamente a matriz de bentonita organofílica.
- Por meio das análises química (FTIR) e térmica (TGA) confirmou-se a presença do acetato de geranila na bentonita organofílica, não sendo encontradas evidências de interações químicas entre a bentonita organofílica e o acetato de geranila;
- O compósito a base de bentonita organofílica e acetato de geranila não causou a morte de animais quando submetido ao ensaio de toxicidade aguda *in vivo*, sendo classificado na categoria 5 de acordo com a OECD (2001), como material de baixa toxicidade, com DL50 superior a 2000 mg·kg⁻¹.

- Conforme sinalizado pelo estudo de liberação do acetato de geranila em diferentes pHs, caso o agente antimicrobiano tenha sido liberado da matriz após 75 h, foi em quantidade inferiores a $0,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para pH 3,5 e $0,004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para pH 6,5, sendo este um indício de que a atividade antimicrobiana dos filmes pode perdurar no material por, no mínimo, este período.
- Por fim pode-se concluir que a hipótese levantada inicialmente foi confirmada, pois a bentonita organofílica incorporada com acetato de geranila é um material antibacteriano e antifúngico, adsorvente de Aflatoxina B1 e atóxica em concentrações inferiores a $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, tornando o compósito promissor para aplicação em nutracêuticos e rações para consumo animal.

CAPÍTULO 9

SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos nesta tese contribuem na busca por soluções para uma problemática que assola produtores e processadores de grãos, bem como toda a cadeia de alimentação animal, uma vez que a contaminação fúngica e a presença de Aflatoxina B1 são um risco eminente. Embora grande parte dos questionamentos aqui levantados, tenham sido respondidos, ao longo do desenvolvimento deste trabalho, surgiram novas lacunas e inquietações, o que abre possibilidade para que novos estudos sejam realizados nessa área. Desta forma, as seguintes propostas para trabalhos futuros são sugeridas:

- Testar a atividade antibacteriana e antifúngica do compósito frente a outros microrganismos;
- Estudar o mecanismo de ação antibacteriana e antifúngica;
- Avaliar a capacidade de adsorção de outras micotoxinas e até mesmo casos de co-contaminação;
- Verificar se o acetato de geranila presente na bentonita organofílica poderia prejudicar a flora bacteriana presente no sistema gastrointestinal de animais;
- Analisar se após o ensaio de adsorção em diferentes pHs a propriedade antimicrobiana ainda se manifestaria no compósito desenvolvido;
- Avaliar as isotermas de adsorção e desta forma a influência da temperatura;
- Testar a toxicidade subaguda do compósito desenvolvido;
- Incorporar o compósito na ração destinada a alimentação animal e testar em frangos.

CAPÍTULO 10

REFERÊNCIAS

ABUAGELA, M. O., IQDIAM, B. M., MOSTAFA, H., GU, L., SMITH, M. E., SARNOSKI, P. J. Assessing pulsed light treatment on the reduction of Aflatoxins in peanuts with and without skin. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 53, p. 2567–2575, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13851>. Acesso em: jan. 2020.

AKPOMIE, K. G., DAWODU, F. A. Potential of a low-cost bentonite for heavy metal abstraction from binary component system. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, vol. 4, nº 1, p. 1-13, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.02.002>. Acesso em: jun. 2020.

ALENCAR, E. R., L. R. D’A., FARONI, SOARES, N. F. F., SILVA, W. A., CARVALHO, M. C. S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of Aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 92, p. 899–905, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4668>. Acesso em: jan. 2020.

ALEXANDER, J. A., ZAINI, M. A. A., SURAJUDEEN, A., ALIYU, E. U., OMEIZA, A. U. Surface modification of low-cost bentonite adsorbents—A review. **Particulate Science and Technology**, vol. 37, nº 5, p. 538-549, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02726351.2018.1438548>. Acesso em: abr. 2020.

ALLTECH. Global Feed Survey, 2020. Disponível em: https://www.alltech.com/sites/default/files/GFS_Brochure_2020.pdf. Acesso em: jun. 2021.

ARUS, V. A., NOUSIR, S., SENNOUR, R., SHIAO, T. C., NISTOR, I. D., ROY, R., AZZOUZ, A. Intrinsic affinity of acid-activated bentonite towards hydrogen and carbon dioxide. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 43, p. 7964-7972, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.034>. Acesso em: jan. 2020.

ASTM. (2015). ASTM G21-15 Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi. AMERICAM SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM.

AWAD, W. A., GHAREEB, K., JOSEF BÖHM, J., ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin Deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food Additives and Contaminants**, vol. 27, nº 4, p. 510–520, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440040903571747>. Acesso em: jan. 2020.

BADGUJAR, K. C., BHANAGE, B. M. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: Kinetic modelling and chain length effect study. **Process Biochemistry**, vol. 49, p. 1304-1313, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.014>. Acesso em: jan. 2020.

BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. 2.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1992. 629 p.

BAPTISTA, A. S., HORII, J., CALORI-DOMINGUES, M. A., DA GLÓRIA, E. M., SALGADO, J. M., VIZIOLI, M. R. Thermolysed and active yeast to reduce the toxicity of Aflatoxin. **Scientia Agricola**, vol.59, nº 2, p. 257-260, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162002000200008>. Acesso em: jan. 2020.

BARRIENTOS-VELAZQUEZ, A. L., KAKANI, R., FOWLER, J., HAQ, A., BAILEY, C. A., DENG, Y. Efficacy of two Texas bentonites in binding Aflatoxin B1 and in reducing aflatoxicosis in broilers. **Clays and Clay Minerals**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42860-022-00191-8>. Acesso em: ago. 2022.

BEDOUX, G., ROIG, B., THOMAS, O., DUPONT, V., LE BOT, B. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 19, p. 1044–1065, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0632-z>. Acesso em: maio 2020.

BERGAYA, F., THENG, B.K.G., LAGALY, G. Handbook of Clay Science. **Developments in Clay Science**, vol. 1. 2^o ed., Ed. Elsevier, 2006. Acesso em: jan. 2020.

BERNARDOS, A., BOZIK, M., ALVAREZ, S., SASKOVA, M., PEREZ-ESTEVE, E., KLOUCEK, P., LHOTKA, M., FRANKOVA, A., MARTINEZ-MANEZ, R. The efficacy of essential oil components loaded into montmorillonite against *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus*. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 34, p. 151–162, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.3488>. Acesso em: jun. 2022.

BERTELLA, F., SCHWANKE, A. J. LOPES, C. W. W., PENHA, F. G. Estudo da ativação ácida de uma argila bentonita. **Perspectiva**, vol. 34, nº 127, p. 105-111, 2010. Disponível em: https://www.uricer.edu.br/site/pdfs/perspectiva/127_127.pdf. Acesso em: jan. 2020.

BETTIOL, P. S., CECHINEL, M. A. P., OLIVEIRA, C. M., GOULART, K., DOL-BÓ, A. G., BERNARDIN, A. M., PETERSON, M. Adsorption of aflatoxin B1 mycotoxins by raw and lyophilized bentonitic clay. **Advanced Powder Technology**, vol. 33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apt.2022.103682>. Acesso em: ago. 2022.

BEZBRADICA, D., CROVIC, M.; TANASKOVIC, S. J., LUKOVIC, N., CAREVIC, M., MILIVOJEVIC, A., KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic syntheses of esters - green chemistry for valuable food, fuel and fine chemicals. **Current Organic Chemistry**, vol. 21, nº 2, p. 104-138, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/1385272821666161108123326>. Acesso em: jan. 2021.

BHATTI, S. A., KHAN, M. Z., SALEEMI, M. K., SAQIB, M., KHAN, A., UL-HASSAN, Z. Protective role of bentonite against Aflatoxin B1- and Ochratoxin A-induced immunotoxicity in broilers. **Journal of Immunotoxicology**, vol. 14, nº 1, p. 66–76, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/1547691X.2016.1264503>. Acesso em: abr. 2020.

BHAVSAR, K. V., YADAV, G. D. Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *Candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 34, p. 288–293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.3502>. Acesso em: jan. 2020.

BOURKAIB, M. C., RANDRIAMALALA, H., DETTORI, L., HUMEAU, C., DELAUNAY, S., CHEVALOT, I., GUIAVARC'H, Y. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations. **Process Biochemistry**, vol. 71, p. 118-126, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>. Acesso em: jan. 2020.

BOVO, F., CORASSIN, C. H., OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de Aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido lácticas. **Ciências biológicas e da saúde**, vol. 12, nº 2, p. 15-21, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2010v12n2p%25p>. Acesso em: abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria n.º 7, de 9 de novembro de 1988. **Padrões de tolerância para Aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias primas e rações**. Diário Oficial da União, Brasília, 1988. Acesso em: mai. 2021.

BRASIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. **Procedimentos para o uso científico de animais**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm. Acesso em: dez. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução de diretoria colegiada – RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. **Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Acesso em: jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução normativa nº 110, de 24 de novembro de 2020. **Lista de matérias-primas aprovadas como ingredientes, aditivos e veículos para uso na alimentação**. Acesso em: jun 2021.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 173, p. 134-158, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>. Acesso em: mai. 2021.

CAPELEZZO, A. P., MOHR, L. C., DALCANTON, F., BARRETA, C. R. D. M., MARTINS, M. A. P. M., FIORI, M. A., MELLO, J. M. M. Polímero biodegradável antimicrobiano através da aditivação com compostos à base de zinco. **Química Nova**, vol. 41, nº 4, p. 367-374, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170187>. Acesso em: jan. 2020.

CAPUTI, B. Legislação em Fábricas de Rações – SINDIRAÇÕES. Universidade de São Paulo – USP, 2019. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4682933/mod_resource/content/1/Aula%20FZEA%2028.05.19%20Regulat%C3%B3rio.pdf. Acesso em: jun. 2021.

CARÃO, Á. C. P., BURBARELLI, M. F. C., POLYCARPO, G. V., SANTOS, A. R., ALBUQUERQUE, R. OLIVEIRA, C. A. F. Métodos físicos e químicos de detoxificação de Aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, vol. 44, nº 4, p. 699-705, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2010v12n2p%25p>. Acesso em: abr. 2020.

CLEGG, F., BREEN, C., MURANYI, P., SCHÖNWEIT, C. Antimicrobial, starch based barrier coatings prepared using mixed silver/sodium exchanged bentonite. **Applied Clay Science**, vol. 179, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105144>. Acesso em: abr. 2020.

CHEN, Y., DING, S., ZHENG, W., ZHANG, Y., WU, Y., HU, X. Proton-gradient-transfer acid complexes and their catalytic performance for the synthesis of geranyl acetate. **Chinese Journal of Catalysis**, vol. 37, nº 12, p. 2114-2121, 2016. Disponível em: [http://10.1016/S1872-2067\(16\)62577-9](http://10.1016/S1872-2067(16)62577-9). Acesso em: jan. 2020.

CHKUASELI, A., KHUTSISHVILI-MAISURADZE, M., CHAGELISHVILI, A., NATSVALADZE, K., LASHKARASHVILI, T., CHAGELISHVILI, G., MAISURADZE, N. Application of new mycotoxin adsorbent-bentonite clay “Askangel” in poultry feed. **Annals of Agrarian Science**, vol. 14, p. 295-298, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aasci.2016.09.004>. Acesso em: out. 2020.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptible tests; Approved standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Acesso em: jan. 2016.

CONCEA - Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37 – DIRETRIZ PARA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA – Brasília, 15 de fevereiro de 2018.

COLELLA, C. Recent advances in natural zeolite applications based on external surface interaction with cations and molecules. **Studies in Surface Science and Catalysis**, vol. 170, p. 2063-2073, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(07\)81100-1](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(07)81100-1). Acesso em: mai. 2022.

COLOVIC, R., PUVACA, N., CHELI, F., AVANTAGGIATO, G., GRECO, D., ĐURAGIC, O., KOS, J., PINOTTI, L. Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed. **Toxins**, vol. 617, nº 11, p. 1-18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11110617>. Acesso em: jan. 2020.

COMISSÃO EUROPEIA. Commission recommendation of 14 January 2011 establishing guidelines for the distinction between feed materials, feed additives, biocidal products and veterinary medicinal products. O. J. Eur. Union 2011, p. 75–79, 2011. Acesso em: fev. 2021.

COSTANZO, P., SANTINI, A., FATTORE, L., NOVELLINO, E., RITIENI, A. Toxicity of Aflatoxin B1 towards the vitamin D receptor (VDR). **Food and Chemical Toxicology**, vol. 76, p. 77–79, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.025>. Acesso em: jan. 2020.

CORRÊA, L. S., HENRIQUES, R. O., RIOS, J. V., LERIN, L. A., OLIVEIRA, D., FURIGO JR, A. Lipase-catalyzed esterification of geraniol and citronellol for the synthesis of terpenic esters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03102-1>. Acesso em: jan. 2020.

CROOKS, J. E., EL-DALY, H., EL-SHEIKH, M. Y., HABIB, A. M., ZAKI, A. B., Kinetics of ion-exchange on montmorillonite clays. **International Journal of Chemical Kinetics**, vol.

25, p. 161-168, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/kin.550250304>. Acesso em: jan. 2020.

DAKOVIC, A., MATIJASEVIC, S., ROTTINGHAUS, G. E., LEDOUX, D. R., BUTKERAITIS, P., SEKULIC, Z. Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 66, p. 20–25, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.008>. Acesso em: jan. 2020.

DAKOVIC, A., KRAGOVIC, M., ROTTINGHAUS, G. E., LEDOUX, D. R., BUTKERAITIS, P., VOJISLAVLJEVIC, D. Z., ZARIC, S. D., STAMENIC, L. Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as Aflatoxin B1 adsorbent. **Materials Chemistry and Physics**, vol. 137, p. 213-220, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.09.010>. Acesso em: jun. 2021.

DANN, A. B., HONTELA, A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **Journal of Applied Toxicology**, vol. 31, p. 285–311, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jat.1660>. Acesso em: mai. 2020.

DÁRIO, G. M., SILVA, G. G., GONÇALVES, D. L., SILVEIRA, P., TEIXEIRA JUNIOR, A., ANGIOLETTO, E., BERNARDIN, A. M. Evaluation of the healing activity of therapeutic clay in rat skin wounds. **Materials Science and Engineering C**, vol. 43, p. 109–116, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.024>. Acesso em: abr. 2020.

DAS, L., BHAUMIK, E., RAYCHAUDHURI, U., CHAKRABORTY, R. Role of nutraceuticals in human health. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 49, nº 2, p. 173–183, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4>. Acesso em: jun. 2020.

DAS, S., SINGH, V. K., DWIVEDY, A. K., CHAUDHARI, A. K., UPADHYAY, N., SINGH, A., DEEPIKA, DUBEY, N. K. Antimicrobial activity, antiaflatoxigenic potential and in situ efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 160, p. 102–111, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.013>. Acesso em: jan. 2020.

DELLAFIORA, L., DALL'ASTA, C. Forthcoming challenges in mycotoxins toxicology research for safer food—A need for multi-omics approach. **Toxins**, vol. 9, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins9010018>. Acesso em: jun. 2021.

DURÁN, E., BUENO, S., HERMOSÍN, M. C., COX, L., GÁMIZ, B. Optimizing a low added value bentonite as adsorbent material to remove pesticides from water. **Science of the Total Environment**, vol. 672, p. 743-751, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.014>. Acesso em: jan. 2020.

ELLIOTT, C. T., CONNOLLY, L., KOLAWOLE, O. Potential adverse effects on animal health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce mycotoxin exposure. **Mycotoxin Research**, vol. 36, p.115–126, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00375-7>. Acesso em: jun. 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Sec. 683.100 **Action Levels for Aflatoxins in Animal Food**, 2019. Disponível em:

<https://www.fda.gov/media/121202/download#:~:text=In%201969%2C%20FDA%20set%20an,to%20the%20lowest%20possible%20level>. Acesso em: jan. 2020.

FOLETTI, E. L., VOLZONE, C., MORGADO, A. F., PORTO, L. M. Influência do tipo de ácido usado e da sua concentração na ativação de uma argila bentonítica. **Cerâmica**, vol. 47, nº 304, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0366-69132001000400008>. Acesso em: jan. 2020.

GAN, F., HANG, X., HUANG, Q., DENG, Y. Assessing and modifying China bentonites for Aflatoxin adsorption. **Applied Clay Science**, vol. 168, p. 348–354, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.12.001>. Acesso em: jan. 2020.

GONÇALVES, M. J., CRUZ, M. T., TAVARES, A. C., CAVALEIRO, C., LOPES, M. C., CANHOTO, J., SALGUEIRO, L. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. **Industrial Crops and Products**, vol. 35, p. 166–171, 2012. Disponível em: [10.1016/j.indcrop.2011.06.030](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030). Acesso em: jan. 2020.

GUPTA, P., TANEJA, S. C., SHAH, B. C. A. C., SETHI, V. K., QAZI, G. N. Lipase-catalysed separation of geometrical isomers: geraniol-nerol. **Chemistry Letters**, vol. 36, p. 1110–1111, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1246/cl.2007.1110>. Acesso em: jan. 2020.

GUPTA, A., DHAKATE, S. R., PAHWA, M., SINHA, S., CHAND, S., MATHUR, R. B. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. **Process Biochemistry**, vol. 48, p. 124–132, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.028>. Acesso em: jan. 2020.

HASSAN, A. A., ABU HAFSA, S. H., ELGHANDOUR M. M. M. Y., REDDY, P. R. K., MONROYE, J. C., SALEM, A. Z. M. Dietary supplementation with sodium bentonite and coumarin alleviates the toxicity of Aflatoxin B1 in rabbits. **Toxicon**, vol. 171, p. 35–42, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.014>. Acesso em: out. 2020.

HORKY, P., SKALICKOVA, S., BAHOLET, D., SKLADANKA, J. Nanoparticles as a Solution for Eliminating the Risk of Mycotoxins. **Nanomaterials**, nº 8, vol. 727, p. 1–21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano8090727>. Acesso em: jan. 2020.

HOTI, G., MATENCIO, A., PEDRAZZO, A. R., CECONE, C., APPLETON, S. L., MONFARIED, Y. K., CALDERA, F., TROTTA, F. Nutraceutical concepts and dextrin-based delivery systems. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23084102>. Acesso em: jul. 2022.

HUSSEIN, H. S., BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, vol. 167, p. 101–134, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1). Acesso em: jan. 2020.

HUSSIN, F., AROUA, M. K., DAUD, W. M. A. W. Textural characteristics, surface chemistry and activation of bleaching earth: A review. **Chemical Engineering Journal**, vol. 170, p. 90–106, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.03.065>. Acesso em: jan. 2020.

HWANG, J-H., LEE, K-G. Reduction of Aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, vol. 98, p. 71–75, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.038>. Acesso em: jan. 2020.

JALILI, M. A review on aflatoxins reduction in food. **Iranian Journal of Health, Safety and Environment**, vol. 3, p. 445–459, 2016. e-ISSN: :2345-5535. Acesso em: jan. 2020.

JARD, G., LIBOZ, T., MATHIEU, F., GUYONVARCH, A., LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Journal Food Additives & Contaminants: Part A**, vol. 28, n° 11, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>. Acesso em: abr. 2020.

JAREK, F., REIS, D. M., MAULER, R. S., BARBOSA, R. V., KLOSS, J. R. Caracterização de argilas naturais e quimicamente modificadas para desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos. **10° CBPol**, Foz do Iguaçu, PR, 2009. Disponível em: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/120/41120127.pdf. Acesso em: jan. 2022.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JAYAPRAKASH, A., THANMALAGAN, R. R., ROY, A., ARUNACHALAM, A., LAKSHMI P. T. V. Strategies to understand *Aspergillus flavus* resistance mechanism in *Arachis hypogaea* L. **Current Plant Biology**, vol. 20, p. 1-11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100123>. Acesso em: jan. 2020.

JAYNES, W. F., ZARTMAN, R. E., HUDNALL, W. H. Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. **Applied Clay Science**, vol. 36, p. 197–205, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.012>. Acesso em: jan. 2020.

JARDON-XICOTENCATL, S., DÍAZ-TORRES, R., MARROQUÍN-CARDONA, A., VILLARREAL-BARAJAS, T., MÉNDEZ-ALBORES, A. Detoxification of Aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. **Toxins**, vol. 7, p. 4294-4314, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins7104294>. Acesso em: jan. 2020.

JERMAK, U., CHINAPHUTI, A., POAPOLATHEP, A., KAWAI, R., NAGASAWA, H., SAKUDA, S. Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces Aflatoxin production inhibitors. **Microbiology**, vol. 159, p. 902–912, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.065813-0>. Acesso em: jan. 2020.

KARAGÜZEL, C., ÇETINEL, T., BOYLU, F., ÇINKU, K., ÇELIK, M. S. Activation of (Na, Ca)-bentonites with soda and MgO and their utilization as drilling mud. **Applied Clay Science**, vol. 48, p. 398–404, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.01.013>. Acesso em: jan. 2020.

KELLER, L. A. M., ARONOVICH, M., KELLER, K. M., CASTAGNA, A. A., CAVAGLIERI, L. R., ROSA, C. A. R. Incidence of mycotoxins (AFB1 and AFM1) in feeds and dairy farms from Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Medicine Open Journal**, vol. 1, n° 1, p. 29-35, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17140/VMOJ-1-106>. Acesso em: mai. 2021.

KHANEGHAH, A. M., HASHEMI, S. M. B. LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 3, p. 1-19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>. Acesso em: jan. 2020.

KHANSILI, N., KRISHNA, P. M. Curcumin functionalized TiO₂ modified bentonite clay nanostructure for colorimetric Aflatoxin B1 detection in peanut and corn. **Sensing and Bio-Sensing Research**, vol. 35, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100480>. Acesso em: jun. 2022.

KHATOON, A., KHAN, M. Z., KHAN, A., JAVED, I. Toxicopathological and serum biochemical alterations induced by ochratoxin a in broiler chicks and their amelioration by locally available bentonite clay. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, vol. 53, n° 4, p. 977-984, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/16.5573>. Acesso em: jun. 2021.

KOOLI, F., LIU, Y., AL-FAZE, R., AL SUHAIMI, A. Effect of acid activation of Saudi local clay mineral on removal properties of basic blue 41 from an aqueous solution. **Applied Clay Science**, vol. 116-117, p. 23-30, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2015.07.044>. Acesso em: jan. 2020.

KOSICKI, R., BŁAJET-KOSICKA, A., GRAJEWSKI, J., TWARUZEK, M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 215, p. 165–180, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012>. Acesso em: mai. 2021.

KRISHNAN, B., MAHALINGAM, S. Ag/TiO₂/bentonite nanocomposite for biological applications: Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic investigations. **Advanced Powder Technology**, vol. 28, p. 2265-2280, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2017.06.007>. Acesso em: abr. 2020.

LUPATINI, F. **Avaliação do efeito de variáveis produtivas na conversão alimentar de frangos de corte**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, 2015.

LI, J., WANG, J., WANG, X-J., WANG, J-F. Adsorption–Desorption of Cd (II) and Pb (II) on Ca-Montmorillonite. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, vol. 51, n° 18, p. 6520–6528, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ie203063s>. Acesso em: jun. 2021.

LI, Y., TIAN, G., DONG, G., BAI, S., HAN, X., LIANG, J., MENG, J., ZHANG, H. Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. **Applied Clay Science**, vol. 163, p. 299–311, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.032>. Acesso em: jan. 2020.a

LI, S. J., ZHANG, X., WANG, X. H., ZHAO, C. Q. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 156, p. 316-343, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.015>. Acesso em: jan. 2020.b

LIAN, L., GUO, L., GUO, C. Adsorption of Congo red from aqueous solutions onto Ca-bentonite. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 161, p. 126–131, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.063>. Acesso em: jun. 2020.

LIU, J. H., CAI, W. K., KHATOON, N., YU, W. H., ZHOU, C. H. On how montmorillonite as an ingredient in animal feed functions. **Applied Clay Science**, vol. 202, p. 1-16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105963>. Acesso em: jun. 2021.

LOPES, J. M., RUTZ, F., MALLMANN, C. A., TOLEDO, G. S. P. Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. **Ciência Rural**, vol. 36, nº 5, p. 1594-1599, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000500040>. Acesso em: mai. 2022.

LUO, X., WANG, R., WANG, LI., WANG, Y., CHEN, Z. Structure elucidation and toxicity analyses of the degradation products of Aflatoxin B1 by aqueous ozone. **Food Control**, vol. 31, p. 331-336, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.030>. Acesso em: jan. 2020.

MACUVELE, D. L. P., NONES, J., MATSINHE, J. V., BEZERRA A. T., LIMA M. M., SANTOS E. S. W., FIORI M. A., RIELLA H. G. Simultaneous effect of reaction temperature and concentration of surfactant in organo-bentonite synthesis. **Materials Science Forum**, vol. 899, p. 42-47, 2017. Disponível em: [10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.899.42). Acesso em: out. 2020.

MACUVELE, D. L. P. **Compósito de polietileno de ultra alto peso molecular reforçado com hidroxiapatita e bentonita organofílica para aplicações biomédicas**. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2018.

MACUVELE, D. L. P., COLLA, G., CESCO, K., RIBEIRO, L. F. B., COSTA, C. E., NONES, J., BREITENBACH, E. R., PORTO, L. M., SOARES, C., FIORI, M. A., RIELLA, H. G. UHMWPE/HA biocomposite compatibilized by organophilic montmorillonite: An evaluation of the mechanical-tribological properties and its hemocompatibility and performance in simulated blood fluid. **Materials Science & Engineering C**, vol. 100, p. 411-423, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.102>. Acesso em: jan. 2020.

MADBOULY, A. K., IBRAHIM, M. I. M., SEHAB, A. F., ABDEL-WAHHAB, M. A. Co-occurrence of mycoflora, Aflatoxins and Fumonisin in maize and rice seeds from markets of different districts in Cairo, Egypt. **Food Additives and Contaminants: Part B**, vol. 5, nº 2, p. 112–120, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2012.676078>. Acesso em: jan. 2020.

MAGNOLI, A. P., TALLONE, L., ROSA, C. A. R., DALCERO, A. M., CHIACCHIERA, S. M., SANCHEZ, R. M. T. Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with Aflatoxin. **Applied Clay Science**, vol. 40, p. 63–71, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.07.007>. Acesso em: mai. 2021.

MARKOV, K., MIHALJEVI, B., DOMIJAN, A-M., PLEADIN, J., DELAS, F., FRECE, J. Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of Aflatoxin B1 in vitro and in situ using

gamma irradiation. **Food Control**, vol. 54, p. 79-85, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.036>. Acesso em: jan. 2020.

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, vol. 12, nº 1, p. 89-99, 2010. ISSN 1517-8595. Acesso em: jan. 2020.

MENDES, A. A. Jejum Pré-abate em Frangos de Corte. **Brazilian Journal of Poultry Science**, vol. 3, nº 3, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2001000300001>. Acesso em: ago. 2022.

MÉNDEZ-ALBORES, A., DEL RÍO-GARCÍA, J. C., MORENO-MARTÍNEZ, E. Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 135, p. 249–262, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.07.009>. Acesso em: jan. 2020.

MÉNDEZ-ALBORES, A., MARTÍNEZ-BUSTOS, F., GAYTÁN-MARTÍNEZ, M., MORENO-MARTÍNEZ, E. Effect of lactic and citric acid on the stability of B-Aflatoxins in extrusion-cooked sorghum. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 47, p. 1–7, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02376.x>. Acesso em: jan. 2020.

MORAGAS, W. M., SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, vol. 3, nº 10, p. 26-40, 2003. ISSN 1678-6343. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/caminhosdegeografia/article/view/15315/8614>. Acesso em: jun. 2021.

MURCIA, M. D., GÓMEZ, M., GÓMEZ, E., GÓMEZ, J. L., HIDALGO, A. M., SÁNCHEZ, A., VERGARA P. Kinetic modelling and kinetic parameters calculation in the lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate. **Chemical Engineering Research and Design**, vol. 138, p. 135–143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.08.025>. Acesso em: jan. 2020.

NAFCHI, A. M., ALIAS, A. K., MAHMUD, S., ROBAL, M. Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. **Journal of Food Engineering**, vol. 113, p. 511–519, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.017>. Acesso em: jan. 2017.

NAVARRO, E., PICCAPIETRA, F., WAGNER, B., MARCONI, F., KAEGI, R., ODZAK, N., SIGG, L., BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science & Technology**, vol. 42, p. 8959–8964, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es801785m>. Acesso em: maio 2020.

NONES, J., NONES, J., SCUSSEL, V. M. Analysis of the presence of mycotoxins in swine feed and its possible effects on semen quality in a rural property of Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, vol.13, nº 1, p.7-13, 2014. Disponível em: <https://revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5168/3355>. Acesso em: jan. 2020.

NONES, J., RIELLA, H. G., TRENTIN, A. G., NONES, J. Effects of bentonite on different cell types: A brief review. **Applied Clay Science**, vol. 105-106, p. 225–230, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.12.036>. Acesso em: jan. 2020.

NONES, J., NONES, J., POLI, A., TRENTIN, A. G., RIELLA, H. G., KUHNEN, N. C. Organophilic treatments of bentonite increase the adsorption of aflatoxin B1 and protect stem cells against cellular damage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 145, p. 555–561, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.061>. Acesso em: jan. 2020.

NONES, J., SOLHAUG, A., ERIKSEN, G. S., MACUVELE, D. L. P., POLI, A., SOARES, C., TRENTIN, A. G., RIELLA, H. G., NONES, J. 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**, vol. 337, p. 80–89, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.068>. Acesso em: jan. 2020.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 423. Acute oral toxicity—acute toxic class method, 2001. Disponível em: https://ntp.nieh.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf. Acesso em: jun. 2021.

OLIVEIRA, P. M., ZANNINI, E., ARENDT, E. K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. **Food Microbiology**, vol. 37, p. 78-95, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>. Acesso em: mai. 2021.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M., SAJIC, N., XU, Y., HAUGHEY, S. A., MOONEY, M. H., GONG, Y. Y., VERHEIJEN, R., ELLIOTT, C. T. Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. **Food Control**, vol. 63, p. 239-245, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.041>. Acesso em: jan. 2020.

ORVOS, D. R., VERSTEEG, D. J., INAUEN, J., CAPDEVIELLE, M., ROTHENSTEIN, A., CUNNINGHAM, V. Aquatic toxicity of Triclosan. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 21, n° 7, p. 1338–1349, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210703>. Acesso em: maio 2020.

OSTRY, V., MALIR, F., TOMAN, J., GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monograph classification. **Mycotoxin Research**, vol. 33, p. 65–73, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>. Acesso em: jun. 2021.

PAIVA, L. B., MORALES A. R., DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, vol. 54, n° 330, p. 213-226, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0366-69132008000200012>. Acesso em: jan. 2022.

PANKAJ, S. K., SHI, H., KEENER, K. M. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 71, p. 73–83, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.007>. Acesso em: jan. 2020.

PANKEY, G. A., SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 38, p. 864-870, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/381972>. Acesso em: jan. 2020.

PAPPAS, A. C., TSIPLAKOU, E., TSITSIGIANNIS, D. I., GEORGIADOU, M., ILIADI, M. K., SOTIRAKOGLU, K., ZERVAS, G. The role of bentonite binders in single or concomitant mycotoxin contamination of chicken diets. **British Poultry Science**, vol. 57, n°. 4, p. 551–558, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2016.1187712>. Acesso em: out. 2020.

PARK, J-H., SHIN, H-J., KIM, M. H., KIM, J-S., KANG, N., LEE, J-H., KIM, K-T., LEE, J. I., KIM, D-D. Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, vol. 46, p. 363–375, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0258-8>. Acesso em: abr. 2020.

PASHA, T. N., FAROOQ, M. U., KHATTAK, F. M., JABBAR, M. A., KHAN A. D. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as Aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 132, p. 103–110, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.014>. Acesso em: jan. 2020.

PASA, T. L. B., SOUZA, G. K., DIORIO, A., ARROYO, P. A., PEREIRA, N. C. Assessment of commercial acidic ion-exchange resin for ethyl esters synthesis from *Acrocomia aculeata* (Macaúba) crude oil. **Renewable Energy**, vol. 146, p. 469-476, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.025>. Acesso em: mai. 2021.

PEREIRA, C. S., CUNHA, S. C., FERNANDES, J. O. Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. **Toxins**, vol. 11, n° 5, p. 1-62, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>. Acesso em: mai. De 2021.

PEREIRA, N. R. L., LOPES, B., FAGUNDES, I. V., DE MORAES, F. M., MORISSO, F. D. P., PARMA, G. O. C., ZEPON, K. M., MAGNAGO, R. F. Bio-packaging based on cellulose acetate from banana pseudostem and containing *Butia catarinensis* extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 194, p. 32–41, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.179>. Acesso em: mai. 2022.

PITT, J. I., HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Springer, New York, 2009.

PLEADIN, J., FRECE, J., MARKOV, K. **Mycotoxins in food and feed**. In: Advances in food and nutrition research, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>. Acesso em: jan. 2020.

POLYORGANIC TECNOLOGIA LTDA. **Ativos Biocidas Desinfetantes e Conservantes**, 2021. Disponível em: <https://polyorganic.com.br/ativos-biocidas-desinfetantes-e-conservantes/>. Acesso em: jun. 2021.

POREBSKA, R., RYBAK, A., RAPACZ-KMITA, A. Montmorillonite–triclosan hybrid as effective antibacterial additive with enhanced thermal stability for protection of plastic electrical components. **Polymer Bulletin**, vol. 77, p. 17–31, 2020. Disponível em: sci-hub.tw/10.1007/s00289-019-02699-x. Acesso em: maio 2020.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. **Geranyl acetate**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549026>. Acesso em: jan. 2020.

- RAI, M., YADAV, A., GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, vol. 27, p.76–83, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>. Acesso em: jan. 2017.
- RAIOLA, A., TENORE, G. C., MANYES, L., MECA, G., RITIENI, A. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 84, p. 169-180, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.023>. Acesso em: jan. 2020.
- RAJKUMAR, V., GUNASEKARAN, C., CHRISTY, I.K., DHARMARAJ, J., CHINNARAJ, P., PAUL, C.A., 2019. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 156, p. 138–144, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.016>. Acesso em: jan. 2020.
- RAMYADEVI, J., JEYASUBRAMANIAN, K., MARIKANI, A., RAJAKUMAR, G., RAHUMAN, A. A. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. **Materials Letters**, vol. 71, p. 114-116, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.12.055>. Acesso em: out. 2020.
- RASHEED, U., UL AIN, Q., YASEEN, M., FAN, X., YAO, X., TONG, Z., LIU, B. Modification of bentonite with orange peels extract and its application as mycotoxins' binder in buffered solutions and simulated gastrointestinal fluids. **Journal of Cleaner Production**, vol. 267, 122105, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122105>. Acesso em out. 2020.
- RAWAL, S., KIM, J. E., COULOMBE JR., R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, vol. 89, p. 325–331, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.011>. Acesso em: jan. 2020.
- RIBEIRO, W. L. C., CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., MACEDO, I. T. F., SANTOS, J. M. L., ARAÚJO-FILHO, J. V., RIBEIRO, J. C., PEREIRA, V. A., VIANA, D. A., PAULA, H. C. B. BEVILAQUA, C. M. L. In vitro effects of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion on *Haemonchus contortus* and toxicity in rodents. **Veterinary Parasitology**, vol. 212, p. 444–447, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.019>. Acesso em: jan. 2020.
- RODRIGUES, M. G. F., SILVA, M. L. P., SILVA, M. G. C. Caracterização da argila bentonítica para utilização na remoção de chumbo de efluentes sintéticos. **Cerâmica**, Vol. 50, p. 190-196, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0366-69132004000300004>. Acesso em: jan. 2020.
- ROSA, B. H., SILVA, G. S., CONCEIÇÃO, G. J. A., CARVALHO, R. A., AGUIAR-OLIVEIRA, E., MALDONADO, R. R., KAMIMURA, E. S. Application of partially concentrated *Candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 12, p. 90–95, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.005>. Acesso em: jan. 2020.

ROSÁRIO, J. A. **Obtenção de material antimicrobiano a partir de bentonita nacional tratada com prata**. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2010.

ROSÁRIO, J. A., CECHINEL, M. A. P., OLIVEIRA, C. M., DE NONI, A., PETERSON, M., KUHNEN, N. C., RIELLA, H. G. Influence of sodium pretreatments on the preparation of Ag-doped polycationic bentonite for antibacterial purposes. **Bulletin of Materials Science**, vol. 43:106, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12034-020-02085-8>. Acesso em: mai. 2020.

ROSEANU, A., JECU, L., BADEA, M., EVANS, R. W. Mycotoxins: an overview on their quantification methods. **Romanian Journal of Biochemistry**, vol. 47, nº 1, p. 79–86, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228534007_Mycotoxins_an_overview_on_their_quantification_methods Acesso em: jan. 2020.

SAEED, M., FAROOQ, K., NAFEES, M., ARSHAD, M., AKHTER, M. S., WASEEM, A. Green and eco-friendly removal of mycotoxins with organo-bentonites; isothermal, kinetic, and thermodynamic studies. **Clean – soil, air, water**, vol. 48, nº 9, p. 1-8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/clen.201900427>. Acesso em: mai. 2021.

SALGUEIRO, A. M., SANTOS, M. D., SARAIVA, J. A., ALMEIDA, F., SOUSA, I., TEDIM, J., NOGUEIRA, H. I.S., EVTUGUIN, D. V. Ultra-high pressure modified cellulosic fibres with antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, vol. 175, p. 303-310, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.081>. Acesso em: jan. 2020.

SANTINI, A. NOVELLINO, E. To Nutraceuticals and Back: Rethinking a Concept. **Foods**, vol. 6, nº 9, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/foods6090074>. Acesso em: jul. 2022.

SANTOS, R. R., VERMEULEN, S., HARITOVA, A., FINK-GREMMELS, J. Isotherm modeling of organic activated bentonite and humic acid polymer used as mycotoxin adsorbents. **Food Additives and Contaminants**, vol. 28, nº 11, p. 1578–1589, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.595014>. Acesso em: jan. 2020.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 54, p. 177– 182, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00037-X) Acesso em: jan. 2017.

SHARIFI-RAD, J., SUREDA, A., TENORE, G. C., DAGLIA, M., SHARIFI-RAD, M., VALUSSI, M., TUNDIS, R., SHARIFI-RAD, M., LOIZZO, M. R., ADEMILUYI, A. O., SHARIFI-RAD, R., AYATOLLAHI, S. A., IRITI, M. Biological Activities of Essential Oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, vol. 22, nº 70, p. 1-55, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>. Acesso em: nov. de 2021.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J. C., VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 59, p. 426–435, 2002. Disponível em: [10.1007/s00253-002-1032-6](https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6). Acesso em: jan. 2020.

SHAH, L. A., VALENZUELA, M. G. S., EHAN, A. M., DÍAZ, F. R. V., KHATTAK, N. S. Characterization of Pakistani purified bentonite suitable for possible pharmaceutical application. **Applied Clay Science**, vol. 83–84, p. 50–55, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2013.08.007>. Acesso em: abr. 2020.

SHIM, W-B., MUN, H., JOUNG, H-A., OFORI, J. A., CHUNG, D-H., KIM, M-G. Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of Aflatoxin B1 in corn samples. **Food Control**, vol. 36, p. 30-35, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.042>. Acesso em: jan. 2020.

SILVEIRA, J. N. **Processamento de argilas visando o combate dos efeitos tóxicos causados pela Aflatoxina B1**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2016.

SOARES, N. F. F., MOREIRA, F. K. V., FIALHO, T. L., MELO, N. R. Triclosan-based antibacterial paper reinforced with nano-montmorillonite: a model nanocomposite for the development of new active packaging. **Polymers for Advanced Technologies**, vol. 23, p. 901–908, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pat.1986>. Acesso em: maio 2020.

SOUZA, A. V. C. Interpretando os Índices de Conversão Alimentar (I.C.A.) e de Eficiência Alimentar (I.E.A.). Poli nutri alimentos, Artigo técnico, 2003.

STREIT, E., NAEHRER, K., RODRIGUES, I., SCHATZMAYR, G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 93, p. 2892–2899, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6225>. Acesso em: mai. 2021.

STREIT, E., SCHATZMAYR, G., TASSIS, P., TZIKA, E., MARIN, D., TARANU, I., TABUC, C., NICOLAU, A., APRODU, J., PUEL, O., OSWALD, I. P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—focus on Europe. **Toxins**, vol. 4, p. 788-809, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>. Acesso em: mai. 2021.

SUN, Z., SONG, A., WANG, B., WANG, G., ZHENG, S. Adsorption behaviors of Aflatoxin B1 and Zearalenone by organo-rectorite modified with quaternary ammonium salts. **Journal of Molecular Liquids**, vol. 264, p. 645–651, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.091>. Acesso em: jan. 2020.

SUN, G., WANG, S., HU, X., SU, S., ZHANG, Y., XIE, Y., ZHANG, H., TANG, L., WANG, J.-S. Co-contamination of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. **Food Additives and Contaminants**, vol. 28, n° 4, p. 461-470, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.544678>. Acesso em: jun. de 2019.

STAGNARO, S. Y. M., VOLZONE, C., RUEDA, M. L. Influence of thermal treatment on bentonite used as adsorbent for Cd, Pb, Zn retention from mono-solute and poly-solute aqueous solutions. **Materials Research**, vol. 15, n° 4, p. 549-553, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-14392012005000074> Acesso em: jan. 2020.

TANG, X., LI, B., LI, C., LIN, Y. Catalytic synthesis of geranyl propionate. **Agricultural Science & Technology**, vol. 13, nº 2, p. 251–283, 2012. ISSN: 1009-4229. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123331086>. Acesso em: jan. 2020.

TISCHER, J. S., POSSAN, H., LUIZ, J., MALAGUTTI, N. B., MARTELLO, R., VALÉRIO, A., DALMAGRO, J., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J. V. Synthesis of eugenyl acetate through heterogeneous catalysis. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 31, nº 4, p. 312-318, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1566098>. Acesso em: mai. 2021.

TOHDEE, K., KAEWSICHAN, L., ASADULLAH. Enhancement of adsorption efficiency of heavy metal Cu (II) and Zn (II) onto cationic surfactant modified bentonite. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, vol. 6, p. 2821-2828, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.030>. Acesso em: mai. 2021.

TOOR, M., JIN, B. Adsorption characteristics, isotherm, kinetics, and diffusion of modified natural bentonite for removing diazo dye. **Chemical Engineering Journal**, vol. 187, p. 79-88, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.089>. Acesso em: jan. 2020.

TRIPATHI, S. MISHRA, H. N. Studies on the efficacy of physical, chemical and biological Aflatoxin B1 detoxification approaches in red chilli powder. **International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health**, vol. 2, nº 1, p. 69-77, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1504/ijfsnph.2009.026920>. Acesso em: jan. 2020.

U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709. Carcinogenesis Studies of Food Grade Geranyl Acetate (71% Geranyl acetate, 29% Citronelly acetate) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study). Technical Report Series No. 252 (1987) NIH Publication No. 88-2508. Acesso em: jan. 2020.

VILA-DONAT, P., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. New mycotoxin adsorbents based on tri-octahedral bentonites for animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 255, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114228>. Acesso em: abr. 2020.

VIOTTI, G. C. A. **Desenvolvimento e caracterização de argilas organofílicas para uso em alimentação animal como adsorvente inativador de micotoxinas: Aflatoxina B1 e Fumonisina B1**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2006.

WANG, B., MAHONEY, N. E., PAN, Z., KHIR, R., WU, B., MA, H., ZHAO, L. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of Aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. **Food Control**, vol. 59, p. 461-467, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.030>. Acesso em: jan. 2020.a

WANG, J., GULERIA, S., KOFFAS, M. A. G., YAN, Y. Microbial production of value-added nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 37, p. 97–104, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.003>. Acesso em: mai. 2021.b

WANG, G., MIAO, Y., SUN, Z., ZHENG, S. Simultaneous adsorption of Aflatoxin B1 and Zearalenone by mono- and di-alkyl cationic surfactants modified montmorillonites. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 511, p. 67-76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.09.074>. Acesso em: jun. 2021.

WANG, M., HEARON, S. E., PHILLIPS, T. D. A high-capacity bentonite clay for the sorption of Aflatoxins. **Food Additives & Contaminants: PART A**, vol. 37, nº 2, p. 332-341, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1662493>. Acesso em: mai. 2021.

WELKER, J. S., ROSA, A. P., MOURA, D. J., MACHADO, L. P., CATELAN, F., UTPATEL, R. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 37, nº 8, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000800018>. Acesso em: mai. 2022.

XIONG, K., LIU, H. J., LI, L. Product identification and safety evaluation of Aflatoxin B1 decontaminated by electrolyzed oxidizing water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, p. 9770–9778, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf303478y>. Acesso em: jan. 2020.

XIONG, J., HUANG, Y., ZHANG, H., HOU, L. Lipase-catalyzed transesterification synthesis of geranyl acetate in organic solvents and its kinetics. **Food Science and Technology Research**, vol. 20, nº 2, p. 207-216, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3136/fstr.20.207>. Acesso em: jan. 2020.

YU, Y., WU, H., TANG, Y., QUIU, L. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for Zearalenone detoxification. **Microbiological Research**, vol. 167, p. 121–126, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.07.004>. Acesso em: jun. 2021.

YU, W. H., ZHU, T. T., TONG, D. S., WANG, M., WU, Q. Q., ZHOU, C. H. Preparation of organo-montmorillonites and the relationship between microstructure and swellability. **Clays and Clay Minerals**, vol. 65, nº 6, p. 417–430, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1346/CCMN.2017.064068>. Acesso em: jun. 2021.

ZAHOOR, M., KHAN, F. A. Adsorption of Aflatoxin B1 on magnetic carbon nanocomposites prepared from bagasse. **Arabian Journal of Chemistry**, vol. 11, nº 5, p. 729-738, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.025>.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, vol. 15, p. 129-144, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>. Acesso em: jan. 2021.

ZAKI, M. M., EL-MIDANY, S. A., SHAHEEN, H. M., RIZZI, L. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, vol. 4, n 1, p. 13–28, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/JTEH11.072>. Acesso em: jun. 2021.

ZANETTI, M., CARNIEL, T. K., DALCANTON, F., DOS ANJOS, R. S., RIELLA, H. C., DE ARAÚJO, P. H. H., DE OLIVEIRA, J. V., DE OLIVEIRA, D., FIORI, M. A. Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 81, p. 51-60, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.003>. Acesso em: jan. 2020.

ZARE, M., GOLMAKANI, M-T., SARDARIAN, A. Green synthesis of banana flavor using different catalysts: a comparative study of different methods. **Green chemistry letters and reviews**, Vol. 13, nº 2, p. 83–92, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1737739>. Acesso em: mai. 2021.

ZEFERINO, R. C. F., PIAIA, V. A. A., ORSO, V. T., PINHEIRO, V. M., ZANETTI, M., COLPANI, G. L., PADOIN, N., SOARES, C., FIORI, M. A., RIELLA, H. G. Synthesis of geranyl acetate by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. **Chemical Engineering Research and Design**, vol. 168, p. 156-168, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.01.031>. Acesso em: mai. 2021.

ZHANG, W., ZHANG, L.Y., JIANG, X., LIU, X., LI, Y., ZHANG, Y.G. Enhanced adsorption removal of Aflatoxin B1, Zearalenone and Deoxynivalenol from dairy cow rumen fluid by modified nano-montmorillonite and evaluation of its mechanism. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 259, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114366>. Acesso em: jun. 2021.

ZHU, R., CHEN, Q., ZHOU, Q., XI, Y., ZHU, J., HE, H. Adsorbents based on montmorillonite for contaminant removal from water: a review. **Applied Clay Science**, vol. 123, p. 239–258, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2015.12.024>. Acesso em: jan. 2020.