



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

**PROCESSAMENTO DE ARGILAS VISANDO O COMBATE DOS
EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS PELA AFLATOXINA B₁**

JANAÍNA NONES DA SILVEIRA

**FLORIANÓPOLIS
2016**

Janaína Nones da Silveira

**PROCESSAMENTO DE ARGILAS VISANDO O COMBATE DOS
EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS PELA AFLATOXINA B₁**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Gracher Riella

Florianópolis
2016

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

da Silveira, Janaína Nones

Processamento de Argilas Visando o Combate dos Efeitos Tóxicos Causados pela Aflatoxina B₁ / Janaína Nones da Silveira ; orientador, Nivaldo Cabral Kuhnen ; coorientador, Humberto Gracher Riella - Florianópolis, SC, 2016.

216 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Bentonita. 3. Aflatoxina B₁. 4. Adsorção. 5. Células-tronco. I. Cabral Kuhnen, Nivaldo. II. Gracher Riella, Humberto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Janaína Nones da Silveira

**PROCESSAMENTO DE ARGILAS VISANDO O COMBATE DOS
EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS PELA AFLATOXINA B₁**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de março de 2016.

Prof. Nivaldo Cabral Kuhnen, Dr.
Orientador - UFSC

Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.
Coorientador. UFSC

Prof^ª. Cíntia Soares, Dra.
Coordenadora do Curso - UFSC

Banca Examinadora:

Prof. Adriano Michael Bernardin, Dr.
UNESC

Prof^ª. Cíntia Soares, Dr^a.
UFSC

Prof^ª. Deise Helena Baggio Ribeiro, Dr^a.
UFSC

Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr.
UNOCHAPECÓ

Prof^ª. Maria Ana Pignatel Marcon Martins, Dr^a.
UNISUL

*Dedico este trabalho ao meu esposo Alex,
meus pais, Venâncio e Marlene, e meus irmãos Jader e Juliane,
por todo apoio e por estarem sempre presentes nos momentos em que
mais precisei.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Nivaldo Cabral Kuhnen, pela confiança e apoio para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu coorientador, professor Humberto Gracher Riella, por ter contribuído com importantes discussões científicas, além de ter aberto seu laboratório (LABMAC) para que esta tese pudesse ser desenvolvida;

Ao professor Anicleto Poli que, além de possuir uma enorme capacidade e habilidade para transmitir conhecimentos aos seus alunos, é um incrível exemplo de ser humano;

À professora Andrea Gonçalves Trentin, pelas discussões científicas, oportunidades e por todas as colaborações que foram realizadas com seu apoio;

Ao meu irmão Jader, por ser exemplo de determinação, esforço e por ter contribuído muito para a realização e aprimoramento deste trabalho;

Ao meu esposo Alex, pelo amor, compreensão e por me fazer acreditar que todo sonho é alcançável;

Aos meus pais, Venâncio e Marlene, pelo carinho, amor, apoio, zelo, e por serem fontes de inspiração e exemplos de vida;

A minha irmã Juliane e ao meu cunhado Jorge, por toda amizade, cumplicidade, incentivo e carinho;

Ao mais novo e pequeno integrante da família, meu sobrinho Arthur, por irradiar alegria com a sua chegada e presença;

Ao meu sogro Ari, minha sogra Iracema e ao meu cunhado Max, pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração;

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Materiais e Corrosão (LABMAC), os quais compartilharam comigo todas as etapas deste trabalho. Um agradecimento especial aos meus amigos: Andréia, Arthur, Camila, Caroline, Daniel, Eliana, Geraldo, Jarina, Jonas, Larissa, Laura, Leidiani, Luana, Lusitâneo, Marivone, Marla, Rafael, Rozineide e Wellington;

À empresa Fortsanti – Tecnoclay, por ter gentilmente fornecido as amostras de bentonita utilizadas no desenvolvimento deste trabalho;

À minha amiga Geovana Dagostim Savi, pela amizade, conversas, apoio e discussões científicas geradas;

Aos colegas do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), pelos trabalhos em colaboração que foram realizados;

Ao Professor André Báfica, por ter possibilitado o uso do equipamento de HPLC;

Ao Laboratório de Controle de Processos (LCP), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e a Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, pela cordialidade, atenção e apoio na realização dos inúmeros experimentos;

Ao Edivilson Silva, secretário da pós-graduação da Engenharia Química da UFSC, pela sua alegria e disposição em me auxiliar sempre que necessário;

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pelas conversas, ensinamentos e por todas as oportunidades geradas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa oferecida, assim como às demais agências de financiamento do projeto: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT);

À todas as pessoas que passaram pela minha vida e que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste sonho.

"Todos os grandes avanços da ciência nasceram
de uma nova audácia da imaginação".

Dewey (1859-1925)

RESUMO

Bentonitas são argilas que, devido às suas características estruturais, abundância na natureza e baixo custo, são amplamente aplicadas na indústria farmacêutica e de alimentos. Em contato com o corpo estas partículas argilominerais são eficientes para melhoria da saúde, sendo capazes de reduzir os efeitos colaterais de diferentes fármacos e/ou toxinas. Tais efeitos estão relacionados às propriedades químicas destes materiais, as quais podem variar de acordo com o local de extração e/ou de acordo com tratamentos físico-químico que podem ser realizados. Neste contexto, a proposta deste estudo foi caracterizar e realizar tratamentos térmicos (nas temperaturas de 125 a 1000 °C) e organofílicos - com cloreto de benzalcônio (BAC) e brometo de cetrimônio (CTAB) - sobre partículas de bentonita extraídas da região Sul do Estado de Santa Catarina, com o intuito de avaliar a influência destes novos materiais gerados sobre a capacidade de adsorção da micotoxina aflatoxina B₁ (AFB₁). Não obstante, este trabalho também buscou avaliar a toxicidade e potencial terapêutico dos materiais desenvolvidos utilizando, para tal finalidade, células-tronco da crista neural (CN) como modelo de estudo. Os resultados de caracterização demonstraram que a bentonita *in natura* é constituída principalmente por SiO₂ (68,14%), Al₂O₃ (18,04%), Fe₂O₃ (2,80%), K₂O (2,85%), apresentando percentuais abaixo de 1% de MnO, MgO, CaO, Na₂O, TiO₂ e P₂O₅. Os tratamentos térmicos propiciaram transformações nas fases mineralógicas, área superficial, tamanho de poro, estabilidade térmica e distância interlamelar, sendo que estas modificações afetaram a capacidade de adsorção das partículas de bentonita, as quais foram reduzidas progressivamente com o aumento da temperatura. Diferentemente, os tratamentos com sais quaternários de amônio (BAC e CTAB) foram capazes de aumentar a capacidade de adsorção de AFB₁, a qual passou de 27,3% (bentonita *in natura*) para 55,24 e 77,88% para as amostras de bentonitas tratadas com 2% de brometo de cetrimônio a 60 °C (CTAB302) e 2% de cloreto de benzalcônio a 60 °C (BAC302), respectivamente. Os materiais produzidos não apenas foram atóxicos para as células-tronco da CN na concentração de 0,6 mg/mL, como também foram capazes de proteger estas células contra os danos causados pela AFB₁. Os processos de organofilização, inclusive, foram os mais eficientes, sendo capazes de impedir os danos celulares provocados por esta toxina (AFB₁). Todos estes resultados, obtidos *in vitro*, não apenas contribuirão para uma melhor compreensão do mecanismo de ligação da bentonita com a AFB₁, como também serão

importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou materiais mais eficazes para mitigação e/ou eliminação de diferentes agentes tóxicos presentes nas dietas fornecidas aos humanos e/ou animais.

Palavras-chave: Bentonita. Aflatoxina B₁. Adsorção. Células-tronco da crista neural. Tratamentos térmicos. Tratamentos organofílicos.

ABSTRACT

Due to their structural characteristics, bentonites are clays that can be found in abundance in nature, have low cost, and are widely applied in the pharmaceutical and food industries. When in contact with the human body, these clay particles are effective in improving health, reducing side effects of different drugs and / or toxins. Such effects are associated with the chemical properties of these materials, which may vary depending on the extraction site and / or on the physical and chemical treatments they are submitted to. Moreover, this present research aimed to characterize and conduct heat treatment (at temperatures 125-1000°C) and organophilic treatment - (with benzalkonium chloride, BAC, and bromide cetrimonium, CTAB) - on bentonite particles extracted from the southern region of the State of Santa Catarina, in Brazil, in order to assess how these new materials may affect the adsorption capacity of mycotoxin aflatoxin B₁ (AFB₁). In addition, this work aimed to assess the toxicity and therapeutic potential of produced materials, by using neural crest stem cells (NC) as reference. Characterization results showed that *in natura* bentonite consists mainly of SiO₂ (68.14%), Al₂O₃ (18.04%), Fe₂O₃ (2.80%), K₂O (2.85%), showing percentages below 1% of MnO, MgO, CaO, Na₂O, TiO₂ e P₂O₅. Thermal treatments provided changes in the mineralogical phases, surface area, pore size, thermal stability, and interlayer distance. Such changes have affected the adsorption capacity of bentonite particles, which were progressively reduced with increasing temperature. In contrast, treatments with quaternary ammonium salts (BAC and CTAB) were able to increase the adsorption capacity of AFB₁, which rose from 27.3% (*in natura* bentonite) to 55.24; and 77.88% for samples of bentonites treated with 2% of cetrimonium bromide at 60 °C (CTAB302) and 2% of benzalkonium chloride at 60 °C (BAC302), respectively. The materials produced were not only non-toxic to the CN stem cells at a concentration of 0.6 mg/mL, they were also able to protect these cells from any damage caused by AFB₁. The organophilization processes were the most efficient, since they were able to prevent cell damage caused by that toxin (AFB₁). All of such results, found *in vitro*, not only could contribute to a better understanding of the bentonite linkage

mechanism with AFB₁, but could also aid on the development of new drugs and / or more effective materials for moderating and / or removing several toxic agents existing in diets fed to humans and / or animals.

Keywords: Bentonite. Aflatoxin B₁. Adsorption. Neural crest stem cells. Heat treatments. Organophilic treatments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da montmorilonita, principal componente da bentonita.....	32
Figura 2 - Distribuição geográfica da produção mundial de bentonitas	33
Figura 3 - Fontes, vias de entrada e absorção de argilominerais oriundos de bentonitas pelo corpo humano	36
Figura 4 - Estrutura química do cloreto de benzalcônio (A) e brometo de cetrimônio (B)	39
Figura 5 - Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁ ..	44
Figura 6 - Principal mecanismo de ação da AFB ₁	46
Figura 7 - Origem e diferenciação de células-tronco pluripotentes e multipotentes	48
Figura 8 - Amostra de bentonita proveniente de Criciúma	51
Figura 9 - Processamento mecânico da bentonita <i>in natura</i>	52
Figura 10 - Cultivos de células-tronco da crista neural.....	61
Figura 11 - Caracterização da bentonita <i>in natura</i>	66
Figura 12 - Bentonita em altas concentrações interfere na viabilidade das células da CN	68
Figura 13 - Bentonita evita a morte celular das células da CN previamente tratadas com AFB ₁	70
Figura 14 - Bentonita não afeta a diferenciação (para o fenótipo glial) das células da CN.....	72
Figura 15 - Identificação dos grupos funcionais da bentonita relacionados com a capacidade de adsorção da AFB ₁	74
Figura 16 - Mecanismo protetor da bentonita contra os danos causados nas células da CN pela AFB ₁	76
Figura 17 - Morfologia das amostras de bentonita calcinadas	77
Figura 18 - Calcinação proporciona redução nas bandas de água (3417 cm ⁻¹) e alteração nas bandas de silício (1036 cm ⁻¹)	79
Figura 19 - Calcinação causa transformações nas fases de desidratação e desidroxilação.....	80
Figura 20 - O aumento da temperatura causa ruptura das fases mineralógicas da bentonita.....	82
Figura 21 - A calcinação proporciona alterações na massa, na distância interlamelar e na densidade das partículas de bentonita.....	84
Figura 22 - O aumento da temperatura modifica a superfície e tamanho dos poros da bentonita	86

Figura 23 - O tamanho das partículas da bentonita aumentou pela calcinação.....	88
Figura 24 - A calcinação da bentonita mantém o seu efeito protetor sobre as células da CN quando submetidas a danos causados pela AFB ₁	89
Figura 25 - Bentonitas <i>in natura</i> e tratadas termicamente afetam a morte de células-tronco previamente tratadas com AFB ₁	91
Figura 26 - Cromatograma do padrão de AFB ₁ , no qual o pico de AFB ₁ (com concentração de 30 µM) corresponde ao tempo de retenção de 3,7 min	92
Figura 27 - Curva de calibração HPLC.....	93
Figura 28 - O aumento da temperatura de calcinação da bentonita reduz a capacidade de adsorção de AFB ₁	95
Figura 29 - O tratamento térmico na bentonita propiciou modificações estruturais e diminuição da adsorção e proteção celular contra os danos causados pela AFB ₁	96
Figura 30 - Tratamentos organofílicos com BAC ou CTAB não alteram a estrutura morfológica das bentonitas.....	97
Figura 31 - A intercalação de cátions orgânicos na bentonita proporciona mudanças no espectro de FTIR.....	99
Figura 32 - Tratamentos orgânicos na bentonita aumentam sua capacidade de adsorver AFB ₁	101
Figura 33 - Bentonitas previamente tratadas com sais orgânicos impedem os danos celulares causados pela AFB ₁	104
Figura 34 - Os tratamentos organofílicos aumentam a distância interlamelar. BAC302 (A) e CTAB302 (B).....	106
Figura 35 - O tratamento organofílico na bentonita propiciou um aumento na adsorção e proteção celular contra os danos causados pela AFB ₁	107
Figura 36 - Diagrama esquemático contendo os principais resultados obtidos através dos tratamentos (térmicos e organofílicos) realizados na bentonita	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Toxicidade aguda (doses letais) provocada pelas AFLs...	41
Tabela 2 - Limites máximos toleráveis (LMT) para aflatoxinas regulamentadas pela legislação brasileira	43
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas das principais AFLs	45
Tabela 4 - Tipos celulares e estruturas derivadas da crista neural.....	49
Tabela 5 - Matriz de planejamento fatorial para o processo de intercalação de sais orgânicos em amostras de bentonitas <i>in natura</i> ..	54
Tabela 6 - Composição química da bentonita <i>in natura</i> (% em massa)	65
Tabela 7 - Capacidade de troca catiônica da amostra de bentonita	65
Tabela 8 - Grupos funcionais da bentonita.....	75
Tabela 9 - Percentual dos elementos químicos presentes na bentonita <i>in natura</i> e tratada termicamente em diferentes temperaturas.....	77
Tabela 10 - Propriedades texturais de amostras de bentonita <i>in natura</i> e tratadas termicamente.....	85
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para avaliação da capacidade de adsorção de AFB ₁ pelas bentonitas organofílicas.....	102
Tabela 12 - Estimativas dos efeitos e suas interações para a adsorção da AFB ₁ pelas bentonitas organofílicas.....	102
Tabela 13 - Resumo das principais características estruturais e efeitos da bentonita <i>in natura</i> e modificadas através da realização de tratamentos térmicos e organofílicos.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFB₁ - Aflatoxina B₁
AFB₂ - Aflatoxina B₂
AFG₁ - Aflatoxina G₁
AFG₂ - Aflatoxina G₂
AFLs - Aflatoxinas
AFM₁ - Aflatoxina M₁
ANOVA - Análise de Variância
BAC - Cloreto de Benzalcônio
BET - Brunauer–Emmett–Teller
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CN - Crista neural
CNT - Crista neural truncal
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTAB - Brometo de Cetrimônio
CTC - Capacidade de troca catiônica
DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DL50 - Dose Letal 50 %
DMSO - Dimetil sulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DRX - Difração de raios-X
DSC - Calorimetria exploratória diferencial
DTG - Diferencial da análise termogravimétrica
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDX - Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
EE - Extrato de embrião de galinha
FRX - Fluorescência de raios-X
FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer
LACERT - Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PF - Perda ao fogo
RNA - Ácido ribonucleico
SFB - Soro fetal bovino
TG - Análise termogravimétrica
UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	OBJETIVOS	28
1.1.1	Objetivo Geral.....	28
1.1.2	Objetivos Específicos	28
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1	BENTONITAS	31
2.1.1	Estrutura e propriedades das bentonitas	31
2.1.2	Produção e aplicação	33
2.1.2.1	Aplicações farmacológicas e alimentares.....	34
2.1.2.2	Efeito das bentonitas em culturas celulares.....	36
2.1.3	Beneficiamento de bentonitas.....	37
2.1.3.1	Tratamento térmico	37
2.1.3.2	Tratamentos organofílicos.....	38
2.2	AFLATOXINAS.....	40
2.2.1	Definição e ocorrência	40
2.2.2	Propriedades físicas e químicas	44
2.2.3	Biotransformação da AFB₁	45
2.3	CÉLULAS-TRONCO	47
2.3.1	Células-tronco da crista neural.....	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1	MATERIAIS.....	51
3.1.1	Amostras de bentonita	51
3.1.2	Cultura de células	51
3.1.3	Padrão de AFB₁.....	52
3.2	MÉTODOS	52
3.2.1	Beneficiamento da bentonita	52
3.2.1.1	Processamento da bentonita <i>in natura</i>	52
3.2.1.2	Tratamento térmico	53
3.2.1.3	Preparação das bentonitas organofílicas	53
3.2.1.4	Planejamentos fatoriais para o preparo das bentonitas organofílicas.....	53
3.2.1.5	Saturação das amostras de bentonita com AFB ₁	54
3.2.2	Caracterizações das amostras de bentonita	54
3.2.2.1	Fluorescência de raios-X.....	55
3.2.2.2	Microscopia eletrônica de varredura	55
3.2.2.3	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X	55
3.2.2.4	Capacidade de troca catiônica	55
3.2.2.5	Espectroscopia de infravermelho	55
3.2.2.6	Análises termogravimétricas e calorimetria exploratória diferencial	56
3.2.2.7	Difração de raios-X.....	56
3.2.2.8	Massa específica	56

3.2.2.9	Área superficial, diâmetro e volume dos poros.....	57
3.2.2.10	Distribuição do tamanho das partículas	57
3.2.3	Ensaio de adsorção	58
3.2.3.1	Ensaio de adsorção da AFB ₁ por espectroscopia UV/visível ...	58
3.2.3.2	Ensaio de adsorção da AFB ₁ por HPLC	58
3.2.3.2.1	<i>Instrumentação</i>	<i>58</i>
3.2.3.2.2	<i>Condições cromatográficas</i>	<i>58</i>
3.2.3.2.3	<i>Curva de calibração</i>	<i>59</i>
3.2.3.2.4	<i>Preparação das amostras</i>	<i>59</i>
3.2.3.2.5	<i>Isoterma de Langmuir</i>	<i>59</i>
3.2.4	Cultivos celulares	60
3.2.4.1	Cultura de células da crista neural truncal de codornas	60
3.2.4.2	Culturas secundárias	60
3.2.4.3	Ensaio de viabilidade celular.....	61
3.2.4.4	Análise por imunocitoquímica.....	62
3.2.4.5	Ensaio de sobrevivência celular	62
3.2.5	Análises estatísticas.....	63
4	RESULTADOS	65
4.1	BENTONITA PROTEGE CÉLULAS-TRONCO DA CRISTA NEURAL DOS EFEITOS TÓXICOS PROVOCADOS POR AFB ₁	65
4.1.1	Caracterizações da bentonita.....	65
4.1.2	Viabilidade celular.....	67
4.1.3	Bentonita evita a morte das células da crista neural previamente tratadas com AFB₁.....	69
4.1.4	Bentonita não afeta a diferenciação das células da crista neural.....	71
4.1.5	Identificações dos grupos funcionais da bentonita relacionados com a capacidade de adsorção da aflatoxina B₁	73
4.1.6	Resumo	75
4.2	O TRATAMENTO TÉRMICO DA BENTONITA REDUZ A ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B ₁ E AFETA A POPULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO.....	76
4.2.1	A calcinação provoca alterações na morfologia e na composição química das amostras de bentonita.....	76
4.2.2	Calcinação proporciona redução nas bandas de água (3417 cm ⁻¹) e alteração nas bandas de silício (1036 cm ⁻¹)	78
4.2.3	A calcinação causa transformações nas fases de desidratação e desidroxilação	79
4.2.4	O aumento da temperatura causa ruptura das fases mineralógicas da bentonita	81
4.2.5	A calcinação proporciona alterações na massa, distância interlamelar e densidade das partículas de bentonita.....	83

4.2.6	A temperatura modifica a área superficial e o tamanho médio dos poros da bentonita.....	85
4.2.7	A calcinação aumentou a distribuição do tamanho médio das partículas de bentonita.....	87
4.2.8	A calcinação da bentonita não incrementa seu efeito protetor em células da crista neural que sofreram indução de morte por aflatoxina B ₁	88
4.2.9	Padronização dos ensaios de HPLC	91
4.2.10	O aumento da temperatura de calcinação da bentonita reduz a capacidade de adsorção de aflatoxina B ₁	93
4.2.11	Resumo.....	96
4.3	TRATAMENTOS ORGANOFÍLICOS NA BENTONITA AUMENTAM A ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B ₁ E PROTEGEM AS CÉLULAS-TRONCO CONTRA DANOS CELULARES	97
4.3.1	A morfologia da bentonita não sofre modificação após os tratamentos orgânicos com cloreto de benzalcônio e brometo de cetrimônio.....	97
4.3.2	Os tratamentos orgânicos provocaram alterações nas ligações entre C-H e Si-O.....	98
4.3.3	Tratamentos orgânicos na bentonita aumentam sua capacidade de adsorção de aflatoxina B ₁	100
4.3.4	Os novos materiais gerados (BAC e CTAB) apresentaram importantes efeitos de proteção contra danos celulares causados pela aflatoxina B ₁	103
4.3.5	Alterações na distância interlamelar das bentonitas organofílicas estão provavelmente relacionadas com os efeitos observados.....	105
4.3.6	Resumo.....	107
4.4	RESUMO GERAL DOS RESULTADOS	108
5	DISCUSSÃO.....	111
6	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	123
	ANEXOS.....	147
	ANEXO A - Effects of bentonite on different cell types: a brief review	149
	ANEXO B - Bentonite protects neural crest stem cells form death caused by aflatoxin B ₁	155
	ANEXO C -Thermal treatment of bentonite reduces aflatoxin B1 adsorption and affects stem cell death.....	165
	ANEXO D - Calcination of brazilian bentonite affects its structural properties and reduces ability to bind AFB ₁	173

ANEXO E - Organophilic treatments of bentonite increase the adsorption of aflatoxin B₁ and protects stem cells against cellular damage193

1 INTRODUÇÃO

Bentonitas são argilas constituídas, principalmente, pela montmorilonita, um argilomineral do grupo da esmectita (SOUFIANI et al., 2016). Por apresentarem baixo custo e serem facilmente encontradas na natureza, estas partículas são amplamente empregadas na indústria farmacêutica e de alimentos (NIEN; LIAO; LIAO, 2011; ZHANG et al., 2010, 2011).

Na área de alimentos, as partículas de bentonita são utilizadas como aditivos alimentares devido as suas propriedades de adsorção. Quando empregadas com tal finalidade, as bentonitas são capazes de agir como atenuadores dos efeitos tóxicos causados por contaminantes alimentares, incluindo os causados pela micotoxina aflatoxina B₁ (AFB₁) (BARRIENTOS-VELÁZQUEZ et al., 2016; DENG et al., 2010; DIXON et al., 2008; MAGNOLI et al., 2008).

A AFB₁ é uma substância tóxica produzida pelo metabolismo secundário de fungos do gênero *Aspergillus* (STACHOWIAK et al., 2016), sendo considerada uma das substâncias mais predominantes e tóxicas (GROOPMAN; WOGAN, 2016; SHIM et al., 2014). Esta micotoxina pode ser encontrada em uma grande variedade de grãos, como milho, amendoim, centeio, aveia, além de subprodutos de origem animal como leite, ovos e carne (TIRMENSTEIN; MANGIPUDY; BRISTOL-MYERS, 2014; STACHOWIAK et al., 2016). Sua presença, na alimentação humana, pode ocasionar quadros de intoxicação aguda, podendo o indivíduo intoxicado apresentar dores abdominais, vômitos, edemas pulmonares e/ou cerebrais, necroses, icterícia e/ou depressão (MARIN et al., 2013; RAIOLA et al., 2015). Nos casos mais graves, a intoxicação aguda pode ocasionar o óbito (RAIOLA et al., 2015).

A intoxicação crônica por AFB₁ em humanos provoca imunossupressão (RAIOLA et al., 2015), facilitando, conseqüentemente, o desencadeamento de inúmeras doenças, tais como, disfunções hepáticas, respiratórias, além de problemas durante o desenvolvimento embrionário (BAHEY; ELAZIZ; GADALLA, 2015; JUAN-GARCÍA et al., 2013; LEI; ZHANG; QI, 2013; NONES; NONES; TRENTIN, 2013; TANAKA et al., 2015). Não obstante, a presença desta micotoxina pode provocar mutações e câncer (GHADERI et al., 2011; LI et al., 2011). No mundo, cerca de 4,6 a 28,2% de novos casos de câncer hepatocelular, por exemplo, podem estar relacionados à exposição a este contaminante (AFB₁) (LIU; WU, 2010).

Além dos problemas na saúde humana, as aflatoxinas (AFLs) causam sérios prejuízos no setor agropecuário. Na produção animal, a

presença de AFB₁ compromete a lucratividade, uma vez que propicia o desencadeamento de doenças devido ao comprometimento do sistema imune, além de interferir negativamente com as taxas reprodutivas dos plantéis (MALLMANN; DIKIN, 2011; NONES; NONES; SCUSSEL, 2014; TREBAK et al, 2015).

Considerando a necessidade de alternativas mais eficazes para mitigar e/ou eliminar esta substância tóxica (AFB₁), o objetivo deste trabalho foi caracterizar uma bentonita, extraída de Santa Catarina, com o intuito de avaliar seu potencial de aplicação pela indústria de alimentos. Não obstante, para o aperfeiçoamento da capacidade de adsorção deste material, tratamentos térmicos e organofílicos foram realizados. Por fim, com a finalidade de avaliar a segurança biológica e o potencial preventivo e/ou terapêutico da bentonita e/ou dos novos materiais gerados, testes de toxicidade *in vitro* utilizando culturas de células-tronco da crista neural (CN) foram empregados.

A caracterização e compreensão dos efeitos de uma bentonita extraída do sul do Estado de Santa Catarina poderá contribuir para o controle e/ou prevenção de diversas substâncias tóxicas presentes na produção de alimentos, especialmente de micotoxinas. Além disso, as partículas de bentonita e os tratamentos realizados poderão ser estratégicos para ampliar o potencial de aplicação deste material em outras áreas do conhecimento.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Caracterizar uma bentonita extraída da região sul do Estado de Santa Catarina e realizar tratamentos térmicos e organofílicos com o intuito de ampliar a capacidade de adsorção desta argila quando exposta à micotoxina AFB₁.

1.1.2 Objetivos Específicos

- obter as características químicas, mineralógicas e morfológicas de uma bentonita extraída da região sul de Santa Catarina;

- avaliar a capacidade da bentonita *in natura* de alterar a viabilidade das células-tronco da CN;

- avaliar os efeitos causados pela bentonita e/ou bentonita adicionada concomitantemente com a AFB₁, sobre células-tronco da CN;
- aplicar diferentes tratamentos térmicos nas partículas de bentonita, buscando avaliar a influência destes tratamentos sobre a estrutura e morfologia das bentonitas e quantificar a capacidade de adsorção de AFB₁ e seus efeitos sobre as células-tronco da CN;
- intercalar sais quaternários de amônio (brometo de cetrimônio e cloreto de benzalcônio) nas partículas de *bentonita in natura* e verificar se a temperatura e a concentração utilizadas no processo de intercalação influenciam na capacidade de adsorção da AFB₁;
- avaliar se os tratamentos de organofilização das partículas de bentonita influenciam na morfologia e na estrutura dos materiais produzidos;
- verificar uma possível toxicidade dos tratamentos organofílicos utilizando cultivos *in vitro* de células-tronco da CN como modelo de estudo, assim como avaliar o potencial de redução dos efeitos tóxicos causados pela AFB₁ sobre culturas celulares previamente contaminadas com esta micotoxina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BENTONITAS

Bentonitas são formadas por argilas coloidais altamente plásticas, constituídas, principalmente, pela montmorilonita, um argilomineral do grupo esmectita. São produzidas pelo intemperismo e desvitrificação de materiais vítreos de origem vulcânica (SANTANA et al., 2014; WHO, 2005; WILLIAMS; HAYDE; FERRELL JR., 2009).

A formação das bentonitas ocorre essencialmente nas interfaces da crosta terrestre com a atmosfera, hidrosfera e biosfera (GOMES; SILVA, 2007), sendo que o clima, a vegetação e a topografia interferem diretamente no processo de formação destes materiais (ABDOU; AL-SABAGH; DARDIR, 2013).

De acordo com Christidis e Huff (2009), os depósitos de bentonitas podem ser formados por três mecanismos: (a) alteração diagenética de vidro vulcânico em meio aquoso; (b) alteração hidrotermal de vidro vulcânico; e (c) formação de sedimentos ricos em esmectita em lagos e/ou ambientes salgados.

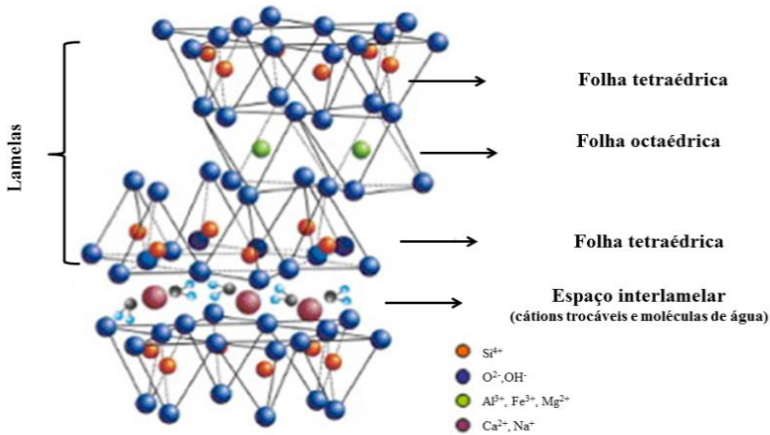
A evolução diagenética (processo de formação e compactação) dos argilominerais em bentonitas pode ser afetada por uma complexa interação de diferentes fatores, incluindo temperatura, propriedades químicas do fluido, tempo de reação, razão fluido/rocha, composição química e características físicas dos materiais precursores (ALTANER; YLAGAN, 1997; HINTS et al., 2008). Da mesma forma, a formação hidrotermal reflete várias interações, tais como a temperatura, as propriedades químicas do fluido e da rocha, bem como a relação de água presente na rocha (MIYOSHI et al., 2013). Por outro lado, a formação de sedimentos ricos em esmectita em ambientes salgados ocorre em climas áridos e não requer precursores de origem vulcânica (CHRISTIDIS; HUFF, 2009).

2.1.1 Estrutura e propriedades das bentonitas

Conforme citado, a montmorilonita, mineral do grupo da esmectita, é o principal componente da bentonita. Esse material possui estrutura cristalina e é composto por duas camadas de tetraedros de silício e por uma camada central de octaedro de alumínio (BORRELLI; THIVENT; AHN, 2013; BREZA et al., 2012; NAGY; KÓNYA, 2009) (Figura 1).

As bentonitas, dependendo da sua natureza, além da montmorilonita, podem conter também uma grande variedade de minerais acessórios, principalmente quartzo, feldspato, muscovita, calcita, caulinita, illita e mica (BOYLU et al., 2010; GONG et al., 2016; NOYAN; ÖNAL; SARIKAYA, 2007; SAMPATAKAKIS et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura química da montmorilonita, principal componente da bentonita.



Fonte: Adaptado de Breza et al. (2012).

De modo geral, pode-se dizer que as bentonitas possuem elevada capacidade de troca catiônica (CTC), adsorção, área superficial e inchamento (CARRETERO; GOMES; TATEO, 2013; KARAKAYA; KARAKAYA; BAKIR, 2011; ZHANSHENG et al., 2006). Além disso, apresentam baixos valores de condutividade hidráulica (ALLO; MURRAY, 2004; HANULÁKOVÁ et al., 2013; SIDHOUM et al., 2013). Estas características variam de acordo com a quantidade de minerais de esmectita e cátions permutáveis presentes no espaço interlamelar das mesmas (HANULÁKOVÁ et al., 2013).

Para uma melhor compreensão e estudo deste material, as bentonitas são classificadas de acordo com o elemento químico dominante, tais como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Al^{3+} (BOZ; DEGIRMENBASI; KALYON, 2013; DARVISHI; MORSALI, 2011). Na predominância de sódio, por exemplo, as bentonitas são denominadas de bentonitas

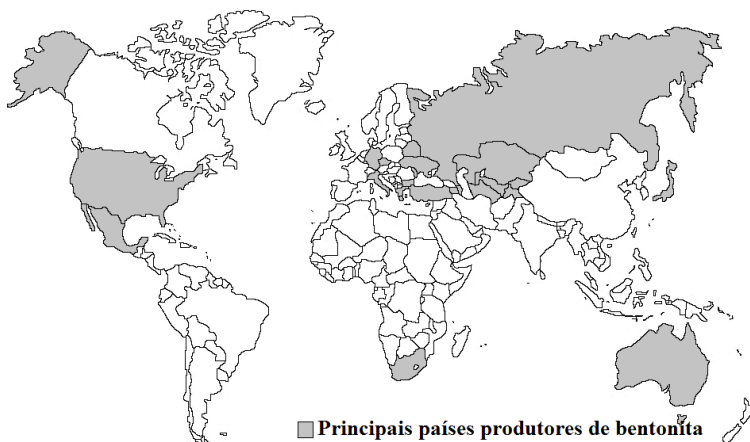
sódicas. Já na presença dominante de cálcio, são chamadas de bentonitas cálcicas (BORRELLI; THIVENT; AHN, 2013) e assim sucessivamente.

A bentonita cálcica é considerada a mais predominante, sendo encontrada em muitas áreas geográficas do mundo. Diferentemente, a bentonita sódica, que possuindo maior capacidade de inchamento quando comparada com a bentonita cálcica, pode ser considerada relativamente rara (FU; CHUNG, 2011; MURRAY, 2006).

2.1.2 Produção e aplicação

Aproximadamente 90% da produção mundial de bentonitas está concentrada em 22 países: África do Sul, Alemanha, Armênia, Austrália, Azerbaijão, Bielorrússia, Bulgária, Cazaquistão, Estados Unidos, Grécia, Itália, Japão, México, Moldávia, Quirguízia, República Checa, Rússia, Tadjiquistão, Turcomenistão, Turquia, Ucrânia e Uzbequistão (WHO, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição geográfica da produção mundial de bentonitas.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

A extração brasileira de bentonitas é superior a 430 mil ton/ano, valor que representa cerca de 4,3% da extração mundial. As reservas brasileiras concentram-se nos estados do Paraná (44,7%), São Paulo (24,2%), Paraíba (20,8%), Bahia (8,4%) e o Rio Grande do Sul (2,0%) (DNPM, 2014).

As principais aplicações das bentonitas brutas, ou seja, sem qualquer tipo de tratamento, são nas áreas de fundição, extração de petróleo/gás natural, inclusão como adjuvante na fabricação de graxas e lubrificantes, na construção civil, assim como na indústria de cosméticos (DNPM, 2014). Por outro lado, as principais aplicações das bentonitas ativadas, as quais passaram por algum tipo de tratamento, estão relacionadas com a: 1) pelletização de minério de ferro (49,5%), fundição (26%), ração animal (11,3%), construção civil (4,3%), fabricação de outros produtos químicos (4,3%), fertilizantes (3,2%) e extração de petróleo e gás com (0,27%) (DNPM, 2014).

2.1.2.1 Aplicações farmacológicas e alimentares

Bentonitas são comumente utilizadas na indústria farmacêutica como excipientes ou substâncias ativas (LÓPEZ-GALINDO; VISERAS, 2004; MURRAY, 2006; RODRIGUES et al., 2013). A montmorilonita, o principal constituinte de bentonita, vem atraindo grande atenção devido à sua capacidade de liberar as drogas de forma controlada. Sua mucoadesividade e potente efeito de desintoxicação é capaz de provocar um aumento da eficácia dos medicamentos (FENG et al., 2009; KEVADIYA; JOSHI, BAJAJ, 2010). A inclusão de montmorilonita reduz, por exemplo, perturbações gastrointestinais (efeitos colaterais) provocadas por quimioterápicos (ILIESCU et al., 2011; KEVADIYA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; SUN; RANGANATHAN; FENG, 2008; VISERAS et al., 2010).

Argilominerais são também utilizados como princípio ativo em cosméticos. Devido aos seus elevados níveis de adsorção de gorduras e toxinas, são comumente utilizados em máscaras faciais (CARRETERO, 2002). Esse tipo de tratamento é também recomendado com a finalidade de reduzir processos inflamatórios ocasionados por furúnculos, acne ou úlceras (CARRETERO, 2002; CHOY et al., 2007).

As argilas utilizadas em cremes (pós ou emulsões) promovem um aumento no número de fibras de colágeno, sugerindo que o provável mecanismo de proteção de bentonitas esteja relacionado com a combinação de adsorção de alérgenos e de melhoria da função de barreira da pele (EMAMI-RAZAVI et al., 2006).

Argilas, incluindo as bentonitas, são capazes de reduzir significativamente o dano tecidual provocado por edemas (EMAMI-RAZAVI et al., 2006). Além disso, os efeitos benéficos e rápidos das argilas na rede de colágeno da pele sugerem que estes materiais podem

ser uma boa opção terapêutica para o rejuvenescimento facial (VALENTI et al., 2012).

Na nutrição animal, argilominerais são utilizados porque possuem capacidade de adsorver substâncias tóxicas (BARRIENTOS-VELÁZQUEZ et al., 2016; FOWLER; LI; BAILEY, 2015; SLAMOVA et al., 2011).

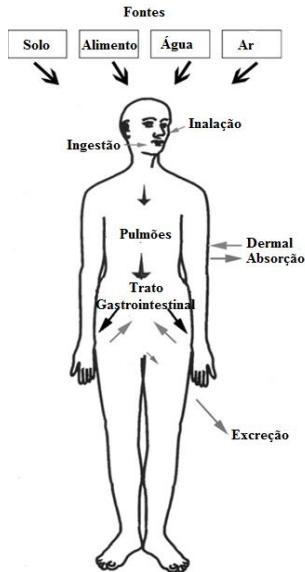
Quando adicionadas em rações animais, as partículas de bentonita podem suprimir o impacto das micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por fungos e que desencadeiam problemas na saúde e bem-estar humano e animal (ABBÈS et al., 2008; BULUT et al., 2009; DENG et al., 2010; MAGNOLI et al., 2008).

A inclusão de 2% de bentonita na alimentação de frangos de corte é capaz de, por exemplo, melhorar o ganho de peso, a conversão alimentar e o consumo de ração (KATOULI et al., 2010; MURRAY, 2000). Não obstante, Lindemann et al. (1997) descobriram que a adição de bentonita sódica (0,5%) na dieta de suínos foi capaz de reduzir em 28% os malefícios provocados pela presença de aflatoxinas (500 µg/kg).

Na indústria farmacêutica, as bentonitas também desempenham um papel importante no desenvolvimento de produtos voltados à cura de úlceras orais, enterite aguda ou crônica e gastrite (CARRETERO, 2002). São também utilizadas para o tratamento de colite, diarreia e hemorroidas (KEVADIYA et al., 2012; LÓPEZ-GALINDO; VISERAS, 2004; VALENTI et al., 2012).

Considerando as inúmeras aplicações em medicamentos e cosméticos, o corpo humano ou animal está constantemente exposto a estes materiais por diferentes fontes e vias de entrada (Figura 3).

Figura 3 - Fontes, vias de entrada e absorção de argilominerais oriundos de bentonitas pelo corpo humano.



Fonte: Adaptado de Gomes e Silva (2007).

2.1.2.2 Efeito das bentonitas em culturas celulares

Em culturas celulares, as bentonitas podem ser capazes de proteger as células contra diversos danos (ABBÈS et al., 2007, 2008; KEVADIYA et al. 2012, 2013). Abbès et al. (2008), por exemplo, relataram que a adição de bentonita concomitantemente com aflatoxina B₁ (AFB₁) em células de câncer de cólon humano foi capaz de reduzir os efeitos nocivos provocados pela presença da micotoxina citada. Estudos semelhantes também já demonstraram que a intercalação da bentonita com fármacos anticancerígenos (por exemplo: tamoxifeno e 6-mercaptopurina) pode reduzir os efeitos colaterais celulares relacionados com danos do material genético (DNA) provocados pelo tratamento (KEVADIYA et al. 2012, 2013).

Corroborando com os resultados acima citados, também já foi demonstrado que partículas de bentonita não apresentaram nenhum grau de toxicidade para diferentes células animais e humanas, como, por exemplo, células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (POPRYADUKHIN et al., 2012) e células de câncer de cólon humano

(MAISANABA et al., 2013a; SHARMA et al., 2010). Além disso, baixas concentrações de montmorilonita não foram capazes de induzir apoptose em fibroblastos e células renais embrionárias de mamíferos (CORRALES et al., 2012; LIU et al., 2011).

Embora detectadas ações positivas das bentonitas em diferentes tipos celulares, outros trabalhos, de forma contrária, indicaram que estes materiais podem, quando aplicados em concentrações elevadas, provocar elevados graus de citotoxicidade (BOWMAN et al., 2011; WHO, 2005). Dentre os efeitos observados, destacam-se a promoção de estresse oxidativo e danos na membrana celular (MAISANABA et al., 2013a; ZHANG et al., 2010). Zhang et al. (2011), por exemplo, demonstraram que as partículas de bentonita são capazes de induzir danos significativos ao DNA e aos cromossomos das células linfoblásticas humanas. Corroborando com estes achados, Murphy et al. (1993) também demonstraram que bentonitas podem induzir fortes efeitos neurotóxicos, promovendo, por exemplo, a degeneração de neurônios.

É provável que a toxicidade induzida seja dose-dependente, também dependente da composição e/ou do processo de ativação das argilas. A ativação, por exemplo, pode ser realizada através de tratamentos alcalinos, térmicos, ácidos e/ou orgânicos (HUANG et al., 2013). As características físico-químicas das argilas, a concentração e o tempo de exposição também podem influenciar na toxicidade (WHO, 2005).

Para maiores informações sobre os efeitos das bentonitas em diferentes tipos celulares, recomenda-se a leitura do artigo de revisão “*Effects of bentonite on different cell types: A brief review*”, o qual foi desenvolvido por Nones et al. (2015a) (Anexo A).

2.1.3 Beneficiamento de bentonitas

2.1.3.1 Tratamento térmico

Conforme citado anteriormente, as propriedades físico-químicas das partículas de bentonita podem ser modificadas por vários tratamentos, dentre eles o tratamento térmico (AYTAS; YURTLU; DONAT, 2009; BOJEMUELLER; NENNEMANN; LAGALY, 2001; VIEIRA et al., 2010a).

As modificações estruturais decorrentes do tratamento térmico (calcinação) são dependentes da temperatura do tratamento (EL MOUZDAHIR et al., 2010), da mineralogia e das estruturas cristalinas

presentes nas amostras tratadas (YILMAZ; KALPAKLI; PISKIN, 2013).

A calcinação, dependendo da temperatura utilizada, pode provocar nas bentonitas uma de-laminação das camadas de aluminossilicato, o que, por sua vez, pode aumentar a distância interlamelar (EL MOUZDAHIR et al., 2010), causar o colapso da estrutura (SABIR; WILD; BAI, 2001; TOOR et al., 2015) e/ou diminuir o número de sítios de troca (SÁNCHEZ et al., 2011). Além das mudanças estruturais citadas, este tipo de tratamento pode também alterar a área superficial, o tamanho de poro e o percentual de água presente nas amostras submetidas a este processo (BERTAGNOLLI; KLEINÜBING; SILVA, 2011; BOJEMUELLER; NENNEMANN; LAGALY, 2001; MULDER et al., 2008). Não obstante, o aumento da temperatura pode gerar alterações na argila através da desidratação, desidroxilação, recristalização, fratura e perda de estrutura cristalina (EMMERICH, 2000; SARIKAYA et al., 2000; STAGNARO; VOLZONE; RUEDA, 2012a).

Além disso, argilas tratadas termicamente podem proporcionar alterações nas suas propriedades de adsorção (SÁNCHEZ et al., 2011), diminuindo (AYTAS; YURTLU; DONAT, 2009; SÁNCHEZ et al., 2011; STAGNARO et al., 2012b) ou aumentando tal capacidade (BOJEMUELLER; NENNEMANN; LAGALY, 2001).

2.1.3.2 Tratamentos organofílicos

Bentonitas organofílicas são argilas que contêm moléculas orgânicas intercaladas entre as suas camadas estruturais (SILVA, 2010). O meio mais comum para produção destes materiais é através da adição de sais quaternários de amônio (surfactantes catiônicos), geralmente por meio de um processo denominado troca catiônica (FU; CHUNG, 2011). Durante este processo, os cátions hidratados (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) são substituídos por cátions de amônio quaternário (SARKAR et al., 2011).

Os compostos de amônio quaternário são agentes tensoativos catiônicos, com cadeias de 16-20 átomos de carbono e, por estes motivos, são considerados as fontes orgânicas mais utilizadas para o preparo de argilas organofílicas (PAIVA; MORALES; DÍAZ, 2008a; SARKAR et al., 2013; YU et al., 2014). Além disso, a estrutura dos sais quaternários de amônio contém pelo menos uma cadeia de hidrocarboneto hidrofóbica ligada a um átomo de nitrogênio carregado positivamente [R_4N^+], bem como outros grupos alquil que, na maioria

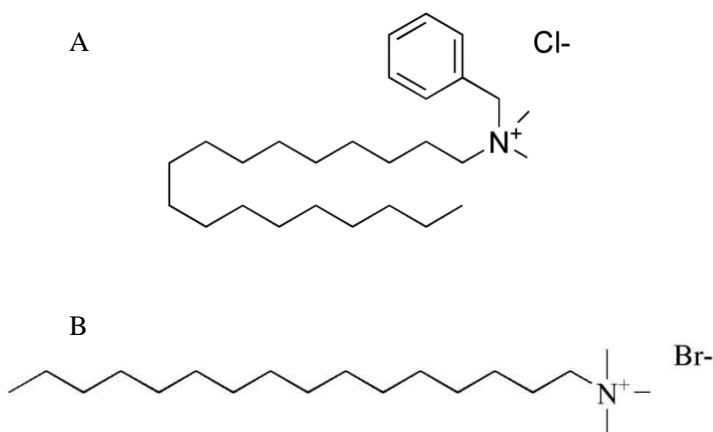
dos casos, são substituintes de cadeia curta, tais como os grupos metil ou benzil (ZHANG et al., 2015).

Por suas características químicas, os brometos e cloretos de amônio são os compostos de amônio quaternário (cátions orgânicos) mais comumente utilizados (MASSINGA et al., 2010). Dentre estes, pode-se citar, como exemplo, o cloreto de benzalcônio e o brometo de cetrimônio (Figura 4).

A inserção das moléculas orgânicas acima descritas é capaz de provocar uma expansão entre a distância interlamelar das argilas (PAIVA; MORALES; DÍAZ, 2008b), além de alterar as características hidrofílicas do material, transformando-as em hidrofóbicas (JOVIĆ-JOVIČIĆ et al., 2010; KHENIFI et al., 2009; MA et al., 2011).

Pelo fato do tratamento organofílico possuir elevada biodegradabilidade, não toxicidade, baixo custo e facilidade de síntese, bentonitas organofílicas podem ser consideradas materiais promissores para o combate (adsorção) de diferentes substâncias tóxicas, incluindo as micotoxinas (ABDEL-WAHHAB et al., 2015; MAGNOLI et al., 2008; SILVA, 2010).

Figura 4 - Estrutura química do cloreto de benzalcônio (A) e brometo de cetrimônio (B).



Fonte: Silva (2010).

2.2 AFLATOXINAS

2.2.1 Definição e ocorrência

As aflatoxinas (AFLs) são substâncias tóxicas produzidas por fungos filamentosos. Existem atualmente 20 classes de AFLs, as quais podem estar presentes em uma grande variedade de alimentos, principalmente grãos e seus subprodutos (DIAO et al., 2013; EL-NEKEETY et al., 2014). As culturas mais afetadas pelas AFLs são as de amendoim e milho, mas outros cultivos agrícolas, tais como arroz, trigo, centeio e aveia também podem ser altamente contaminados (IQBAL; ASI; ARIÑO, 2013; STACHOWIAK et al., 2016). Além disso, estas substâncias podem estar presentes em subprodutos de origem animal, tais como na carne, leite e ovos oriundos de animais que foram alimentados com rações contaminadas por AFLs (SERRANO-NIÑO et al., 2013; TIRMENSTEIN; MANGIPUDY; BRISTOL-MYERS, 2014).

Os fungos responsáveis pela produção de AFLs são os do gênero *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. parasiticus* (EL-NEKEETYA et al., 2014; STACHOWIAK et al., 2016), os quais podem se desenvolver em diferentes condições climáticas, incluindo as regiões tropicais e subtropicais (IQBAL; ASI; ARIÑO, 2013; PITT, 2014). Altas temperaturas no campo e o alto teor de umidade antes da colheita e/ou durante o armazenamento são os principais fatores relacionados com a produção de AFLs (ASHIQ; HUSSAIN, AHMAD, 2014; MITCHELL et al., 2016).

De acordo com Iqbal, Asi e Ariño (2013), as condições ideais para a formação de AFLs incluem teor de umidade entre 18 e 20%, atividade de água $> 0,82$, pH entre 3,0 e 8,5 e temperatura entre 12 e 40 °C, com um valor ótimo para o desenvolvimento de fungos entre 25 e 30 °C.

A presença de AFLs na alimentação humana e animal desencadeia inúmeros efeitos tóxicos, incluindo a redução da eficiência do sistema imunológico e o desenvolvimento de carcinomas (ASHIQ; HUSSAIN, AHMAD, 2014; JUAN-GARCÍA et al., 2013; NONES; NONES; SCUSSEL, 2014; PITT, 2014). A redução da capacidade reprodutiva, da conversão alimentar, da taxa de crescimento e do ganho de peso são alguns dos sintomas comumente observados (FOWLER; LI; BAILEY, 2015; MALLMANN; DIKIN, 2011).

Os efeitos das AFLs no organismo humano e animal estão relacionados, principalmente, com a dose e frequência de ingestão do alimento contaminado. No entanto, a idade, espécie, raça e estado de

saúde do ser humano ou animal também são fatores que influenciam na repercussão do grau da toxicidade (BAHEY; ELAZIZ; GADALLA, 2015; FERNANDES, 2007; MOTTA; DUARTE, 2010). Nenhuma espécie de animais de produção é imune aos efeitos tóxicos causados pelas AFLs (FOWLER; LI; BAILEY, 2015), sendo que os mais jovens são os mais afetados.

A exposição a doses elevadas pode, inclusive, levar a óbito. Em humanos, estima-se que a ingestão maior do que 20 µg/kg de peso corporal / dia seja fatal e a morte ocorra dentro de 7 a 21 dias (WILD; GONG, 2010). Na Tabela 1 é possível observar as doses letais (DL50) para algumas espécies animais.

Tabela 1 - Toxicidade aguda (doses letais) provocada pelas AFLs.

Espécie	DL50 (mg/kg de peso corporal)
Cachorro	0,5-1,0
Coelho	0,3
Galinha	6,0-16,0
Macaco	2,2
Ovelha	1,0-2,0
Pato	0,3-0,6
Rato (fêmea)	18,0
Rato (macho)	7,0
Suíno	0,6-2,0
Truta	0,5-1,0

Fonte: Menegazzo (2008).

Dentre as AFLs, a AFB₁ apresenta a maior toxicidade, reagindo com macromoléculas celulares, tais como DNA, RNA e proteínas (BAHEY; ELAZIZ; GADALLA, 2015; HUUSKONEN et al., 2013). A exposição à AFB₁ pode produzir várias alterações bioquímicas e estruturais em órgãos humanos e animais (BAHEY; ELAZIZ; GADALLA, 2015). O órgão alvo da ação da AFB₁ é o fígado; porém, outros órgãos, tais como rins e pulmões, também podem ser afetados (CORCUERA et al., 2011; FERREIRA et al., 2006; JHA et al., 2012; JU et al., 2016).

De acordo com Kanchana et al. (2013), a toxicidade mediada pela AFB₁ tem sido relacionada com o seu potencial pró-oxidante, devido à geração de espécies reativas de oxigênio durante o processamento metabólico de enzimas do fígado. Estas espécies reativas podem atacar compostos celulares solúveis, bem como membranas, levando ao

comprometimento do funcionamento celular e a consequente citólise (BERG; YODIM; RIEDERER, 2004).

A administração repetida de AFB₁ resulta em degeneração nos sistemas nervoso central e periférico (IKEGWUONU, 1983), podendo, inclusive, afetar o sistema nervoso de fetos (TANAKA et al., 2015). Além disso, a AFB₁ é responsável por causar malformações em muitos órgãos de embriões, não apenas de mamíferos, como também de aves, anfíbios e peixes (BARKAI-GOLAN, 2008).

Na produção animal, os principais sintomas clínicos relacionados com a presença de AFB₁ na dieta são: 1) redução da imunidade e, consequentemente, maior risco de desenvolvimento de doenças causadas por outros agentes patogênicos; 2) redução no ganho de peso; 3) diminuição da eficiência reprodutiva (EWUOLA et al., 2014; TREBAK et al, 2015); 4) mortalidade, principalmente nos casos de exposição aguda a aflatoxina, sendo a morte gerada em decorrência de hepatotoxicidade grave. Neste último caso, a taxa de mortalidade pode chegar a aproximadamente 25% da produção animal (AHLBERG; JOUTSJOKI; KORHONEN, 2015).

Nos seres humanos, a principal sintomatologia relacionada com a aflatoxicose está relacionada com a manifestação de vômitos, dor abdominal, edema pulmonar e cerebral, coma, convulsões, necrose, hemorragia, icterícia, problemas renais, hepáticos e cardíacos (STROSNIDER et al., 2006; TIRMENSTEIN; MANGIPUDY; BRISTOL-MYERS, 2014). De acordo com a IARC (do inglês *International Agency for Research on Cancer*), esta substância é um dos hepatocarcinogênicos mais potentes já conhecidos, sendo classificada como carcinógeno pertencente ao Grupo 1, ou seja, pertencente ao grupo com maior potencial de causar câncer (IQBAL; ASI; ARIÑO, 2013; PITT, 2014).

Em 2011, visando minimizar os problemas causados pelas AFLs no Brasil, passou a vigorar uma nova legislação, a qual estabeleceu limites máximos mais rigorosos para as AFLs presentes em alimentos destinados ao consumo humano (ANVISA, 2011). Nesta legislação (ANVISA, 2011), produtos como o leite, milho, amendoim e castanhas foram contemplados, sendo que os limites máximos dependem do tipo de alimento, variando entre 0,5 a 20 µg/kg (Tabela 2).

Além da regulamentação de novos limites de AFLs em alimentos, várias estratégias têm sido desenvolvidas para reduzir os riscos de exposição à AFB₁ (WANG et al., 2015). Estas estratégias incluem a degradação, a destruição, a inativação e a remoção de AFB₁ através de métodos químicos, físicos e biológicos (AHLBERG; JOUTSJOKI,

KORHONEN, 2015; GIORDANO; NONES, SCUSSEL, 2012; WANG et al., 2015). Estes métodos são geralmente aplicados à alimentação humana ou animal. No entanto, a sua utilização apresenta algumas limitações, tais como, alterações das características organolépticas e do valor nutricional dos alimentos (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2010). Por este motivo, métodos e materiais mais eficazes com intuito de combater e/ou eliminar as micotoxinas ainda precisam ser desenvolvidos e/ou otimizados.

Tabela 2 - Limites máximos toleráveis (LMT) para aflatoxinas regulamentadas pela legislação brasileira.

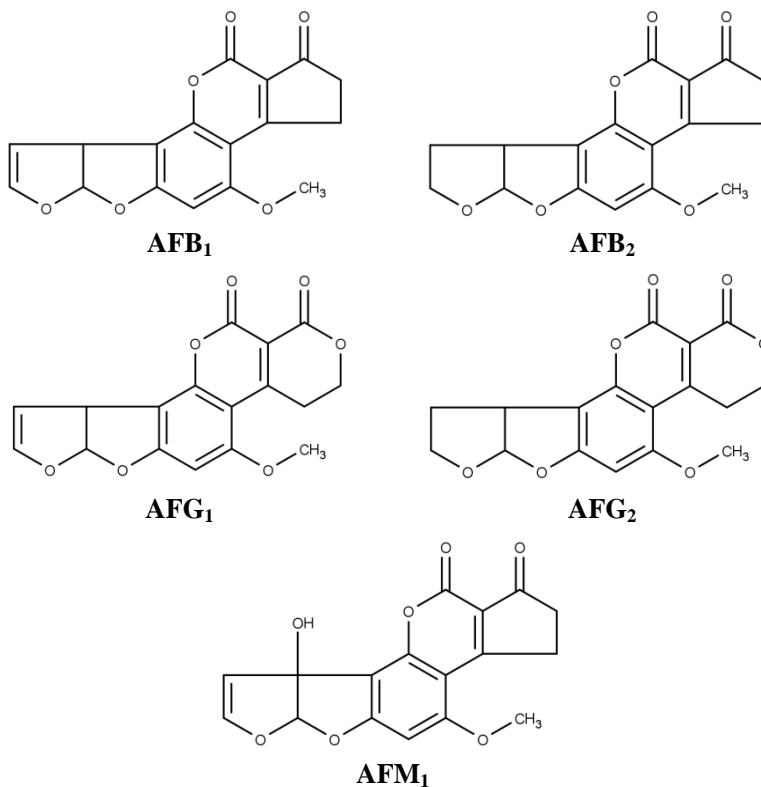
Aflatoxina	Alimento	LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
M ₁	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	1
	Fórmulas infantis para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: pimentas, pimentão-doce), noz-moscada	20
	Amendoim	20
	Milho	20

Fonte: ANVISA (2011).

2.2.2 Propriedades físicas e químicas

Conforme a estrutura química, as AFLs podem ser classificadas em: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina G₂ (AFG₂) e aflatoxina M₁ (AFM₁) (Figura 5).

Figura 5 - Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁.



Fonte: Iqbal, Asi e Ariño (2013).

A principal estrutura química das AFLs é caracterizada pela ligação de dihidrofurano a uma estrutura cumarínica. Estas substâncias são inodoras, cristalinas e altamente lipossolúveis (FETAIH et al., 2014). Devido a estas características, as AFLs são solúveis em reagentes orgânicos, tais como clorofórmio, metanol e dimetil sulfóxido. Além disso, são parcialmente solúveis em água, numa extensão de 10-20 mg/L

(FERNANDES, 2007). Outra característica destas toxinas é sua estabilidade térmica, ou seja, podem permanecer no alimento mesmo após processamentos térmicos utilizando-se altas temperaturas.

Algumas propriedades físico-químicas relacionadas à fórmula molecular, massa molecular, densidade, ponto de ebulição, índice de refração e ponto de fulgor variam entre as diferentes AFLs (Tabela 3). De um modo geral, os valores de densidade e índice de refração são similares para todas estas substâncias, porém, pode-se observar importantes diferenças, entre elas nos pontos de ebulição (521,00 a 644,30 °C) e ponto de fulgor (234,1 a 274,3 °C).

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas das principais AFLs.

Características	Aflatoxinas				
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Massa molecular (g/mol)	312,27	314,29	328,27	330,29	328,27
Massa específica (g/cm ³)	1,56	1,52	1,59	1,55	1,66
Ponto de ebulição (°C)	528,20	521,00	612,10	602,50	644,30
Índice de refração	1,69	1,66	1,68	1,65	1,72
Ponto de fulgor (°C)	237,70	234,10	274,30	269,70	246,10

Fonte: Adaptado CAS (2016).

2.2.3 Biotransformação da AFB₁

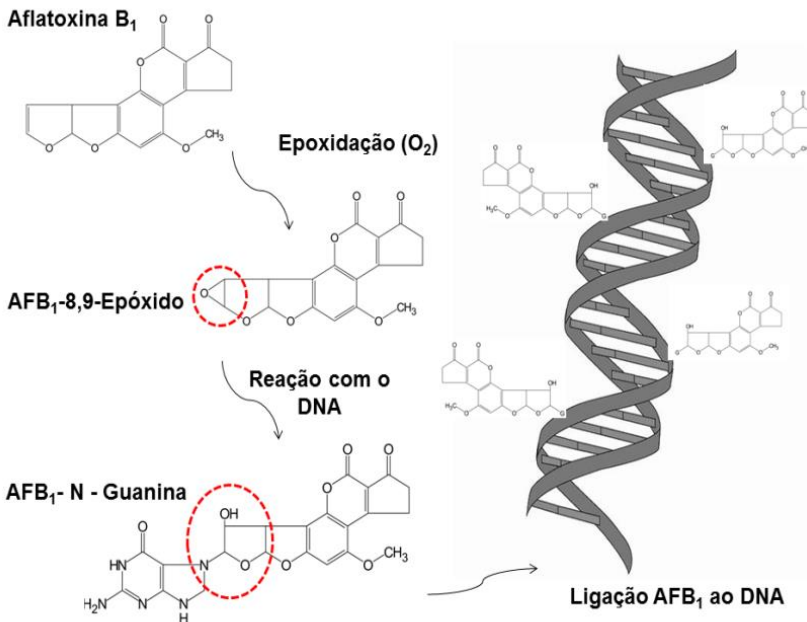
As AFLs são geralmente absorvidas quando entram em contato com o sistema gastrointestinal e respiratório (FETAIH et al., 2014). Após absorvidas, são biotransformadas no fígado, rins ou no trato intestinal (COPPOCK; CHRISTIAN, 2007; FERREIRA et al., 2006; KANBUR et al., 2011).

O composto identificado como 8,9-epóxido de AFB₁ é originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, o qual está presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB₁ (Figura 6). Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente (através de ligações covalentes) com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (JU et al., 2016). A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade biológica, contribuindo para o aparecimento dos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos (TIRMENSTEIN; MANGIPUDY; BRISTOL-MYERS, 2014). Em alguns casos, além da reação de epoxidação, a AFB₁ pode ser biotransformada através de reações de hidroxilação em AFM₁, a qual

geralmente é encontrada em produtos lácteos provindos de animais que se alimentaram de rações contaminadas por AFB₁ (IQBAL; ASI; ARIÑO, 2013).

Embora seja conhecido o principal mecanismo da ação da AFB₁ em diferentes tipos celulares (GHADERI et al., 2011; JU et al., 2016; NONES; NONES; TRENTIN, 2013), ainda é necessário o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias, materiais ou substâncias que possam reverter, minimizar ou até mesmo evitar a ação tóxica deste contaminante alimentar. Para avaliação da eficiência destes novos métodos e materiais desenvolvidos, as células-tronco podem ser consideradas ferramentas importantes, uma vez que estas células são suscetíveis a atividades mutagênicas e carcinogênicas devido a sua natureza proliferativa (GHADERI et al., 2011).

Figura 6 - Principal mecanismo de ação da AFB₁.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

2.3 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco possuem grande capacidade de proliferação e autorrenovação. Além disso, são capazes de responder a diferentes estímulos, podendo originar tipos celulares mais especializados (MILLER; PERIN, 2016; NONES, 2011; PEREIRA, 2008). Estas células podem ser encontradas não apenas em tecidos embrionários, como também em tecidos fetais e adultos (SAKAKI-YUMOTO; KATSUNO; DERYNCK, 2013).

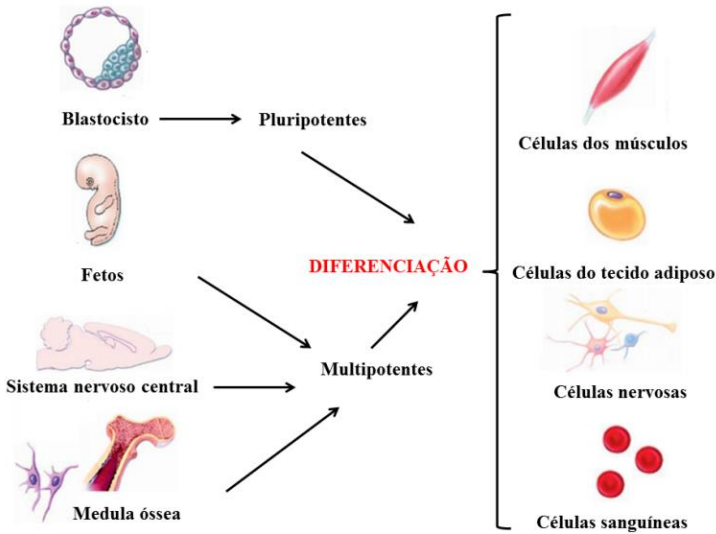
As células-tronco são classificadas, conforme sua potencialidade, (capacidade de originar diferentes tecidos) em: totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005).

As células totipotentes são capazes de gerar todos os tipos celulares, incluindo os anexos embrionários. Por este motivo, são capazes de formar um novo indivíduo (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). Como exemplo de célula totipotente (a única conhecida até o momento), pode-se citar o zigoto (formação no momento da fecundação do ovócito com o espermatozoide) (KANG; TROSKO, 2011).

As células pluripotentes podem se diferenciar em todos os tipos celulares. No entanto, não são capazes de gerar os anexos embrionários, ou seja, não são capazes de gerar um novo indivíduo (GAGE, 2000). Como exemplos de células-tronco pluripotentes, pode-se citar as células embrionárias e também as células derivadas de carcinoma embrionário. As células chamadas de iPS (células-tronco com pluripotencialidade induzida) também são exemplos de células-tronco pluripotentes (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

As células-tronco multipotentes são células somáticas que podem ser encontradas, principalmente, em tecidos adultos, as quais são capazes de se diferenciar em um número mais limitado de células (GARGETT, 2004). Como exemplo de células-multipotentes, pode-se citar as células presentes na medula óssea, as células-tronco mesenquimais e as células-tronco da crista neural (CN) (COSTA; COMABELLA; MONTALBAN, 2012; NONES, 2011; NONES et al., 2012). Na Figura 7 podem ser observados alguns dos principais tecidos onde são encontradas células pluripotentes e multipotentes, bem como as células que podem se originar a partir destas células-tronco através do processo de diferenciação.

Figura 7 - Origem e diferenciação de células-tronco pluripotentes e multipotentes.



Fonte: Adaptado de Costa, Comabella e Montalban (2012).

2.3.1 Células-tronco da crista neural

As células da crista neural (CN) surgem a partir de uma estrutura presente em embriões de animais vertebrados através de um processo conhecido como neurulação, o qual consiste na formação do tubo neural.

Além de heterogêneas, as células da CN são consideradas multipotentes, ou seja, podem originar diversos tipos celulares, como neurônios, células gliais e células endócrinas (NONES, 2011; MOTOHASHI; KUNISADA, 2015). Além destes tipos celulares, a CN também é capaz de originar células mesenquimais, as quais são capazes de se diferenciar e formar tendões, tecidos conjuntivos, cartilagens, ossos e tecidos adiposos (DUPIN; SOMMER, 2012; LE DOUARIN; BRITO; CREUZET, 2007; LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Os principais tipos celulares derivados das células da CN estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4 - Tipos celulares e estruturas derivadas da crista neural.

Tipo Celular	Derivado
Neurônios	Sistema nervoso periférico: gânglios sensoriais, simpáticos e entéricos
Células gliais	Células gliais do sistema nervoso periférico e células de Schwann dos nervos periféricos
Células endócrinas	Células produtoras de calcitonina da tireóide e células catecolaminérgicas da glândula adrenal
Células mesenquimais	Cartilagem, ossos, derme, tecidos dentário, conjuntivo, muscular liso, vascular e adiposo, glândulas e meninges da cabeça e pescoço

Fonte: Adaptado de Gilbert (2003) apud Nones (2011).

Pelo fato das células da CN possuírem elevada capacidade de diferenciação, divisão e migração, são consideradas excelentes modelos de estudo de toxicidade celular (ABUD et al., 2015; KANG; TROSKO, 2011; TROSKO; CHANG, 2010), podendo auxiliar na compreensão do efeito de fármacos e toxinas (a exemplo das AFLs) e de eventuais patologias decorrentes da exposição deste tipo celular a estas substâncias (CHEN; SULIK, 2000; FLENTKE et al., 2011; GARIC et al., 2011; GARIC-STANKOVIC et al., 2006; GHADERI et al., 2011; WENTZEL; ERIKSSON, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Amostras de bentonita

As amostras de bentonita foram coletadas no município de Criciúma, Santa Catarina, região sul do Brasil (Figura 8).

Figura 8 - Amostra de bentonita proveniente de Criciúma.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

3.1.2 Cultura de células

Foram utilizados embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) no estágio de desenvolvimento de 20-25 somitos para culturas de células da crista neural da região truncal (CNT). Os ovos fertilizados foram: 1) obtidos no biotério do Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da UFSC, onde os animais foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 17 h/7 h, possuindo água e ração *ad libitum* ou; 2) adquiridos diretamente de empresa especializada na produção de ovos. O período de incubação dos ovos foi de 48 h, a 37,5 °C, em chocadeira com umidade relativa de 65%.

A utilização destes animais foi realizada de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo todos os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC - projetos número 103 e 787).

3.1.3 Padrão de AFB₁

O padrão de AFB₁ foi adquirido da Sigma Aldrich. Após diluído em acetonitrila (grau de pureza HPLC) ou dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 500 µM, foi mantido à temperatura refrigerada de -20 °C.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Beneficiamento da bentonita

3.2.1.1 Processamento da bentonita *in natura*

As impurezas presentes na bentonita *in natura* foram removidas através de um processamento mecânico (Figura 9). Para tal, foi inicialmente pesado 50 g de bentonita e adicionado 50 mL de água. Esta dispersão permaneceu sob agitação em um agitador mecânico (Nova Ética/M-110) a 1500 rpm, durante 2 h.

Após a etapa de agitação, as amostras foram filtradas à vácuo, secas a 60 °C e, em seguida, desagregadas em um moinho excêntrico (Servitech/ct-242). Posteriormente, as partículas de bentonita passaram pelo peneiramento vibratório em malha ABNT n° 200 (75 µm).

Para o uso da bentonita em experimentos de cultivo celular *in vitro*, as amostras processadas foram também submetidas a tratamento com luz ultravioleta (UV) durante 1 h.

Figura 9 - Processamento mecânico da bentonita *in natura*.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

3.2.1.2 Tratamento térmico

Após processo de lavagem, amostras de bentonita *in natura* foram tratadas termicamente em mufla (Jung, N1100), durante 4 h. Para realização da calcinação, foram utilizadas as seguintes temperaturas: 125, 250, 500, 750 e 1000 °C.

3.2.1.3 Preparação das bentonitas organofílicas

O seguinte procedimento foi utilizado para preparação das bentonitas organofílicas: 5 g de bentonita foram adicionadas a 50 mL de água destilada. Em seguida, essa suspensão foi agitada até a completa dispersão em banho maria utilizando-se agitador de movimento recíproco (Nova Ética, 304 TPA), velocidade de 200 rpm e temperatura de 30 ou 60 °C. Simultaneamente, os sais quaternários de amônio, cloreto de benzalcônio (do *inglês* - BAC) ou brometo de cetrimônio (do *inglês* - CTAB) foram diluídos em água destilada (50 mL) nas concentrações de 2 ou 6% da massa de bentonita e aquecidos à temperatura de 30 ou 60 °C e, em seguida, adicionados à dispersão de bentonita. As suspensões contendo a bentonita e os sais quaternários permaneceram sob agitação a 200 rpm na temperatura de 30 ou 60 °C, durante 4 h e, em seguida, em repouso *overnight* sob temperatura ambiente (25 °C), sem controle de luz.

Os produtos resultantes dessas reações foram lavados com água destilada e secos sob temperatura de 80 °C.

3.2.1.4 Planejamentos fatoriais para o preparo das bentonitas organofílicas

Dois planejamentos fatoriais 2^2 foram utilizados para o preparo das bentonitas organofílicas com a finalidade de avaliar se os tratamentos da bentonita com sais quaternários de amônio (BAC e CTAB) seriam capazes de aumentar a adsorção de AFB₁. Para realização deste estudo, diferentes níveis de concentração e de temperatura foram utilizados (Tabela 5), os quais foram baseados em estudos previamente publicados (ZHU et al., 2010). Os efeitos da organofilização das bentonitas foram realizados através das respostas da capacidade de adsorção da AFB₁. A capacidade de adsorção das bentonitas foi determinada aplicando a técnica de cromatografia líquida (HPLC). As leituras foram realizadas em triplicata, sendo os resultados obtidos avaliados no *software Statistica 8.0* ®, através da análise de

variância (ANOVA), com nível de significância de 5% entre as médias das amostras.

Tabela 5 - Matriz de planejamento fatorial para o processo de intercalação de sais orgânicos em amostras de bentonitas *in natura*.

Experimento	Amostra	Temperatura de reação (°C)	Concentração do sal (%)
<i>Cloreto de benzalônio (BAC)</i>			
1	BAC302	30 (-1)	2 (-1)
2	BAC306	30 (-1)	6 (+1)
3	BAC602	60 (+1)	2 (-1)
4	BAC606	60 (+1)	6 (+1)
<i>Brometo de cetrimônio (CTAB)</i>			
1	CTAB302	30 (-1)	2 (-1)
2	CTAB306	30 (-1)	6 (+1)
3	CTAB602	60 (+1)	2 (-1)
4	CTAB606	60 (+1)	6 (+1)

Fonte: Desenvolvido pela autora.

3.2.1.5 Saturação das amostras de bentonita com AFB₁

As amostras de bentonita (0,6 g) foram saturadas com 1 mL de AFB₁ (concentração de 30 µM). Em seguida, a suspensão foi armazenada por 24 h e, posteriormente, centrifugada a 2000 rpm (80-2B Centribio), durante 57 min. Após a centrifugação, as amostras foram secas à temperatura ambiente, sem o controle de luminosidade, e posteriormente analisadas.

3.2.2 Caracterizações das amostras de bentonita

Com o intuito de determinar a composição e características morfológicas e estruturais das amostras de bentonita *in natura* e tratadas termicamente e organicamente foram utilizadas diferentes técnicas, incluindo a fluorescência de raios-X (FRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), capacidade de troca catiônica (CTC), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análises termogravimétricas (TG/DTG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X (DRX). Além disso também foram

determinadas a massa específica, área superficial, diâmetro e volume dos poros e tamanho das partículas.

3.2.2.1 Fluorescência de raios-X

Para determinar a composição química das amostras de bentonita *in natura*, foi empregada a técnica de fluorescência de raios-X (FRX). O ensaio de FRX foi executado utilizando um espectrômetro da marca Bruker, modelo – S2 Ranger.

3.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das partículas das bentonitas foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram metalizadas com ouro e as avaliações das superfícies das amostras de bentonita foram realizadas utilizando-se ampliações de 50 a 5000 vezes, com energia de 10 e 15 kV. Os ensaios de MEV foram realizados em microscópio eletrônico de varredura da marca Jeol, modelo JSM – 6390 LV.

3.2.2.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

As identificações dos principais elementos químicos presentes nas amostras de bentonita foram realizadas através de análises de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX). Para tal, uma sonda (Thermo, modelo 6733A-1NES-SN) acoplada a um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo JSM – 6390 LV) foi utilizada.

3.2.2.4 Capacidade de troca catiônica

A capacidade de troca catiônica (CTC) da bentonita *in natura* foi determinada pelo somatório dos percentuais dos seguintes cátions: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Na^+ e K^+ foram determinados por espectrometria de absorção atômica (Perkin Elmer Pinnacle 900T); Ca^{2+} e Mg^{2+} foram quantificados através de um espectrômetro de absorção atômica com chama (Cole Parmer 2655-00).

3.2.2.5 Espectroscopia de infravermelho

As análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas para a bentonita *in natura* e/ou

submetida a diferentes tratamentos (térmico ou organofílico). Para tal finalidade, foram inicialmente preparadas pastilhas de KBr contendo 2% (p/p) de amostra. Os espectros no infravermelho foram obtidos em ampla região, de 400 a 4000 cm^{-1} , em espectrofotômetro (Shimadzu, IR Prestige-21 ou Agilent Technologies Spectrum, Cary 600 Series), com transformada de Fourier.

3.2.2.6 Análises termogravimétricas e calorimetria exploratória diferencial

A estabilidade térmica e as transformações de fase das amostras de bentonita foram analisadas através de análises termogravimétricas (TG), diferencial das análises termogravimétricas (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As análises foram realizadas utilizando o aparelho STA 449F3 da Netzsch (Júpiter), com taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, partindo da temperatura ambiente de 25 $^{\circ}\text{C}$ até 1000 $^{\circ}\text{C}$. As diferenciais das análises termogravimétricas (DTG) foram determinadas com auxílio do *software* Origin 8.0. A perda de massa das amostras de bentonita *in natura* e tratadas termicamente foi também determinada por análise gravimétrica.

3.2.2.7 Difração de raios-X

As análises de difração de raios-X (DRX) permitiram a identificação dos minerais que constituem as amostras de bentonita *in natura* ou tratadas. As medidas foram realizadas em um difratômetro Philips, modelo X'pert, com radiação cobre $K\alpha$ ($\lambda = 0,15418$ nm), potência de 40 kV e 30 mA, variando de 0 a 20 $^{\circ}$ com intervalo 2θ de 0,05 $^{\circ}/\text{s}$. A distância interlamelar de cada amostra foi calculada aplicando a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

onde “n” é a ordem de difração, “d” é distância interlamelar (nm), “ θ ” é o ângulo de difração ($^{\circ}$) e “ λ ” o comprimento de onda (nm).

3.2.2.8 Massa específica

As densidades das amostras de bentonita foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Boca Santa (2012), a qual é baseada no princípio de Arquimedes.

Para tal, inicialmente foi determinada a densidade da água destilada, através da pesagem de um balão volumétrico de 50 mL vazio e, posteriormente, cheio. Em seguida foi realizada a subtração da massa do balão volumétrico em relação à massa total (balão cheio de água), dividindo posteriormente esse valor pelo volume total do balão (50 mL), sendo o resultado obtido a densidade da água.

A massa específica das amostras de bentonita foram determinadas através da adição de 1 g de cada amostra no balão volumétrico, acrescido de água destilada. Após este procedimento, foi determinado o volume de cada amostra, através da diferença entre o volume total (50 mL) e o volume ocupado pela água no balão volumétrico. Através da razão entre a massa e o volume da amostra obtido foi possível obter o valor da densidade de cada amostra.

3.2.2.9 Área superficial, diâmetro médio e volume dos poros

A área superficial, o diâmetro médio e o volume dos poros das amostras de bentonita, antes e após o tratamento térmico, foram determinadas através das análises de adsorção-dessorção de N_2 , utilizando instrumento Quantachrome (Autosorb-1). Para a realização destas avaliações, as amostras foram inicialmente mantidas a 250 °C, durante 12 h, sob atmosfera de nitrogênio. A partir dos dados obtidos (isotermas de adsorção de N_2 em diferentes pressões parciais de N_2) foi possível determinar a área superficial pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938), diâmetro médio dos poros pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (BARRET; JOIYNER; HALENDA, 1953) e o volume dos poros (considerando a quantidade de nitrogênio adsorvido P/Po igual a 0,95).

3.2.2.10 Distribuição do tamanho das partículas

A distribuição do tamanho das partículas de bentonita foi obtida por difração de raios laser utilizando um analisador da marca Cilas, modelo 1064. Para a realização da técnica, suspensões muito diluídas de bentonita em água (cerca de 0,1% em peso de sólidos) foram dispersas em ultrassom, durante 60 s. Em seguida, foi realizada a leitura no equipamento citado (analisador).

3.2.3 Ensaios de adsorção

3.2.3.1 Ensaios de adsorção da AFB₁ por espectroscopia UV/visível

A avaliação da capacidade de adsorção das amostras de bentonita foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro UV/visível (Q7980 Quimis) e em comprimento de onda de 365 nm. Para tal, foram adicionados 50 µL de bentonita *in natura* e/ou tratadas termicamente (concentração de 0,6 mg/mL) em 1 mL de solução de AFB₁ (30 µM). As amostras foram deixadas *overnight* a temperatura de 25 °C e, em seguida, centrifugadas (80-2B Centribio) a 2000 rpm, durante 57 min. A quantidade de AFB₁ adsorvida foi determinada avaliando-se o sobrenadante, sendo que o valor obtido foi comparado com uma solução controle de AFB₁ (30 µM).

3.2.3.2 Ensaios de adsorção da AFB₁ por HPLC

3.2.3.2.1 Instrumentação

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês – HPLC) foram realizadas no cromatógrafo Waters Alliance 2795, equipado com bomba quaternária, forno e auto-amostrador refrigerado acoplado a um detector de fluorescência (Waters 2475, Milford). As colunas utilizadas foram: 1) C18 (Polaris, Metachem), com tamanho de partículas de 5 µm, dimensões de 150 mm x 4,6 mm ou; 2) C18 (Synergi Hydro-RP, Phenomenex), com tamanho de partículas de 4 µm, dimensões de 150 mm x 2,0 mm. Ambas acopladas a uma pré-coluna de 20 x 2 mm (Alltech).

3.2.3.2.2 Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila:água (50:50, v/v), a qual foi bombeada em modo isocrático, em fluxo de 0,20 ou 0,70 mL/min, com coluna do HPLC mantida a 35 °C. As amostras de AFB₁ e/ou AFB₁ com bentonitas foram mantidas sob temperatura de 4 °C durante a realização das leituras no HPLC. Em seguida, as amostras foram detectadas por fluorescência em comprimento de onda de excitação e emissão de 365 e 430 nm, respectivamente. Os cromatogramas foram adquiridos e integrados com o *software* Empower ® 2 (Waters Co., Milford, EUA). A quantidade de AFB₁ adsorvida pelas

bentonitas foi calculada a partir da diferença entre a área do pico de AFB₁ inicial e final.

3.2.3.2.3 Curva de calibração

As soluções-padrão de AFB₁ foram preparadas em água Milli-Q, nas concentrações de: 0,1; 1; 3; 10 e 30 µM, sendo que a curva de calibração para AFB₁ foi determinada com base nas concentrações versus a área de pico. Cada solução foi injetada três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* Origin 8.0.

3.2.3.2.4 Preparação das amostras

Após determinação dos parâmetros instrumentais do cromatógrafo, foram realizados os estudos de adsorção das moléculas de AFB₁ pelas amostras de bentonita. Para tais avaliações, diferentes concentrações de bentonitas (0,2; 0,4 ou 0,6 mg/mL) foram adicionadas a 200 µL de solução AFB₁ (30 µM). Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por 24 h e, posteriormente, centrifugadas (CFN-II Vision1500) a 4000 rpm, durante 30 min. A quantidade de AFB₁ adsorvida foi determinada avaliando-se o sobrenadante, sendo que uma alíquota da solução de AFB₁ (30 µM) foi usada como solução controle.

3.2.3.2.5 Isoterma de Langmuir

A capacidade de adsorção da bentonita *in natura* foi avaliada através da representação gráfica dos dados de adsorção (em concentrações de AFB₁ variando de 0,1 a 30 µM), utilizando-se para realização das análises a equação de Langmuir:

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{k_d Q_{max}} + \frac{C_{eq}}{Q_{max}}$$

em que “C_{eq}” é a concentração de equilíbrio, “q” é a quantidade de AFB₁ adsorvida, “k_d” é um coeficiente de distribuição e “Q_{max}” a capacidade máxima de adsorção.

3.2.4 Cultivos celulares

3.2.4.1 Cultura de células da crista neural truncal de codornas

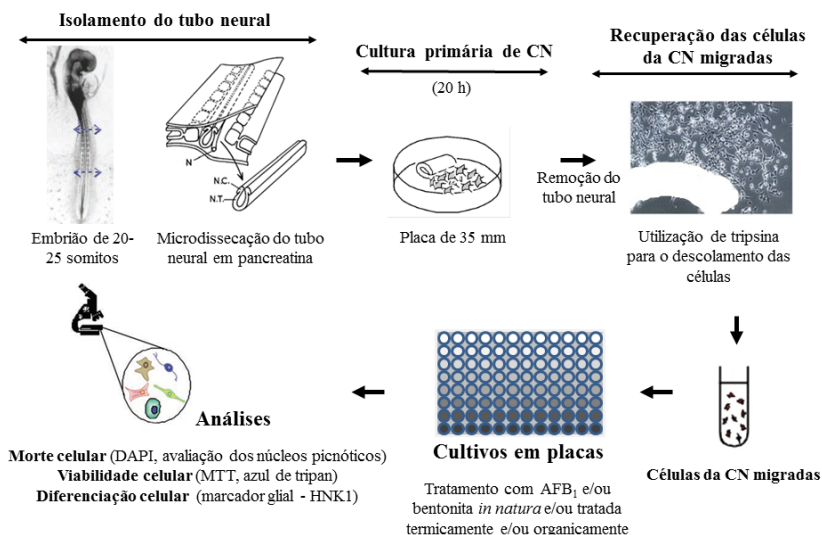
Para a realização de experimentos com a crista neural truncal (CNT), tubos neurais no estágio de 20-25 somitos foram isolados. Os explantes foram dissociados em solução de pancreatina (6,25 g/L, Sigma) com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio e colocados em placas de cultura de 35 mm (Corning, NY, USA) revestidas com colágeno tipo I (50 µg/mL, Sigma), conforme instruções do fabricante. Os tubos isolados foram colocados diretamente sobre placas de propileno (Corning - 35 mm) e mantidos por 20 h em meio de cultura alfa-MEM (Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 µg/mL, Gibco). As culturas permaneceram em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂, em ar atmosférico.

3.2.4.2 Culturas secundárias

Após os períodos de migração em cultura primária descritos acima, os explantes do tubo neural foram removidos e descartados. As células remanescentes, que correspondem às células da crista neural (CN), foram tripsinizadas com solução de tripsina a 0,25% e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02% (EDTA) (Sigma) e recuperadas através de bloqueio em meio contendo 10% de SFB seguido de centrifugação (500 X g por 10 min). Para a realização das culturas secundárias, as células foram ressuspensas e plaqueadas em gotas de 30 µL contendo 200 células em placas de 96 poços (Corning). As culturas de células da CNT foram mantidas em um meio composto por alfa-MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY), acrescido de 10% de SFB (Cultilab), penicilina (200 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 µg/mL, Gibco), as quais foram cultivadas em estufa úmida (95%) a 37 °C e 5% CO₂. No início do plaqueamento e a cada dois dias de cultivo, foram realizados os tratamentos com AFB₁ (30 µM), com bentonita *in natura* (0,2 - 1,6 mg/mL) e/ou com AFB₁ (30 µM) acrescida de amostras de bentonita (0,6 mg/mL) *in natura*, tratadas termicamente (125 °C, 250 °C, 500 °C, 750 °C e 1000 °C) ou organicamente (BAC302 CTAB302). Após o período de tratamento (4 dias), os diferentes grupos experimentais foram analisados através de ensaios de viabilidade celular (MTT e azul de tripan), avaliação de morte celular (análise dos núcleos

picnóticos) e, em alguns casos, diferenciação celular (HNK1) (Figura 10).

Figura 10 - Cultivos de células-tronco da crista neural.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

3.2.4.3 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade das células-tronco da CN foi determinada por ensaios de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e azul de tripan.

MTT foi usado para análise da atividade mitocondrial (avaliação de citotoxicidade). Nesse ensaio, MTT foi reduzido a sal de formazan (colorido e insolúvel em água) pelo sistema succinato-tetrazólio redutase, o qual pertence à cadeia respiratória mitocondrial. Para realização desta técnica, células da CN foram cultivadas na presença ou não de diferentes concentrações de bentonita/AFB₁. Em seguida, MTT foi adicionado em cada poço, na concentração final de 150 µg/mL, e as células foram, então, incubadas durante 2 h a 37 °C. O produto da reação foi dissolvido com DMSO e quantificado através de leitura em espectrofotômetro Bio-Tek FL-600 Microplate Fluorescence Reader em comprimento de onda de 540 nm.

Para as análises de azul de tripan as células da CN foram tratadas com bentonita (0,2-1,6 mg/mL), AFB₁ (30 µM) ou AFB₁ + bentonita (*in*

natura, 125 °C, 250 °C, 500 °C, 750 °C, 1000 °C, BAC302 ou CTAB302), durante 4 dias. Posteriormente os cultivos celulares foram tripsinizados, centrifugados e lavados com PBS (NaCl, 8 g/L; KCl, 0,09 g/L; KH₂PO₄, 0,4 g/L; Na₂HPO₄, 3 g/L), sendo, em seguida, corados com solução de azul de tripan (0,4%, a 25 °C, durante 3 min) para posterior avaliação em microscópio Olympus IX71. A viabilidade celular foi determinada através dos percentuais de células não coradas (viáveis) e coradas (não viáveis).

3.2.4.4 Análise por imunocitoquímica

Após tratados, os diferentes grupos experimentais (AFB₁ (30 µM), bentonita (0,6 mg/mL) e AFB₁ + bentonita) foram avaliados utilizando-se a técnica de imunocitoquímica, com auxílio de marcadores específicos para células gliais (Anti-HNK1). Para tal, as culturas foram primeiramente fixadas com paraformaldeído a 4% durante 30 min. Em seguida, foram permeabilizadas com solução de PBS-Triton X-100 (Sigma) (0,25%) durante 30 min. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB diluído em PBS (NaCl, 8 g/L; KCl, 0,09 g/L; KH₂PO₄, 0,4 g/L; Na₂HPO₄, 3 g/L) durante 30 min. As células foram, então incubadas *overnight*, a 4 °C, com o anticorpo HNK1.

Posteriormente, as culturas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) (Sigma) e, subsequentemente, incubadas por 1 h, a temperatura de 25 °C, com anticorpos secundários. Posteriormente, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com corante fluorescente nuclear (DAPI - 1 mg/mL; Sigma). Os grupos experimentais foram observados em microscópio fluorescente (Olympus IX71) e fotografados em câmara Olympus DP71. Foram analisados pelo menos 15 diferentes campos por condição de experimento, utilizando-se três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos por campos do microscópio e as proporções das marcações foram analisadas pela relação entre o número total de células e o número de células positivas para o marcador analisado (HNK1).

3.2.4.5 Ensaios de sobrevivência celular

A morte celular foi analisada através de avaliações morfológicas (visualização da fragmentação da cromatina) via marcação por 4', 6-

diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI), seguindo os procedimentos descritos por Nones, Nones e Trentin (2013).

3.2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 4®. Os dados obtidos foram avaliados por análises de variância (ANOVA) através do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas em um nível de significância entre as médias de 1 e/ou 5%.

4 RESULTADOS

4.1 BENTONITA PROTEGE CÉLULAS-TRONCO DA CRISTA NEURAL DOS EFEITOS TÓXICOS PROVOCADOS POR AFB₁

4.1.1 Caracterizações da bentonita

Os resultados demonstraram, através do ensaio de FRX (Tabela 6), que os óxidos mais abundantes presentes na amostra de bentonita *in natura* foram SiO₂ e Al₂O₃, enquanto que K₂O, Fe₂O₃, MgO, Na₂O, CaO, P₂O₅, TiO₂ e MnO foram encontrados apenas em pequenas quantidades, menores do que 3%. A perda ao fogo (PF) das amostras de bentonita *in natura*, determinada pelo aquecimento da amostra a 1000 °C, durante 2 h, revelou um valor de 5,05% de massa.

Tabela 6 - Composição química da bentonita *in natura* (% em massa).

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	P.F.	Total
68,14	18,04	2,80	0,01	0,84	0,05	0,50	2,85	0,77	0,03	5,05	99,08

P.F.: perda ao fogo a 1000 °C. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Os ensaios de MEV da bentonita *in natura* demonstraram a presença de partículas individuais, com contornos claramente definidos e plaquetas irregulares que tendem a formar aglomerados (Figura 11 A, B).

As fases cristalinas da bentonita foram analisadas por DRX (Figura 11 C), sendo que os principais minerais identificados foram montmorilonita (M), caulinita (C), muscovita (M) e quartzo (Q).

A capacidade de troca catiônica (CTC) da amostra da bentonita *in natura* foi de 4,866 cmol_c/kg (Tabela 7).

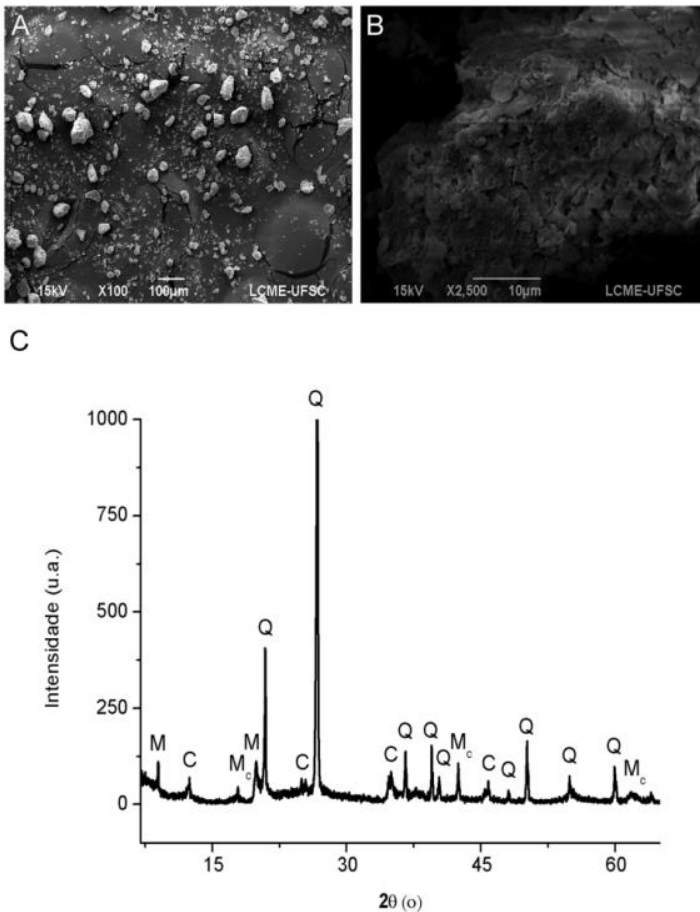
Tabela 7 - Capacidade de troca catiônica da amostra de bentonita.

Cátions	CTC (cmol _c /kg)
Ca ²⁺	0,070
Na ⁺	0,333
K ⁺	2,813
Mg ²⁺	1,650
Total	4,866

Fonte: Desenvolvido pela autora.

Após determinação das características químicas e morfológicas das partículas de bentonita *in natura*, foi avaliada uma eventual toxicidade desse material quando exposto a culturas de células-tronco da CN, através de ensaios de viabilidade (MTT e azul de tripan) e sobrevivência celular (DAPI e avaliação de núcleos picnóticos).

Figura 11 - Caracterização da bentonita *in natura*. Após a extração, as partículas de argila foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (A, B) e a composição mineralógica foi analisada por DRX (C). M - Montmorilonita, C - Caulinita, Mc - muscovita, Q - Quartzo. Barra de calibração = 100 e 10 μm .



Fonte: Desenvolvido pela autora.

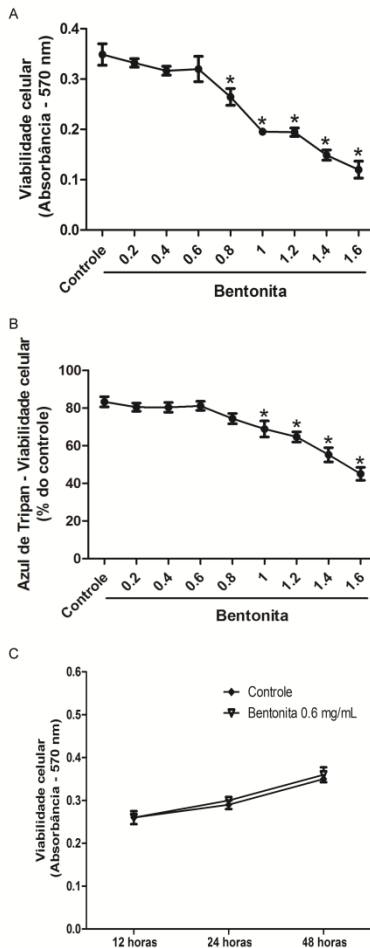
4.1.2 Viabilidade celular

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular (forma de verificar possíveis efeitos citotóxicos provocados pela bentonita), culturas de células da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo controle) ou 0,2 a 1,6 mg/mL de solução de bentonita. Através de ensaios de MTT, observou-se uma redução progressiva nos valores de absorbância após 4 dias de tratamento das células, com concentrações que variaram de 0,8 a 1,6 mg/mL (0,26 e 0,12 de absorção, respectivamente), quando comparado com o grupo controle (0,34 absorbância) (Figura 12 A). Nenhuma alteração foi observada na concentração de 0,2 a 0,6 mg/mL (Figura 12 A).

Resultados semelhantes de viabilidade celular foram obtidos através da técnica de azul de tripan, onde foi possível determinar a proporção de células consideradas viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas de azul) (Figura 12 B). Nesta análise, o tratamento com concentrações inferiores a 0,8 mg/mL de bentonita resultou em aproximadamente 80% de viabilidade celular. Por outro lado, a bentonita em concentrações iguais ou superiores a 1 mg/mL reduziu a porcentagem de células viáveis de uma forma dose-dependente. As culturas tratadas com 1, 1,2, 1,4 e 1,6 mg/mL de bentonita demonstraram 68, 64, 55 e 45% de viabilidade celular, respectivamente.

Após obtenção destes resultados, as células da CN foram tratadas com bentonita na concentração de 0,6 mg/mL (dose considerada não tóxica), para verificação da influência do tempo sobre o tratamento. Para tal, foram escolhidos os tempos de 12, 24 e 48 h, os quais foram avaliados através da técnica de MTT (Figura 12 C). Nesta análise, os valores de absorbância obtidos (0,26; 0,29; 0,35) foram semelhantes às do grupo controle (0,26; 0,30; 0,36). Esses dados, associado aos demais valores obtidos, demonstraram que a bentonita não foi capaz de provocar toxicidade celular em concentrações iguais ou inferiores a 0,6 mg/mL, não havendo diferença em relação ao grupo controle nos diferentes tempos de tratamento avaliados.

Figura 12 - Bentonita em altas concentrações interfere na viabilidade das células da CN. Culturas secundárias de células-tronco da CN foram incubadas com DMSO (grupo controle) e 0,2 a 1,6 mg/mL de bentonita. Após 4 dias de tratamento, a viabilidade celular foi analisada por MTT (A) e azul de tripan (B). A viabilidade celular foi também analisada após 12, 24 e 48 h de tratamento com 0,6 mg/mL de bentonita (C). Os resultados representam a média de três experimentos independentes realizadas em triplicata \pm EP. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.1.3 Bentonita evita a morte das células da crista neural previamente tratadas com AFB₁

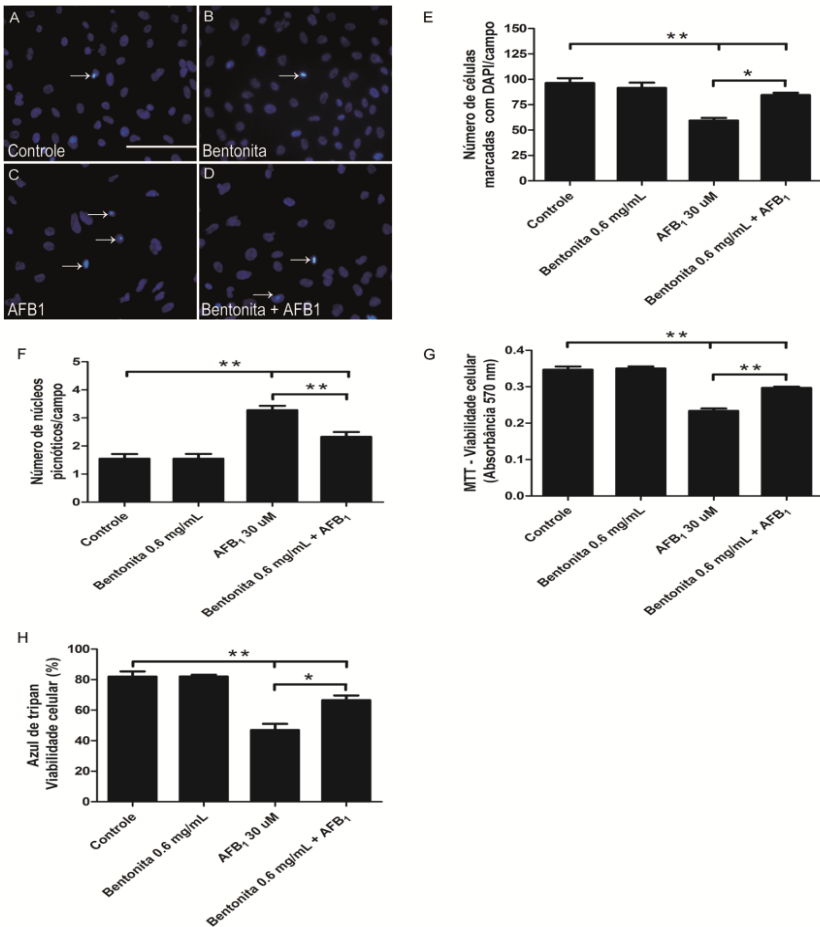
Já havia sido demonstrado que a AFB₁ é capaz de provocar toxicidade celular (NONES; NONES; TRENTIN, 2013). Considerando estes aspectos, buscou-se avaliar se a bentonita na concentração 0,6 mg/mL seria capaz de evitar a morte das células da CN induzida por 30 µM de AFB₁. Para tal, culturas de células da CN foram tratadas (grupos experimentais: controle, AFB₁, bentonita e AFB₁ + bentonita tratados concomitantemente) e submetidas à marcação nuclear por DAPI, para posterior quantificação dos núcleos totais e picnóticos (Figura 13).

O tratamento com AFB₁ diminuiu significativamente o número total de células (cerca de 1,62 vezes) em comparação ao grupo controle (Figura 13 A, C, E). Este efeito foi parcialmente evitado pela adição de bentonita (0,6 mg/mL) concomitantemente adicionada a 30 µM de AFB₁ (1,12 vezes em comparação com o grupo controle) (Figura 13 A-D, E).

Com o intuito de verificar se o aumento do número total de células seria provocado por uma redução na morte celular promovido pela bentonita, os núcleos picnóticos foram quantificados após marcação por DAPI (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009; NONES; NONES; TRENTIN, 2013) (Figura 13 A-D, F). Nesta análise, não foi observada uma redução na proporção de células mortas após o tratamento com bentonita, em relação ao grupo controle (1,55 células mortas/campo para ambos os tratamentos). Por outro lado, AFB₁ diminuiu o número de núcleos totais (marcados por DAPI) em 2,1 vezes (efeito tóxico). Este efeito foi parcialmente evitado pela adição de bentonita (diminuição de 1,49 vezes no grupo tratado com bentonita associado a AFB₁ em comparação com o grupo controle).

Ensaio de MTT (Figura 13 G) confirmaram os dados acima descritos, demonstrando uma diminuição dos valores de absorbância para o grupo tratado com 30 µM de AFB₁ (0,23 absorbância) em comparação ao grupo controle (0,34 absorbância). A adição de 0,6 mg/mL de bentonita associada a 30 µM de AFB₁ evitou parcialmente o efeito (0,29 absorbância). Da mesma forma, a análise de azul de tripan (Figura 13 H) demonstrou que o tratamento com 30 µM de AFB₁ resultou em 46% de viabilidade celular. Por outro lado, essa viabilidade aumentou quando 0,6 mg/mL de bentonita foram adicionados (20% de aumento em comparação com o grupo tratado com AFB₁).

Figura 13 - Bentonita evita a morte celular das células da CN previamente tratadas com AFB₁. Culturas secundárias de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo controle), 0,6 mg/mL de bentonita, 30 µM de AFB₁ ou 0,6 mg/mL de bentonita concomitantemente adicionado com 30 µM de AFB₁. Após 4 dias de tratamento, o número total de núcleos de células por campo foi determinado por marcação com DAPI (A-E) e a morte celular foi analisada através da quantificação de células picnóticas (A-D, F). A viabilidade celular foi analisada por MTT e azul de tripan (G-H). Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicada ± EP. * P <0,05 ou ** P <0,01 em relação ao grupo controle e/ou tratado com AFB₁. Barra de calibração = 200 µm.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Com base nos resultados obtidos, pode-se demonstrar que a administração de bentonita foi capaz de evitar a morte celular provocada pela AFB₁.

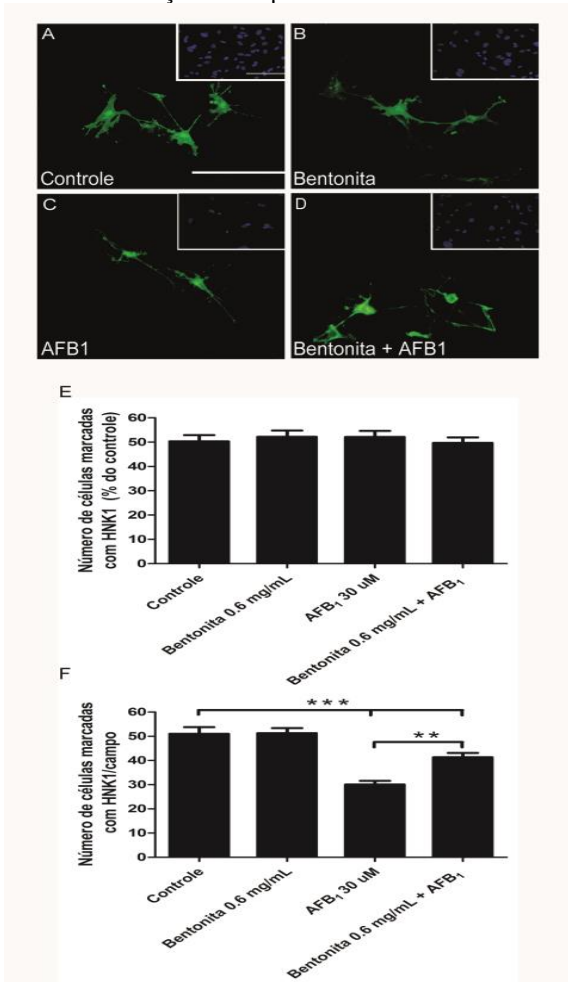
4.1.4 Bentonita não afeta a diferenciação das células da crista neural

Células da CN podem originar diferentes tecidos. Com o objetivo de verificar se partículas de bentonita seriam capazes de interferir no processo de diferenciação deste tipo celular, culturas secundárias de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo controle), 0,6 mg/mL de bentonita, 30 µM de AFB₁ ou 30 µM de AFB₁ concomitantemente adicionada com 0,6 mg/mL de bentonita (Figura 14).

Após 4 dias de tratamento, o fenótipo celular HNK1 (marcador de células gliais derivadas da CN) foi analisado através da técnica de imunocitoquímica. Os resultados obtidos demonstraram que a proporção de células positivas para HNK1 em relação ao número total de células (coloração por DAPI) não foi alterada pelos diferentes tratamentos (Figura 14 A - E). Embora o número total de células não tenha sofrido alteração pelo tratamento com a bentonita (em comparação ao grupo controle), o número de células gliais/campo diminuiu cerca de 1,7 vezes para o grupo tratado com AFB₁ e 1,24 vezes para o grupo tratado com AFB₁ concomitantemente adicionada com bentonita (Figura 14 A-D, F).

Os resultados destes experimentos demonstram que a bentonita associada com AFB₁ afeta toda a população de células da CN, não interferindo na diferenciação celular glial.

Figura 14 - Bentonita não afeta a diferenciação (para o fenótipo glial) das células da CN. Culturas secundárias de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo controle), 0,6 mg/mL de bentonita, 30 μ M de AFB₁ ou 0,6 mg/mL de bentonita concomitantemente adicionada com 30 μ M de AFB₁. Imagens representativas (A-D) e a análise quantitativa de células glias marcadas (HNK1) foram realizadas (E). A proporção de fenótipo HNK1 para o número total de células foi representada em F. Os resultados demonstram a média de três experimentos independentes realizados em triplicada \pm EP. *** P <0,05 em relação ao grupo controle ou ** P <0,01 em relação ao grupo tratado com AFB₁. Barra de calibração = 200 μ m.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.1.5 Identificações dos grupos funcionais da bentonita relacionados com a capacidade de adsorção da aflatoxina B₁

A bentonita foi capaz de reduzir o efeito tóxico da AFB₁ em culturas de células CN, indicando um efeito protetor deste material. Uma explicação para esta constatação pode estar relacionada com a capacidade de adsorção da bentonita (DIAZ et al., 2004; DIXON et al., 2008; PASHA et al., 2007). Com o objetivo de identificar os grupos funcionais da bentonita envolvidos com os efeitos observados, as técnicas de espectroscopia de infravermelho (FTIR) e isoterma de adsorção foram realizadas.

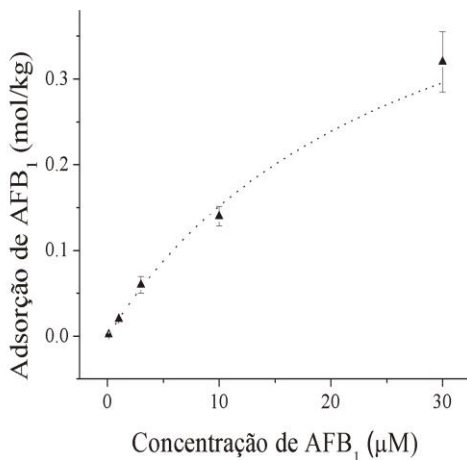
As análises acima descritas revelaram que a capacidade máxima de adsorção da bentonita foi de 0,6 mol/kg e o coeficiente de distribuição (Kd) foi de 0,04 - resultados obtidos pela aplicação da equação de Langmuir, ($R^2 \geq 0,99$), a qual demonstrou um modelo de adsorção de AFB₁ favorável (Figura 15 A).

A análise de FTIR foi utilizada para analisar os grupos funcionais da bentonita (Figura 15 B). As bandas em torno de 2837 e 3417 cm⁻¹ foram atribuídas à vibração dos grupos C-H e moléculas de água respectivamente (WANG et al., 2009). Uma banda atribuída à ligação de Si-OH foi observada na região de 3705 cm⁻¹ e uma banda em torno de 537 cm⁻¹ pode ser atribuída à deformação angular de Si-O-Al. Além disso, a banda em 466 cm⁻¹ foi relacionada com a deformação angular de Si-O-Si (WANG et al., 2009; ZHIRONG; UDDIN; ZHANXUE, 2011). A Tabela 8 lista os principais grupos funcionais presentes na amostra de bentonita.

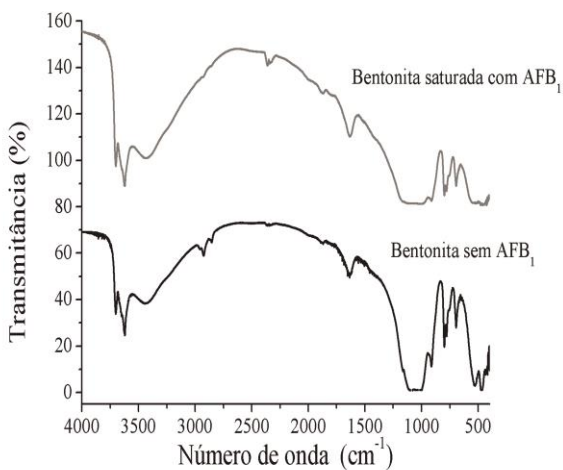
Na bentonita saturada pela AFB₁, foram observadas alterações nas bandas em torno de 913-1036 cm⁻¹ (Figura 13 B), as quais foram relacionadas com os grupos funcionais Al-Al-OH e SiO, ambos os grupos pertencentes à estrutura química da bentonita.

Figura 15 - Identificação dos grupos funcionais da bentonita relacionados com a capacidade de adsorção da AFB₁. Através da isoterma de Langmuir foi possível observar um modelo de adsorção de AFB₁ favorável (A). Alterações nos grupos funcionais foram observadas na região de 913-1036 cm⁻¹ (B). Os resultados representam a média dos experimentos, os quais foram realizados em triplicata ± EP.

A



B



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Tabela 8 - Grupos funcionais da bentonita.

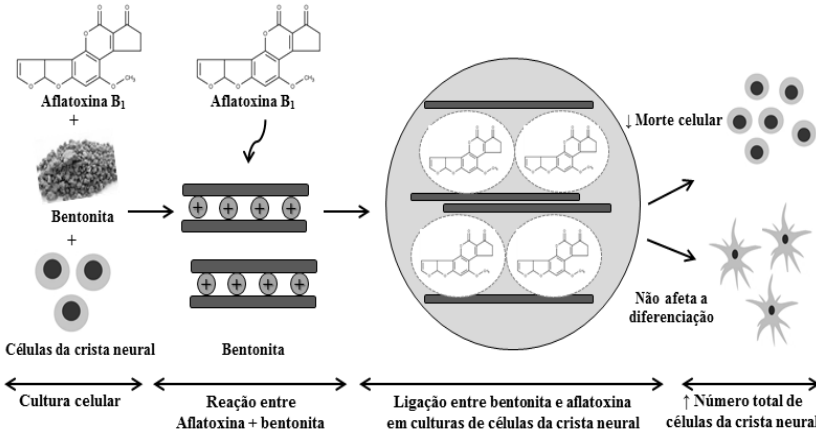
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
Si-OH	3705
Al-Al-OH	3606
H ₂ O	3417
C-H	2837
H ₂ O	1638
SiO	1036
Al-Al-OH	913
Al-OH-Mg	796
Si-O-Si	699
Si-O-Al	537
Si-O-Si	466

Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.1.6 Resumo

O resumo dos principais resultados obtidos no tópico 4.1 pode ser observado na Figura 16. Estes dados foram recentemente publicados na revista *Applied Clay Science: Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin B₁*. NONES, J.; NONES, J.; RIELLA, H.G.; KUHNEN, N.K.; TRENTIN, A. *Applied Clay Science*, v. 104, p.119-127, 2015b (Anexo B).

Figura 16 - Mecanismo protetor da bentonita contra os danos causados nas células da CN pela AFB₁. Sob condições de cultura, AFB₁ interagiu com a bentonita, ocupando a distância interlamelar, reduzindo a disponibilidade de AFB₁ e, conseqüentemente, diminuindo os danos tóxicos causados nas células da CN. Estes eventos contrubuíram para gerar um aumento no número total de células da CN, sem afetar o processo de diferenciação.



4.2 O TRATAMENTO TÉRMICO DA BENTONITA REDUZ A ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B₁ E AFETA A POPULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

4.2.1 A calcinação provoca alterações na morfologia e na composição química das amostras de bentonita

Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento térmico nas características morfológicas e químicas, ensaios de MEV e EDX foram realizados tanto para bentonita *in natura* (grupo controle), quanto para bentonitas tratadas a 125, 250, 500, 750 e 1000 °C.

Através de análises de EDX pode ser observado que os elementos químicos mais abundantes presentes na amostra de bentonita *in natura* e tratadas termicamente (125, 250, 500, 750 e 1000 °C) foram: O, Si e Al. Diferentemente, Fe, K, Mg e Ti foram encontrados em pequenas quantidades (abaixo de 10%) (Tabela 9).

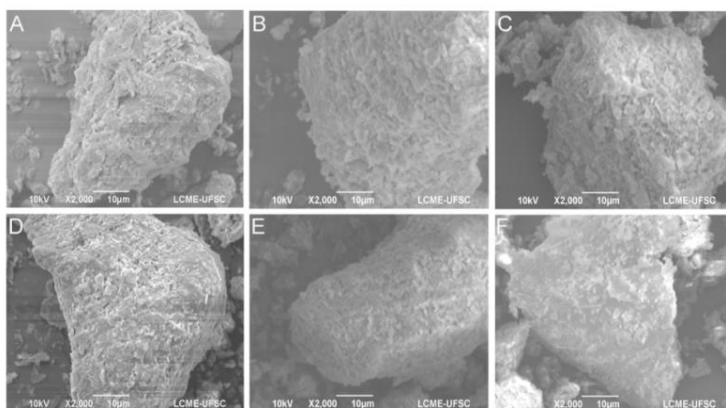
Tabela 9 - Percentual dos elementos químicos presentes na bentonita *in natura* e tratada termicamente em diferentes temperaturas.

Elemento	Massa (%)					
	<i>In natura</i>	125°C	250°C	500°C	750°C	1000°C
O	41,90	24,30	51,28	36,55	43,69	52,53
Si	34,96	40,40	33,11	40,85	31,13	28,51
Al	12,06	14,92	7,05	14,97	9,99	9,19
Fe	6,36	8,42	4,45	3,52	8,24	5,07
K	3,49	9,61	3,20	3,88	5,14	3,37
Mg	0,43	0,32	0,26	0,23	0,22	0,25
Ti	0,80	2,03	0,66	0,00	1,59	1,08
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Fonte: Desenvolvido pela autora.

As imagens de MEV (Figura 17 A-F) demonstraram que todos os grupos (*in natura* ou tratados) apresentaram partículas individuais, com contornos claramente reconhecíveis e plaquetas irregulares que tendem a formar aglomerados. Um pequeno aumento na rugosidade das partículas, no entanto, pode ser observado nos grupos que sofreram calcinação (Figura 17 B-F) quando comparado com o grupo controle.

Figura 17 - Morfologia das amostras de bentonita calcinadas. Após tratamento térmico, as partículas argilominerais foram analisadas por MEV. *In natura* (A), 125 °C (B), 250 °C (C), 500 °C (D), 750 °C (E) e 1000 °C (F). Barra de calibração = 10 µm.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

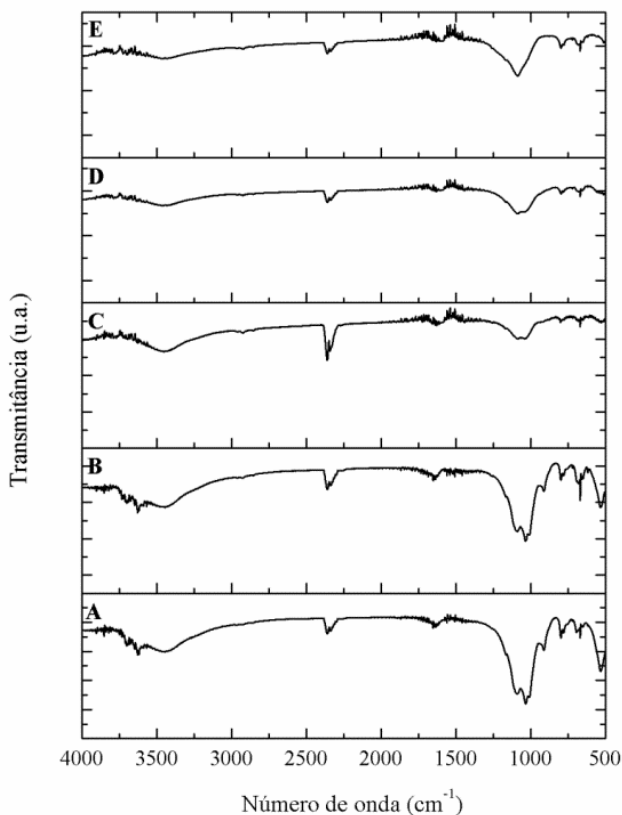
4.2.2 Calcinção proporciona redução nas bandas de água (3417 cm^{-1}) e alteração nas bandas de silício (1036 cm^{-1})

Para avaliar os grupos químicos presentes nas amostras de bentonita, antes e após o tratamento térmico (Figura 17), foi aplicada a técnica de FTIR.

Na Figura 18, em todos os grupos avaliados (*in natura* ou calcinados), a banda em torno de 3417 e 3705 cm^{-1} foi atribuída às moléculas de água e à ligação entre silício e hidroxila (Si-OH), respectivamente. Na região de 1036 cm^{-1} foi observada uma banda referente à elevada frequência de SiO, enquanto a banda centrada a 913 cm^{-1} foi atribuída à ligação de Al-Al-OH.

É importante notar que a intensidade das bandas em torno de 3417 e 1036 cm^{-1} foi reduzida quando realizado o tratamento térmico (acima de 500 °C) (Figura 18), devido a uma provável alteração da quantidade de água e nas ligações de silício.

Figura 18 - Calcinação proporciona redução nas bandas de água (3417 cm^{-1}) e alteração nas bandas de silício (1036 cm^{-1}): $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A), $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B), $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C), $750\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D) e $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ (E).

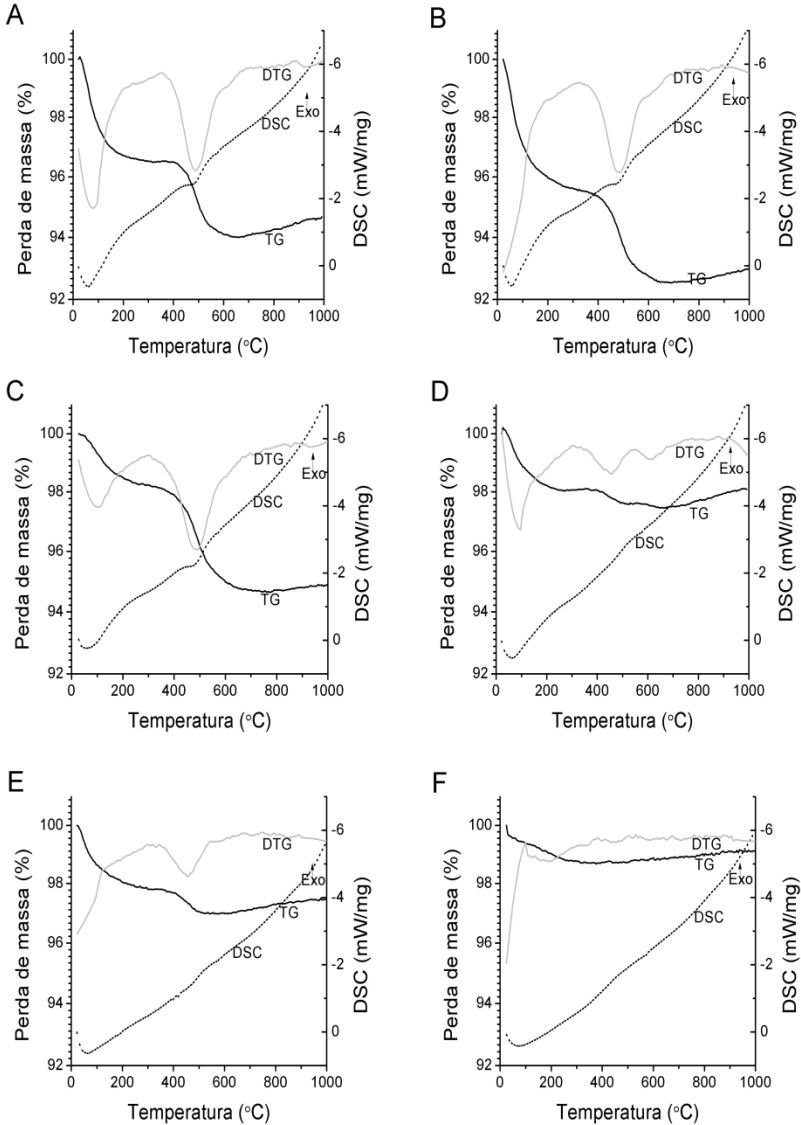


Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.3 A calcinação causa transformações nas fases de desidratação e desidroxilação

Com o objetivo de investigar os efeitos da temperatura nas amostras de bentonita, análises termogravimétricas (TG), diferenciais das análises termogravimétricas (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas (Figura 19).

Figura 19 - Calcinação causa transformações nas fases de desidratação e desidroxilação. Após o tratamento térmico, as partículas de bentonita foram avaliadas através de análise termogravimétrica. *In natura* (A): 125 °C (B): 250 °C (C): 500 °C (D): 750 °C (E) e 1000 °C (F).



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Através da TG foi possível identificar uma perda de massa total para a bentonita *in natura* em torno de 5% (Figura 19 A). Resultados semelhantes foram observados para bentonita tratada a 125 e 250 °C, onde as perdas de massa foram de 7,04 e 5,11%, respectivamente (Figura 19 B-C). Um menor valor de perda de massa foi encontrado nas bentonitas tratadas com temperaturas acima de 500 °C (cerca de 2%), atingindo o seu valor mínimo nas amostras calcinadas a temperatura de 1000 °C (menos de 1%) (Figura 19 D-F).

As análises termogravimétricas (TG) mostraram duas transições significativas de perda de massa (Figura 19 A-D). A primeira transição de perda, em torno de 88 °C, refere-se à perda de água por desidratação. A segunda perda de massa ocorreu em torno de 489 °C, sendo provavelmente correspondente à desidroxilação dos argilominerais.

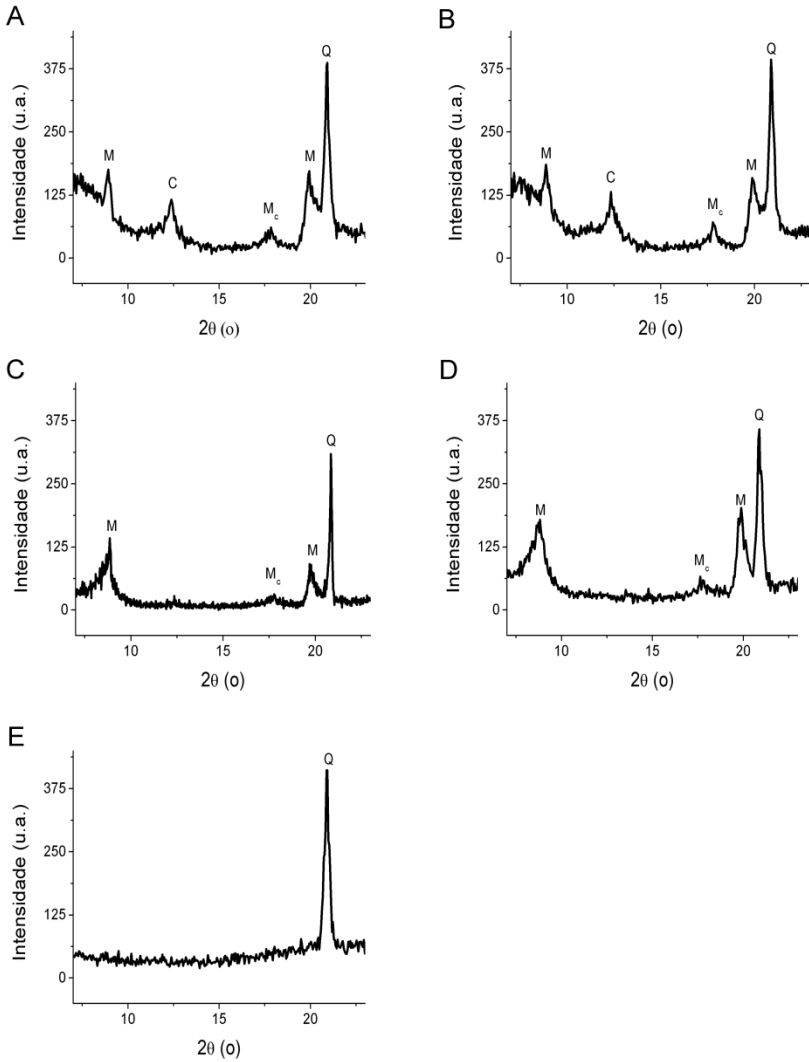
Corroborando com os resultados obtidos por DTG, as análises de DSC (Figura 19 A-F) demonstraram transições características de desidratação (em torno de 60 °C) e desidroxilação (em torno de 480 °C).

4.2.4 O aumento da temperatura causa ruptura das fases mineralógicas da bentonita

A transformação das fases mineralógicas antes e após os tratamentos térmicos da bentonita foram analisadas por DRX (Figura 20). Os minerais identificados nas amostras de bentonita foram a montmorilonita (M), quartzo (Q), caulinita (C) e a muscovita (Mc).

De acordo com as análises de DRX realizadas, pode-se observar que o pico da montmorilonita teve pequenas variações após o aquecimento à temperatura de 125 a 750 °C, o qual desapareceu nas amostras tratadas à temperatura de 1000 °C. Além disso, pode-se observar que o tratamento na temperatura de 500 °C provocou a desidroxilação da caulinita, resultando no colapso da estrutura mineral da argila e desaparecimento do pico em 12,4° (2 θ) (Figura 20 C). Da mesma forma, as fases cristalinas da bentonita desapareceram após calcinação a 1000 °C, podendo apenas ser identificado o pico de quartzo (Figura 20 E).

Figura 20 - O aumento da temperatura causa ruptura das fases mineralógicas da bentonita. (M – Montmorilonita, C-Caulinita, Mc - Muscovita, Q - Quartzo). 125 °C (A); 250 °C (B); 500 °C (C); 750 °C (D) e 1000 °C (E).



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.5 A calcinação proporciona alterações na massa, distância interlamelar e densidade das partículas de bentonita

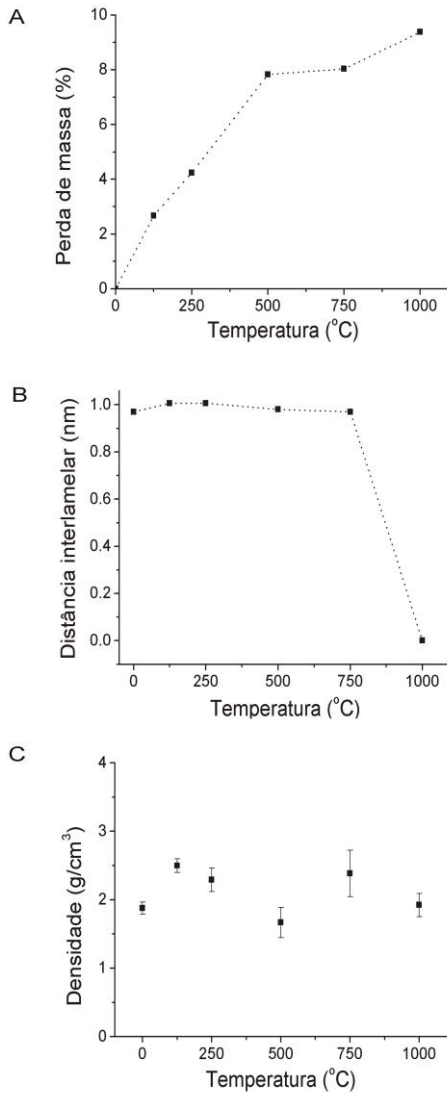
Para avaliar o efeito da temperatura sobre as partículas de bentonita foram realizadas as determinações dos percentuais de perda de massa, distância interlamelar e de densidade.

Os resultados demonstraram que o tratamento térmico (nas temperaturas de 125 a 1000 °C) foi capaz de proporcionar perda de massa, fato atribuído à perda de moléculas de água, impurezas e transformações estruturais. Além disso, foi possível observar que o aumento da temperatura (de 125 a 1000 °C) causou um aumento da perda de massa (Figura 21 A).

Na bentonita *in natura*, pode-se observar que o difratograma apresentou o pico da montmorilonita (d_{001}) em $2\theta = 9,1^\circ$ (Figura 20 A), o qual corresponde à distância interlamelar de 0,97 nm (Figura 21 B). Essa distância sofreu pequenas variações após tratamento térmico, com aumento de 0,97 a 1,00 nm, quando as amostras foram tratadas a 125 ou 250 °C. Uma diminuição de 0,98 e 0,97 nas temperaturas de 500 e 750 °C, respectivamente, pode ser observada. Diferentemente, o pico da montmorilonita (d_{001}) foi desfragmentado a 1000 °C, não sendo possível calcular a distância interlamelar para este grupo experimental.

A densidade da bentonita *in natura* foi de 1,87 g/cm³ (Figura 21 C), sendo obtidos resultados semelhantes nos demais tratamentos térmicos realizados.

Figura 21 - A calcinação proporciona alterações na massa, na distância interlamelar e na densidade das partículas de bentonita. Perda de massa (A); distância interlamelar (B); massa específica (C). Os resultados de densidade representam a média de ensaios realizados em triplicata \pm DP.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.6 A temperatura modifica a área superficial e o tamanho médio dos poros da bentonita

A área superficial da bentonita *in natura* ($30,10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) diminuiu após o tratamento térmico (até $2,16 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) (Tabela 10). No entanto, o diâmetro médio dos poros aumentou, passando de $8,80 \text{ nm}$ para $37,61 \text{ nm}$ para a bentonita *in natura* e tratada a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Além disso, o volume de poros das amostras de bentonita teve uma leve diminuição quando as amostras de bentonitas foram submetidas a temperaturas mais elevadas.

Tabela 10 - Propriedades texturais de amostras de bentonita *in natura* e tratadas termicamente.

Bentonita	Área superficial (m^2g^{-1})	Diâmetro médio dos poros (nm)	Volume dos poros (cm^3g^{-1})
<i>In natura</i>	30,10	8,80	0,066
125 °C	29,47	8,93	0,066
250 °C	29,21	9,64	0,070
500 °C	25,89	9,40	0,061
750 °C	20,02	12,39	0,062
1000 °C	2,16	37,61	0,020

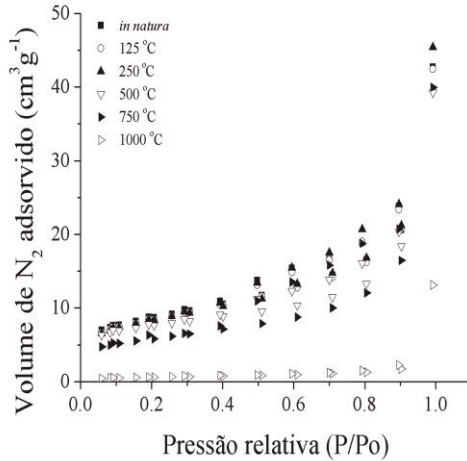
Fonte: Desenvolvido pela autora.

As isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio para a bentonita *in natura* e para as amostras preparadas a diferentes temperaturas foram analisadas. Os resultados obtidos demonstraram que todas as amostras produziram isotermas do tipo IV, as quais podem ser consideradas comuns para materiais mesoporosos. No entanto, como mostrado na Figura 22 A, o aumento gradativo da temperatura de calcinação foi capaz de diminuir o volume de nitrogênio adsorvido.

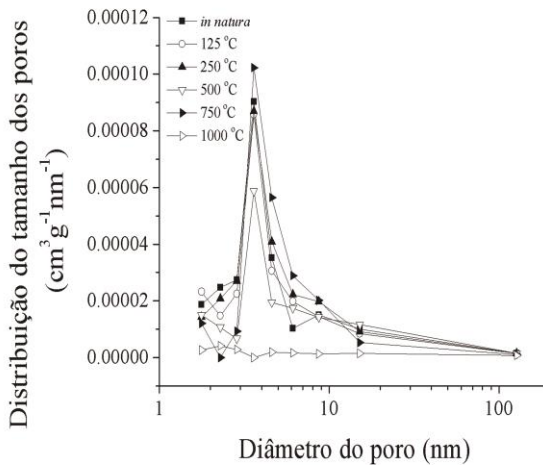
A distribuição do tamanho dos poros das amostras de bentonita apresentou um valor máximo em $3,6 \text{ nm}$ nos grupos da bentonita tratada a $125, 250, 500$ e $750 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 22 B), sendo observado uma diminuição na intensidade do pico na temperatura de $1000 \text{ }^\circ\text{C}$,

Figura 22 - O aumento da temperatura modifica a superfície e tamanho dos poros da bentonita. As amostras foram mantidas a 250 °C, durante 12 h, sob atmosfera de nitrogênio. Depois deste procedimento, isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio (A) e distribuição do tamanho dos poros (B) foram determinadas.

A



B

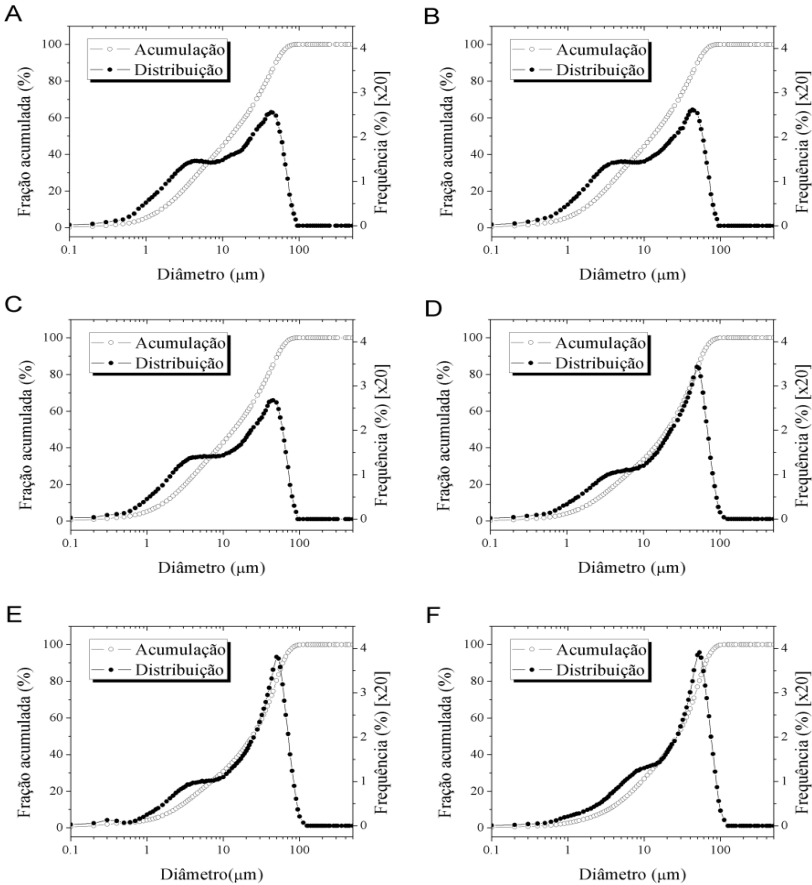


Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.7 A calcinação aumentou a distribuição do tamanho médio das partículas de bentonita

Conforme pode ser observado na Figura (23 A), a distribuição média do tamanho das partículas de *bentonita in natura* foi de 19,96 μm , sendo que as partículas menores foram distribuídas entre 1,59 e 12,79 μm (Figura 23 A). O tratamento térmico a 125 e 250 $^{\circ}\text{C}$ afetou a distribuição média de tamanho de partículas, a qual passou a ser de 20,11 μm e 20,83 μm , respectivamente (Figura 23 B-C). Por outro lado, o tratamento térmico nas temperaturas de 500, 750 e 1000 $^{\circ}\text{C}$ provocou um aumento na distribuição de tamanho de partícula para 26,08, 28,15 e 30,73 μm , respectivamente (Figura 23 D-F).

Figura 23 - O tamanho das partículas da bentonita aumentou pela calcinação. A distribuição do tamanho de partículas de bentonita foi determinada por análise de difração a laser. *In natura* (A); 125 °C (B); 250 °C (C); 500 °C (D); 750 °C (E) e 1000 °C (F).



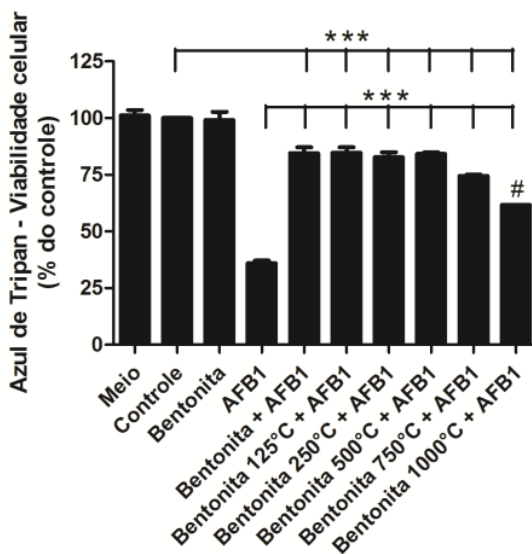
Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.8 A calcinação da bentonita não incrementa seu efeito protetor em células da crista neural que sofreram indução de morte por aflatoxina B₁

Como já demonstrado, partículas de bentonita foram capazes de evitar a morte celular induzida pela AFB₁. Com o intuito de avaliar se o tratamento térmico na bentonita (de 125 a 1000 °C) poderia aumentar o

efeito protetor, foram realizados ensaios de viabilidade celular (grupos experimentais tratados com: bentonita *in natura*, a 125, 250, 500, 750 e 1000 °C, concomitantemente tratados com AFB₁).

Figura 24 - A calcinação da bentonita mantém o seu efeito protetor sobre as células da CN quando submetidas a danos causados pela AFB₁. Culturas secundárias de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo controle), 0,6 mg/mL de bentonita *in natura*, 30 µM de AFB₁ ou 0,6 mg/mL de bentonita (*in natura* ou calcinada a 125, 250, 500, 750 e 1000 °C) concomitantemente adicionada com 30 µM de AFB₁. Após 4 dias de tratamento, a viabilidade celular foi analisada através da técnica de azul de tripan. Os resultados demonstram a média de três experimentos independentes realizados em triplicada ± EP. *** P <0,05 em relação ao grupo controle e tratado com a AFB₁ ou # P <0,05 em relação ao grupo tratado com a bentonita *in natura*.



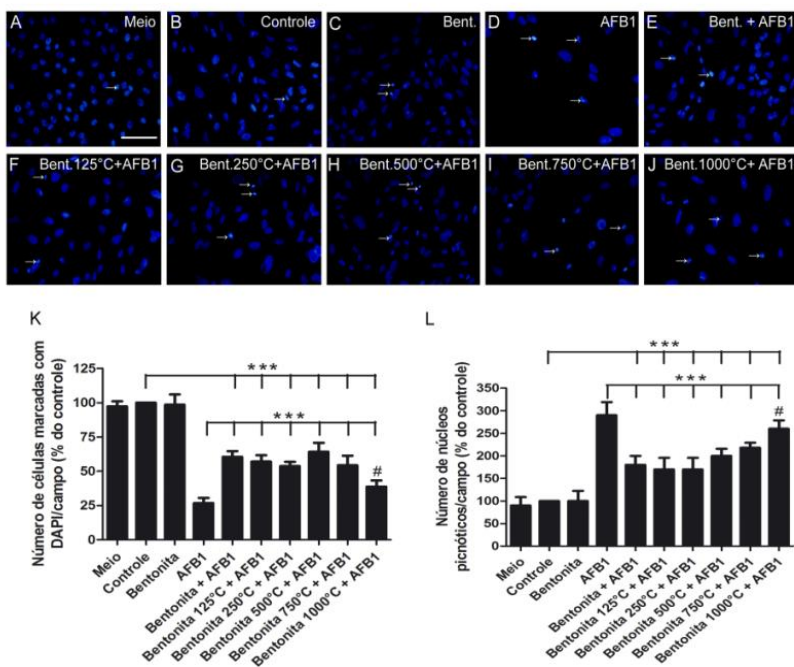
Fonte: Desenvolvido pela autora.

Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com AFB₁ (30 µM) resultou em 36% de células viáveis (Figura 24). Por outro lado, a administração concomitante de bentonita *in natura* (0,6 mg/mL) com AFB₁ aumentou a viabilidade celular (aumento de 48% quando comparado com o grupo tratado com AFB₁). Efeito semelhante ao grupo tratado com a bentonita *in natura* (84% de viabilidade) foi observado com a adição da bentonita tratada termicamente a 125, 250, 500, 750 °C

(viabilidade de 78, 83, 84 e 74%, respectivamente). O tratamento com a bentonita a 1000 °C, no entanto, provocou uma menor viabilidade celular (cerca de 18% menor em comparação com os grupos tratados com as outras bentonitas).

Após avaliada a viabilidade celular, o número total de células da CN e núcleos picnóticos foram quantificados através da marcação por DAPI. Os resultados obtidos demonstraram que o grupo tratado com AFB₁ diminuiu o número total de células (Figura 25 D, K) e aumentou o número total de núcleos picnóticos (Figura 25 D, L) em comparação com o grupo de controle. A adição da bentonita *in natura* ou calcinada (125, 250, 500, 750), adicionadas concomitantemente com 30 µM AFB₁ (Figura 25, A-G), foi capaz de reverter parcialmente o efeito provocado pela AFB₁ sobre as células da CN. Embora a calcinação a 125, 250, 500, 750 °C não tenha provocado um aumento do efeito protetor em relação ao grupo controle (bentonita *in natura*), a bentonita tratada com a temperatura de 1000 °C foi capaz de provocar uma redução destes valores, ou seja, provocou uma redução no número total de células e um aumento na quantidade de núcleos picnóticos (Figura 25, E-L).

Figura 25 - Bentonitas *in natura* e tratadas termicamente afetam a morte de células-tronco previamente tratadas com AFB₁. Culturas secundárias de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com: DMSO (grupo controle), 0,6 mg/mL de bentonita *in natura*, 30 µM de AFB₁ ou 0,6 mg/mL de bentonita (*in natura* ou calcinada a 125, 250, 500, 750 e 1000 °C) concomitantemente adicionada com 30 µM de AFB₁. Após 4 dias de tratamento, o número total de células por campo foi determinado por coloração por DAPI (A-K) e a morte celular foi analisada através da quantificação de células picnóticas (A-J, L). Os resultados demonstram a média de três experimentos independentes realizados em triplicada ± EP. *** P <0,05 em relação ao grupo controle e tratado com a AFB₁ ou # P <0,05 em relação ao grupo tratado com a bentonita *in natura*.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

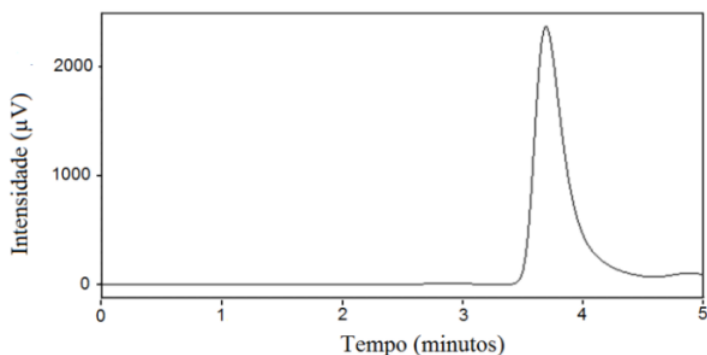
4.2.9 Padronização dos ensaios de HPLC

Com o intuito de quantificar a capacidade de adsorção das partículas de bentonita, ensaios cromatográficos foram realizados. Para tal, inicialmente as condições do cromatógrafo foram padronizadas (fase móvel, fluxo, comprimento de onda) e adaptadas à polaridade e às características da coluna e da AFB₁. Depois de estabelecidos os

parâmetros, foram realizadas injeções do padrão de AFB₁ (concentrações que variaram de 0,1 a 30 µM), adquirindo separação do pico da AFB₁ no tempo de retenção de 3,7 min (Figura 26).

Conforme demonstrado na Figura 27, a curva de calibração, determinada a partir das áreas dos picos de AFB₁ apresentou linearidade no intervalo de concentração de 0,1 a 30 µM.

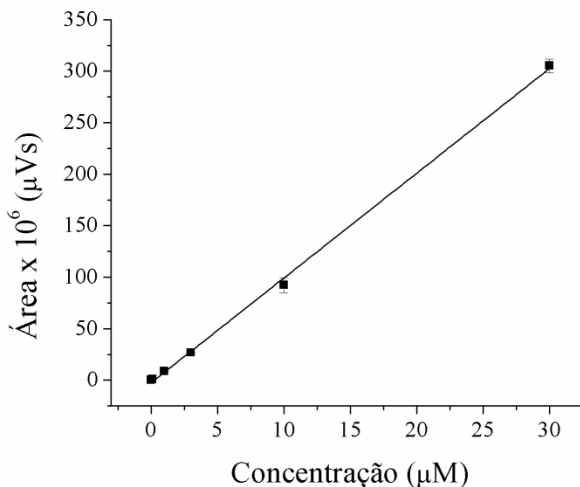
Figura 26 - Cromatograma do padrão de AFB₁, no qual o pico de AFB₁ (com concentração de 30 µM) corresponde ao tempo de retenção de 3,7 min.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

A equação de regressão linear, obtida pelo método dos mínimos quadrados, foi $y = 11,2 \cdot 10^6 x - 10,5 \cdot 10^6$, sendo y a área do pico da AFB₁ e x a concentração da AFB₁. O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9948.

Figura 27 - Curva de calibração HPLC.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.10 O aumento da temperatura de calcinação da bentonita reduz a capacidade de adsorção de aflatoxina B₁

As partículas de bentonita *in natura* ou calcinadas a 125, 250, 500, 750, 1000 °C, demonstraram um efeito protetor sobre as células-tronco da CN quando adicionadas concomitantemente com substâncias tóxicas, tais como aflatoxinas. Esse efeito protetor foi atribuído à capacidade de adsorção destas bentonitas. Para avaliar esta hipótese, as técnicas de espectroscopia UV/visível e HPLC foram utilizadas (Figura 28).

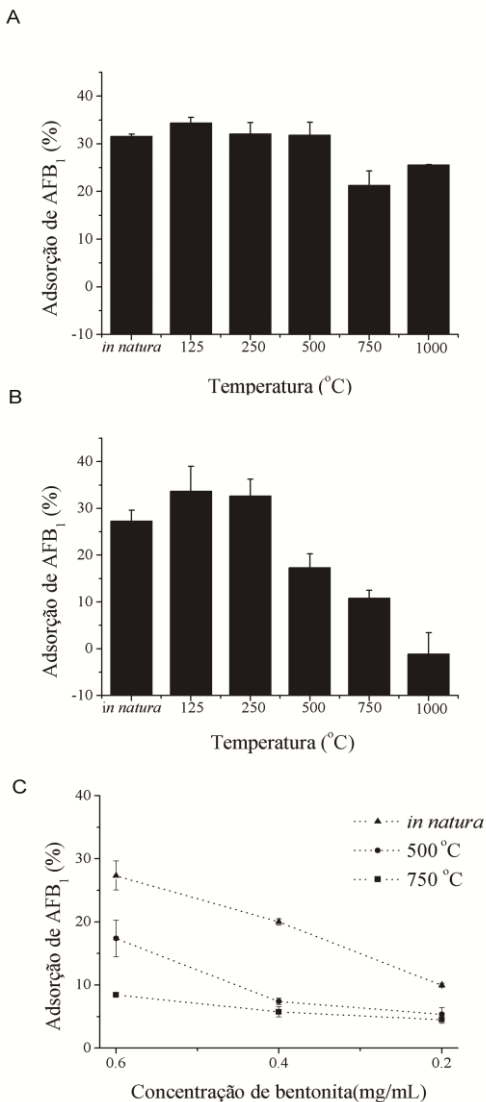
Os resultados demonstraram que, através da espectroscopia UV/visível, nenhuma mudança ocorreu na capacidade de adsorção da bentonita tratada termicamente a 125, 250 e 500 °C em relação à bentonita *in natura* (Figura 28 A). No entanto, essa capacidade sofreu uma leve diminuição nos grupos calcinados a 750 °C (21% de AFB₁ adsorvida) e a 1000 °C (25% de AFB₁ adsorvida), quando comparado com o grupo da bentonita *in natura* (31,6% de AFB₁ adsorvida).

Através das análises de HPLC, conforme demonstrado na Figura 26 B, foi possível observar que a bentonita *in natura* apresentou adsorção de AFB₁ de 27,3% e que o tratamento a 125 e 250 °C, durante 4 h, aumentou a capacidade de adsorção da bentonita em torno de 5%. A

capacidade de adsorção, no entanto, diminuiu à medida que a temperatura variou de 500 a 750 °C, sendo que o tratamento a 1000 °C não apresentou nenhuma capacidade de adsorção.

O efeito da concentração do adsorvente sobre a capacidade de adsorção de AFB₁ pela bentonita *in natura* e tratada termicamente (500 e 750 °C) foi demonstrado na Figura 278 C. Através desta análise, foi possível observar que a adsorção de AFB₁ diminuiu com a diminuição da quantidade de cada adsorvente adicionado em suspensão.

Figura 28 - O aumento da temperatura de calcinação da bentonita reduz a capacidade de adsorção de AFB₁. A adsorção foi analisada por espectroscopia UV/visível (A) e HPLC (B-C). Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em duplicata \pm EP.

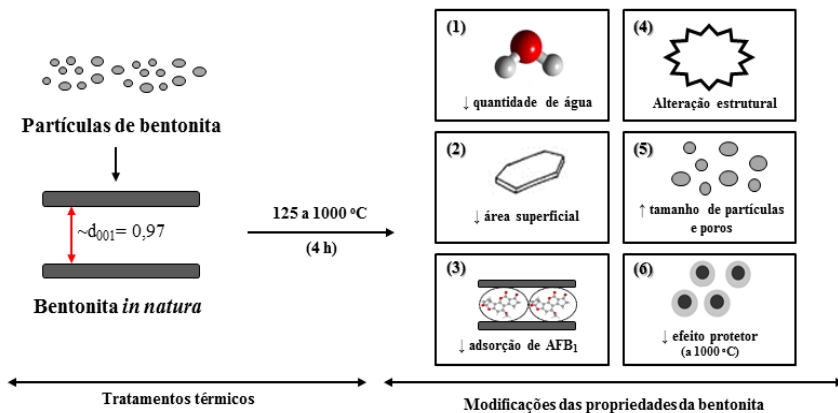


Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.2.11 Resumo

O resumo dos principais resultados obtidos no t3pico 4.2 pode ser observado na Figura 29. A primeira parte dos dados obtidos foram publicados na revista *Materials Science Engineering C: Thermal treatment of bentonite reduces aflatoxin B₁ adsorption and affects stem cell death*. NONES, J.; NONES, J.; RIELLA, H.G.; POLI, A.; TRENTIN, A.G.; KUHNEN, N.C. *Materials Science Engineering C*, v.55, p. 530-537, 2015c (Anexo C). A segunda parte dos dados foram aceitos para publica33o na revista *International Journal of Applied Research and Technology: Calcination of brazilian bentonite affects its structural properties and reduces ability to bind AFB₁*. NONES, J.; NONES, J.; RIELLA, H.G.; POLI, A.; KUHNEN, N.C. *International Journal of Applied Research and Technology*, submetido/aceito, 2016 (Anexo D).

Figura 29 - O tratamento t3rmico na bentonita propiciou modifica33es estruturais e diminui33o da adsor33o e prote33o celular contra os danos causados pela AFB₁.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

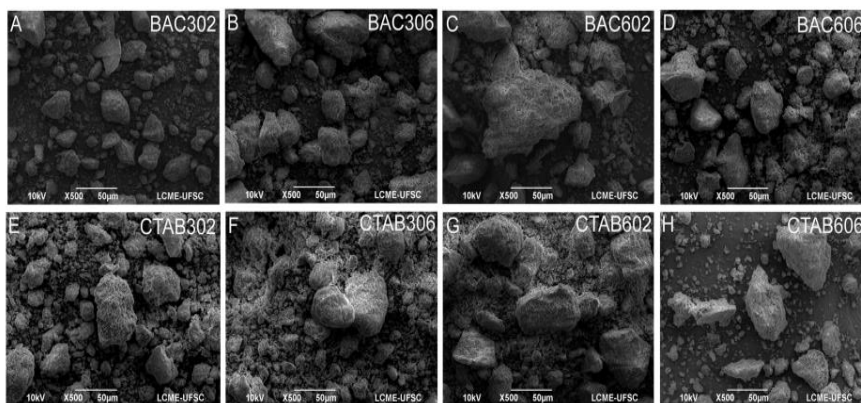
4.3 TRATAMENTOS ORGANOFÍLICOS NA BENTONITA AUMENTAM A ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B₁ E PROTEGEM AS CÉLULAS-TRONCO CONTRA DANOS CELULARES

4.3.1 A morfologia da bentonita não sofre modificação após os tratamentos orgânicos com cloreto de benzalcônio e brometo de cetrimônio

Com o objetivo de avaliar se os tratamentos organofílicos com BAC ou CTAB seriam capazes de interferir na estrutura morfológica das partículas de bentonita, a técnica de MEV foi utilizada.

A técnica de MEV, como pode ser visualizado na Figura 30, demonstrou que os tratamentos da bentonita com cloreto de benzalcônio - BAC (Figura 30 A-D) e brometo de cetrimônio - CTAB (Figura 30 E-H), sob diferentes condições de concentração e de temperatura, não foram capazes de alterar a estrutura morfológica da bentonita, ou seja, os grupos de bentonitas organofílicas apresentaram a mesma morfologia da bentonita *in natura*.

Figura 30 - Tratamentos organofílicos com BAC ou CTAB não alteram a estrutura morfológica das bentonitas: BAC302 (A); BAC306 (B); BAC602 (C); BAC606 (D); CTAB302 (E); CTAB 306 (F); CTAB602 (G); CTAB606 (H). Barra de calibração = 50 µm.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.3.2 Os tratamentos orgânicos provocaram alterações nas ligações entre C-H e Si-O

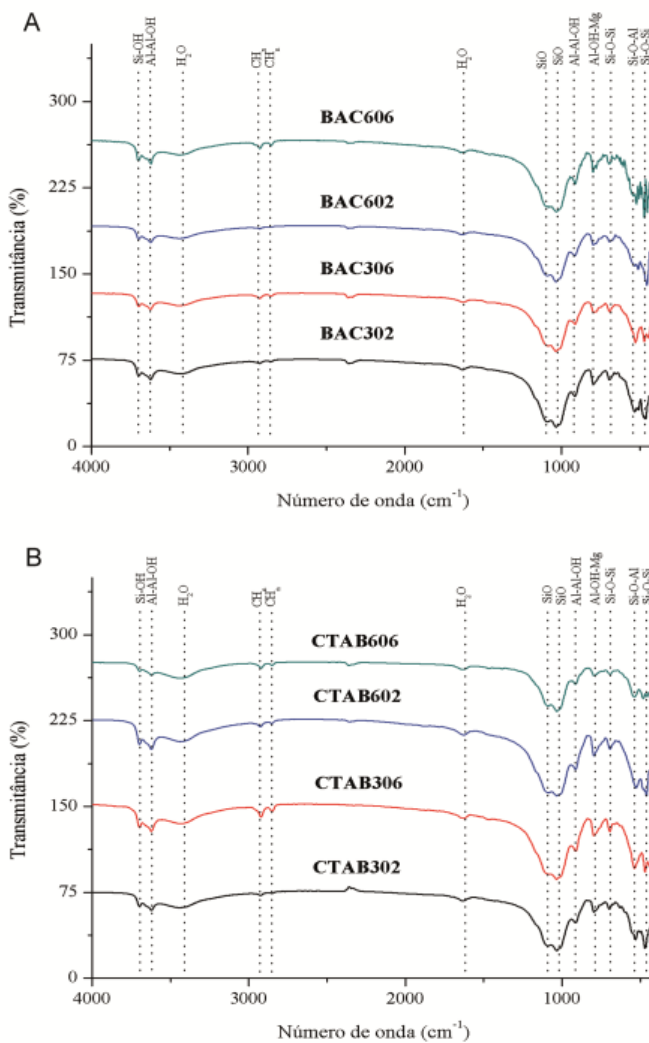
Os espectros de FTIR foram usados para avaliar os grupos químicos presentes nas amostras de bentonita, antes e após a organofilização. Tais espectros, que podem ser visualizados na Figura 31, demonstraram ser semelhantes entre todos os grupos tratados, sendo que as bandas em torno de 3417 e 1640 cm^{-1} foram atribuídos às moléculas de água (Figura 31 A-B).

A técnica acima citada demonstrou a existência de bandas de Al-OH, as quais apareceram na região de 3620 e 913 cm^{-1} . Além disso, Si-OH apareceu na região de 3705 cm^{-1} . As bandas a 2920 e 2850 cm^{-1} foram atribuídas à vibração assimétrica e simétrica de estiramento da ligação C-H, estando provavelmente relacionadas com o processo de organofilização.

Comparando os espectros obtidos para as bentonitas organofílicas com a bentonita *in natura* (NONES et al., 2015b), é possível observar mudanças no número de onda da banda de Si-O (1020-1090 cm^{-1}), fato que deve-se à provável incorporação de BAC ou CTAB.

Outros grupos funcionais presentes nas amostras de bentonita, tais como Al-OH-Mg, Si-O-Al e Si-O-Si, também foram observados (Figura 31 A-B).

Figura 31 - A intercalação de cátions orgânicos na bentonita proporciona mudanças no espectro de FTIR. BAC (A) e CTAB (B).



Fonte: Desenvolvido pela autora.

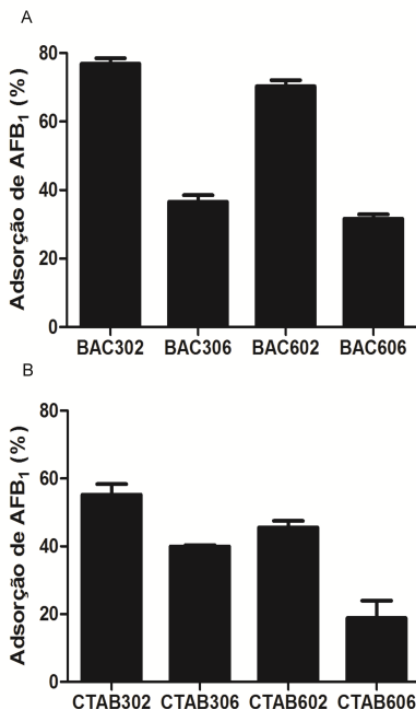
4.3.3 Tratamentos orgânicos na bentonita aumentam sua capacidade de adsorção de aflatoxina B₁

Com o intuito de analisar se a incorporação de BAC ou CTAB nas amostras de bentonita, a diferentes temperaturas e concentrações, seria capaz de aumentar a sua capacidade de adsorção, análises de HPLC foram realizadas e seus efeitos avaliados estatisticamente.

Os resultados obtidos demonstraram que a bentonita tratada com 2% de BAC, a 30 °C (BAC302), apresentou maior capacidade de adsorção da AFB₁ (76,88%) (Figura 32 A). Valor semelhante (70,31% de adsorção de AFB₁) foi obtido no grupo de bentonita tratada com 2% de BAC a 60 °C (BAC602). Por outro lado, concentrações mais elevadas de BAC (6% de massa de bentonita) não foram capazes de aumentar a adsorção de AFB₁ pela bentonita, mostrando valores de adsorção em torno de 36,54 e 31,62% para BAC306 e BAC606, respectivamente (Figura 32 A).

Embora o tratamento com CTAB também tenha promovido o aumento da capacidade de adsorção de AFB₁ pela bentonita, os resultados foram menos eficazes quando comparados com tratamentos com BAC (Figura 32 B). Neste caso, o tratamento da bentonita realizado com a menor concentração de CTAB (2%) e menor temperatura (30 °C) mostrou a melhor capacidade de adsorção da AFB₁ (55,24% de adsorção AFB₁), quando comparado com a concentração e temperatura mais elevada. As amostras de CTAB306 e CTAB602 apresentaram 38,98 e 45,59% de adsorção de AFB₁, respectivamente.

Figura 32 - Tratamentos orgânicos na bentonita aumentam sua capacidade de adsorver AFB₁. Bentonita tratada com cloreto de benzalcônio - BAC (A) e brometo de cetrimônio - CTAB (B) (0,6 mg/mL) foi adicionado a 30 µM de AFB₁. Após 24 h, a adsorção foi analisada por HPLC. Os resultados representam a média dos experimentos em triplicata ± EP.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Análises estatísticas, conforme dados presentes nas Tabelas 11 e 12, demonstraram que o aumento da temperatura e da concentração dos surfactantes têm efeitos significativos na capacidade de adsorção da AFB₁. De acordo com estas análises, os valores de F mostrados na Tabela 11 foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) para ambos os sais testados, apresentando valores de 559,53 e 44,56 para a concentração de BAC e CTAB, respectivamente. Para a temperatura, os valores de F obtidos para BAC e CTAB foram 11,83 e 23,92, respectivamente. No entanto, quando avaliada a interação entre a temperatura e a concentração, nenhuma diferença estatística foi observada para ambos os sais testados. De forma complementar, o teste

t-Student revelou que a temperatura e a concentração utilizadas no processo de organofilização da bentonita também apresentaram diferenças significativas, apresentando efeitos negativos na adsorção da AFB₁ (Tabela 12).

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para avaliação da capacidade de adsorção de AFB₁ pelas bentonitas organofílicas.

Fator	SQ	GL	MQ	F	P
BAC					
(1) Temperatura	99,13	1	99,13	11,83	0,00*
(2) Concentração	4685,31	1	4685,31	559,53	0,00*
Interação (1) e (2)	2,05	1	2,05	0,24	0,63
Erro	66,98	8	8,37		
Total	4853,48	11			
CTAB					
(1) Temperatura	710,15	1	710,16	23,92	0,00*
(2) Concentração	1322,79	1	1322,79	44,57	0,00*
Interação (1) e (2)	98,71	1	98,71	3,32	0,10
Erro	237,43	8	29,68		
Total	2369,09	11			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

*P<0,05; Fonte: Desenvolvido pela autora.

Tabela 12 - Estimativas dos efeitos e suas interações para a adsorção da AFB₁ pelas bentonitas organofílicas.

Factor	Efeito	Erro padrão	t	P
BAC				
(1) Temperatura	-5,74	1,67	-3,44	0,00*
(2) Concentração	-39,52	1,67	-23,65	0,00*
Interação (1) e (2)	0,83	1,67	0,49	0,63
CTAB				
(1) Temperatura	-15,38	3,14	-4,89	0,00*
(2) Concentração	-20,99	3,14	-6,67	0,00*
Interação (1) e (2)	-5,73	3,14	-1,82	0,10

*P<0,05. Fonte: Desenvolvido pela autora.

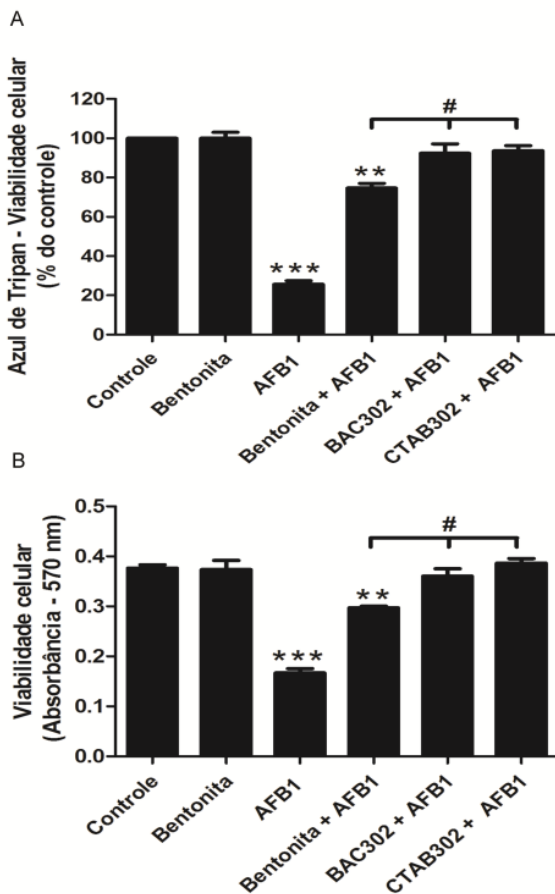
4.3.4 Os novos materiais gerados (BAC e CTAB) apresentaram importantes efeitos de proteção contra danos celulares causados pela aflatoxina B₁

Como demonstrado previamente, partículas de bentonita possuíam capacidade de evitar a morte celular induzida pela AFB₁, inibindo parcialmente seus efeitos citotóxicos. Com a finalidade de avaliar o efeito protetor destas bentonitas modificadas (BAC e CTAB), culturas de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo de controle), 0,6 mg/mL de bentonita *in natura*, 30 µM de AFB₁, 0,6 mg/mL de BAC302 ou CTAB302, sendo que o indutor de toxicidade celular (30 µM de AFB₁) foi concomitantemente adicionado aos grupos onde houve a adição dos grupos de bentonitas citados.

Corroborando com resultados previamente obtidos (NONES et al., 2015b), ensaios de azul de tripan demonstram uma redução na viabilidade celular (redução de 74,3% em comparação com o grupo controle) após tratamento com AFB₁ (Figura 33 A). De forma semelhante ao previamente avaliado (NONES et al., 2015b), este efeito foi parcialmente evitado pela coadministração da bentonita *in natura*, aumentando a viabilidade celular em 49% em comparação ao grupo tratado com AFB₁. Vale ressaltar que estes materiais produzidos (bentonitas organofílicas) foram capazes de evitar o efeito tóxico causado pela AFB₁, mostrando valores de 93,7 e 94,3% de viabilidade celular para BAC302 e CTAB302, respectivamente.

Para confirmar o resultado previamente obtido com o teste de azul de tripan, ensaios de MTT também foram realizados. Estes ensaios (Figura 33 B) demonstraram que o tratamento com AFB₁ resultou em 0,16 de absorbância e que a coadministração de bentonita *in natura* com AFB₁ foi capaz de incrementar este valor para 0,30 de absorbância. Corroborando com os resultados obtidos nas análises de azul de tripan, os ensaios de MTT também demonstraram que os tratamentos de bentonita com BAC302 e CTAB302 foram capazes de evitar os danos causados pela AFB₁, aumentando a viabilidade celular para valores iguais ao grupo controle (0,36 e 0,38 de absorbância para BAC302 e CTAB302, respectivamente).

Figura 33 - Bentonitas previamente tratadas com sais orgânicos impedem os danos celulares causados pela AFB₁. Culturas secundárias de células-tronco da CN de codornas foram incubadas com DMSO (grupo controle), 0,6 mg/mL de bentonita *in natura*, 30 µM de AFB₁ ou 0,6 mg/mL da bentonita (*in natura* ou organofílica - BAC302 e CTAB302) concomitantemente adicionada com 30 µM de AFB₁. Depois de 4 dias de tratamento, a viabilidade celular foi analisada através da técnica de azul de tripan (A) e MTT (B). Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata ± EP. ***P < 0,01 comparado com o grupo controle, **P < 0,05 comparado com o grupo tratado com AFB₁ e # P < 0,05 comparado com o grupo tratado com a bentonita *in natura* + AFB₁.

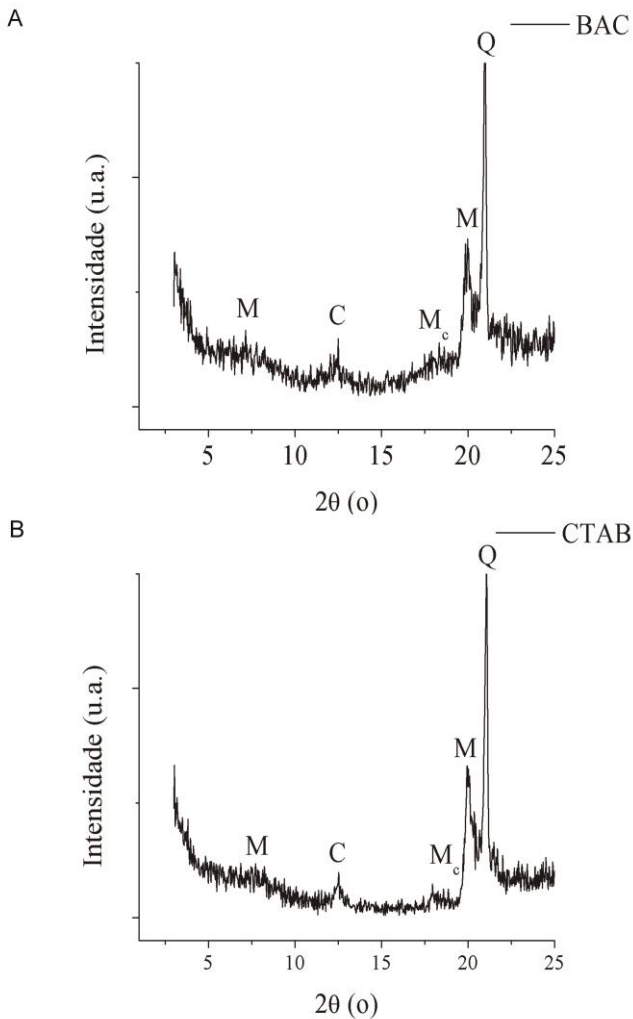


Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.3.5 Alterações na distância interlamelar das bentonitas organofílicas estão provavelmente relacionadas com os efeitos observados

Os resultados revelaram que a adição de bentonita tratada com CTAB302 ou BAC302 evitou o efeito negativo da AFB₁ em culturas de células-tronco da CN. Uma explicação para este fato pode estar relacionado com a capacidade de adsorção da bentonita. Portanto, para testar esta hipótese, a composição mineralógica e distância interlamelar das bentonitas modificadas com sais quaternários de amônio (BAC e CTAB) foram analisadas através da técnica de DRX (Figura 34).

Figura 34 - Os tratamentos organofílicos aumentam a distância interlamelar. BAC302 (A) e CTAB302 (B). M - Montmorillonita, C - Caulinita, Mc - Muscovita, Q - Quartzo.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Os resultados obtidos demonstraram que as amostras das bentonitas organofílicas possuem a mesma composição mineralógica

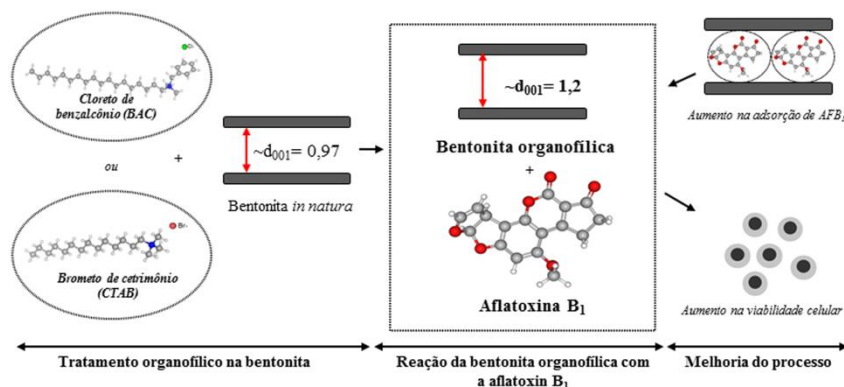
que a bentonita *in natura* (NONES et al., 2015b), no entanto, alterações na distância interlamelar foram observadas (Figura 34). De acordo com os resultados obtidos, a distância interlamelar da bentonita *in natura* foi de 0,97 nm (NONES et al., 2015c), a qual aumentou para 1,23 nm (d_{001} em $2\theta = 7,16^\circ$) e 1,22 nm (d_{001} em $2\theta = 7,22^\circ$) após a adição de BAC e CTAB, respectivamente (Figura 34).

O fato de ter sido observado um aumento da distância interlamelar corrobora com a hipótese de que este maior espaço é capaz de facilitar a adsorção da AFB₁ e, conseqüentemente, evitar os danos promovidos por esta substância nas células da CN.

4.3.6 Resumo

O resumo dos principais resultados obtidos no tópico 4.3 pode ser observado na Figura 35. Estes dados foram recentemente submetidos para publicação na revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: Organophilic treatments of bentonite increase the adsorption of aflatoxin B₁ and protects stem cells against cellular damage*. NONES, J.; NONES, J.; POLI, A.; TRENTIN, A.G.; RIELLA, H.G.; KUHNEN, N.C. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Submetido, 2016 (Anexo E).

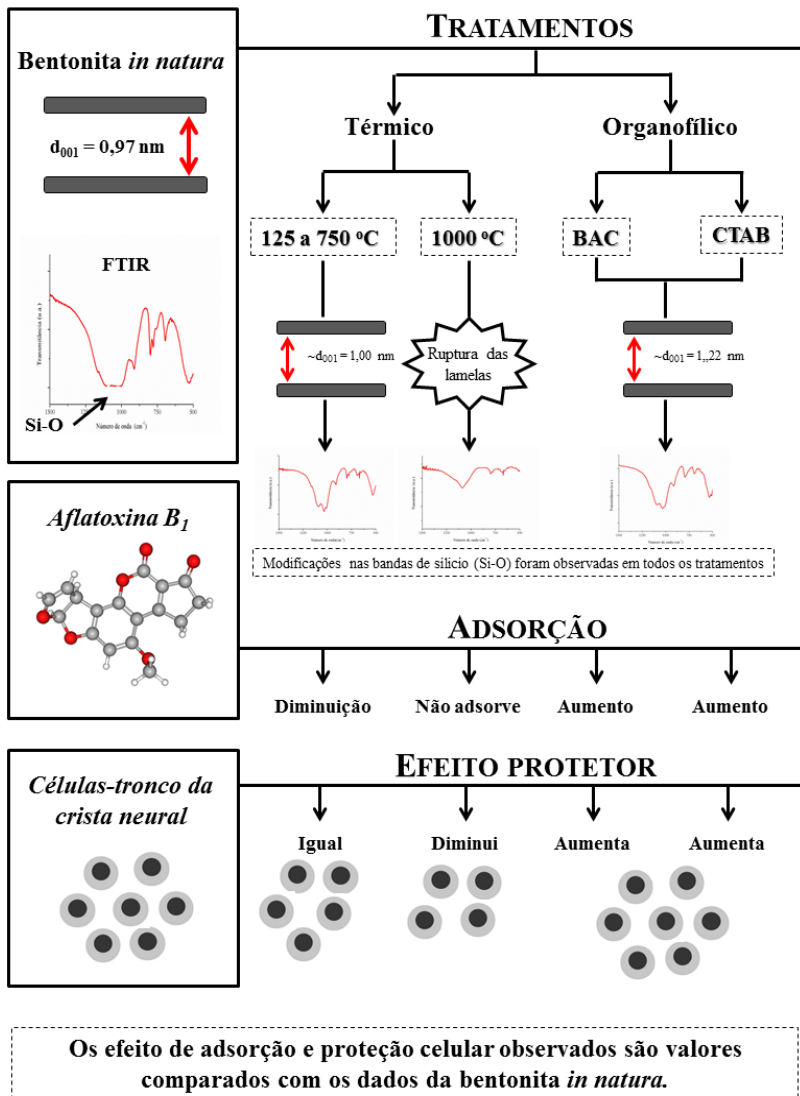
Figura 35 - O tratamento organofílico na bentonita propiciou um aumento na adsorção e proteção celular contra os danos causados pela AFB₁.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.4 RESUMO GERAL DOS RESULTADOS

Figura 36 - Diagrama esquemático contendo os principais resultados obtidos através dos tratamentos (térmicos e organofílicos) realizados na bentonita.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Tabela 13 - Resumo das principais características estruturais e efeitos da bentonita *in natura* e modificadas através da realização de tratamentos térmicos e organofílicos.

Análises	Tratamentos*						
	Térmico (°C)					Organofílico	
	125	250	500	750	1000	BAC	CTAB
Morfologia	≠	≠	≠	≠	≠	=	=
Distância interlamelar	↑	↑	=	=	≠	↑	↑
Composição mineralógica	=	=	≠	≠	≠	=	=
Ligação entre Si-O	≠	≠	≠	≠	≠	≠	≠
Quantidade de água	↓	↓	↓	↓	↓	NA	NA
Área superficial	↓	↓	↓	↓	↓	NA	NA
Tamanho do poro	↑	↑	↑	↑	↑	NA	NA
Tamanho de partícula	↑	↑	↑	↑	↑	NA	NA
Densidade	=	=	=	=	=	NA	NA
Viabilidade (azul de tripan) [#]	=	=	=	=	↓	↑	↑
Viabilidade (MTT) [#]	NA	NA	NA	NA	NA	↑	↑
População celular (DAPI) [#]	=	=	=	=	↓	NA	NA
Morte celular [#]	=	=	=	=	↑	NA	NA
Adsorção de AFB ₁	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑

*Os resultados foram comparados com os dados da bentonita *in natura*; [#] adicionado concomitantemente com a AFB₁; ≠ alterado; = sem alteração; ↑ aumento; ↓ diminuição; NA não analisado. Fonte: Desenvolvido pela autora.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou uma bentonita extraída da região sul do Estado de Santa Catarina e demonstrou, pela primeira vez, que este material é capaz de promover a sobrevivência de células-tronco da CN quando estas são submetidas a um indutor de toxicidade celular (AFB₁). Com o intuito de desenvolver novos materiais capazes de ampliar a capacidade de adsorção deste material (bentonita), tratamentos térmicos (nas temperaturas de 125 a 1000 °C) e organofílicos (com cloreto de benzalcônio (BAC) e brometo de cetrimônio (CTAB) foram realizados, sendo que o processo de organifilização demonstrou ser efetivo para aumentar a capacidade de adsorção da bentonita. Este tipo de tratamento (organifilização), além de atóxico para as células da CN, também foi capaz de evitar os danos celulares provocados pela AFB₁.

Os resultados de caracterização química demonstraram que a bentonita extraída do sul do Estado de Santa Catarina é constituída por elevados percentuais de óxido de silício e alumínio, com quantidades inferiores a 3% de óxido de ferro, potássio, magnésio, manganês, cálcio, sódio, titânio e fósforo. Os valores obtidos estão em concordância com dados já previamente publicados referentes a amostras de bentonita extraídas de outras regiões (ALABARSE et al., 2011; SILVA, 2010). Além disso, de forma similar aos trabalhos de Bertagnolli, Kleinübing e Silva (2011) e Vieira et al. (2010a), foram detectadas, através da análise de DRX, a presença de motmorilonita e quartzo na bentonita *in natura*. Outros minerais, como caulita e muscovita, também foram detectados, os quais são considerados minerais acessórios, comumente encontrados em bentonitas e dependentes da origem geológica (BOYLU et al., 2010; GONG et al., 2016; NOYAN; ÖNAL; SARIKAYA, 2007).

De forma semelhante ao trabalho de Bertagnolli, Kleinübing e Silva (2011), as partículas de bentonita não apresentaram um formato morfológico definido, sendo formadas por plaquetas irregulares. Além disso, demonstraram uma tendência de formar aglomerados, os quais geralmente foram formados por partículas de tamanhos diferentes. Por outro lado, a capacidade de troca catiônica da bentonita (CTC - 4,866 cmol_c/kg) foi inferior aos valores reportados por outros autores (40 - 60 cmol_c/kg) (HASSAN; ABDEL-KHALEK, 1998; TONNESEN et al., 2012), provavelmente devido à presença de quartzo nas amostras (REZENDE; PINTO, 2016; TONNESEN et al., 2012). Apesar dos baixos valores de CTC encontrados, estes valores, segundo

Kannewischer et al. (2006), exercem pouca influência na capacidade de adsorção da AFB₁.

A bentonita *in natura*, na concentração de 0,6 mg/mL, foi capaz de promover a sobrevivência de células da CN quando estas foram submetidas a um indutor de toxicidade previamente conhecido (AFB₁). Além disso, o número de células gliais derivadas da CN aumentou após o tratamento com bentonita concomitantemente associado com AFB₁, embora a proporção de fenótipos de células da CN não tenha sofrido alteração. Esses resultados sugerem que a bentonita afeta a população de células da CN como um todo, em vez de atuar sobre um fenótipo específico. De forma contrária, os resultados obtidos demonstraram que a viabilidade das células da CN diminuíram após o tratamento com altas concentrações de bentonita (maiores de que 0,8 mg/mL), enquanto que baixas concentrações deste material (menores do que 0,6 mg/mL) não apresentaram nenhuma citotoxicidade.

O efeito, além de ser provavelmente dose-dependente (MAISANABA et al., 2013b), pode também variar de acordo com a bentonita e com o tipo celular que está sendo estudado. Corroborando com estes resultados, Elmore (2003) relata que diferentes variedades de argila, incluindo montmorilonita, foram citotóxicas para linhagens de células de macrófagos e apresentaram atividade hemolítica. Da mesma forma, células de neuroblastoma brevemente expostas a 1,0 mg/mL de bentonita perderam a capacidade de manter seus potenciais de ação (BANIN; MEIRI, 1990). Além disso, partículas de bentonita (0,1 mg/mL) podem ser capazes de induzir fortes efeitos neurotóxicos, provocando uma rápida degeneração de cultura de neurônios da medula espinhal de murinos (MURPHY et al., 1993).

Micotoxinas presentes na dieta induzem a apoptose em diversos tecidos e órgãos de mamíferos, incluindo os rins e o fígado (LEI; ZHANG; QI, 2013; LIU et al., 2012; RIBEIRO et al., 2010; TOLLESON et al., 1996). Além disso, podem ocasionar degeneração do sistema nervoso central e periférico (IKEGWUONU, 1983), além de efeitos negativos na sobrevivência e proliferação de células da CN (NONES; NONES; TRENTIN, 2013).

Considerando o potencial tóxico das micotoxinas, várias medidas com o intuito de minimizar sua toxicidade podem ser tomadas. Dentre essas medidas, pode-se citar o uso de bentonitas, as quais, quando presentes em dietas e/ou em fármacos, reduzem a disponibilidade das toxinas (DEVREESE et al., 2013; PASHA et al., 2007; ROSA et al., 2001), além de atuarem como protetores de diferentes células do organismo humano e animal (ABBÈS et al., 2007, 2008; DAKOVIĆ et

al., 2008; DIXON et al., 2008; JAYNES; ZARTMAN, 2011; KANNEWISCHER et al., 2006), fato que propicia a redução da toxicidade e dos efeitos colaterais promovidos por estes contaminantes alimentares.

Os resultados obtidos demonstraram que a bentonita *in natura* extraída da região sul do Estado de Santa Catarina foi capaz de aumentar a sobrevivência de células-tronco da CN quando estas sofreram um processo de indução de morte causada por AFB₁. Esses achados podem, provavelmente, ser atribuídos ao fato da bentonita ser constituída pela motmorilonita, argilomineral capaz de promover a adsorção de moléculas de AFB₁ por meio de sua estrutura lamelar (DENG et al., 2010; KANNEWISCHER et al., 2006; PHILLIPS; LEMKE; GRANT, 2002). A adsorção da AFB₁ entre a distância interlamelar da motmorilonita pode ter reduzido a disponibilidade da AFB₁ no meio de cultivo das células da CN, contribuindo para a redução dos efeitos citotóxicos promovidos por esta micotoxina. Tal fato não apenas foi capaz de reduzir a toxicidade, como também, em consequência, promover o aumento do número total de células da CN, assim como de reduzir o número de células que entraram em processo de apoptose, quando comparado com o grupo controle. Cabe ressaltar, ainda, que a capacidade máxima de adsorção obtida neste trabalho (0,6 mol/kg) está de acordo com critérios previamente estabelecidos por Dixon et al. (2008), o qual considera que um bom adsorvente de aflatoxina possui potencial de adsorção superior a 0,30 mol/kg.

Corroborando com os resultados acima descritos, após saturação da bentonita com AFB₁, uma banda com menor intensidade (em torno de 913-1036 cm⁻¹), relacionada com os grupos funcionais Al-Al-OH e SiO, foi observada (Figura 14 B). Isto pode indicar que AFB₁ participa de um mecanismo de ligação específica com a montmorilonita, possivelmente formando complexos com metais (SARR; CLEMENT; PHILLIPS, 1991; PHILLIPS; SARR; GRANT, 1995). Resultados semelhantes foram relatados por Dixon et al., (2008) e Tenório, Mulder e Dixon (2008). Esses dados sugerem que as moléculas de aflatoxina ocuparam a distância interlamelar da bentonita, provavelmente formando complexos com metais, levando a uma redução da disponibilidade de AFB₁ e, conseqüentemente, diminuindo o dano tóxico causado nas células da CN. Com o intuito de comprovar esta hipótese, maiores estudos precisam ser realizados para que todas as vertentes relacionadas com o mecanismo protetor observado sejam desvendadas.

Experimentos previamente realizados indicaram que a modificação térmica de bentonitas altera sua estrutura e capacidade de adsorção (AL-ASHEH; BANAT; ABU-AITAH, 2003; AYTAS; YURTLU; DONAT, 2009; BOJEMUELLER; NENNEMANN; LAGALY, 2001), provocando um aumento dos sítios de adsorção (AL-ASHEH; BANAT; ABU-AITAH, 2003). Considerando estes aspectos, as amostras da bentonita extraída de Santa Catarina foram submetidas a diferentes temperaturas (125 a 1000 °C) com a finalidade de verificar se tais tratamentos seriam capazes de incrementar o potencial de adsorção desses materiais.

Os resultados obtidos demonstraram que a calcinação (tratamento térmico) não afetou significativamente a morfologia das partículas de bentonita, as quais se apresentaram aglomeradas em pedaços compactos, acompanhadas pelo desenvolvimento de rugosidades (BERTAGNOLLI; KLEINÜBING; SILVA, 2011; HE; MAKOVICKY; OSBAECK, 2000). Além da morfologia, também não foram observadas mudanças expressivas na composição química das bentonitas (O, Si, Al, Fe, K, Mg e Ti) após a realização dos tratamentos.

Já havia sido demonstrado que bentonita submetida a tratamentos térmicos perde água da superfície ou dos espaços interlamelares (HOLTZER; BOBROWSKI; ZYMANKOWSKA-KUMON, 2011; PŘIKRYL; WEISHAUPTOVÁ, 2010; ZUZANA et al., 2012), fato que propicia a redução da intensidade das bandas de água ou de seu completo desaparecimento após o tratamento (BERTAGNOLLI; KLEINÜBING; SILVA, 2011; CÓTICA et al., 2011; HOLTZER; BOBROWSKI; ZYMANKOWSKA-KUMON, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo, cujo aumento da temperatura proporcionou a diminuição da intensidade das bandas de água (3417 cm^{-1} - observadas através da análise de FTIR). Corroborando com os resultados acima obtidos, as análises térmicas (TG) revelaram que, quanto maior a temperatura de calcinação da bentonita, menor é a quantidade de água presente nas amostras.

Considerando que a perda de água observada poderia ocorrer através de dois estágios, os quais estariam relacionados com o processo de desidratação (perda de água superficial) e desidroxilação (perda de água estrutural) das amostras (DAKOVIĆ et al. 2008; VIEIRA et al. 2010a; ZUZANA et al., 2012), análises de DTG foram realizadas. Os resultados obtidos através desta técnica permitiram identificar que estes estágios endotérmicos (desidratação e desidroxilação) ocorreram nas temperaturas de 60-88 °C e 480-488 °C, respectivamente. Da mesma forma, o segundo pico endotérmico mostrado na análise DSC (em torno

de 400 a 750 °C) também comprova a existência de desidroxilação das amostras de bentonita (*in natura* e tratadas a 125 e 250 °C) (ZIVICA; PALOU, 2015).

A composição de argilominerais nas amostras de bentonita também pode ser afetada por altas temperaturas (BELKHIRI et al. 2012; TĂMĂȘAN et al., 2010; VIEIRA et al., 2010 a, b). Essas transformações dependem da origem mineralógica e estrutural das bentonitas (YILMAZ; KALPAKLI; PISKIN, 2013), podendo divergir de uma argila para outra (VIMONSES et al., 2009). Considerando estes aspectos, foi realizada uma avaliação com o intuito de verificar se a calcinação seria capaz de transformar as fases mineralógicas das amostras de bentonita.

Os resultados demonstraram que os picos da montmorilonita não foram afetados após aquecimento a uma temperatura de 500 °C. No entanto, picos da caulinita desapareceram na mesma temperatura, o que sugere a transformação da caulinita em metacaulinita devido ao efeito da perda de grupos - OH estruturais (RASHAD, 2013). O difratograma da bentonita aquecida a 1000 °C apresentou apenas um pico de quartzo. Resultados semelhantes foram relatados por Belkhiri et al. (2012) e Tămășan et al. (2010), cujo tratamento térmico na bentonita revelou uma fase vítrea (estrutura amorfa) a partir de 800 °C, com uma presença residual de quartzo.

Já havia sido demonstrado que temperaturas superiores a 150 °C são capazes de provocar o colapso da distância interlamelar das esmectitas, gerando uma distância interlamelar menor do que 1,0 nm (DENG et al., 2010). Considerando que as moléculas de AFB₁ podem ocupar a maior parte desta distância, podendo a mesma ser afetada pelo tratamento térmico (CÓTICA et al., 2011; LI; DONG; LEE, 2004), este espaço entre as lamelas foi determinado. Os resultados obtidos demonstraram que a distância interlamelar foi de cerca de 1,0 nm nos tratamentos utilizando temperaturas de 125 a 750 °C, ocorrendo total ruptura a 1000 °C. A diminuição da distância interlamelar da bentonita e a desSORÇÃO de água presente na distância interlamelar gerou, como consequência, a diminuição da sua área superficial (BOJEMUELLER; NENNEMANN; LAGALY, 2001; NOYAN; ÖNAL; SARIKAYA, 2006; SOURI et al., 2015).

Trabalhos anteriores haviam observado que a área superficial de argilominerais diminui drasticamente pela calcinação a partir de 650 a 930 °C, fato ocasionado devido à aglomeração das partículas (HE; MAKOVICKY; OSBAECK, 1995). Corroborando com estes resultados previamente publicados, os resultados obtidos demonstraram que a área

superficial da bentonita *in natura* ($30,10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) diminui após o tratamento térmico acima de $500 \text{ }^\circ\text{C}$ (atingindo $2,16 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$).

De forma semelhante, a porosidade dos argilominerais está diretamente relacionada ao seu conteúdo de água (HELLER-KALLAI, 2013; TOOR et al., 2015), o que justifica o fato dos resultados terem demonstrado que os tratamentos térmicos geraram uma diminuição no volume dos poros das bentonitas, provavelmente devido à contração ou colapso dos poros (YILMAZ; KALPAKLI; PISKIN, 2013).

A calcinação alterou a porosidade média da argila, ampliando os microporos através da liberação de água, fato responsável por gerar materiais mesoporosos (VIEIRA et al., 2010a). Da mesma forma, a distribuição de tamanho de partículas da bentonita foi afetada pelo aumento da temperatura de calcinação. Tais aumentos na distribuição de tamanho de partículas estão associados com a aglomeração das partículas (HE; MAKOVICKY; OSBAECK, 2000).

Considerando que o tratamento térmico foi capaz de alterar as características estruturais da bentonita, foi realizada a avaliação da capacidade de adsorção de AFB_1 por estas bentonitas calcinadas, as quais foram determinadas através de ensaios de espectroscopia de UV/vísivel e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados demonstraram que a bentonita *in natura* reduziu a toxicidade da AFB_1 (diminuição em cerca de 30% da disponibilidade). No entanto, as temperaturas superiores ou iguais a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ causaram a ruptura da estrutura e, conseqüentemente, diminuição da adsorção (sendo nula para bentonita tratada a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ – análises de HPLC). Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Stagnaro et al. (2012b), os quais demonstraram que a adsorção de Cd pela bentonita *in natura* foi ligeiramente reduzida por meio de tratamentos térmicos até $450 \text{ }^\circ\text{C}$, diminuindo fortemente quando a temperatura aplicada para o sólido foi superior. Da mesma forma, Aytas, Yurtlu e Donat (2009) demonstraram que, ao calcinar a bentonita a $400 \text{ }^\circ\text{C}$, a capacidade de adsorção de urânio tornou-se mais elevada, porém, esta adsorção diminuiu quando a temperatura de tratamento da bentonita foi superior a $400 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ainda com relação à adsorção, outro fator que deve ser considerado é a concentração de adsorvente em contato com a toxina (AFB_1). Os resultados demonstraram que a adsorção de AFB_1 diminuiu com a diminuição da quantidade de adsorvente em suspensão, estando estes fatores correlacionados. Em suma, corroborando com dados previamente publicados, a quantidade de adsorvente foi proporcional ao número de sítios ativos para a molécula de AFB_1 adsorvida (DAKOVIĆ et al., 2008).

Como previamente identificado neste trabalho, a bentonita foi capaz de prevenir a morte celular induzida pela AFB₁ (NONES et al., 2015b), efeito provavelmente relacionado com a capacidade de adsorção desta argila. Resultados semelhantes de proteção com a bentonita tratada termicamente (125 a 750 °C) foram obtidos, comprovando que a bentonita calcinada também é capaz de proteger, de forma semelhante a bentonita *in natura*, as células da CN dos danos causados pela AFB₁. Diferentemente, o tratamento a 1000 °C também foi capaz de proteger as células da CN da morte. No entanto, este tratamento foi inferior quando comparado com as outras bentonitas. Esta redução provavelmente está relacionada ao fato de ter ocorrido a ruptura da montmorilonita (a 1000 °C) o que, por sua vez, gerou uma redução na capacidade de adsorção de AFB₁ e, conseqüentemente, do efeito protetor celular.

Pesquisas já haviam demonstrado que bentonitas modificadas organicamente, através da adição de sais quaternários de amônio, tais como cloreto de benzalcônio (BAC) e brometo de cetrimônio (CTAB), são capazes de aumentar a capacidade de adsorção de corantes têxteis (KIRANŞAN et al., 2014; ZOHRA et al., 2008), compostos aromáticos (CHEN et al., 2008) e combustíveis derivados do petróleo (BERTAGNOLLI; SILVA, 2012). Este aumento na capacidade de adsorção depende de inúmeros fatores, os quais primeiramente estão relacionados com a ligação dos surfactantes com as argilas, as quais, por sua vez, dependem da: 1) natureza dos grupos estruturais na superfície da argila; 2) estrutura molecular do surfactante; 3) temperatura e 4) concentração (ROSEN, 2004). Além disso, é importante considerar se a superfície da argila contém sítios altamente carregados ou grupos essencialmente apolares, bem como, quais átomos desses sítios ou grupos são consistentes (PAVAN et al., 1999). Por outro lado, também é importante considerar se o surfactante é iônico, hidrofóbico e se a sua cadeia é longa ou curta (PAVAN et al., 1999).

Com o intuito de aprimorar a capacidade de adsorção da bentonita *in natura*, foi realizado o tratamento deste material com dois surfactantes catiônicos (BAC e CTAB), bem como avaliada a influência da temperatura e concentração sobre este processo de incorporação e de aprimoramento da adsorção deste material.

Os resultados apresentados mostraram que as bentonitas organofílicas tratadas a baixas temperaturas demonstraram maior capacidade de adsorção de AFB₁ (BAC302 e CTAB302), quando comparadas com altas temperaturas (BAC602 e CTAB602). Este fato provavelmente ocorreu devido a uma melhor incorporação do

surfactante a baixas temperaturas (30 °C). Outras pesquisas já haviam relatado efeito semelhante, ou seja, quando ocorre um aumento na temperatura também ocorre uma diminuição da eficiência de adsorção de surfactantes iônicos pela interface do adsorvente (GÜRSES et al., 2010; PARIA; KHILAR, 2004; ROSEN, 2004). De acordo com Gürses et al. (2010), um aumento da temperatura conduz a uma extensão da camada e aumenta o movimento térmico de cada partícula da argila, o que provoca uma diminuição na difusão dos íons dos sais da fase líquida para a superfície da argila. Em outras palavras, um aumento na temperatura provoca um aumento da entropia do sistema, o que resulta em uma diminuição da organização dos agregados (surfactantes) na superfície do adsorvente (PAVAN et al., 1999).

Outro fator que influencia a organofilização de argilas é a concentração de surfactantes. Menores concentrações de surfactantes apresentam uma maior tendência de serem adsorvidos à superfície ou interfaces da argila (PARIA; KHILAR, 2004; ROSEN et al., 2004), enquanto que altas concentrações de surfactante podem saturar a superfície deste material. Após a saturação, agregados moleculares de surfactantes são formados e, em muitos casos, as moléculas tendem a formar esferas (micelas) no volume da solução (KHENIFI et al., 2009; GÜRSES et al., 2010). O soluto (bentonita) se incorpora a estes micro reservatórios (micelas), o que leva a uma redução na eficiência de remoção de compostos orgânicos (KHENIFI et al., 2009). Estas pesquisas corroboram com os resultados deste estudo, onde as melhores adsorções foram obtidas com baixas concentrações (BAC302 e CTAB302) quando comparados com concentrações elevadas (BAC306 e CTAB306).

Já havia sido descrito que o processo de organofilização pode afetar a polaridade das partículas de bentonita, as quais passam de hidrofílicas para hidrofóbicas (BASKARALINGAM et al., 2006; XI et al., 2004; XI et al., 2005a; KO et al., 2007; SARKAR et al., 2013). Estas características também foram identificadas nas bentonitas organofílicas desenvolvidas, podendo ser comprovadas pelas vibrações de estiramento dos grupos C-H que foram encontradas.

Corroborando com os dados acima descritos, estudos já relataram que, quando a organo-bentonita é obtida, vibrações de estiramento simétricas e assimétricas de grupos C-H apareceram na região a 2850 e 2920 cm^{-1} , respectivamente, estando os mesmos relacionados com a polaridade das amostras (ABDALLAH; YILMAZER, 2011; ONG et al., 2014; RAHARDJO et al., 2011; ZOHRA et al., 2008).

Alterações nos grupos funcionais também foram identificadas na frequência de alongamento de Si-O ($1020-1090\text{ cm}^{-1}$), o que pode ser atribuído a um aumento da interação entre o surfactante e a superfície da argila (KARACA; GÜRSES; KORUCU, 2013; XI et al., 2005b). Estas modificações, ocorridas nas argilas organofílicas, podem contribuir para uma ampliação da capacidade de adsorção de compostos orgânicos (BASKARALINGAM et al., 2006; CARVALHO et al., 2012; JAYNES; ZARTMAN, 2011; KOSWOJO et al., 2010), fato que corrobora com os dados deste estudo, onde a organofilização foi capaz de aumentar a adsorção e o efeito protetor celular contra os efeitos tóxicos da AFB₁.

Corroborando com os achados acima descritos, as frequências de alongamento da ligação Si-O foram alteradas, o que pode facilitar a ligação da AFB₁ com a bentonita. De acordo com os dados previamente descritos (NONES et al., 2015b), a aflatoxina pode formar complexos com a bentonita através de ligações específicas com silício (Si). Os dados obtidos apoiam a ideia de que as moléculas de aflatoxina ocupam a distância interlamelar das bentonitas organofílicas, provavelmente formando complexos com metais, o que leva a uma redução da AFB₁ disponível e, conseqüentemente, uma redução total dos danos celulares causados por esta micotoxina nas células-tronco da CN.

Ainda corroborando com esta hipótese, os tratamentos organofílicos promoveram um aumento na distância interlamelar das bentonitas submetidas aos tratamentos, fato que pode ter sido provocado em decorrência da intercalação dos surfactantes orgânicos entre as camadas das argilas (PAIVA; MORALES; DÍAZ, 2008a; MOTA; RODRIGUES; MACHADO, 2014; XI et al., 2004; XI et al., 2005a).

Em síntese, os novos materiais desenvolvidos (bentonitas organofílicas) a partir de uma bentonita extraída de Santa Catarina, apresentaram elevado potencial de adsorção para a micotoxina AFB₁ e, portanto, podem ser considerados alternativas viáveis para o combate deste contaminante alimentar. Além disso, as bentonitas obtidas através da organofilização e tratamentos térmicos não apresentaram nenhuma toxicidade celular, sendo também capazes de incrementar a viabilidade e evitar a morte causada pela AFB₁. Estes dados, além de inovadores, podem ser considerados opções promissoras para a prevenção e combate dos efeitos agudos e/ou crônicos provocados por micotoxinas e demais substâncias tóxicas presentes nos diferentes tipos de alimentos.

6 CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível caracterizar pela primeira vez uma bentonita proveniente de sul de Santa Catarina e promover, por meio de tratamentos térmicos e organofílicos, o aprimoramento de algumas características deste material para minimizar os efeitos nocivos causados pela AFB₁. Dentre as principais aquisições e conclusões deste trabalho, pode-se destacar:

- a bentonita proveniente do Sul de Santa Catarina apresentou elevados percentuais de óxidos de silício e alumínio, além da presença de montmorilonita, quartzo, muscovita e caulinita. Também apresentou contornos de partículas bem definidos e elevada capacidade de adsorção de AFB₁ (0,6 mol/kg);
- concentrações de bentonita menores do que 0,6 mg/mL não foram tóxicas em ensaios celulares *in vitro*, sendo extremamente relevantes para reversão parcial da morte de células-tronco da CN previamente expostas a agente indutor de toxicidade(AFB₁). Além disso, a concentração de bentonita de 0,6 mg/mL não foi capaz de afetar o processo de diferenciação destas células.
- os tratamentos térmicos (acima de 500 °C) causaram a ruptura das fases mineralógicas das bentonitas (montmorilonita, caulinita e muscovita), diminuição da distância interlamelar e da quantidade de água e alterações na ligação entre silício e oxigênio (Si-O). Além disso, os tratamentos causaram redução da área superficial, aumento do diâmetro dos poros e tamanho das partículas, assim como decréscimo da capacidade de adsorção de AFB₁;
- o tratamento térmico (125 a 750 °C) não foi capaz de aumentar o efeito protetor em células-tronco da CN contra a morte causada pela AFB₁ quando comparado com a bentonita *in natura*, havendo redução deste efeito protetor quando a bentonita foi submetida a 1000 °C;
- os tratamentos organofílicos das amostras de bentonita proporcionaram aumento da capacidade de adsorção da AFB₁, sendo mais eficazes nas bentonitas previamente tratadas a baixas temperaturas

e concentrações de BAC e CTAB (concentração de 2% e temperatura de 30 °C). Embora estes tratamentos não tenham afetado a morfologia das partículas, alteraram as ligações entre silício e oxigênio e proporcionaram um aumento das distâncias interlamelares destas bentonitas;

- os novos materiais desenvolvidos (bentonitas organofílicas: BAC302 e CTAB302), além de não apresentarem toxicidade celular nas concentrações utilizadas, foram também capazes de reverter a morte das células da CN previamente expostas à AFB₁;

- as bentonitas extraídas de Santa Catarina possuem grande potencial de adsorção da AFB₁, sendo que os tratamentos organofílicos foram eficazes no aprimoramento deste processo de adsorção. Embora ainda sejam necessários mais estudos relacionados aos efeitos e interações destes materiais com o corpo humano e/ou animal, os materiais desenvolvidos possuem grande potencial de aplicação pela indústria alimentar e farmacêutica visando a prevenção e o controle da toxicidade da AFB₁ e/ou de outros agentes tóxicos.

REFERÊNCIAS

ABBÈS, S. et al. Efficacy of Tunisian montmorillonite for in vitro aflatoxin binding and in vivo amelioration of physiological alterations. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 1-2, p. 151-157, 2008.

ABBÈS, S. et al. Inactivation of cadmium induced immunotoxicological alterations in rats by Tunisian montmorillonite clay. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 750-760, 2007.

ABDALLAH, W.; YILMAZER, U. Novel thermally stable organo-montmorillonites from phosphonium and imidazolium surfactants. **Thermochimica Acta**, v. 525, p. 129-140, 2011.

ABDEL-WAHHAB, M.A. et al. Efficacy of organo-modified nano montmorillonite to protect against the cumulative health risk of aflatoxin b1 and ochratoxin a in rats. **Soft Nanoscience Letters**, v. 5, p. 21-35, 2015.

ABDOU, M.I.; AL-SABAGH, A.M.; DARDIR, M.M. Evaluation of Egyptian bentonite and nano-bentonite as drilling mud. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 22, n. 1, p. 53-59, 2013.

ABUD, A.P.R. et al. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 992-998, 2015.

AHLBERG, S.H.; JOUTSJOKI, V.; KORHONEN, H.J. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 87-102, 2015.

ALABARSE, F.G. et al. In-situ FTIR analyses of bentonite under high-pressure. **Applied Clay Science**, v. 51, n. 1-2, p. 202-208, 2011.

AL-ASHEH, S.; BANAT, F.; ABU-AITAH, L. Adsorption of phenol using different types of activated bentonites. **Separation and Purification Technology**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2003.

ALLO, W.A.; MURRAY, H. H. Mineralogy, chemistry and potential applications of a white bentonite in San Juan province, Argentina. **Applied Clay Science**, v. 25, n. 3-4, p. 237-243, 2004.

ALTANER, S.P.; YLAGAN, R.F. Comparison of structural models of mixed-layer illite/smectite and reaction mechanisms of smectite illitization. **Clays and Clay Minerals**, v. 45, n. 4, p. 517-533, 1997.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html >. Acesso em: 24 fev. 2016.

ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 66, p. 1-10, 2014.

AYTAS, S.; YURTLU, M.; DONAT, R. Adsorption characteristic of U(VI) ion onto thermally activated bentonite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 667-674, 2009.

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

BANIN, E., MEIRI, H. Toxic effects of alumino-silicates on nerve cells. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 171-178, 1990.

BARKAI-GOLAN, R. Aspergillus mycotoxins. In: Rivka Barkai-Golan and Nachman Paster (Coord.). **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**, Elsevier, Amsterdam, 2008, p. 115-151.

BARRET, E.P.; JOIYNER, L.G.; HALENDA, P.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I computations from nitrogen isotherms. **Journal of American Chemistry Society**, v. 73, p. 373, 1953.

BARRIENTOS-VELÁZQUEZ, A. L. et al. The effects of pH, pepsin, exchange cation, and vitamins on aflatoxin adsorption on smectite in simulated gastric fluids. **Applied Clay Science**, v. 120, p. 17-23, 2016.

BASKARALINGAM, P. et al. Adsorption of acid dye onto organobentonite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 128, p. 138-144, 2006.

BELKHIRI, S. et al. Textural and structural effects of heat treatment and γ -irradiation on Cs-exchanged NaX zeolite, bentonite and their mixtures. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 161, p. 115-122, 2012.

BERG, D.; YOUDIM, M.B.; RIEDERER, P. Redox imbalance. **Cell Tissue Research**, v. 318, p. 201, 2004.

BERTAGNOLLI, C.; SILVA, M. G. C. Characterization of Brazilian Bentonite Organoclays as sorbents of petroleum-derived fuels. **Materials Research**, v. 15, p. 253-259, 2012.

BERTAGNOLLI, C.; KLEINÜBING, S. J.; SILVA, G. M. C. Preparation and characterization of a Brazilian bentonite clay for removal of copper in porous beds. **Applied Clay Science**, v. 53, n. 1, p. 73-79. 2011.

BOCA SANTA, R. A. A. **Desenvolvimento de geopolímeros a partir de cinzas pesadas oriundas da queima do carvão mineral e metacaulim sintetizado a partir de resíduo da indústria de papel**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Programa de pós graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 2012.

BOJEMUELLER, E.; NENNEMANN, A.; LAGALY, G. Enhanced pesticide adsorption by thermally modified bentonites. **Applied Clay Science**, v. 18, n. 5-6, p. 277-284, 2001.

BORRELLI, R.A.; THIVENT, O.; AHN, J. Parametric studies on confinement of radionuclides in the excavated damaged zone due to bentonite type and temperature change. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 65, p. 32-41, 2013.

BOWMAN, P.D. et al. Toxicity of aluminum silicates used in hemostatic dressings toward human umbilical veins endothelial cells, hela cells, and raw 267.4 mouse macrophages. **Journal of Trauma**, v. 71, n. 3, p. 727-732, 2011.

BOYLU, F. et al. The separation efficiency of Na-bentonite by hydrocyclone and characterization of hydrocyclone products. **International Journal of Mineral Processing**, v. 94, n. 3-4, p. 196-202, 2010.

BOZ, N.; DEGIRMENBASI, N.; KALYON, D.M. Transesterification of canola oil to biodiesel using calcium bentonite functionalized with K compounds. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 138-139, p. 236-242, 2013.

BREZA, J. et al. Synthesis of nanocomposites based on nanotubes and silicates. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 7, p. 2540-2543, 2012.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309, 1938.

BULUT, G. et al. Production of desiccants from Turkish bentonites. **Applied Clay Science**, v. 46, n. 2, p. 141-147, 2009.

CALLONI, G.W.; LE DOUARIN, N.M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 8947-8952, 2009.

CARRETERO, M.I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health a review. **Applied Clay Science**, v. 21, n. 3-4, p. 155-163, 2002.

CARRETERO, M.I.; GOMES, C.S.F.; TATEO, F. Clays, Drugs, and Human Health. In: BERGAYA, F.; LAGALY, G. (Coord.). **Developments in Clay Science**. Elsevier, Amsterdam, 2013, p. 711-764.

CARVALHO, M.N. et al. Evaluation of BTEX and phenol removal from aqueous solution by multi-solute adsorption onto smectite organoclay. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 95-101, 2012.

CAS, Chemical Abstracts Service. Disponível em: <http://cas.chemnet.com>. Acesso em: 17 fev. 2016.

CHEN, B. et al. Enhanced sorption of naphthalene and nitroaromatic compounds to bentonite by potassium and cetyltrimethylammonium cations. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 116-123, 2008.

CHEN, S.Y.; SULIK, K.K. Iron-mediated free radical injury in ethanol exposed mouse nc cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 1, p. 134-140, 2000.

CHOY, J.H. et al. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1-3, p. 122-132, 2007.

CHRISTIDIS, G.; HUFF, D.H. Geologic aspects and genesis of bentonites. **Elements**, v. 5, p. 93-98, 2009.

COPPOCK, R.W.; CHRISTIAN, R.G. Aflatoxins. In: GUPTA, R. C. (Coord.). **Veterinary Toxicology**, Elsevier, Amsterdam, 2007, p. 939-950.

CORCUERA, L.A. et al. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin A in rat plasma, liver and kidney. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 26, p. 2733-2740, 2011.

CORRALES, T. et al. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of poly (ϵ - caprolactone) / montmorillonite nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 12, p. 4247-4256, 2012.

COSTA, C.; COMABELLA, M.; MONTALBAN, X. Tratamiento de enfermedades neurológicas basado en células madre. **Medicina Clínica**, v. 139, n. 5, p. 208-214, 2012.

CÓTICA, L.F. et al. Cobalt-modified Brazilian bentonites: Preparation, characterisation, and thermal stability. **Applied Clay Science**, v. 51, n. 1-2, p. 187-191, 2011.

DAKOVIĆ, A. et al. Aflatoxin b1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 20-25, 2008.

DARVISHI, Z.; MORSALI, A. Synthesis and characterization of nano-bentonite by solvothermal method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 377, n. 1-3, p. 15-19, 2011.

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

DEVREESE, M. et al. An in vitro model using the IPEC-J2 cell line for efficacy and drug interaction testing of mycotoxin detoxifying agents. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 157-163, 2013.

DIAO, E. et al. Ozonolysis efficiency and safety evaluation of aflatoxin B1 in peanuts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 519-525, 2013.

DIAZ, D.E. et al. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin m1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, n. 2, p. 233-241, 2004.

DIXON, J.B. et al. Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: an introductory plan. **Applied Clay Science**, v. 40, n. 1-4, p. 201-208, 2008.

DNPM. Departamento Nacional de Produção Mineral. Bentonita. Sumário Mineral. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br> Acesso em: 17 fev. 2016.

DUPIN, E.; SOMMER, L. Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. **Developmental Biology**, v. 366, n. 1, p. 83-95. 2012.

EL MOUZDAHIR, Y. et al. Equilibrium modeling for the adsorption of methylene blue from aqueous solutions on activated clay minerals. **Desalination**, v. 250, p. 335-338, 2010.

ELMORE, A.R. Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgit, bentonite, fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate,

montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. **International Journal of Toxicology**, v. 22, p. 37-102, 2003.

EL-NEKEETYA, A. A. et al. Quercetin inhibits the cytotoxicity and oxidative stress in liver of rats fed aflatoxin-contaminated diet. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 319-329, 2014.

EMAMI-RAZAVI, S.H. et al. Effect of bentonite on skin wound healing: experimental study in the rat model. **Acta Medica Iranica**, v. 44, n. 4, p. 235-240, 2006.

EMMERICH, K. Spontaneous rehydroxylation of a dehydroxylated *cis*-vacant montmorillonite. **Clays and Clay Minerals**, v. 48, n. 3, p. 405-408, 2000.

EWUOLA, E.O. et al. Testicular biochemicals, sperm reserves and daily sperm production of West African dwarf bucks fed varied levels of dietary aflatoxin. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 3-4, p. 182-187, 2014.

FENG, S.S. et al. Poly (lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of docetaxel. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3297-3306, 2009.

FERNANDES, R.R. G. **Micotoxinas: a situação atual da legislação e metodologias analíticas**. Universidade de Aveiro. 2007, 256f. Dissertação (mestrado). Curso de pós graduação em química e qualidade dos alimentos, Universidade do Aveiro, 2007.

FERREIRA, H. et al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**, v. 2 n.1 p. 113-127, 2006.

FETAIH, H. A. et al. Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats. **Pathology - Research and Practice**, v. 210, n. 12 p. 1079-89 2014.

FLENTKE, G.R. et al. Calcium-mediated repression of β -catenin and its transcriptional signaling mediates neural crest cell death in an avian model of fetal alcohol syndrome. **Birth Defects Research. Part A, Clinical Molecular Teratology**, v. 7, n. 7, p. 591-602, 2011.

FOWLER, J.; LI, W.; BAILEY, C. Effects of a calcium bentonite clay in diets containing aflatoxin when measuring liver residues of aflatoxin B₁ in starter broiler chicks. **Toxins (Basel)**, v. 7, p. 3455-3464, 2015.

FU, Y.; CHUNG, D.D.L. Coagulation of oil in water using sawdust, bentonite and calcium hydroxide to form floating sheets. **Applied Clay Science**, v. 53, n. 4, p. 634-641, 2011.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433-1438, 2000.

GARGETT, C.E. Stem cells in gynaecology. **Australian and Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 44, n. 380-386, 2004.

GARIC, A. et al. CaMKII activation is a novel effector of alcohol's neurotoxicity in neural crest stem/progenitor cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 4, p. 646-657, 2011.

GARIC-STANKOVIC, A. et al. Structural constraints for alcohol-stimulated Ca²⁺ release in neural crest, and dual agonist/antagonist properties of n-octanol. **Alcoholism, Clinical Experimental Research**, v. 30, n. 3, p. 552-559, 2006.

GHADERI, M. et al. A comparison of DNA damage induced by aflatoxin B₁ in hepatocyte-like cells, their progenitor mesenchymal stem cells and CD34⁺ cells isolated from umbilical cord blood. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 719, n. 1-2, p. 14-20, 2011.

GILBERT, S.F. **Developmental biology**. 7^a Edição, Suíça, 2003. 838 p.

GIORDANO, B.N.E., NONES, J.; SCUSSEL, V.M. Susceptibility of the in shell Brazil nut mycoflora and aflatoxin cantamination to ozone gas treatment during storage. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 1-10, 2012.

GOMES, C.S.F.; SILVA, J.B.P. Minerals and clay minerals in medical geology. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1-3, p. 4-21, 2007.

GONG, Z. et al. A simple method for physical purification of bentonite. **Applied Clay Science**, v. 119, p. 294-300, 2016.

GROOPMAN, J.D.; WOGAN, G.N. Aflatoxin: a global public health problem. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P.M.; TOLDRÁ, F. (Coord.). **Encyclopedia of Food and Health**, Elsevier, Amsterdam, 2016, p. 68-72.

GÜRSES, A. et al. Monomer and micellar adsorptions of CTAB onto the clay/water interface. **Desalination**, v. 264, p. 165-172, 2010.

HANULÁKOVÁ, D. et al. Determination of pore water composition during long term interaction of bentonite substrates with water media: comparative study. **Applied Clay Science**, v. 80-81, p. 69-75, 2013.

HASSAN, M.S.; ABDEL-KHALEK, N.A. Beneficiation and applications of an Egyptian bentonite. **Applied Clay Science**, v. 13, n. 2, p. 99-115, 1998.

HE, C.; MAKOVICKY, E.; OSBAECK, B. Thermal stability and pozzolanic activity of calcined illite. **Applied Clay Science**, v. 9, p. 337-354, 1995.

HE, C.; MAKOVICKY, E.; OSBAECK, B. Thermal stability and pozzolanic activity of raw and calcined mixed-layer mica/smectite. **Applied Clay Science**, v. 17, n. 3-4, p. 141-161, 2000.

HELLER-KALLAI, L. Thermally Modified Clay Minerals. In: BERGAYA, F.; LAGALY, G. (Coord.). **Developments in Clay Science**. Elsevier, Amsterdam, pp. 411-433, 2013.

HINTS, R. et al. Multiphase Silurian bentonites in the Baltic Palaeobasin. **Sedimentary Geology**, v. 209, p. 69-79, 2008.

HOLTZER, M.; BOBROWSKI, A.; ZYMANKOWSKA-KUMON, S. Temperature influence on structural changes of foundry bentonites. **Journal of Molecular Structure**, v. 1004, n. 1-3, p. 102-108, 2011.

HUANG, Y. et al. Genetic damage and lipid peroxidation in workers occupationally exposed to organic bentonite particles. **Mutation Research**, v. 751, n. 1, p. 40-44, 2013.

HUUSKONEN, P. et al. The effects of aflatoxin B₁ on transporters and steroid metabolising enzymes in JEG-3 cells. **Toxicology Letters**, v. 218, n. 3, p. 200-206, 2013.

IKEGWUONU, F. I. The neurotoxicity of aflatoxin B₁ in the rat. **Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 247-259, 1983.

ILIESCU, R.I. et al. Hybrid materials based on montmorillonite and citostatic drugs: Preparation and characterization. **Applied Clay Science**, v. 52, n. 1-2, p. 62-68, 2011.

IQBAL, S.Z.; ASI, M.R.; ARIÑO, A. Aflatoxins. In: MALOY, S.; HUGHES, K. (Coord.). **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. Elsevier, Amsterdam, 2013, p. 43-47.

JAYNES, W.F.; ZARTMAN, R.E. Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. **Toxins**, v. 3, n. 6, p. 551-565, 2011.

JHA, A. et al. Protective Effect of Black Tea Infusion on Aflatoxin-Induced Hepatotoxicity in Mice. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 3 n. 1, p. 29-36, 2012.

JOVIĆ-JOVIČIĆ, N. et al. Organo-inorganic bentonite for simultaneous adsorption of acid orange 10 and lead ions. **Applied Clay Science**, v. 47 p. 452-456, 2010.

JU, H. et al. Crosstalk-eliminated quantitative determination of aflatoxin B₁-induced hepatocellular cancer stem cells based on concurrent monitoring of CD133, CD44, and aldehyde dehydrogenase. **Toxicology Letters**, v. 243, p. 31-39, 2016.

JUAN-GARCÍA, A. et al. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 40-59, 2013.

KANBUR, M. et al. The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 1960-1964, 2011.

KANCHANA, K. et al. Pharmacological effect of Kalpaamruthaa on renal and cardiac damage induced by ingestion of aflatoxin B₁ studied in wistar rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 233-240, 2013.

KANG, K.S.; TROSKO, J.E. Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. S1, p. S269-S289, 2011.

KANNEWISCHER, I. et al. Smectite clays as adsorbents of aflatoxin b1: initial steps. **Clay Science**, v. 12, p. 199-204, 2006.

KARACA, S.; GÜRSES, A.; KORUCU, M. E. Investigation of the orientation of CTA⁺ ions in the interlayer of CTAB pillared montmorillonite. **Journal of Chemistry**, v. 274838, p. 1-10, 2013.

KARAKAYA, M.Ç.; KARAKAYA, N.; BAKIR, S. Some properties and potential applications of the Na- and Ca-bentonites of ordu (N.E. Turkey). **Applied Clay Science**, v. 54, p. 159-165, 2011.

KATOULI, M.S. et al. Effect of different levels of kaolin, bentonite and zeolite on broilers performance. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 58-62, 2010.

KEVADIYA, B.D. et al. Evaluation of clay/poly (l-lactide) microcomposites as anticancer drug, 6-mercaptopurine reservoir through in vitro cytotoxicity, oxidative stress markers and in vivo pharmacokinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 400-407, 2013.

KEVADIYA, B.D. et al. Montmorillonite/poly-(ε-caprolactone) composites as versatile layered material: reservoirs for anticancer drug and controlled release property. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 265-272, 2012.

KEVADIYA, B.D.; JOSHI, G.V.; BAJAJ, H.C. Layered bionanocomposites as carrier for procainamide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 280-286, 2010.

KHENIFI, A. et al. Removal of 2,4-DCP from wastewater by CTAB/bentonite using one-step and two-step methods: A comparative study. **Chemical Engineering Journal**, v. 146, p. 45-354, 2009.

KIRANŞAN, M. et al. Preparation of cetyltrimethylammonium bromide modified montmorillonite nanomaterial for adsorption of a textile dye. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, p. 2565-2577, 2014.

KO, C. H. et al. *p*-Nitrophenol, phenol and aniline sorption by organo-clays. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 275-282, 2007.

KOSWOJO, R. et al. Acid Green 25 removal from wastewater by organo-bentonite from Pacitan. **Applied Clay Science**, v. 48, p. 81-86, 2010.

LE DOUARIN, N.M.; BRITO, J.M.; CREUZET, S. Role of the neural crest in face and brain development. **Brain Research Reviews**, v. 55, n. 2, p. 237-247, 2007.

LE DOUARIN, N.M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge. 1999. 445 p.

LEI, M.; ZHANG, N.; QI, D. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin b1 and other selected mycotoxins on the cell line porcine kidney. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 7-8, p. 1149-1157, 2013.

LI, C.H. et al. Hepatic oval cell lines generate hepatocellular carcinoma following transfection with hbx gene and treatment with aflatoxin b1 in vivo. **Cancer Letters**, v. 311, n. 1, p. 1-10, 2011.

LI, L.; DONG, J.; LEE, R. Preparation of α -alumina-supported mesoporous bentonite membranes for reverse osmosis desalination of aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 540-546, 2004.

LINDEMANN, M.D. et al. Appraisal of the value of selected clays and minerals in diets with and without aflatoxin- contaminated maize fed to young pigs. **Journal of Animal & Feed Sciences**, v. 6, n. 4, p. 507-519, 1997.

LIU, Q. et al. Apoptosis and cytotoxicity of oligo(styrene-co-acrylonitrile) modified montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 51, n. 3, p. 214-219, 2011.

LIU, R. et al. In vitro toxicity of aflatoxin b1 and its photodegradation products in HepG2 cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 276-81, 2012.

LIU, Y.; WU, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 118 p. 818-24, 2010.

LÓPEZ-GALINDO, A.; VISERAS, C. Pharmaceutical and cosmetic applications of clays. In: WYPYCH, F.; SATYANARAYANA K.G. (Coord.). **Clay Surfaces: Fundamentals and Applications**, Elsevier, Amsterdam, 2004, p. 267-289.

MA, J. et al. Mechanism of adsorption of anionic dye from aqueous solutions onto organobentonite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1758-1765, 2011.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E. et al. Antigenotoxic Studies of Different Substances to Reduce the DNA Damage Induced by Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 738-757, 2010.

MAGNOLI, A. P. et al. Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. **Applied Clay Science**, v. 40, n. 1-4, p. 63-71, 2008.

MAISANABA, S. et al. In vitro toxicological assessment of clays for their use in food packaging a applications. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 266-275, 2013b.

MAISANABA, S. et al. Toxic effects of a modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2, **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 714-725, 2013a.

MALLMANN, C.A.; DIKIN, P. **Mycotoxins and mycotoxicoses in swine**. Special nutrients: the Mycotoxins specialist. Santa Maria, 2011. 92p.

- MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.
- MASSINGA, P. H. et al. Alkyl ammonium intercalation of Mozambican bentonite. **Applied Clay Science**, v. 49, p. 142-148, 2010.
- MENEGAZZO, R. Qualidade de Rações para Zootécnicos. In: SCUSSEL, V.M. ROCHA, M. (Coord.). **Atualidades em Micotoxinas e Armazenamento de Grãos II**. ABMAG, Florianópolis, 2008. p.557-561.
- MILLER, L.W.; PERIN, E.C. Introduction and Overview of Stem Cells. In: PERIN, E.C.; MILLER, L.W. TAYLOR, D.A. WILLERSON, J. T. (Coord.). **Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease**. Elsevier, Amsterdam, 2016, p.3-11.
- MITCHELL, N.J. et al. Potential economic losses to the USA corn industry from aflatoxin contamination. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 15, p. 1-11. 2016.
- MIYOSHI, Y. et al. Mg-rich clay mineral formation associated with marine shallow-water hydrothermal activity in an arc volcanic caldera setting. **Chemical Geology**, v. 355, p. 28-44, 2013.
- MOTA, M. F.; RODRIGUES, M. G. F.; MACHADO, F. Oil–water separation process with organoclays: A comparative analysis. **Applied Clay Science**, v. 99, p. 237-245, 2014.
- MOTOHASHI, T.; KUNISADA, T. Extended multipotency of neural crest cells and neuralcrest-derived cells. In: TRAINOR, P.A. (Coord.). **Current Topics in Developmental Biology**, Elsevier, Amsterdam, 2015, p. 69-95.
- MOTTA, T.P.; DUARTE, K.M.R. ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. **Pubvet**, v. 4, n. 42, p.1-10, 2010.
- MULDER, I. et al. Smectite clay sequestration of aflatoxin b: particle size and morphology. **Clay and Clay Minerals**, v. 56, p. 558-570, 2008.
- MURPHY, E.J. et al. Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, v. 57, n. 2, p. 483-490, 1993.

MURRAY, H. H. Bentonite Applications. **Developments in Clay Science**, v. 2, p. 111-130, 2006.

MURRAY, H.H. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. **Applied Clay Science**, v. 17, n. 5-6, p. 207-221, 2000.

NAGY, N.M.; KÓNYA, J. **Interfacial Chemistry of Rocks and Soils**. New York: CRC Press Taylor & Francis, 2009. 230 p.

NIEN, Y.T.; LIAO, Y.H.; LIAO, P.C. Antibacterial activity of poloxamer-modified montmorillonite clay against *E. coli*. **Materials Letters**, v. 65, n. 19-20, p. 3092-3094, 2011.

NONES, J. et al. Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin B1. **Applied Clay Science**, v. 104, p. 119-127, 2015b.

NONES, J. et al. Effects of bentonite on different cell types: A brief review. **Applied Clay Science**, v. 105-106, p. 225-230, 2015a.

NONES, J. et al. Thermal treatment of bentonite reduces aflatoxin b1 adsorption and affects stem cell death. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems**, v. 55, p. 530-537, 2015c.

NONES, J. **Papel dos flavonóides na sobrevivência celular: avaliação dos seus efeitos sobre células progenitoras do sistema nervoso central e periférico**. 2011. 230 f. Tese (Doutor em Ciências Morfológicas, Programa de pós graduação em Ciências Morfológicas, UFRJ, Rio de Janeiro, 2011).

NONES, J. et al. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. **Cell and Tissue Research**, v. 50, n. 2, p. 305-315, 2012.

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**, v. 13, p. 7-13, 2014.

- NONES, J.; NONES, J.; TRENTIN, A. The flavonoid hesperidin protects neural crest cells from death caused by aflatoxin B₁. **Cell Biology International (Print)**, v. 37, p. 181-186, 2013.
- NOYAN, H.; ÖNAL, M.; SARIKAYA, Y. The effect of heating on the surface area, porosity and surface acidity of a bentonite. **Clay and Clay Minerals**, v. 54, p. 375-381, 2006.
- NOYAN, H.; ÖNAL, M.; SARIKAYA, Y. The effect of sulphuric acid activation on the crystallinity, surface area, porosity, surface acidity, and bleaching power of a bentonite. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 156-163, 2007.
- ONG, L.K. et al. Investigation on the montmorillonite adsorption of biocidal compounds incorporating thermodynamical-based multicomponent adsorption isotherm. **Chemical Engineering Journal**, v. 241, p. 9-18, 2014.
- PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v. 54, p. 213-226, 2008b.
- PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ F. R. V. Organoclays: Properties, preparation and applications. **Applied Clay Science**, v. 42, p. 8-24, 2008a.
- PARIA, S.; KHILAR, K.C. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid–water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 110, p. 75-95, 2004.
- PASHA, T.N. et al. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1-2, p. 103-110, 2007.
- PAVAN, P. C. et al. Adsorption of sodium dodecylsulfate on a hydrotalcite-like compound. Effect of temperature, pH and ionic strength. **Colloids and Surfaces**, v. A154, p. 399-410, 1999.
- PEREIRA, L.V. The importance of the use of stem cells for public health. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PHILLIPS, T.D.; LEMKE, S.L.; GRANT, P.G. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 504, p. 157-171, 2002.

PHILLIPS, T.D.; SARR, A.B.; GRANT, P.G. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. **Natural Toxins**, v. 3, p. 204-213, 1995.

PITT, J.I. Mycotoxins: Aflatoxins. In: MOTARJEMI, Y. (Coord.). **Encyclopedia of Food Safety**, Elsevier, Amsterdam, 2014, p. 289-294.

POPRYADUKHIN, P.V. et al. Composite materials based on chitosan and montmorillonite: prospects for use as a matrix for cultivation of stem and regenerative cells. **Cell and Tissue Biology**, v. 6, n. 1, p. 82-88, 2012.

PŘIKRYL, R.; WEISHAUPTOVÁ, Z. Hierarchical porosity of bentonite-based buffer and its modification due to increased temperature and hydration. **Applied Clay Science**, v. 47, n. 1-2, p.163-170, 2010.

RAHARDJO, A. K. et al. Modified Ponorogo bentonite for the removal of ampicillin from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 1001-1008, 2011.

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

RASHAD, A.M. Metakaolin as cementitious material: history, scours, production and composition. **Construction and Building Materials**, v. 41, p. 303-318, 2013.

REZENDE, M.J.C.; PINTO, A.C. Esterification of fatty acids using acid-activated Brazilian smectite natural clay as a catalyst. **Renewable Energy**, v. 92, p. 171-177, 2016.

RIBEIRO, D.H. et al. Effects of aflatoxin b(1) and fumonisin b(1) on the viability and induction of apoptosis in rat primary hepatocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1944-1955, 2010.

- RODRIGUES, L.A.S. et al. The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 642-651, 2013.
- ROSA, C.A.R. et al. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poultry Science**, v. 80, n. 2, p. 139-144, 2001.
- ROSEN, M. J. **Surfactants and interfacial phenomena**, third edition, John Wiley & Sons, New York, 2004. 455p.
- SABIR, B.B.; WILD, S.; BAI, J. Metakaolin and calcined clays as pozzolans for concrete: a review. **Cement and Concrete Composites**, v. 23, p. 441-454, 2001.
- SAKAKI-YUMOTO, M.; KATSUNO, Y.; DERYNCK, R. TGF- β family signaling in stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 2, p. 2280-2296, 2013.
- SAMPATAKAKIS, S. et al. Respiratory disease related mortality and morbidity on an island of greece exposed to perlite and bentonite mining dust. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 4982-4995, 2013.
- SÁNCHEZ, R. M. T. et al. Benzimidazole adsorption on the external and interlayer surfaces of raw and treated montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 53, n. 3, p. 366-373, 2011.
- SANTANA, L.N.L. et al. Mullite formation from bentonites containing kaolinite: Effect of composition and synthesis parameters. **Applied Clay Science**, v. 87, p. 28-33, 2014.
- SARIKAYA, Y. et al. The effect of thermal treatment on some of the physicochemical properties of a bentonite. **Clays and clay minerals**, v. 48, n. 5, p. 557-562, 2000.
- SARKAR, B. et al. Structural characterisation of Arquad[®] 2HT-75 organobentonites: Surface charge characteristics and environmental application. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p. 155-161, 2011.

- SARKAR, B. et al. Toxicity of organoclays to microbial processes and earthworm survival in soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 793-800, 2013.
- SARR, A.B.; CLEMENT, B.A.; PHILLIPS, T.D. Molecular mechanism of aflatoxin B₁ chemisorption by hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Toxicology**, v. 7, p. 97, 1991.
- SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.
- SERRANO-NIÑO, J.C. et al. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an *in vitro* digestive model. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 202-207, 2013.
- SHARMA, A.K. et al. Genotoxicity of unmodified and organo-modified montmorillonite. **Mutation Research**, v. 700, n. 1-2, p. 18-25, 2010.
- SHIM, W.B. et al. Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B₁ in corn samples. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 30-35, 2014.
- SIDHOUM, D.A. et al. Removal of paraquat from water by an Algerian bentonite. **Applied Clay Science**, v. 83-84, p. 441-448, 2013.
- SILVA, L. A. **Desenvolvimento do processo de obtenção da bentonita organofílica de moçambique: síntese e caracterização. 2010. 65f.** Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Programa de pós-graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis.
- SLAMOVA, R. et al. Clay minerals in animal nutrition. **Applied Clay Science**, v. 51, n. 4, p. 395-398, 2011.
- SOUFIANI, G.R. N. et al. Assessment of aflatoxin B₁ adsorption efficacy of natural and processed bentonites: In vitro and in vivo assays. **Applied Clay Science**, v. 123, p. 129-133, 2016.

SOURI, A. et al. An investigation on pozzolanic activity of Iranian kaolins obtained by thermal treatment. **Applied Clay Science**, v. 103, p. 34-39, 2015.

STACHOWIAK, M. O. et al. Fast and sensitive aflatoxin B₁ and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. **Food Control**, v. 63, p. 239-245, 2016.

STAGNARO, S. Y. M. et al. Structural modification of a lamellar solid by thermal treatment. Effect on the Cd and Pb adsorptions from aqueous solution. **Procedia Materials Science**, v. 1, p. 180-184, 2012b.

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**, v. 15, n. 4, p. 1-5, 2012a.

STROSNIDER, H. et al. Workgroup report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1898-1903, 2006.

SUN, B.; RANGANATHAN, B.; FENG, S.S. Multifunctional poly (D,L-lactide-co-glycolide) / montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. **Biomaterials**, v. 29, n. 4, p. 475-486, 2008.

TĂMĂȘAN, M. et al. Textural properties of the medical Algo clay as influenced by calcination. **Applied Clay Science**, v. 50, n. 3, p. 418-422, 2010.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TANAKA, T. et al. Developmental exposure of aflatoxin B₁ reversibly affects hippocampal neurogenesis targeting late-stage neural progenitor cells through suppression of cholinergic signaling in rats. **Toxicology**, v. 336, p. 59-69, 2015.

TENÓRIO, A.M.G.; MULDER, I.; DIXON, J.B. Smectite clay adsorption of aflatoxin vs. octahedral composition as indicated by FTIR. **Clays Clay Minerals**, v. 56 n. 5, p. 571-578, 2008.

TIRMENSTEIN, M.A.; MANGIPUDY, R.; S. C. BRISTOL-MYERS: Aflatoxin. In: WEXLER, P. (Coord.). **Encyclopedia of Toxicology**, Elsevier, New Brunswick, 2014, p. 104-106.

TOLLESON, W.H. et al. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin b1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 2, p. 239-249, 1996.

TONNESEN, D.A. et al. Caracterização mineralógica e beneficiamento das bentonitas da região de Cubati e Pedra Lavrada-PB. **Holos**, v.1 p. 2-14, 2012.

TOOR, M. et al. Activating natural bentonite as a cost-effective adsorbent for removal of Congo-red in wastewater. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 653-661, 2015.

TREBAK, F. et al. Impact of aflatoxin B1 on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior. **Neurotoxicology**, v. 49, p. 165-173, 2015.

TROSKO, J.E.; CHANG, C.C. Factors to consider in the use of stem cells for pharmaceutical drug development and for chemical safety assessment. **Toxicology**, v. 270, p. 18-34, 2010.

VALENTI, D.M. et al. Effect of topical clay application on the synthesis of collagen in skin: an experimental study. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, n. 2, p. 164-168, 2012.

VIEIRA, M.G. et al. Removal of nickel on bofe bentonite calcined clay in porous bed. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1-3, p. 109-118, 2010a.

VIEIRA, M.G.A. et al. Sorption kinetics and equilibrium for the removal of nickel ions from aqueous phase on calcined Bofe bentonite clay. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1-3, p. 362-371, 2010b.

VIMONSES, V. et al. Enhancing removal efficiency of anionic dye by combination and calcination of clay materials and calcium hydroxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1-3, p. 941-947, 2009.

VISERAS, C. et al. Current challenges in clay minerals for drug delivery. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 3, p. 291-295, 2010.

WANG, S. et al. Characterization of GMZ bentonite and its application in the adsorption of Pb(II) from aqueous solutions. **Applied Clay Science**, v. 43, p.164-171, 2009.

WANG, T. et al. Inhibition effects of Chinese cabbage powder on aflatoxin B1-induced liver cancer. **Food Chemistry**, v. 186, p. 13-19, 2015.

WENTZEL, P.; ERIKSSON, U.J., Altered gene expression in neural crest cells exposed to ethanol in vitro. **Brain Research**, v. 1305, p. 50-60, 2009.

WHO (World Health Organization), Bentonite, kaolin, and selected clay minerals. World health organization, international programme on chemical safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland, v. 231, 2005.

WILD, C.P.; GONG, Y.Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p.71-82, 2010.

WILLIAMS, L.B.; HAYDE, S.E.; FERRELL JR, R.E. Bentonite, Band-aids, and borborygmi. **Elements**, v. 5, n. 2, p. 99-104, 2009.

XI, Y. et al. Infrared spectroscopy of organoclays synthesized with the surfactant octadecyltrimethylammonium bromide. **Spectrochimica Acta-Part A**, v. 61, p. 515-525, 2005b.

XI, Y. et al. Modification of Wyoming montmorillonite surfaces using a cationic surfactant. **Langmuir**, v. 21, p. 8675-8680, 2005a.

XI, Y. et al. Structure of organoclays - an X-ray diffraction and thermogravimetric analysis study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 277, p. 116-120, 2004.

YILMAZ, M. S.; KALPAKLI, Y.; PISKIN, S. Thermal behavior and dehydroxylation kinetics of naturally occurring sepiolite and bentonite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 3, p. 1191-1199, 2013.

YU, W.H. et al. Clean production of CTAB-montmorillonite: formation mechanism and swelling behavior in xylene. **Applied Clay Science**, v. 97-98, p. 222-234, 2014.

ZHANG, C. et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. **Science of the Total Environment**, v. 518-519, p. 352-362, 2015.

ZHANG, M. et al. Studying the cytotoxicity and oxidative stress induced by two kinds of bentonite particles on human B lymphoblast cells in vitro. **Chemico Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 390-396, 2010.

ZHANG, M. et al. Studying the genotoxic effects induced by two kinds of bentonite particles on human b lymphoblast cells in vitro. **Mutation Research**, v. 720, n. 1-2, p. 62-66, 2011.

ZHANSHENG, W. et al. Characterization, acid activation and bleaching performance of bentonite from Xinjiang. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, p. 253-258, 2006.

ZHIRONG, L.; UDDIN, M.A.; ZHANXUE, S. FT-IR and XRD analysis of natural Na-bentonite and Cu(II)-loaded Na-bentonite. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 79, p. 1013-1016, 2011.

ZHU, R. et al. Structural and sorptive characteristics of the cetyltrimethylammonium and polyacrylamide modified bentonite. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 220-225, 2010.

ZIVICA, V.; PALOU, M.T. Physico-chemical characterization of thermally treated bentonite. **Composites Part B: Engineering**, v. 68, p. 436-445, 2015.

ZOHRA, B. et al. Adsorption of direct red 2 on bentonite modified by cetyltrimethylammonium bromide. **Chemical Engineering Journal**, v. 136, p. 295-305, 2008.

ZUZANA, O. et al. Effect of thermal treatment on the bentonite properties. **Arhivza Tehnicke Nauke**, v. 7, p. 49-56, 2012.

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Clay Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clay

Review article

Effects of bentonite on different cell types: A brief review

Janaína Nones^{a,*}, Humberto Gracher Riella^a, Andrea Gonçalves Trentin^b, Jader Nones^b^a Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil^b Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2014

Received in revised form 30 December 2014

Accepted 31 December 2014

Available online 15 January 2015

Keywords:

Bentonite

Cell effects

Pharmacological applications

ABSTRACT

Bentonites, clays considered to be good adsorbents, have numerous applications because of their structural characteristics, their abundance in nature, low cost and availability. Research suggests that bentonites may be excellent cell protectors and that they can reduce some of the side effects of drugs such as those used for cancer treatment. Once inside the human or animal body, bentonite particles are efficient at promoting growth (acting as adsorbents of toxins), improving health (reducing the harmful effects of drugs) and promoting well being (active principles in cosmetics and pharmaceuticals). The effects of bentonite vary depending on the type of cell they reach. For this reason, it is necessary to determine the adequate dosage and exposure time as well as evaluate their toxicity in vitro and in vivo. In certain concentrations bentonites may cause undesired effects, such as apoptotic cell death, oxidative stress and damage of the cell membrane. On the other hand, the same concentrations can also contribute to an increase in viability and the survival of other cell types. In this paper, the main chemical characteristics of bentonites are reviewed and some pharmacological applications are described. It was finally reviewed how bentonites interact with different types of cells and new perspectives are briefly discussed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bentonite is formed by highly colloidal and plastic clays composed mainly of montmorillonite (Mt), a clay mineral of the smectite group (Who, 2005; Williams et al., 2009; Bergaya and Lagaly, 2013). The main factors that interfere in the formation of bentonite are climate and topography vegetation (Abdou et al., 2013).

These compound deposits are formed by any of the following three mechanisms: (i) diagenetic alteration of volcanic glass in an aqueous environment; (ii) hydrothermal alteration of volcanic glass and (iii) formation of smectite-rich sediments in salt lakes and salted environments (Christidis and Huff, 2009).

The diagenetic evolution of the clay minerals in bentonite can be affected by a complex interplay of different factors including temperature, fluid chemistry, reaction time, fluid/rock ratio and probably the composition of the precursor materials (Altaner and Yagan, 1997). Similarly, the formation of hydrothermal alteration minerals reflects several fluid–mineral interactions, such as temperature, chemistry of the fluid and the host–rock as well as the water–rock ratio (Miyoshi et al., 2013). On the other hand, the variation in the mineralogy of salt lake sediments is an indicator of past salinity conditions and hydrological changes (Sinha and Raymahashay, 2004).

Approximately 90% of the world's bentonite production is concentrated in 22 countries: Armenia, Australia, Azerbaijan, Belarus, Bulgaria, Czech Republic, Germany, Greece, Italy, Japan, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Mexico, Moldova, Russia, South Africa, Tajikistan, Turkey, Turkmenistan, Ukraine, USA and Uzbekistan (Who, 2005).

Bentonite is widely used as a thickener and extender for paints, as an additive in ceramics. This material also plays an important role in the development of health products (Viseras et al., 2010) such as cosmetics, foods and pharmaceuticals (Allo and Murray, 2004). It has been extensively used in the treatment of pain, for wound healing, colitis, diarrhea, hemorrhoids, stomach ulcers, intestinal problems, acne and anemia, and it has been shown to increase the collagen fibers in skin and a variety of other tissues (López-Galindo and Viseras, 2004; Dong and Feng, 2005; Kevadiya et al., 2012; Valenti et al., 2012).

Each of these industrial applications requires specific properties and characteristics of the material (Allo and Murray, 2004). These facts provide the constant human exposure to these clays; however, the direct effect on different cell types has not yet been elucidated.

In the present review, discussion about the chemical characteristics of bentonite and focus on its interactions with different cell types both in vitro and in vivo was approached. The first part starts by reviewing the chemical composition and interactions of bentonite. In the second part, it was briefly discussed the emerging view of the importance of this material in industrial approaches, with an emphasis on cosmetic, pharmacological and food products. Finally, it was shared in vitro and in vivo evidences of the role of bentonite in cell biology.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 4738/ 9908 2680; fax: +55 48 3721 9672.
E-mail address: jnones@cidasc.sc.gov.br (J. Nones).

2. Development

2.1. Bentonites

Mt, a swelling clay mineral of the smectite group, is the primary component of bentonite. Depending on the nature of their genesis, bentonites contain a variety of accessory minerals (Noyan et al., 2007), mainly quartz, feldspar, calcite, illite and mica (Boylu et al., 2010; Sampatakakis et al., 2013). Mt is composed of two layers of silica tetrahedra with a central layer of alumina octahedron between them (Nagy and Kónya, 2009; Borrelli et al., 2013). Mt has both interlayer and ionizable hydroxyl sites on its external surface (Nien et al., 2011).

The characteristics of bentonites are dependent on the amount of smectite and on the exchangeable cations present in the interlayer space (Hanuláková et al., 2013). High content of SiO₂ and Al₂O₃, with smaller contents of other oxides, can be observed in the bentonite sample by chemical analysis. Scanning electron microscopy of bentonite shows individual particles that are irregular platelets and tend to form thick and large agglomerates (Fig. 1A, B).

Bentonites are good adsorbents owing to their structural characteristics. The main characteristics of these materials are a high cation exchange capacity, swelling capacity and low hydraulic conductivity (Allo and Murray, 2004; Hanuláková et al., 2013; Sidhoum et al., 2013).

There are few types of bentonites which are named based on the dominant exchangeable cation in the Mt; i.e., sodium-type or calcium-type (Borrelli et al., 2013). Calcium bentonite is the most prevalent of the smectite and is found in many geographical locations in the world. Sodium bentonite is relatively rare compared to calcium bentonite, and it swells more in water than calcium bentonite (Murray, 2006; Fu and Chung, 2011). Cation exchange (sodium in, calcium out) increases the distance between the layers structures of bentonite, hence allowing for the entrance of water (Barbanti et al., 1997).

Chemical treatment of clays can modify their structure, texture and/or other properties (Elkhalifah et al., 2013). Indeed, bentonites were usually classified into native bentonite, active bentonite (alkaline, acidic treatment) and organic bentonite (organic treatment) (Huang et al., 2013).

Alkaline activation is generally performed by treatment with sodium carbonate (soda). The activation with 2–4% of soda is traditionally used to process lower quality bentonites in the industry (Karagüzel et al., 2010).

Acid activation of bentonite with HCl or H₂SO₄ results in a change of its composition, surface area and porosity as well as in an enhancement of its absorptive properties (Wallis et al., 2007; Karimi and Salem, 2011; Komadel and Madejová, 2013). Furthermore, acid treatment removes the calcium ions from the surfaces and edges of the layers, which increases the overall negative charge (Murray, 2000). González-Pradas et al. (1991) studied the evolution of surface properties, after acid

treatment. They found that the surface area of bentonite was dependent on the acid concentration reaching the maximum value (292 m²/g) when bentonite was activated with 1.0 M H₂SO₄ and heated at 100 °C.

Organobentonites are produced by modifying bentonite with quaternary ammonium cations via a cation exchange process (Fu and Chung, 2011). During this procedure, the hydrated cations (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺), which neutralize the excess negative charge evolving due to isomorphous substitution in the silicon tetrahedra and/or aluminium octahedra, are replaced by the quaternary ammonium cations in the interlayer space (Sarkar et al., 2011). The inorganic cations are progressively replaced by the organic cations. Thus, the surface of bentonite may considerably change its highly hydrophilic properties for increasingly organophilic (hydrophobic) ones (Ma et al., 2011).

2.2. Pharmaceutical applications of bentonites

Bentonites are commonly used in the pharmaceutical industry as excipients, active substances or dispersion agents that fulfill technological functions (López-Galindo and Viseras, 2004; Murray, 2006; Rodrigues et al., 2013). New excipients with very specific targets are added to most new pharmaceuticals. Such targets vary to include decreasing or increasing dissolution rate, delaying drug release, targeting drug release (biopharmaceutical targets), preventing or reducing side effects (pharmacological targets), masking taste or increasing stability (technological targets) (Carretero, 2002; Viseras et al., 2010; Rodrigues et al., 2013).

Mt has attracted a great deal of attention due to its ability to release drugs in a controlled manner, its mucoadhesiveness and potent detoxification effect, which eventually all lead to high drug efficacy (Feng et al., 2009; Kevadiya et al., 2010).

Moreover, inclusion of Mt mediates gastrointestinal disturbance, one of the most common side effects of cancer chemotherapy (Sun et al., 2008; Viseras et al., 2010; Iliescu et al., 2011; Kevadiya et al., 2012; Rodrigues et al., 2013). It has been shown that Mt can significantly enhance the cellular uptake of the nanoparticles in two human colon derived cell lines, i.e., Caco-2 and HT-29 cells and may, thus, have great potential for oral delivery of paclitaxel and other anticancer drugs (Dong and Feng, 2005). Lin et al. (2002) indicated that 5-fluorouracil (5-FU) could be successfully inserted into the interlayer spacing of Mt as a feasible composite for the treatment of colorectal cancer. Dong and Feng (2005) developed a novel bioadhesive drug delivery system, poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/Mt) nanoparticles, for oral delivery of paclitaxel.

Clay minerals are also used as active principles in cosmetics such as facemasks due to their high absorbency level of substances such as greases and toxins (Carretero, 2002). Therefore, they are recommended for inflammatory processes such as boils, acne and ulcers, as

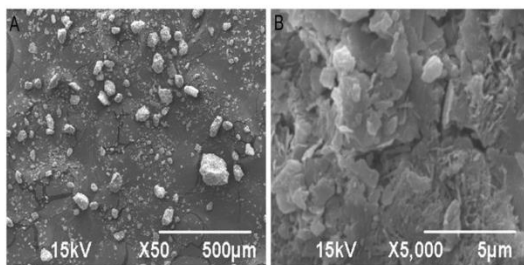


Fig. 1. Morphological characteristics of bentonite. Scanning electron microscopy a bentonite from the South of Brazil [A–B]. Scale bar = 5–500 μm.

antiperspirants and to give the skin opacity, remove shine and cover blemishes (Carretero, 2002; Choy et al., 2007).

Furthermore, clay used in creams, powders or emulsions, promote an increase in the number of collagen fibers, suggesting that the protective mechanism of bentonite is likely to be a combination of allergen absorption and skin barrier function improvement (Emami-Razavi et al., 2006).

Clay packs significantly reduce tissue damage associated with swelling, when applied externally in severe trauma situations (Emami-Razavi et al., 2006). The rapid beneficial effects of clay on the collagen network, while not affecting the skin histoarchitecture, suggest that clay may be a good therapeutic option for facial rejuvenation (Valenti et al., 2012).

Cosmetic preparations, clays act as a physical barrier against UV radiation, considerably increasing the protection factor of the compound (Carretero, 2002; López-Galindo and Viseras, 2004). Clays can also be used as dispersing agents in paste masks, eyeliners, foundations and nail lacquers (Who, 2005; Murray, 2006).

As thickeners, they are ideal constituents of shampoos and toothpastes. As suspending and dispersing aids, they are especially used in powdered pigments. They can also be used as thickeners for continuous oil phase in skin creams.

In animal nutrition, clay minerals are used for their adsorption/absorption properties (Slamova et al., 2011). Mt for example, is a potent detoxifier for the intestines since it can absorb dietary, bacterial and metabolic toxins as well as abnormally increased hydrogen ions observed in acidosis (Sun et al., 2008).

When added to animal feeds, bentonite can increase their nutritional benefit and suppresses the impact of mycotoxins in the diets of farm animals (Abbès et al., 2008; Magnoli et al., 2008; Bulut et al., 2009; Deng et al., 2010; Davies, 2013; Harvey and Lagaly, 2013). Lindemann et al. (1997) found that the average daily gain of weaning pigs was reduced by ~28% when they were fed a diet containing 500 µg/kg aflatoxin. Sodium bentonite (0.5%) amendment to this diet resulted in total growth recovery.

The inclusion of 2% bentonite in broiler feed improves weight gain, feed efficiency and feed intake (Murray, 2000; Katouli et al., 2010). Walz et al. (1998) similarly showed that the growth performance of lambs was improved when feed included a 1% dietary supplement of sodium bentonite.

2.3. Main evidences of the role of bentonites on cellular cultures

Compounds prepared with clay minerals are attracting great attention in the field of biology because of the synergies found between its biopharmaceutical and technological features. The therapeutic advantages of these technologically advanced drugs make this field of research a high-priority development area (Aguzzi et al., 2007; Viseras et al., 2010).

In fact, as described above, clays are believed to be promising in the development of a wide range of pharmaceutical and technological applications (Rodríguez et al., 2013). For this reason, in this paper, the effects of clay minerals on different cell types and on the main mechanisms of action behind them was approached, with special emphasis on cellular protection and toxicity.

Bentonites have been shown to protect cells from several insults (Abbès et al., 2008). Kevadiya et al. (2012), for example, showed that clay minerals reduce genotoxic effects and facilitate drug delivery. The study evaluated intercalation of tamoxifen (oral chemotherapy) in the interlayer space of Na⁺Mt and the genotoxic effects of tamoxifen–Mt (37 µg) in human lymphocyte cell culture. Moderate reduction in DNA damage was found when pristine tamoxifen was intercalated with Mt.

The viability of human neuroblastoma cells in culture was decreased after exposure to 6-mercaptopurine (anti cancer drug), an effect prevented by administration of the drug added with bentonite (Kevadiya et al., 2013). Brazilian bentonite reverts the process of cell

death caused by aflatoxin B₁ in neural crest stem cells (Nones et al., 2015). Bentonite at low concentration (0.6 mg/mL) did not affect the neural crest stem cell viability, possibly due to a dose dependent effect (Fig. 2). Similarly, Abbès et al. (2008) reported that the addition of Mt reduced aflatoxin B₁ related mortality in a colon-cancer cell line.

In addition to this, compounds based on chitosan and Na⁺Mt were not cytotoxic to mesenchymal stem cells of adipose tissue (Popryadukhin et al., 2012). Indeed, Maisanaba et al. (2014) reported no cytotoxic effects of this clay mineral (at 0–125 µg/mL) on Caco-2 cells (a human colon-cancer cell line). When Caco-2 cells were exposed to 10 and 20 µg/mL organically modified Mt, the reactive oxygen species content was not altered (Maisanaba et al., 2014). In a similar study, lower concentrations of clay mineral (1, 5 or 10 µg/mL) did not increase reactive oxygen species production in human hepatoma cells (Lordan et al., 2011).

A lower level of apoptosis was observed in human fibroblasts and embryonic kidney cells after incubation with high Mt content (1 g/L) (Liu et al., 2011). Likewise, no significant apoptosis was observed in murine fibroblasts after treatment with copolymer based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone) /Mt (Corrales et al., 2012).

Furthermore, Mt did not induce DNA strand-breaks in a human colon-cancer cell line in culture after 24 hours (Sharma et al., 2010). Similarly, organically modified Mt at concentrations of 10, 20 or 40 µg/mL did not induce any DNA damage in human colon carcinoma cells (Maisanaba et al., 2014).

In vitro studies have revealed that 12 and 6% Mt cross-linked by 5 and 0.5% biocomposites with glutaraldehyde seem to be the two most efficient and effective biodegradable scaffolds in human osteosarcoma proliferation, migration, expansion, adhesion, penetration, spreading and differentiation (Haroun et al., 2009). Furthermore, the composites, included nanocomposites, prepared by dispersion of Mt can be considered as promising candidate for drug delivery formulations (Salcedo et al., 2012) and wound healing (Sandri et al., 2014).

Although clays usually have positive effects such as cell death protection, in vitro studies on a variety of mammalian cell types have indicated a high degree of cytotoxicity (Who, 2005; Bowman et al., 2011) promoting oxidative stress and cell membrane damage (Geh et al., 2006; Lu et al., 2009; Zhang et al., 2010).

Genotoxicity induced by bentonites can be explained by their quartz content (less than 1% to more than 20%) and activating process (e.g. alkaline, acidic and organic activations) (Huang et al., 2013).

Furthermore, both the rate and degree of cell lysis are dose dependent (Who, 2005). For example, neural crest stem cell viability decreases after treatment with high concentrations of bentonite (more than 0.8 mg/mL) (Nones et al., 2015).

In concentrations lower than 1.0 mg/mL with Mt particles smaller than 5 µm in diameter bentonite has caused membrane damage and promoted cell lysis in several cell types (Who, 2005). The cytotoxic effect of bentonite particles has been examined in vitro on human lung fibroblasts associated with membrane lysis (Geh et al., 2006). In addition, different concentrations of bentonite induce strong neurotoxic effects, promoting rapid degeneration of murine spinal cord neurons in culture (Murphy et al., 1993). Indeed, Elmore (2003) reported that a variety of clays minerals, including Mt, are cytotoxic to several macrophage cell lines and have hemolytic activity.

Previous studies have demonstrated the severe toxic effect (cell lysis) of clay minerals such as Mt on human endothelial cells and macrophages, but these compounds have been shown to have little or no effect on neuroblastoma or oligodendroglial cells (Murphy et al., 1993; Bowman et al., 2011).

Regarding cell toxicity, further research is needed to determine adequate dosage and to evaluate toxicity in vivo (Maisanaba et al., 2014). Appropriate concentration levels for therapeutic applications should be achieved without reaching high toxicity levels or dropping below the minimum levels of effectiveness (Depan et al., 2009).

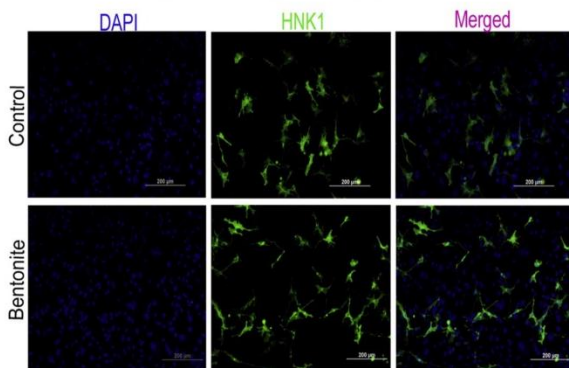


Fig. 2. Effects of bentonite on neural crest cells. A DAPI and HNK1 immunocytochemistry in neural crest cultures in control conditions (DMSO) or exposed to 0.6 mg/mL of bentonite. Scale bar = 200 µm.

The main effects observed in cells are generally linked to cellular concentrations of bentonite particles. Indeed, Zhang et al. (2011) have shown that native bentonite particles and active bentonite particles can induce significant DNA and chromosome damage in human B lymphoblast cells *in vitro*.

The physicochemical characteristics of each clay mineral and the time of exposure can also influence cell toxicity. For example, morphological alterations were observed when a human colon-cancer cell line was exposed to 20 µg/mL organically modified Mt for 24 and 48 h, with mitochondria exhibiting matrix and inner membrane degradation as well as dilated dictyosomes (Maisanaba et al., 2014).

These studies show that although bentonite particles can provide great benefits when well employed, there is cause for concern regarding the possible damage that they can cause to cells. Thus, since the composition of clay may vary depending on the region of extraction and *in vitro* and *in vivo* laboratory testing are important to ensure the quality of products that contain bentonites.

3. Concluding remarks

Clay minerals are generally considered nontoxic to humans and animals and have been widely used in cosmetics and as excipients in drugs and foods (Lee et al., 2005; Bowman et al., 2011; Liu et al., 2011; Corrales et al., 2012). However, the toxicological aspects of these materials have been scarcely studied (Geh et al., 2006; Maisanaba et al., 2014).

Whereas many reports have supported the *in vivo* activity of bentonites, their *in vitro* efficacy is still controversial, possibly due to the limited knowledge of their pharmacokinetics. There is hardly any scientific evidence to describe the mechanisms by which clays promote human and animal health (Williams et al., 2009).

Until now, due to its abundance, low cost and availability, bentonite has been the most widely used clay (Wiszniewski et al., 2007; Zhang et al., 2012). However, new perspectives for its use in biomedicine are emerging (e.g. tissue engineering) and existing uses are being improved (e.g. drug carrier for oral chemotherapy) affording greater benefits for different cells of the human body.

The present review suggests that the current interest in medical mineralogy and on bentonites in particular is bound to grow as novel *in vitro* and *in vivo* experiments with clay are conducted.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank José Luis Morales Lombardo for the English revision of the manuscript and research supported by LCME-UFSC. This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq/Brazil), MCT/INFRA (Brazil), PRONEX/CNPq, Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPES, SC, Brazil).

References

- Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Hetta, M.M., Ibrahim, M., Abdel-Wahhab, M.A., Bacha, H., Oueslati, R., 2008. Efficacy of Tunisian montmorillonite for *in vitro* aflatoxin binding and *in vivo* amelioration of physiological alterations. *Appl. Clay Sci.* 42, 151–157.
- Abdou, M.I., Al-Sabagh, A.M., Dardir, M.M., 2013. Evaluation of Egyptian bentonite and nano-bentonite as drilling mud. *Egypt. J. Pet.* 22, 53–59.
- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viescas, C., Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations. *Appl. Clay Sci.* 36, 22–36.
- Alto, W.A., Murray, H.H., 2004. Mineralogy, chemistry and potential applications of a white bentonite in San Juan province, Argentina. *Appl. Clay Sci.* 25, 237–243.
- Altaner, S.P., Ylagan, R.F., 1997. Comparison of structural models of mixed-layer illite/smectite and reaction mechanisms of smectite utilization. *Clays Clay Miner.* 45, 517–533.
- Barbanti, D., D'Orazio, M., Versari, A., 1997. Study on some sorption properties of bentonites for their potential use in food technology. *J. Food Eng.* 33, 193–206.
- Bergaya, F., Lagaly, G., 2013. General introduction: clays, clay minerals, and clay science. In: Bergaya, F., Lagaly, G. (Eds.), *Handbook of Clay Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–19.
- Borrelli, R.A., Thivent, O., Ahn, J., 2013. Parametric studies on confinement of radionuclides in the excavated damaged zone due to bentonite type and temperature change. *Phys. Chem. Earth* 65, 32–41.
- Bowman, P.D., Wang, X., Meledeo, M.A., Dubick, M.A., Kheirabadi, B.S., 2011. Toxicity of aluminum silicates used in hemostatic dressings toward human umbilical veins endothelial cells, hela cells, and raw 267.4 mouse macrophages. *J. Trauma* 71, 727–732.
- Boylu, F., Ginko, K., Esenli, F., Çelik, M.S., 2010. The separation efficiency of Na-bentonite by hydrocyclone and characterization of hydrocyclone products. *Int. J. Miner. Process.* 94, 196–202.
- Bulut, G., Chimeddorj, M., Esenli, F., Çelik, M.S., 2009. Production of desiccants from Turkish bentonites. *Appl. Clay Sci.* 46, 141–147.
- Carretero, M.L., 2002. Clay minerals and their beneficial effects upon human health: a review. *Appl. Clay Sci.* 2, 155–163.

- Choy, J.H., Choi, S.J., Oh, J.M., Park, T., 2007. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Appl. Clay Sci.* 36, 122–132.
- Christidis, G., Huff, D.H., 2009. Geologic aspects and genesis of bentonites. *Elements* 5, 93–98.
- Corales, T., Larraza, I., Catalina, F., Puroles, T., Ramirez-Santillan, C., Matesanz, M., Alrusci, C., 2012. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of poly(ϵ -caprolactone)/montmorillonite nanocomposites. *Biomaterials* 13, 4247–4256.
- Davies, T.C., 2013. Geochemical variables as plausible aetiological cofactors in the incidence of some common environmental diseases in Africa. *J. Afr. Earth Sci.* 79, 24–49.
- Deng, Y., Velázquez, A.L.B., Billes, F., Dixon, J.B., 2010. Bonding mechanisms between aflatoxin B₁ and smectite. *Appl. Clay Sci.* 50, 92–98.
- Depan, D., Kumar, A.P., Singh, K.P., 2009. Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan- β -lactide acid and montmorillonite. *Acta Biomater.* 5, 93–100.
- Dong, Y., Feng, S., 2005. Poly(α -lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26, 6068–6076.
- Elkhalifa, A.E.I., Maitra, S., Bustam, M.A., Murgesan, T., 2013. Effects of exchanged ammonium cations on structure characteristics and CO₂ adsorption capacities of bentonite clay. *Appl. Clay Sci.* 83–84, 391–398.
- Elmore, A.R., 2003. Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgite, bentonite, fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. *Int. J. Toxicol.* 22, 37–102.
- Emami-Razavi, S.H., Esmaeili, N., Forouzanna, S.K., Amanpour, S., Rabbani, S., Alizadeh, A.M., Mohagheghi, M.A., 2006. Effect of bentonite on skin wound healing: experimental study in the rat model. *Acta Med. Iran.* 44, 225–240.
- Feng, S.S., Mei, L., Aniba, P., Gan, C.W., Zhou, W., 2009. Poly(lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of docetaxel. *Biomaterials* 30, 3297–3306.
- Fu, Y., Chung, D.D.L., 2011. Coagulation of oil in water using sawdust, bentonite and calcium hydroxide to form floating sheets. *Appl. Clay Sci.* 53, 634–641.
- Geh, S., Yücel, R., Duffin, R., Albrecht, C., Born, P.J.A., Armbruster, L., Rautf-Heimsoth, M., Brining, T., Hoffmann, E., Rettenmeier, A.W., Dopp, E., 2006. Cellular uptake and cytotoxic potential of respirable bentonite particles with different quartz contents and chemical modifications in human lung fibroblasts. *Arch. Toxicol.* 80, 98–106.
- González-Pradas, E., Villafraña-Sánchez, E., Villafraña-Sánchez, M., del Rey-Bueno, F., Valverde-García, A., García-Rodríguez, A., 1991. Evolution of surface properties in a bentonite as a function of acid and heat treatments. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52, 211–218.
- Hanušková, D., Zeman, J., Vašček, R., Přikryl, R., Kuchovský, T., 2013. Determination of pore water composition during long-term storage of bentonite substrates with water media: comparative study. *Appl. Clay Sci.* 80–81, 69–75.
- Haroun, A.A., Gamal-Elden, A., Harding, D.R., 2009. Preparation, characterization and in vitro biological study of biometric three-dimensional gelatin-montmorillonite/cellulose scaffold for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20, 2527–2540.
- Harvey, C.C., Lagaly, G., 2013. Industrial applications. In: Bergaya, F., Lagaly, G. (Eds.), *Handbook of Clay Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 451–480.
- Huang, Y., Zhang, M., Zou, H., Li, X., Xing, M., Fang, X., He, J., 2013. Genetic damage and lipid peroxidation in workers occupationally exposed to organic bentonite particles. *Mutat. Res.* 751, 40–44.
- Ilieșcu, R.J., Andronescu, E., Voicu, G., Fici, A., Covalici, C.L., 2011. Hybrid materials based on montmorillonite and citostatic drugs: preparation and characterization. *Appl. Clay Sci.* 52, 62–68.
- Karagözel, C., Çetinel, T., Boylu, F., Çinkin, K., Çelik, M.S., 2010. Activation of (Na, Ca)-bentonites with soda and MgO and their utilization as drilling mud. *Appl. Clay Sci.* 48, 398–404.
- Karim, L., Saleh, A., 2011. The role of bentonite particle size distribution on kinetic of cation exchange capacity. *J. Ind. Eng. Chem.* 17, 90–95.
- Katouli, M.S., Boldaji, F., Dastar, B., Hassani, S., 2010. Effect of different levels of kaolin, bentonite and zeolite on broilers performance. *J. Biol. Sci.* 10, 58–62.
- Keavadiya, B.D., Joshi, G.V., Bajaj, H.C., 2010. Layered bio-nanocomposites as carrier for pro-naiamide. *Int. J. Pharm.* 388, 280–286.
- Keavadiya, B.D., Thumbar, K.P., Rajput, M.M., Rajkumar, S., Brambhatt, H., Joshi, G.V., Dangl, G.P., Mody, H.M., Gadha, P.K., Bajaj, H.C., 2012. Montmorillonite/poly(ϵ -caprolactone) composites as versatile layered material: reservoirs for anticancer drug and controlled release property. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 265–272.
- Keavadiya, B.D., Chettiar, S.S., Rajkumar, S., Bajaj, H.C., Gosai, K.A., Brahmbhatt, H., 2013. Evaluation of clay/poly(α -lactide) microcomposites as anticancer drug, 6-mercaptopurine reservoir through in vitro cytotoxicity, oxidative stress markers and in vivo pharmacokinetics. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 112, 400–407.
- Komadel, F., Madejová, J., 2013. Acid activation of clay minerals. In: Bergaya, F., Lagaly, G. (Eds.), *Handbook of Clay Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 385–409.
- Lee, Y.H., Kuo, T.F., Chen, B.Y., Feng, Y.K., Wen, Y.R., Lin, W.C., Lin, F.H., 2005. Toxicity assessment of montmorillonite as a drug carrier for pharmaceutical applications: yeast and rats model. *Biomol. Eng. Appl. Basis Commun.* 17, 72–78.
- Lin, F.H., Lee, Y.H., Jian, C.H., Wonga, J.M., Shieha, M.J., Wang, C.Y., 2002. A study of purified montmorillonite intercalated with 5-fluorouracil as drug carrier. *Biomaterials* 23, 198–1987.
- Lindemann, M.D., Blodgett, D.J., Harper, A.F., Kornegay, E.T., Doerr, J.A., 1997. Appraisal of the value of selected clays and minerals in diets with and without aflatoxin-contaminated maize fed to young pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 6, 507–519.
- Liu, Q., Liu, Y., Xiang, S., Mo, X., Su, S., Zhang, J., 2011. Apoptosis and cytotoxicity of oligo(styrene-co-acrylonitrile)-modified montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 51, 214–219.
- López-Galindo, A., Viseras, C., 2004. Pharmaceutical and cosmetic applications of clays. In: Wypych, F., Satyanarayana, K.G. (Eds.), *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications*. Elsevier, Amsterdam, pp. 267–289.
- Lordan, S., Kennedy, J.E., Higginbotham, C.L., 2011. Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line. *J. Appl. Toxicol.* 31, 27–35.
- Lu, Y.Z., Zhang, M.B., Li, X.X., Yan, S.X., Chen, Q., Xing, M.L., Zou, H., He, J., 2009. Comparative study of cytotoxicity induced by two kinds of bentonite particles in vitro. *27, 338–340* (Chinese).
- Ma, J., Cui, B., Dai, J., Li, D., 2011. Mechanism of adsorption of anionic dye from aqueous solutions onto organobentonite. *J. Hazard. Mater.* 186, 1758–1765.
- Magnoli, A.P., Tallone, L., Rosa, C.A.R., Dalçero, A.M., Chiacchiera, S.M., Sanchez, R.M.T., 2008. Commercial bentonites as detoxifier of broiler fecal contaminated with aflatoxin. *Appl. Clay Sci.* 40, 63–71.
- Maisanaba, S., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F.J., Jordá, M., Cameán, A.M., Aucejo, S., Jos, A., 2014. Toxic effects of a modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2. *J. Appl. Toxicol.* 34, 714–725.
- Miyoshi, Y., Ishibashi, J., Faure, K., Maeto, K., Matsukura, S., Omura, A., Shimada, K., Sato, H., Sakamoto, T., Uehara, S., Chiba, H., Yamamoto, T., 2013. Mg-rich clay mineral formation associated with marine shallow-water hydrothermal activity in an arc volcanic caldera setting. *Chem. Geol.* 355, 28–44.
- Murphy, E.J., Roberts, E., Anderson, D.K., Horrocks, L.A., 1993. Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 57, 483–490.
- Murray, H.H., 2000. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and pygorskate: a general overview. *Appl. Clay Sci.* 17, 207–221.
- Murray, H.H., 2006. Bentonite applications. In: Murray, H.H. (Ed.), *Developments in Clay Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 111–130.
- Nag, M.M., Kongs, J., 2009. *Interfacial Chemistry of Rocks and Soils*. CRC Press Taylor & Francis, New York.
- Nien, Y.T., Liao, Y.H., Liao, P.C., 2011. Antibacterial activity of poloxamer-modified montmorillonite clay against *E. coli*. *Mater. Lett.* 65, 3092–3094.
- Nones, J., Nones, J., Riella, H.G., Kuhnen, N.C., Trentin, A., 2015. Bentonite protects neural crest stem cell from death caused by aflatoxin B₁. *Appl. Clay Sci.* 104, 119–127.
- Noyan, H., Onal, M., Sarikaya, Y., 2007. The effect of sulphuric acid activation on the crystallinity, surface area, porosity, surface acidity, and bleaching power of a bentonite. *Food Chem.* 105, 156–162.
- Poppyadukhin, P.V., Dobrovolskaya, I.P., Yudin, V.E., Ivan'kova, E.S., Smolyaninov, A.B., Smirnova, N.V., 2012. Composite materials based on chitosan and montmorillonite: prospects for use as a matrix for cultivation of stem and regenerative cells. *Cell Tissue Biol.* 8, 82–88.
- Rodrigues, L.A.S., Figueiras, A., Veiga, F., Freitas, R.M., Nunes, L.C.C., Silva Filho, E.C., Leite, C.M.S., 2013. The systems containing clays and clay minerals from modified dry release: a review. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 103, 642–651.
- Salcedo, I., Aguzzi, C., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Mori, M., Cerezo, P., Sánchez, R., Viseras, C., Caramella, C., 2012. In vitro biocompatibility and mucadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: a new drug delivery. *Appl. Clay Sci.* 55, 131–137.
- Sampatakakis, S., Linos, A., Papadimitriou, E., Petralias, A., Dalma, A., Papisaranti, E.S., Christoforidou, E., Stolidis, M., 2013. Respiratory disease related mortality and morbidity on an island of Greece exposed to perlite and bentonite mining dust. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 4982–4995.
- Sandri, G., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzi, C., Mori, M., Grisoli, P., Cerezo, P., Tenci, M., Viseras, C., Caramella, C., 2014. Montmorillonite-chitosan-silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: in vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. *Carbohydr. Polym.* 102, 970–977.
- Sarkar, B., Megharaj, M., Xi, Y., Naidu, R., 2011. Structural characterisation of Arqua® ZHT-75 organobentonites: surface charge characteristics and environmental application. *J. Hazard. Mater.* 195, 155–161.
- Sharma, A.K., Schmidt, B., Frandsen, H., Jacobsen, N.R., Larsen, E.H., Binderup, M.L., 2010. Genotoxicity of unmodified and organo-modified montmorillonite. *Mutat. Res.* 700, 18–25.
- Sidhoum, D.A., Socías-Viciana, M.M., Ureña-Amate, M.D., Perdour, A., González-Pradas, E., Debbağh-Boutarouch, N., 2013. Removal of paraquat from water by an Algerian bentonite. *Appl. Clay Sci.* 83–84, 441–448.
- Sinha, R., Raynor, G., Collins, S.B., 2004. Evaporite mineralogy and geochemical evolution of the Sambhar Salt Lake, Rajasthan, India. *Sediment. Geol.* 166, 59–71.
- Slamova, R., Trckova, M., Vondruskova, H., Zraly, Z., Pavlik, L., 2011. Clay minerals in animal nutrition. *Appl. Clay Sci.* 51, 395–398.
- Sun, B., Ranganathan, B., Feng, S.S., 2008. Multifunctional poly(α -lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials* 29, 475–486.
- Valenti, D.M., Silva, J., Testolin, W.R., Velosa, A.F., Mello, S.B., 2012. Effect of topical clay application on the synthesis of collagen in skin: an experimental study. *Chem. Exp. Dermatol.* 37, 164–168.
- Viseras, C., Cerezo, P., Sanchez, R., Salcedo, I., Aguzzi, C., 2010. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Appl. Clay Sci.* 48, 291–295.
- Wallis, P.J., Gates, W.P., Patti, A.F., Scott, J.L., Teoh, E., 2007. Assessing and improving the catalytic activity of K-10 montmorillonite. *Green Chem.* 9, 1–8.
- Walz, L.S., White, T.W., Fernandez, J.M., Gentry, L.R., Blouin, D.C., Froetschel, M.A., Brown, T.F., Larson, C.J., Chapa, A.M., 1998. Effects of fish meal and sodium bentonite on daily gain, wool growth, carcass characteristics, and ruminal and blood characteristics of lambs fed concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 76, 2025–2103.
- Who (World Health Organization), 2005. Bentonite, kaolin, and selected clay minerals. World health organization, international programme on chemical safety, vol. 231. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- Williams, L.B., Hayde, S.E., Ferrell Jr., R.E., 2009. Bentonite, Band aids, and borborygmi. *Elements* 5, 99–104.
- Wiszniewski, J., Surmacz-Górska, J., Robert, D., Weber, J.V., 2007. The effect of landfill leachate composition on organics and nitrogen removal in an activated sludge system with bentonite additive. *J. Environ. Manag.* 85, 59–68.
- Zhang, M., Lu, Y., Li, X., Chen, Q., Lu, L., Xing, M., Zou, H., He, J., 2010. Studying the cytotoxicity and oxidative stress induced by two kinds of bentonite particles on human B lymphoblast cells in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 183, 390–396.
- Zhang, M., Li, X., Lu, Y., Fang, X., Chen, Q., Xing, M., He, J., 2011. Studying the genotoxic effects induced by two kinds of bentonite particles on human B lymphoblast cells in vitro. *Mutat. Res.* 720, 62–66.
- Zhang, Y., Long, Y., Yuanheng, Z., Zhu, Y., Wang, H., Wu, H., Lu, W., 2012. Effect of a mixed anionic-nonionic surfactant adsorption on bentonite structure and on distribution of pentachlorophenol. *Appl. Clay Sci.* 69, 93–98.



Research paper

Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin B₁[☆]Janaína Nones^a, Jader Nones^b, Humberto Gracher Riella^a, Nivaldo Cabral Kuhnen^a, Andrea Trentin^{b,*}^a Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil^b Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2014

Received in revised form 11 November 2014

Accepted 14 November 2014

Available online 4 December 2014

Keywords:

Bentonite

Cellular survival

Neural crest stem cells

Aflatoxin B₁

ABSTRACT

Bentonites, which have been shown to be good mycotoxin adsorbents, have a wide range of biochemical and industrial uses. Although many *in vitro* studies have shown the effects of bentonite on a variety of cell types, there is no comparable information regarding its effects on neural crest (NC) stem cells. The NC is a collection of multipotent and oligopotent progenitors endowed with both neural and mesenchymal potentials. NC cells originated at trunk level can become peripheral nervous system cells, melanocytes and smooth muscle cells. For this reason, the NC is considered an ideal model for studying the role of different substances on cell differentiation, survival and growth. We have recently shown that aflatoxin B₁ (AFB₁) decreases the viability and reduces the population of NC cells. In the present work, we have characterized bentonite extracted from the South of Brazil and investigated its effects on NC differentiation and survival, when challenged with AFB₁. The results have highlighted the high content of SiO₂, Fe₂O₃ and K₂O present in bentonite, with content of MnO, MgO, CaO, Na₂O, TiO₂ and P₂O₅ lower than 1%. These results have also shown that bentonite at 0.6 mg/mL is not toxic to NC cells in culture. Furthermore, bentonite increased the viability of NC cells previously treated with AFB₁ without affecting cell differentiation. The evidence suggests that AFB₁ interacted with bentonite by occupying the interlayer spaces, which might have contributed to a reduction of AFB₁ availability and, consequently, a reduction in NC damage and an increase in the total number of cells. Our study contributes to a better understanding of the effects of clay minerals on the NC and may help to create new, more effective pharmacological applications to reduce or eliminate the toxic effects of AFB₁.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bentonite is an adsorbent aluminosilicate clay. Because of its high adsorptive properties, it is widely used for a large variety of purposes: as bonding material (by foundries), as a support and lubricant agent (in construction and civil engineering), as a sealing material (in environmental engineering), as a clarification agent (by food processing industries), as feed supplement (in agriculture), and as filler (by pharmaceutical and cosmetic industries) (Nien et al., 2011; Zhang et al., 2011, 2010).

Existing studies have demonstrated the severe toxic effect (cell lysis) that clay minerals such as montmorillonite and bentonite can have on human endothelial cells and macrophages. However, these compounds have been proven to have little or no effect on neuroblastoma, oligodendroglial cells and mesenchymal stem cells of adipose tissue (Murphy et al., 1993a; Bowman et al., 2011; Popryadukhin et al., 2012).

Studies with cultured human neuroblastoma have revealed an increased cell death rate after exposure to anti-cancer drugs, while treatment with clay based drugs (rich in bentonite) has resulted in increased cell viability (Kevadiya et al., 2013). Indeed, bentonite has been used for therapeutic purposes such as: curing wounds, relieving irritations, increasing collagen fibers, protecting skin against physical or chemical substances, and treating gastrointestinal disorders (López-Galindo and Viseras, 2004; Kevadiya et al., 2012; Valenti et al., 2012).

Although *in vitro* studies report the effects of bentonite on a variety of cell types (Murphy et al., 1993b; Abbès et al., 2008; Zhang et al., 2011), there is no information available regarding the effects of this compound on the NC. The NC is a transient structure of the vertebrate embryo formed by the lateral borders of the closing neural tube during neurulation. After extensive migration, NC cells, consisting of a population of multipotent stem cells, can differentiate into multiple cell lineages according to their location in the embryo, giving rise to neurons and glial cells of the peripheral nervous system (PNS), pigmented cells and some endocrine cells (Le Douarin et al., 2007; Le Douarin and Kalcheim, 1999). In addition, the NC provides the head with mesenchymal cells that can differentiate into tendons, connective, cartilage, bone,

[☆] Financial support: CNPq, INNT, FAPESC and CAPES.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 4738/9908 2680; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: andrea.trentin@ufsc.br (A. Trentin).

and adipose tissues (Le Douarin and Kalchheim, 1999; Le Douarin et al., 2007; Dupin and Sommer, 2012).

Exposure to drugs or environmental chemicals can cause abnormal migration, differentiation, division or survival of NC cells and can contribute to multiple pathologies (Chen and Sulik, 2000; Garic-Stankovic et al., 2006; Wentzel and Eriksson, 2009; Flentke et al., 2011; Garic et al., 2011). Understanding the effects of bentonite on NC stem cells can help to prevent many NC-derived pathologies.

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the most predominant and most toxic mycotoxins identified (Shim et al., 2014). Its effects include carcinogenicity, hepatotoxicity and mutagenicity (Li et al., 2011; Juan-García et al., 2013; Lei et al., 2013), and may also lead to multiple developmental diseases (Cilevici et al., 1980; Diertert et al., 1985; Bintvihok et al., 2002). We have recently demonstrated that AFB₁ can interfere with embryo development by causing NC cell death (Nones et al., 2013). In vitro we have also reported that AFB₁ cell toxicity managed to be reduced by hesperidin (a flavonoid) (Nones et al., 2013, 2012).

Despite the reported effects of bentonite on different cell types (Zhang et al., 2010; Bowman et al., 2011; Lordan et al., 2011; Popryadukhin et al., 2012; Devreese et al., 2013), there is no information concerning the effects of this compound on multipotent progenitor cells. Therefore, in the present study, we have investigated the effects of bentonite on NC differentiation and survival, when the NC is exposed to AFB₁. By using an in vitro system of cell culture of quail NC, we have demonstrated for the first time that bentonite reduces the toxicity of AFB₁, possibly due to its ability to adsorb the AFB₁ present in the culture medium.

Our results indicate that bentonite can modulate stem cell viability by reducing cell death caused by toxic factors, such as AFB₁. These findings offer new perspectives for understanding the relevance of clay mineral particles for treating humans and animals.

2. Material and methods

2.1. Drugs

Bentonite samples were collected in Criciúma, Santa Catarina State, in the south of Brazil. The samples were washed with distilled water to remove any impurities and were dried in an electric oven at 60 °C for 8 h. After that, the samples were kept in a stock solution of 40 mg/mL diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at –20 °C. AFB₁ (Sigma) was kept in a stock solution of 10 mM.

2.2. Bentonite characterization

The chemical composition of bentonite was determined with X-ray fluorescence analysis (XRF), using Bruker's S2 Ranger. X-ray diffraction (XRD) analysis of the bentonite was made with accelerating voltage of 40 kV and 30 mA, Cu K_α ($\lambda = 0.154178$ nm) radiation ranging from 0 to 20° and 2 θ scan rate of 0.05°/s (PANalytical X'Pert PRO Multi Purpose). The surface morphology of bentonite was investigated using a JEOLJSM-6390 LV scanning electron microscope. Na⁺ and K⁺ cation exchange capacity (CEC) was determined by atomic absorption spectrophotometer (PerkinElmer Pinnacle 900 T); Ca²⁺ and Mg²⁺ were measured by a flame atomic adsorption spectrometer (Cole Parmer 2655-00).

2.3. Quail NC cell cultures

Quail NC cell cultures were performed as previously described by Trentin et al. (2004) and Nones et al. (2013, 2012). Briefly, neural tubes obtained from quail embryos (18–25 somite stage) were dissected at trunk level and plated in plastic culture dishes (Corning). After 24 h, emigrated NC cells were harvested for secondary plating (400 cells per well of a 96-well plate). Cultures were maintained for an additional 4 days in a medium containing: α -minimum essential medium

(α -MEM; Gibco) enriched with 10% fetal bovine serum (Cultlab), 2% chicken embryonic extract, penicillin (200 U/mL) and streptomycin (10 μ g/mL) (all from Sigma). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was changed every 2 days. Each culture was incubated with DMSO (control group) or 0.2–1.6 mg/mL of bentonite. In order to determine the role of bentonite on cell survival, AFB₁ (30 μ M), was added – alone or concomitantly – to cells treated with a specific concentration (0.6 mg/mL) of bentonite.

2.4. Cell viability

The viability of NC cells was determined by trypan blue (Youn et al., 2013) and by 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Trentin et al., 1995; Nones et al., 2013) assays. For trypan blue analyses, NC cells were treated with bentonite (0.2–1.6 mg/mL), AFB₁ (30 μ M) alone or in combination, for 4 days, and subsequently collected by centrifugation. After washing in PBS, cells were stained with 0.4% trypan blue solution at room temperature for 3 min, and cells were then counted using a hemocytometer and a light microscope. At least one thousand cells were observed and the percentages of unstained (viable) and stained (nonviable) cells were determined. For MTT assay, 0.5 mg/mL of MTT solution was added to the culture medium 2 h before completing the treatment described above. The medium was then gently removed and 100 μ L of DMSO was added to each well and the resulting product was incubated for 10 min. The formalized product generated was then solubilized with DMSO and the absorbance measured at 570 nm.

2.5. Immunocytochemistry

For cytoskeleton protein analysis, cell cultures were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 0.2% Triton-X-100 (Vetec Química Fina) for 5 min at room temperature. Subsequently, all treated groups were incubated with 5% bovine serum albumin (BSA; Sigma) in PBS (blocking solution) for 1 h, followed by an overnight incubation at 4 °C with a specific glial primary antibody (HNK1) (Calloni et al., 2009, 2007). After incubation with HNK1, cells were extensively washed in PBS and incubated with the secondary antibodies diluted in blocking solution for 2 h. Secondary antibodies were obtained from Southern Biotechnology. Detailed procedures are described elsewhere (Trentin et al., 2004; Costa-Silva et al., 2009). Cell nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma). Fluorescent labeling was observed under an epifluorescent microscope (Olympus IX71). Negative controls were obtained by omitting primary antibodies. In all cases, no reactivity was observed when the primary antibody was absent.

2.6. Cell death assay

Cell death was quantified by assessing the characteristic nuclear changes (e.g., chromatin condensation and nuclear fragmentation) using DAPI nuclear binding dye (Costa-Silva et al., 2009; Nones et al., 2012) and fluorescence microscopy. Briefly, cells treated were fixed with 4% paraformaldehyde and washed in PBS. Next, cell nuclei were stained with DAPI and visualized/analyzed under an epifluorescent microscope (Olympus IX71).

Table 1

Chemical composition of bulk bentonite (mass %).

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	LOI	Total
68.14	18.04	2.80	0.01	0.84	0.05	0.50	2.85	0.77	0.03	5.05	99.08

LOI: loss on ignition at 1000 °C.

2.7. Isothermal adsorption of AFB₁ by bentonite

Adsorption of AFB₁ molecules was assessed by isothermal adsorption assay and analyzed by Langmuir equation. To that end, 50 μL of 0.6 mg/mL bentonite was added to 1 mL of AFB₁-solution (1, 20, 40 μM). Samples were stored overnight and then centrifuged (80-2B Centrifio) at 2000 rpm for 57 min. The amount of adsorbed AFB₁ was determined in the supernatant with UV/visible spectrophotometry at 365 nm. The adsorption capacity was evaluated by plotting the adsorption data using the linear form of the Langmuir equation:

$$\frac{C_{\text{eq}}}{q} = \frac{1}{k_d Q_{\text{max}}} + \frac{C_{\text{eq}}}{Q_{\text{max}}}$$

First, Q_{max} and k_d were determined, where C_{eq} is the equilibrium concentration, q is the amount of AFB₁ adsorbed, k_d is a distribution coefficient, and Q_{max} is the maximum adsorption capacity. Two controls consisting of 1 mL of stock solution (40 μM) without adsorbent and 1 mL of the lowest concentration without adsorbent (1 μM) were also analyzed.

2.8. Infrared absorption of AFB₁ saturated bentonite

Bentonite's structural composition and aflatoxin sequestration were analyzed by infrared absorption assay (FTIR). For that purpose, 0.6 g of bentonite was saturated with 30 μM of AFB₁. The dispersion (1 mL) was stored overnight and the samples were centrifuged (80-2B Centrifio) at 2000 rpm for 57 min and dried at room temperature on glass slides. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) of bentonite was obtained using a Shimadzu Spectrum, IR Prestige-21. FTIR spectra were taken in the range from 4000 to 400 cm^{-1} in the transmission mode in KBr pellets.

2.9. Quantitative and statistical analysis

Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, when appropriate, using GraphPad Prism 4.0 software (Nones et al., 2013). $P < 0.05$ was considered statistically significant. The experiments were performed in triplicate and each result represents the mean of at least three independent experiments.

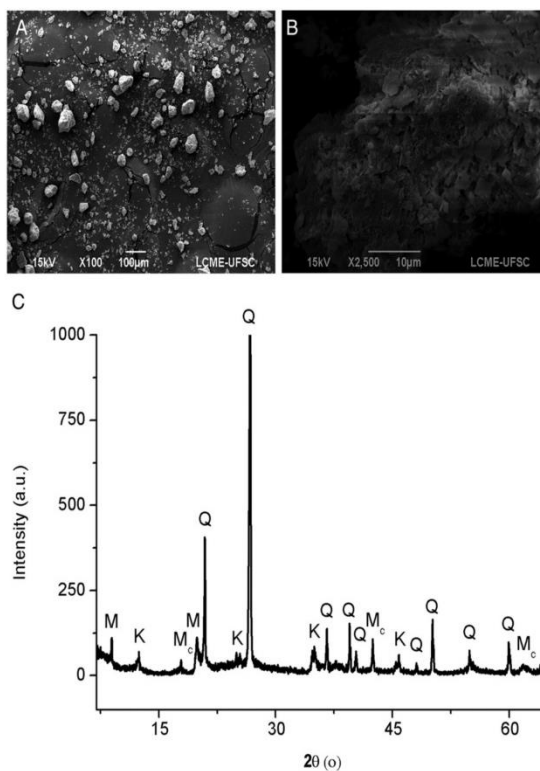


Fig. 1. Bentonite characterization. Following extraction, clay mineral particles were analyzed by scanning electron microscopy (A, B). Mineralogical composition was analyzed by XRD assay (C). M – Montmorillonite, K – Kaolinite, Me – muscovite, Q – quartz. Scale bar = 10 and 100 μm .

3. Results

3.1. Bentonite characterization

Different geological formations can affect the chemical and physical properties of bentonite. In this work, bentonite extracted from Criciúma (Santa Catarina State, Brazil) was used for the first time. This compound was characterized by assessing its chemical composition, morphology, thermal properties and cation exchange capacity.

As shown by X-ray fluorescence assay (Table 1), the most abundant oxides present in bentonite were SiO_2 and Al_2O_3 , whereas Fe_2O_3 , K_2O , MnO , MgO , CaO , Na_2O , TiO_2 and P_2O_5 were found only in small quantities (less than 3%). Loss on ignition (LOI), performed by heating samples at 1000°C for 2 h, revealed a value of 5.05% in mass.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis of bentonite showed individual particles, most of which have clearly recognizable contours and irregular layers that tend to form thick and large agglomerates (Fig. 1A, B).

The crystalline phases of bentonite were analyzed by XRD (Fig. 1C). The minerals identified were montmorillonite (M), kaolinite (K), muscovite (Mc) and quartz (Q).

The CEC was measured at $4.866\text{ cmol}_e\text{ kg}^{-1}$ (Table 2). After bentonite characterization, we determined whether NC cells could be affected by these clay mineral particles.

3.2. Cell viability

In order to evaluate cell viability, cultures of quail NC cells were incubated with vehicle (control group) or 0.2–1.6 mg/mL of bentonite solution. By MTT assay, we observed a progressive reduction in the absorbance values after a 4-day cell treatment with 0.8 to 1.6 mg/mL (0.26 to 0.12 absorbance, respectively) when compared with control group (0.34 absorbance) (Fig. 2A). This effect could be attributed to a decrease in cell number. No effect was observed from 0.2 to 0.6 mg/mL (Fig. 2A).

To double-check this result, trypan blue analysis was performed to determine the proportion of viable and nonviable cells (Fig. 2B). Treatment with concentrations of bentonite lower than 0.8 mg/mL resulted in about 80% cell viability. On the other hand, bentonite at concentrations equal or higher than 1 mg/mL reduced the percentage of unstained (viable) cells in a dose-dependent way. Cultures treated with 1, 1.2, 1.4 and 1.6 mg/mL of bentonite showed 68, 64, 55 and 45% cell viability, respectively.

Taken together, these data support the suggestion that bentonite could promote apoptosis at concentrations higher than 0.8 mg/mL. Next, bentonite at 0.6 mg/mL was used in treatment of NC cell cultures and MTT viability assay was performed at different times of treatment (12, 48 and 96 h) (Fig. 2C). Absorbance values obtained (0.26; 0.29; 0.35) were similar to those for control group (0.26; 0.30; 0.36). Therefore, it can be concluded that bentonite does not cause cell toxicity or interfere with cell viability in concentrations lower than 0.6 mg/mL and for up to 96 h of treatment.

3.3. Bentonite prevents NC cell death caused by AFB_1

In previous studies, we have shown that AFB_1 reduces NC cell viability in culture (Nones et al., 2013) and we have wondered if bentonite at 0.6 mg/mL could prevent cell death induced by $30\ \mu\text{M}$ AFB_1 . Therefore,

through DAPI nuclear staining, we quantified the total number of NC cells (Fig. 3).

AFB_1 treatment significantly decreased the total number of cells (about 1.62-fold) compared to control group (Fig. 3A, C, E). This effect was partially reversed by 0.6 mg/mL bentonite when concomitantly added to $30\ \mu\text{M}$ AFB_1 (1.12-fold compared to control group) (Fig. 3A, D, E).

In order to verify if the increase in the total number of cells is a result of a reduction in cell death promoted by bentonite, the picnotic nuclei were quantified after DAPI staining (Calloni et al., 2009; Nones et al., 2013) (Fig. 3A–D, F). We did not observe a reduction in the proportion of dead cells after bentonite treatment, compared to control group (1.55 cell death/field in both treatments). On the other hand, AFB_1 decreased the number of DAPI-labeled nuclei by 2.1-fold, and that effect was partially reverted by adding bentonite

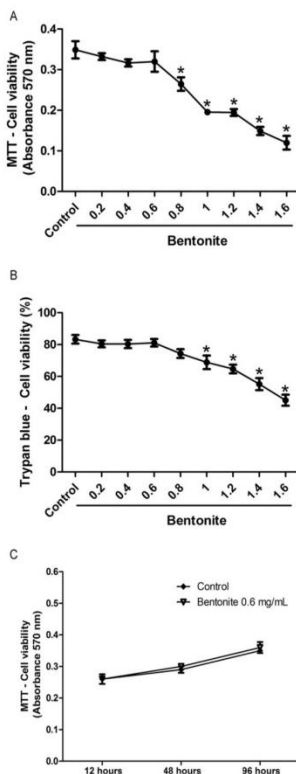


Fig. 2. Bentonite affects NC cell viability. Secondary quail trunk NC cell cultures were incubated with DMSO (control group), 0.2–1.6 mg/mL of bentonite. After 4 days of treatment, cell viability was analyzed by MTT (A) and trypan blue assay (B). NC cell viability was also analyzed after 12, 48 and 96 h of treatment with 0.6 mg/mL of bentonite (C). The results represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm SEM. * $P < 0.05$ compared to control group.

Table 2
Physical-chemical properties of bentonite.

Index	Cation exchange capacity $\text{cmol}_e\text{ kg}^{-1}$
CEC	Ca^{2+} Na^+ K^+ Mg^{2+}
Values	4.866 0.070 0.333 2.813 1.650

(1.49-fold in the AFB₁ plus bentonite group compared to control group).

MTT assay (Fig. 3G) confirmed the above data and showed a decrease in the absorbance values for the culture treated with 30 μ M AFB₁ (0.23 absorbance) compared to control group (0.34 absorbance). The addition of 0.6 mg/mL of bentonite, concomitantly with AFB₁, partially reversed the effect (0.29 absorbance). Similarly, trypan blue analysis (Fig. 3H) showed that the treatment with 30 μ M of AFB₁ resulted in 46% cell viability. On the other hand, cell viability increased when 0.6 mg/mL of bentonite was concomitantly added (20% increase compared to the AFB₁-treated group). Therefore, the co-administration of bentonite with AFB₁ prevented cell death promoted by AFB₁, confirming the effects of bentonite on NC cell survival.

3.4. Bentonite does not affect NC differentiation

Next, we evaluated whether bentonite could influence the NC cell phenotypic profile in addition to their numbers. Therefore, secondary cultures of quail trunk NC were incubated with: a vehicle (control group), 0.6 mg/mL of bentonite, 30 μ M of AFB₁ or 30 μ M of AFB₁ concomitantly with 0.6 mg/mL of bentonite (Fig. 4). After 4 days of treatment, cell phenotypic marker HNK1 (that stains NC-derived glial cells) was analyzed by immunocytochemistry. The proportion of HNK1-positive cells in relation to the total number of cells (stained by DAPI) was not altered by any treatment (Fig. 4A–E). Although the absolute number of cells was not affected by bentonite treatment, compared to control group the number of glial cells per field decreased by about

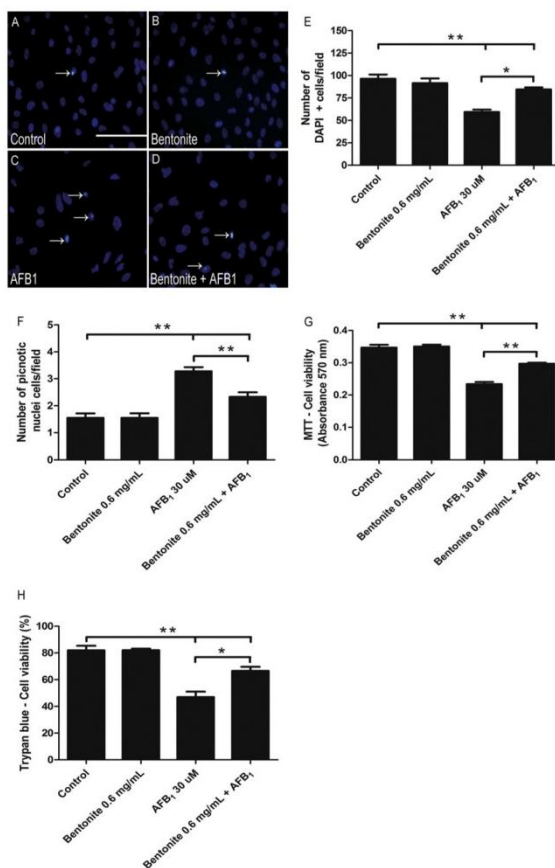


Fig. 3. Bentonite affects the NC cell population. Secondary quail trunk NC cell cultures were incubated with DMSO (control group), 0.6 mg/mL of bentonite, 30 μ M of AFB₁ or 0.6 mg/mL of bentonite concomitantly added with 30 μ M of AFB₁. After 4 days of treatment, the total number of cell nuclei per field was determined by DAPI (A–E) staining and cell death was analyzed by quantification of picnotic cells (A–D; F). Cell viability was analyzed by MTT and trypan blue assay (G–H). The results represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm SEM. **P* < 0.05 or ***P* < 0.01 compared to control group. Scale bar = 200 μ m.

1.7-fold for the AFB₁-treated culture and 1.24-fold for the culture treated with AFB₁ concomitantly added with bentonite (Fig. 4A–D, F). Together with the previous results, this experiment demonstrates that bentonite with AFB₁, in fact, affects the NC cell population as a whole instead of a specific NC derived phenotype.

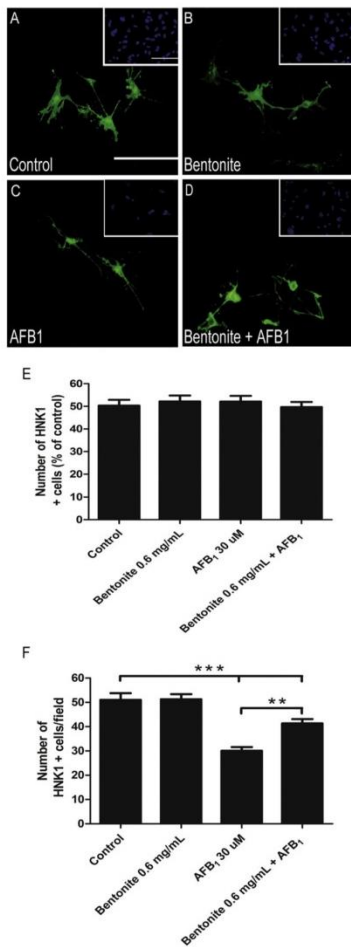


Fig. 4. Bentonite does not affect NC cell differentiation. Cultures of quail trunk NC cells were incubated for 4 days with a vehicle (control group) or 0.6 mg/mL of bentonite, 30 μM of AFB₁ or 0.6 mg/mL of bentonite concomitantly added with 30 μM of AFB₁. Representative pictures (A–D) and quantitative analysis of glial cells labeled (HNK1) were performed (E). The proportion of HNK1 phenotype to the total number of cells is represented in F. The results represent the mean of three independent experiments performed in triplicate ± SEM. **P < 0.05 or ***P < 0.01 compared to control group. Scale bar = 200 μm.

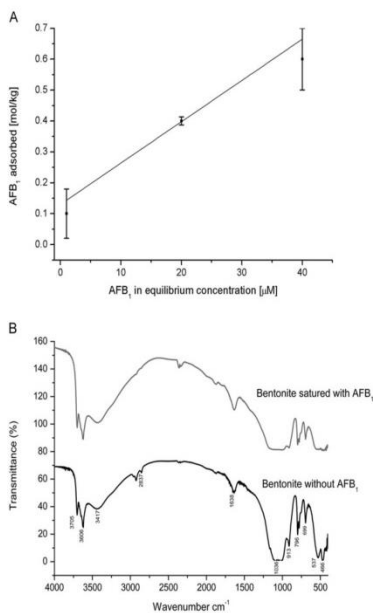


Fig. 5. Bonding between AFB₁ and bentonite. Bentonite samples were mixed in test tubes with different concentrations of AFB₁. Aflatoxin adsorption vs. concentration of aflatoxin (A). Functional group alterations were observed in the region of 913–1036 cm⁻¹ (B). The results represent the mean of three experiments performed in duplicate ± SEM.

3.5. Bonding between AFB₁ and bentonite

The above results revealed that addition of bentonite reduced the negative effect of AFB₁ in NC cell cultures, indicating a protective effect. One explanation for this finding could be linked to the capacity of bentonite to adsorb different particles, especially mycotoxins (Diaz et al., 2004; Pasha et al., 2007; Dixon et al., 2008). Therefore, infrared absorption (FTIR) and isothermal adsorption tests were performed in order to determine the interaction and bonding between the toxin (AFB₁) and the adsorbent (bentonite).

Table 3
Functional groups of bentonite.

Functional groups	Wavenumber (cm ⁻¹)
Si–OH	3705
Al–Al–OH	3606
H ₂ O	3417
Stretching vibration C–H	2837
H ₂ O	1638
SiO	1036
Al–Al–OH	913
Al–OH–Mg	796
Si–O–Si	699
Si–O–Al	537
Si–O–Si	466

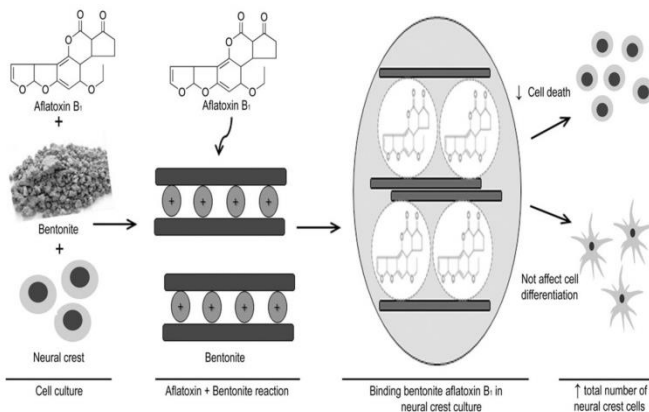


Fig. 6. Mechanism of action of bentonite in the protection of NC cells against damage caused by AFB₁. Under culture conditions, AFB₁ interacted with bentonite, occupying the interlayer space of montmorillonite, a clay mineral which is the main component of bentonite. This reduces AFB₁ availability and, consequently, NC cell damage. In turn, this contributes to an increase in the total number of NC cells. There were no observable effects on NC cell differentiation.

A maximum adsorption capacity was measured at $0.730 \text{ mol kg}^{-1}$ and the distribution constant (K_d) was set at 0.093, as indicated by Langmuir's equation. Langmuir's model ($R^2 \geq 0.98$) showed a favorable AFB₁ adsorption mechanism (Fig. 5A).

FTIR analysis was used to determine functional groups (Fig. 5B). The broad bands around 2837 and 3417 cm^{-1} was attributed to stretching vibration of a CH group and adsorbed water molecules, respectively (Wang et al., 2009). A band attributed to Si–OH appeared in the region of 3705 cm^{-1} . The band around 537 cm^{-1} can be attributed to the angular deformation of Si–O–Al while the band centered at 466 cm^{-1} related to the angular deformation of Si–O–Si (Wang et al., 2009; Zhiron et al., 2011). Table 3 listed the main functional groups of bentonite.

When bentonite was saturated by AFB₁, alterations were observed in bands around 913 – 1036 cm^{-1} (Fig. 5B), related with Al–Al–OH and SiO functional groups of bentonite.

4. Discussion

The present study has demonstrated for the first time that bentonite extracted from the South of Brazil promotes NC cell survival in the presence of AFB₁. The number of NC-derived glial cells increased after the addition of bentonite concomitantly with AFB₁, although the proportion of NC cell phenotypes did not alter. This suggests that bentonite affects the NC cell population as a whole rather than any specific cell type.

It has been previously demonstrated that different concentrations of bentonite induce strong neurotoxic effects (Murphy et al., 1993b) causing a rapid degeneration of murine spinal cord neurons in culture. Neuroblastoma cells briefly exposed to up to 1.0 mg/mL of bentonite had their resting potentials depolarized and lost the ability to maintain action potentials (Banin and Meiri, 1990). Indeed, Elmore (2003) reports that different varieties of clay minerals, including montmorillonite, are cytotoxic to macrophage cell lines and displayed hemolytic activity. These findings are in accordance with our observations that NC cell viability decreases after treatment with high concentrations of bentonite while a low concentration of this compound is not toxic, suggesting a dose dependent effect. Further studies are needed to determine the adequate dose and to assess toxicity in vivo (Maisanaba et al., 2013).

Mycotoxins have already been shown to induce apoptosis in several mammalian tissues, such as the kidney and liver (Tolleson et al., 1996;

Ribeiro et al., 2010; Liu et al., 2012; Lei et al., 2013). Indeed, the administration of AFB₁ to rats resulted in degeneration of both the central and peripheral nervous systems (Ikegwuonu, 1983). More recently, our group observed the effects of this substance on the survival and proliferation of NC cells in vitro (Nones et al., 2013). For those reasons, several measures have been taken to minimize the effect of mycotoxins, such as the use of adsorbents like bentonite in feed or drugs (Rosa et al., 2001; Pasha et al., 2007; Devreese et al., 2013). This compound has been shown to protect cells from several kinds of damage (Kannevischer et al., 2006; Abbès et al., 2008, 2007; Dakovic et al., 2008; Dixon et al., 2008; Jaynes and Zartman, 2011). However, the mechanisms underlying the effect of bentonite on NC cell survival have not been thoroughly researched.

Perhaps this can be explained by the fact that AFB₁ molecules can occupy most of the interlayer space in smectites (Phillips et al., 2002; Kannevischer et al., 2006; Deng et al., 2010). A high Langmuir Q_{max} value suggests that the adsorption depends mainly upon the accessibility of intact interlayers (Mulder et al., 2008). The adsorption capacity shown by our data ($0.730 \text{ mol kg}^{-1}$) is in agreement with the criteria previously established by Dixon et al. (2008), which considers values higher than 0.30 mol kg^{-1} a good absorbance of aflatoxin.

Moreover, the low bentonite CEC value shown in Table 2 may indicate that cations present in the interlayer space, have little influence on the adsorption capacity of the compound. Kannevischer et al. (2006) have already suggested that cations such as K^+ , Na^+ and Mg^{2+} , do not seem to affect adsorption ability significantly.

After saturation of bentonite with AFB₁, a band with lower intensity (around 913 – 1036 cm^{-1}), related with Al–Al–OH and SiO functional groups of bentonite, was observed. This might indicate that AFB₁ participates in a specific bonding mechanism with the montmorillonite, possibly forming complexes with metals (Sarr et al., 1991; Phillips et al., 1995). Similar results were reported by Tenório et al. (2008) as well as Dixon et al. (2008). All the above supports the view that aflatoxin molecules occupied the interlayer space of montmorillonite (a clay mineral which is the main component of bentonite), probably forming complexes with metals, which led to a reduction of AFB₁ availability and, consequently, of NC cell damage caused by that mycotoxin (Fig. 6).

Our study indicates a new role for bentonite in NC cell survival in vitro and that it might also positively influence different kinds of

cells in vivo. Further studies may lead to the development of new pharmacological drugs and treatments.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank José Luis Morales Lombardo for the English review of the manuscript and research supported by LCME-UFSC. This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq/Brazil), MCT/INFRA (Brazil), PRONEX/CNPq, Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC, SC, Brazil).

References

- Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Hetta, M.M., Ibrahim, M., Abdel-Wahhab, M.A., Bacha, H., Queslari, R., 2008. Efficacy of Tunisian montmorillonite for in vitro aflatoxin binding and in vivo amelioration of physiological alterations. *Appl. Clay Sci.* 42, 151–157.
- Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Nahdi, K., Younes, R.B., Hetta, M.M., El-Kady, A.A., Abdel-Wahhab, M.A., Queslari, R., 2007. Inactivation of cadmium induced immunotoxicological alterations in rats by Tunisian montmorillonite clay. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 750–760.
- Banin, E., Meiri, H., 1990. Toxic effects of aluminum-silicates on nerve cells. *Neuroscience* 39, 171–178.
- Binthvohk, A., Thiengnin, S., Doi, K., Kumagai, S., 2002. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1037–1039.
- Bowman, P.D., Wang, X., Meledeo, M.A., Dubick, M.A., Kheirabadi, B.S., 2011. Toxicity of aluminum silicates used in hemostatic dressings toward human umbilical veins endothelial cells, beta cells, and raw 264 mouse macrophages. *J. Trauma* 71, 727–732.
- Calloni, G.W., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., Dupin, E., 2007. Sonic hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19879–19884.
- Calloni, G.W., Le Douarin, N.M., Dupin, E., 2009. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8947–8952.
- Chen, S.Y., Salk, K.K., 2000. Iron-mediated free radical injury in ethanol exposed mouse ne cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 134–140.
- Glicivci, O., Gordos, I., Ghidus, E., Moldovan, A., 1980. The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B1 on the chick embryo development. *Morphol. Embryol.* 4, 309–314.
- Costa-Silva, B., Costa, M.C., Melo, F.R., Neves, C.M., Alvarez-Silva, M., Calloni, G.W., Trentin, A.G., 2009. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. *Exp. Cell Res.* 315, 955–967.
- Dakovic, A., Matijasevic, S., Rottinghaus, C.E., Ledoux, D.R., Butkeraitis, P., Sekuli, Z., 2008. Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 65, 20–25.
- Deng, Y., Velázquez, A.L.R., Billes, F., Dixon, J.B., 2010. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Appl. Clay Sci.* 50, 92–98.
- Devreese, M., Pasmans, F., Backer, P., Croubels, S., 2013. An in vitro model using the IPEC-J2 cell line for efficacy and drug interaction testing of mycotoxin detoxifying agents. *Toxicol. in Vitro* 27, 157–163.
- Diaz, D.E., Hagler Jr., W.M., Blackwelder, J.T., Eve, J.A., Hopkins, B.A., Anderson, K.L., Jones, F.T., Whitlow, L.W., 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157, 233–241.
- Dietert, R.R., Qureshi, M.A., Nanna, U.C., 1985. Bloom SE Embryonic exposure to aflatoxin B1: mutagenicity and influence on development and immunity. *Environ. Mutagen.* 7, 715–725.
- Dixon, J.B., Kanewischer, I., Arvide, M.G.T., Velázquez, A.L.R., 2008. Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clay: an introductory plan. *Appl. Clay Sci.* 40, 201–208.
- Dupin, E., Sommer, L., 2012. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev. Biol.* 366, 82–95.
- Elmore, A.R., 2003. Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgite, bentonite, Fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. *Int. J. Toxicol.* 22, 37–102.
- Flentke, G.R., Garic, A., Amberger, E., Hernandez, M., Smith, S.M., 2011. Calcium-mediated repression of β -catenin and its transcriptional signaling mediates neural crest cell death in an avian model of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 7, 591–602.
- Garic, A., Flentke, G.R., Amberger, E., Hernandez, M., Smith, S.M., 2011. CaMKII activation is a novel effector of alcohol's neurotoxicity in neural crest stem/progenitor cells. *J. Neurochem.* 118, 646–657.
- Garic-Stankovic, A., Hernandez, M., Flentke, G.R., Smith, S.M., 2006. Structural constraints for alcohol-stimulated Ca²⁺ release in neural crest, and dual agonist/antagonist properties of n-oxotanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 552–559.
- Ileguwa, F.I., 1983. The neurotoxicity of aflatoxin B1 in the rat. *Toxicology* 28, 247–259.
- Jaynes, W.F., Zartman, R.E., 2011. Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. *Toxins* 3, 551–565.
- Juan-García, A., Manyes, L., Ruiz, M.J., Font, G., 2013. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: a review. *Food Chem. Toxicol.* 56, 40–59.
- Kanewischer, I., Arvide, M.G.T., White, G.N., Dixon, J.B., 2006. Smectite clays as adsorbents of aflatoxin B1: initial steps. *Clay Sci.* 12, 199–204.
- Kevaliyaa, B.D., Chettiar, S.S., Rajkumar, S., Bajaj, H.C., Bramhbhatt, K.A.H., 2013. Evaluation of clay/poly (β -lactide) microcomposites as anticancer drug, 5-mercaptopurine reservoir through in vitro cytotoxicity, oxidative stress markers and in vivo pharmacokinetics. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 112, 400–407.
- Kevaliyaa, B.D., Thambar, R.P., Rajput, M.M., Rajkumar, S., Bramhbhatt, H., Joshi, G.V., Dang, G.P., Mody, H.M., Gadhia, P.K., Bajaj, H.C., 2012. Montmorillonite/poly(ϵ -caprolactone) composites as versatile layered material: reservoirs for anticancer drug and controlled release property. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 265–272.
- Le Douarin, N.M., Brito, J.M., Cruzet, S., 2007. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res. Rev.* 55, 237–247.
- Le Douarin, N.M., Kalcheim, C., 1999. *The Neural Crest*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lei, M., Zhang, N., Qi, D., 2013. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1 and other selected mycotoxins on the cell line porcine kidney. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65, 1149–1157.
- Li, C.H., Wang, Y.J., Dong, W., Xiang, S., Liang, H.F., Wang, H.Y., Dong, H.H., Chen, L., Chen, X.P., 2011. Hepatic oval cell lines generate hepatocellular carcinoma following transfection with hlx gene and treatment with aflatoxin B1 in vivo. *Cancer Lett.* 311, 1–10.
- Liu, R., Jin, Q., Huang, J., Liu, Y., Wang, X., Zhou, X., Zhou, X., Mao, W., Wang, S., 2012. In vitro cytotoxicity of aflatoxin B1 and its photodegradation products in HepG2 cells. *J. Appl. Toxicol.* 32, 276–281.
- López-Galindo, A., Vieseras, C., 2004. Clay surfaces: fundamentals and applications, pharmaceutical and cosmetic applications of clays. *Interface Sci. Technol.* 1, 267–289.
- Lordan, S., Kennedy, J.E., Higinbotham, C.L., 2011. Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line. *J. Appl. Toxicol.* 31, 27–35.
- Maisanaba, S., Puerto, M., Pichardo, S., Jordá, M., Moreno, F.J., Aceujo, S., Jos, A., 2013. In vitro toxicological assessment of clays for their use in food packaging applications. *Food Chem. Toxicol.* 57, 266–275.
- Mulder, L., Velázquez, A.L.B., Tenório, M.G.A., White, G.N., Dixon, J.B., 2008. Smectite clay sequestration of aflatoxin B1: particle size and morphology. *Clays Clay Minerals* 56, 558–570.
- Murphy, E.J., Roberts, E., Anderson, D.K., Horrocks, L.A., 1993a. Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 57, 483–490.
- Murphy, E.J., Roberts, E., Horrocks, L.A., 1993b. Aluminum silicate toxicity in cell cultures. *Neuroscience* 55, 2597–2605.
- Nien, Y.T., Liao, Y.H., Liao, P.C., 2011. Antibacterial activity of poloxamer-modified montmorillonite clay against *E. coli*. *Mater. Lett.* 65, 3092–3094.
- Nones, J., Costa, A.P., Leal, R.B., Gomes, F.C.A., Trentin, A.G., 2012. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell Tissue Res.* 350, 305–315.
- Nones, J., Nones, J., Trentin, A., 2013. The flavonoid hesperidin protects neural crest cells from death caused by aflatoxin B1. *Cell Biol. Int.* 37, 181–186.
- Pasha, T.N., Farooq, M.U., Khattak, F.M., Jabbar, M.A., Khan, A.D., 2007. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin adsorbents in diets for broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 103–110.
- Phillips, T.D., Lemke, S.L., Grant, P.G., 2002. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504, 157–171.
- Phillips, T.D., Sarr, A.B., Grant, P.G., 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Nat. Toxins* 3, 204–213.
- Popryadukhin, P.V., Dobrowskaya, I.P., Yudin, V.E., Ivan'kova, E.M., Smolyaninov, A.B., Smimova, N.V., 2012. Composite materials based on chitosan and montmorillonite: prospects for use as a matrix for cultivation of stem and regenerative cells. *Cell Tissue Biol.* 6, 82–88.
- Ribeiro, D.H., Ferreira, F.L., da Silva, V.N., Aquino, S., Corrêa, R., 2010. Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on the viability and induction of apoptosis in rat primary hepatocytes. *Int. J. Med. Sci.* 11, 1944–1955.
- Rosa, C.A.R., Mazzo, R., Magnoli, C., Salvano, M., Chiachiera, S.M., Ferrero, S., Saenz, M., Carvalho, E.C.Q., Dalcerro, A., 2001. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poult. Sci.* 80, 139–140.
- Sarr, A.B., Clement, B.A., Phillips, T.D., 1991. Molecular mechanism of aflatoxin B1 chemisorption by hydrated sodium calcium aluminosilicate (abstract). *Toxicology* 7, 97.
- Shim, W.B., Mun, H., Joung, H.A., Ofori, J.A., Chung, D.H., Kim, M.G., 2014. Chemulminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B1 in corn samples. *Food Control* 36, 1–30.
- Tenório, M.G.A., Mulder, L., Velázquez, A.L.B., Dixon, J.B., 2008. Smectite clay adsorption of aflatoxin vs. octachloro composition as indexed by FTIR. *Clays Clay Minerals* 56, 571–578.
- Tollson, W.H., Melchior Jr., W.B., Morris, S.M., McGarrity, L.J., Domon, O.E., Muskhelishvili, L., James, S.J., Howard, P.C., 1996. Apoptosis and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis* 17, 239–249.

- Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., Dupin, E., 2004. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of NC precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4495–4500.
- Trentin, A., Rosenthal, D., Maura Neto, V., 1995. Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation, and proliferation. *J. Neurosci. Res.* 41, 409–417.
- Valenti, D.M., Silva, J., Teodoro, W.R., Velosa, A.P., Mello, S.B., 2012. Effect of topical clay application on the synthesis of collagen in skin: an experimental study. *Clin. Exp. Dermatol.* 37, 164–168.
- Wang, S., Dong, Y., He, M., Chen, L., Yu, X., 2009. Characterization of GMZ bentonite and its application in the adsorption of Pb(II) from aqueous solutions. *Appl. Clay Sci.* 43, 164–171.
- Wentzel, P., Eriksson, U.J., 2009. Altered gene expression in neural crest cells exposed to ethanol *in vitro*. *Brain Res.* 1305, 50–60.
- Youn, H., Jeong, J.C., Jeong, Y.S., Kim, E.J., Um, S.J., 2013. Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor- κ B signaling in h460 lung cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 944–951.
- Zhang, M., Li, X., Lu, Y., Fang, X., Chen, Q., Xing, M., He, J., 2011. Studying the genotoxic effects induced by two kinds of bentonite particles on human b lymphoblast cells *in vitro*. *Mutat. Res.* 720, 62–66.
- Zhang, M., Lu, Y., Li, X., Chen, Q., Lu, L., Xing, M., Zou, H., He, J., 2010. Studying the cytotoxicity and oxidative stress induced by two kinds of bentonite particles on human B lymphoblast cells *in vitro*. *Chem. Biol. Interact.* 183, 390–396.
- Zhiron, L., Uddin, M.A., Zhanoue, S., 2011. FT-IR and XRD analysis of natural Na-bentonite and Cu(II)-loaded Na-bentonite. *Spectrochim. Acta A* 79, 1013–1016.



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Thermal treatment of bentonite reduces aflatoxin B₁ adsorption and affects stem cell death[☆]



Janaína Nones^{a,*}, Jader Nones^b, Humberto Gracher Riella^a, Anicleto Poli^c,
 Andrea Gonçalves Trentin^b, Nivaldo Cabral Kuhnen^a

^a Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2015

Received in revised form 1 May 2015

Accepted 27 May 2015

Available online 30 May 2015

Keywords:

Bentonite

Adsorption

Thermally modified

Aflatoxin B₁

Cellular survival

ABSTRACT

Bentonites are clays that highly adsorb aflatoxin B₁ (AFB₁) and, therefore, protect human and animal cells from damage. We have recently demonstrated that bentonite protects the neural crest (NC) stem cells from the toxicity of AFB₁. Its protective effects are due to the physico-chemical properties and chemical composition altered by heat treatment. The aim of this study is to prepare and characterize the natural and thermal treatments (125 to 1000 °C) of bentonite from Criciúma, Santa Catarina, Brazil and to investigate their effects in the AFB₁ adsorption and in NC cell viability after challenging with AFB₁. The displacement of water and mineralogical phases transformations were observed after the thermal treatments. Kaolinite disappeared at 500 °C and muscovite and montmorillonite at 1000 °C. Slight changes in morphology, chemical composition, and density of bentonite were observed. The adsorptive capacity of the bentonite particles progressively reduced with the increase in temperature. The observed alterations in the structure of bentonite suggest that the heat treatments influence its interlayer distance and also its adsorptive capacity. Therefore, bentonite, even after the thermal treatment (125 to 1000 °C), is able to increase the viability of NC stem cells previously treated with AFB₁. Our results demonstrate the effectiveness of bentonite in preventing the toxic effects of AFB₁.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bentonite particles are efficient at promoting growth (acting as adsorbents of toxins), improving health (reducing the harmful effects of drugs), and promoting well-being (active principles in cosmetics and pharmaceuticals) [1]. Furthermore, this material can protect human and animal cells from several kinds of damage [2–7]. Furthermore, it has been proved to be efficient as a sequestering agent for aflatoxins [3,8].

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most potent natural carcinogen known and is usually the major aflatoxin produced by toxigenic strains [9,10]. This compound induced cytotoxicity [11] and it is responsible for inflicting damage on DNA, mutation, abortion, birth deformity, suppression of immune system, and phytotoxic reactions [12,13]. It can influence the very early stages of mammalian embryonic development, affecting the survival and proliferation of neural crest (NC) stem cells, and consequently the formation of the peripheral nervous system [8,14]. Recently,

we have also reported that AFB₁ cell toxicity can be reduced by bentonite particles [8].

The physico-chemical properties of the bentonite particles may be modified by various treatments, including thermal treatment [15–17]. Changes in the clay by dehydration, dehydroxylation, recrystallization, fracture, and loss of crystal structure can occur as a result of increasing temperature [18–20]. Furthermore, the thermal treatment leads to a delamination of the aluminosilicate layers, which may enhance the available space between the silicate layers [21] or decrease the number of exchange sites [22]. These transformations are dependent on the temperature treatment [21], mineralogy, and crystal structures [23], effects that differ according to the mineralogy composition of the clay.

Thermally treated clays can provide a simple possibility to change the adsorption properties [22], decreasing adsorption in some cases [16,22, 24] or increasing in others [15].

The purpose of this study is to prepare and characterize natural and thermal treatment bentonite and to investigate their effects on the adsorption of AFB₁, using NC stem cell cultures submitted in damage caused by AFB₁ as a model to study the biological effects of both treatments. By using an *in vitro* system of AFB₁ adsorption and cell culture of quail NC, we demonstrated for the first time that calcined bentonite reduces the toxicity of AFB₁ in the culture medium, decreasing the adsorption and protective effect after calcination at 1000 °C. Perhaps

[☆] Financial support: CNPq, INNT, FAPESC, and CAPES.

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, 88040-900. Tel.: 55 48 3721-4070/3721-9931.

E-mail address: janaína.nones@posgrad.ufsc.br (J. Nones).

thermal treatment was able to protect cells from AFB₁ damage. However, this treatment was not able to increase AFB₁ adsorption. These findings contribute to a better understanding of the effectiveness of bentonite in controlling the toxic effects of AFB₁ and offers new perspectives for understanding the relevance of bentonite use in human and animal therapies.

2. Material and methods

2.1. Drugs

Bentonite samples were collected in Criciúma, Santa Catarina State, in the south of Brazil. The samples were washed with distilled water to remove any impurities and were dried in an electric oven at 60 °C for 8 h. Bentonite was thermally treated and the samples were subjected to the calcination process in a muffle (Jung, N1 100) furnace at 125, 250, 500, 750 and 1000 °C for 4 h. Then, the bentonite samples were kept in a stock solution of 40 mg/mL diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at –20 °C, for cell assay, or in water for adsorption study. AFB₁ (Sigma) was kept in a stock solution of 500 µM and, for the tests, it was diluted in DMSO or acetonitrile at 30 µM for cell assay and adsorption study, respectively.

2.2. Bentonite characterization

The chemical composition of bentonite was determined by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and the surface morphology of bentonite was investigated using a JEOLJSM - 6390LV scanning electron microscope (SEM). Bentonite's structural composition was analyzed by infrared absorption assay (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). FTIR of bentonite was obtained using a Shimadzu Spectrum, IR Prestige-21. FTIR spectra were taken in the range from 4000 to 400 cm⁻¹ in the transmission mode in KBr pellets. The XRD analysis of the bentonite samples was made with the accelerating voltage of 40 kV and 30 mA, Cu K_α (λ = 0.154178 nm) radiation ranging from 0 to 20° and 2θ scan rate of 0.05°/s (PanAnalytical X'Pert PRO Multi Purpose). Then, the interlayer spacing of each sample was calculated using Bragg's law:

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

where n is the path differences between the reflected waves which equal an integral number of wavelengths (λ) and d is the interlayer spacing (nm), θ the angle of diffraction (°), λ the wavelength (nm). The density was measured using Archimedes' principle. The loss in mass of bentonite was determined by muffle drying at different temperatures (125, 250, 500, 750 and 1000 °C) during 4 h. Loss in mass is defined as the ratio between the mass of water and other impurities and the mass of dry solid expressed as a percentage.

2.3. Aflatoxin B₁ adsorption study

Adsorption of AFB₁ molecules was assessed by UV/visible spectrophotometry [8]. To that end, 50 µL of 0.6 mg/mL bentonite was added to 1 mL of AFB₁-solution (30 µM). The samples were stored overnight and then centrifuged (80-2B Centrifio) at 2000 rpm for 57 min. The amount of adsorbed AFB₁ was determined in the supernatant with UV/visible spectrophotometry at 365 nm.

For high-performance liquid chromatography (HPLC) assay, different amounts of bentonite samples were added to 200 µL of AFB₁-solution (30 µM) where a 0.2, 0.4 or 0.6 mg/mL concentration was obtained. Samples were stored overnight and then centrifuged (1500 CFN-II Vision) at 4000 rpm for 30 min. The amount of adsorbed AFB₁ was determined in the supernatant with HPLC analysis. An aliquot of the original AFB₁ test solution was used as the HPLC standard. HPLC analyses were performed on a Waters E2795 AllianceBio Separation Module composed of a quaternary pump with a refrigerated autosampler coupled to a Waters 2475

fluorescence detector (λ_{ex} = 365 nm; λ_{em} = 430 nm). The column was a Polaris C18A Metachem, 5 µm particle size, 150 mm × 4.6 mm, guard column was an Alltech 20 × 2 mm. The mobile phase water: acetonitrile (50:50) was pumped at a flow rate of 0.7 mL/min. Chromatograms were obtained and integrated with the Empower® 2 software (Waters Co., Milford, USA). Percent AFB₁ bound by the bentonites was calculated from the difference between the initial and final AFB₁ concentration in the aqueous supernatant after equilibrium.

2.4. Quail NC cell cultures

Quail NC cell cultures were performed and characterized as previously described by Trentin et al. [25] and Nones et al. [14,26]. Briefly, neural tubes obtained from quail embryos (18–25 somite stage) were dissected at the trunk level and plated in plastic culture dishes (Corning). After 24 h, emigrated NC cells were harvested for secondary plating (400 cells per well of a 96-well plate). Cultures were maintained for an additional 4 days in a medium containing: α-minimum essential medium (α-MEM; Gibco) enriched with 10% fetal bovine serum (Cultlab), 2% chicken embryonic extract, penicillin (200 U/mL) and streptomycin (10 µg/mL) (all from Sigma). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was changed every 2 days. Each culture was incubated with DMSO (control group) or 0.6 mg/mL of natural or thermal treatment (125 to 1000 °C) bentonite. In order to determine the role of bentonite on cell survival, AFB₁ (30 µM), was added – alone or concomitantly – to cells treated with a specific concentration (0.6 mg/mL) of bentonite.

2.5. Cell viability

The viability of NC cells was determined by trypan blue [27]. NC cells were treated with natural or thermal treatment at 125, 250, 500, 750 and 1000 °C bentonite (0.6 mg/mL), AFB₁ (30 µM) alone or in combination, for 4 days, and subsequently collected by centrifugation. After washing in PBS, cells were stained with 0.4% trypan blue solution at room temperature for 3 min, and cells were then counted using a hemocytometer and a light microscope. At least one thousand cells were observed and the percentages of unstained (viable) and stained (nonviable) cells were determined.

2.6. Cell death assay

Cell death was quantified by assessing the characteristic nuclear changes (e.g., chromatin condensation and nuclear fragmentation) using DAPI nuclear binding dye [14] and fluorescence microscopy. Briefly, cells treated were fixed with 4% paraformaldehyde and washed in PBS. Next, cell nuclei were stained with DAPI and visualized/analyzed under an epifluorescent microscope (Olympus IX71).

2.7. Quantitative and statistical analysis

Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, using GraphPad Prism 4.0 software. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The experiments were performed in triplicate and each result represents the mean of at least three independent experiments.

3. Results

3.1. Morphology and chemical composition of bentonites

In order to know the elemental composition of the bentonite samples (natural and thermally treated) and understand the effects of calcination, elemental analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray (EDX) analysis.

Table 1
Percentage of compounds in bentonite natural and thermally treated at different temperatures.

Element	Mass of bentonite (%)					
	Natural	125 °C	250 °C	500 °C	750 °C	1000 °C
O	41.90	24.30	51.28	36.55	43.69	52.53
Si	34.96	40.40	33.11	40.85	31.13	28.51
Al	12.06	14.92	7.05	14.97	9.99	9.19
Fe	6.36	8.42	4.45	3.52	8.24	5.07
K	3.49	9.61	3.20	3.88	5.14	3.37
Mg	0.43	0.32	0.26	0.23	0.22	0.25
Ti	0.80	2.03	0.66	0.00	1.59	1.08
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

As shown by EDX assay (Table 1), the most abundant elements present in bentonite samples were O, Si and Al, whereas Fe, K, Mg and Ti were found only in small quantities (less than 10%). There were no significant variations in bentonite composition before and after thermal treatment.

As shown in Fig. 1A–F, both natural and thermally treated bentonite showed individual particles, most of which have clearly recognizable contours and irregular platelets that tend to form thick and large agglomerates. A small increase in particle roughness could be observed by the calcination procedure.

3.2. Calcination provides a reduction in water bands (3417 cm^{-1}) and silicon (1036 cm^{-1})

The FTIR spectra were used to evaluate chemical bonds from the groups present in bentonite samples, before and after thermal treatment (Fig. 2). The broad band around 3417 cm^{-1} was attributed to adsorbed water molecules. A band attributed to Si–OH appeared in the region of 3705 cm^{-1} . The band around 1036 cm^{-1} can be attributed to Si–O while the band centered at 913 cm^{-1} can be attributed to Al–Al–OH.

The intensity of bands around 3417 , 1036 and 913 cm^{-1} was reduced by calcinations (Fig. 2A–E). This result suggests the displacement of water and silicon by thermal treatment.

3.3. Temperature causes the rupture of the mineralogical phases of bentonite

The mineralogical composition and phase transformations on thermally treated bentonite were analyzed by XRD (Fig. 3A–E). The major minerals identified in both samples were montmorillonite (M) and quartz (Q). Other minerals were identified in bentonite samples, such as kaolinite (K) and muscovite (Mc).

The montmorillonite peak changed slightly after heating from 125 to 750 °C (Fig. 3A–E) although it disappeared after reaching 1000 °C . At 500 °C , the dehydroxylation of kaolinite results in the collapses of clay mineral structures and disappearance of peak at 12.4° (2θ) (Fig. 3C). The crystalline phases occurring in the bentonite disappeared after calcination at 1000 °C , and it displays only a quartz peak (Fig. 3E).

3.4. Calcination of bentonite provides changes in the mass, density, and interlayer spacing

In order to evaluate the effect of temperature on other characteristics of the bentonite samples, the interlayer spacing and loss in mass and density were determined.

The loss in mass of the bentonite sample on heating was attributed to the loss water molecules and other impurities. The temperature increase is proportional to the increased mass loss (Fig. 4A).

The XRD pattern of natural bentonite showed the d_{001} reflection at $2\theta = 9.1$ (Fig. 3). The corresponding interlayer spacing is 0.97 nm (Fig. 4B). The interlayer spacing (d_{001}) value changed slightly after it was thermally treated. It increased from 0.97 to 1.00 nm when the samples were treated at 125 or 250 °C and decreased to 0.98 and 0.97 at the temperatures 500 and 750 °C , respectively. The montmorillonite peak (d_{001}) was defragmented at 1000 °C ; it has not been possible to calculate the interlayer space at this temperature.

The density of natural bentonite is 1.87 g/cm^3 (Fig. 4C). No significant changes in the density of bentonite after the heat treatment was observed.

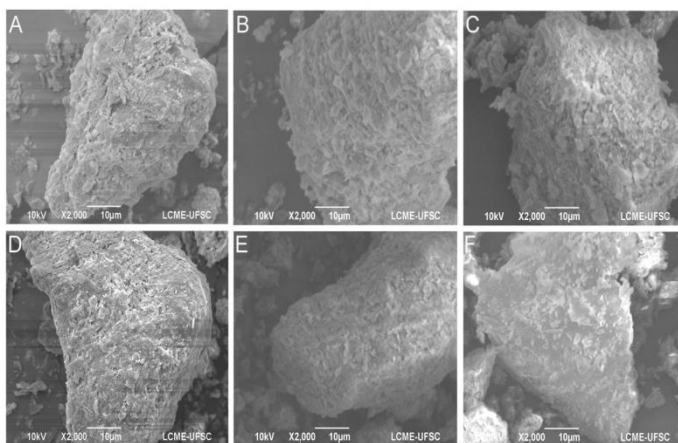


Fig. 1. Morphology of bentonite samples. After thermal treatment, the bentonite particles were analyzed by scanning electron microscopy. Natural (A), 125 °C (B), 250 °C (C), 500 °C (D), 750 °C (E) and 1000 °C (F). Scale bar = $10\text{ }\mu\text{m}$.

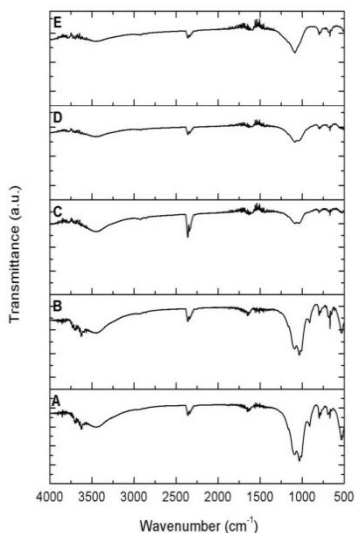


Fig. 2. Calcination provides a reduction in water bands (3417 cm^{-1}) and silicon (1036 cm^{-1}). 125 °C (A), 250 °C (B), 500 °C (C) 750 °C (D) and 1000 °C (E).

3.5. Calcination of bentonite does not cause damage to NC stem cells

Recently, we have demonstrated that bentonite particles can prevent cell death induced by AFB₁ [8,14]. In this work, we have enquired as to whether thermally treated bentonite could interfere in this effect,

increasing our reducing this effect. To analyze these characteristics, trypan blue assay and DAPI staining were used.

Trypan blue assay showed that treatment with AFB₁ (30 μM) resulted in 36% cell viability (Fig. 5). On the other hand, the co-administration of natural bentonite (0.6 mg/mL) with AFB₁ increased cell viability (48% increase compared to the AFB₁-treated group), confirming the effects of bentonite on NC cell survival. In the addition of thermally treated bentonite (at 125, 250, 500, 750 °C), the absorbance values were similar to the natural bentonite (78, 83, 84 and 74% of absorbance, respectively). However, after treatment of bentonite at 1000 °C, a lower viability (around 18% lower compared to the bentonite-treated groups), was observed.

After that, we quantified the total number of NC cells and picnotic nuclei by DAPI staining. The group treated with AFB₁ decreased the total number of cells (Fig. 6, B, D, K) and increased picnotic nuclei (Fig. 6, B, D, L) compared to control group. These results were significantly reversed by the addition of natural or calcined bentonite (125, 250, 500, 750 and 1000 °C) added concomitantly with 30 μM AFB₁ (Fig. 6, A–L). After treatment of bentonite at 1000 °C, a lower total number of cells and a higher number of picnotic nuclei were observed when compared to bentonite treatment groups (Fig. 6, E–L).

3.6. Increasing the calcination temperature of bentonite reduces the adsorption capacity of AFB₁

Our results indicate that both of the bentonite samples that were tested showed a protective effect on stem cells when added concomitantly with toxic substances, such as aflatoxins. The protective effect can be attributed to the adsorption capacity that was influenced by the heat treatment.

By UV/visible spectrophotometry, no change was observed in the adsorption capacity of natural bentonite or thermally treated at 125, 250 and 500 °C (Fig. 7A). However, a decrease in the AFB₁ adsorption values for the addition bentonite calcined at 750 °C (21% AFB₁ adsorbed) and 1000 °C (25% AFB₁ adsorbed) compared to natural bentonite (31.6% absorbance) could be observed.

To double-check this result, the adsorption of AFB₁ by natural and thermally treatment bentonite was measured by HPLC analysis. Natural

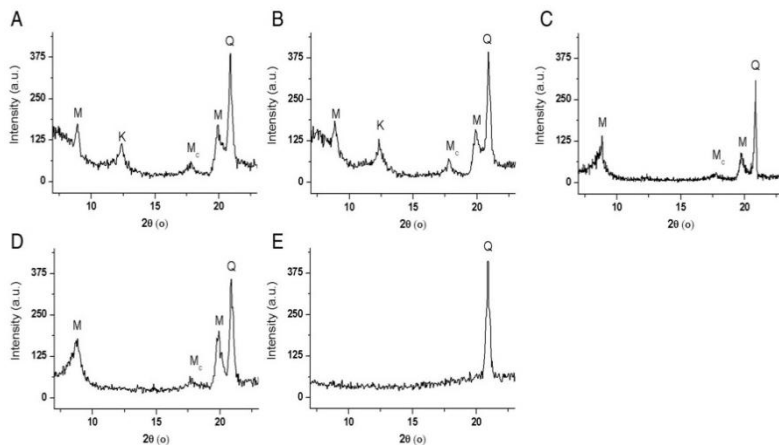


Fig. 3. Temperature causes rupture of the mineralogical phases of bentonite. Mineralogical composition was analyzed by XRD assay: M – Montmorillonite, K – Kaolinite, Mc – muscovite, Q – quartz. 125 °C (A), 250 °C (B), 500 °C (C), 750 °C (D) and 1000 °C (E).

bentonite showed AFB₁ adsorption of 27.3% and the treatment at 125 and 250 °C for 4 h can enhance the adsorption capability of bentonite around 5% (Fig. 7B). In this analysis, AFB₁ adsorption was found to decrease as the temperature varied from 500 °C to 750 °C. Bentonite (at 1000 °C) was also analyzed and had almost zero adsorption capacity for AFB₁ (Fig. 7B). The effect on the adsorption of AFB₁ by natural and thermally treated bentonite (500 and 750 °C) for different concentrations can be seen in Fig. 7C. The adsorption of AFB₁ decreased with decreasing amounts of each adsorbent in suspension.

4. Discussion

This study investigated the effect of thermally treated bentonite on the adsorption of AFB₁ and their influence in protecting NC stem cells from the damage caused by these toxins. The structure, composition, and AFB₁ adsorption of bentonite samples are affected by the heat treatment, although the protective effect on NC cells is maintained.

Previous studies have indicated that the thermal modification of aluminosilicates changes their structure and adsorption ability [15,16,28], which may contribute to opening channels inside the bentonite structure, providing more adsorption sites [28] or breaks the crystal structure and decreases the adsorbability [16,24].

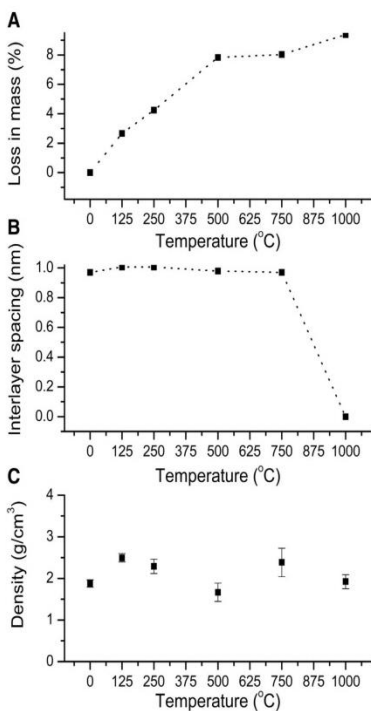


Fig. 4. Calcination of bentonite provides changes in mass, density, and interlayer spacing. Mass loss (A), interlayer spacing (B) and density (C). The results represent the mean of experiments performed in triplicate \pm SEM.

Our data did not show significant changes in the percentages of chemical elements (O, C, Si, Al, Fe, K, Mg, Ti) after treatment. Similar results were found by Vieira [17] and by Bertagnoli et al. [29]. They could not find changes in chemical composition of bentonites by EDX. Individual particles agglomerated into compact lumps accompanied by the development of grooves on the surfaces of the lumps, after thermal treatment [29,30].

The bentonite that was submitted to heat treatments lost the adsorbed water from the surface (dehydration) and from the interpacket spaces (its stage of dehydroxylation) [31–33]. The intensity of such ranges was reduced or a complete disappearance of bands at wave numbers of approx. 3450 cm^{-1} was observed [29,32,34]. These findings are in accord with our results, when the temperature was increased in turn causing the decrease of the intensities of the bands of water (3417 cm^{-1}).

The clay mineral composition of the bentonite samples can be affected by high temperatures and these transformations depend on their mineralogy and crystal structures [23] and can diverge from one form of clay to another [35]. Research has demonstrated that clay minerals, such as montmorillonite, sepiolite, and kaolinite, have shown a high adsorption capacity of aflatoxin [36]. For this reason, we evaluated the effect of temperature on the mineralogical composition and phase transformations of bentonite samples from the south of Brazil. Our results showed that the montmorillonite peaks did not change after heating to a temperature of 500 °C [32], but the kaolinite peaks disappeared at the same temperature, suggesting the transformation of kaolinite into metakaolin by the effect of the loss of structural OH groups [37]. The XRD patterns of bentonite heated at 1000 °C displays only a quartz peak. Similar results were reported by Belkhiri et al. [38] and Tamaşan et al. [39], where heat treated bentonite revealed a glassy phase starting from 800 °C with a residual presence of quartz.

Recently, our team proposed that AFB₁ molecules can occupy most of the interlayer space in bentonite [8], which explains the protective effect on NC stem cells when submitted to damage caused by AFB₁. The interlayer space can be affected by thermal treatment [34,40]. Smectite, for example, collapses the basal spacing to less than 1.0 nm at 150 °C and higher temperatures [41]. Similarly, our results showed

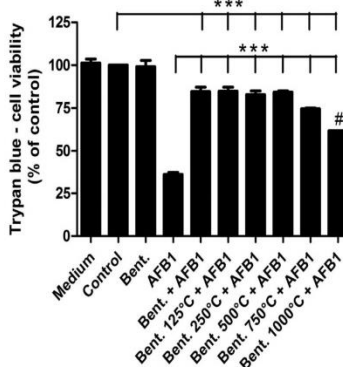


Fig. 5. Calcination of bentonite maintains the protective effect on NC cells when submitted to the damage caused by AFB₁. Secondary nasal trunk NC cell cultures were incubated with medium, DMSO (control group), 0.6 mg/mL of natural bentonite, 30 μM of AFB₁ or 0.6 mg/mL of bentonite (natural or calcined at 125, 250, 500, 750 and 1000 °C), concomitantly added with 30 μM of AFB₁. After 4 days of treatment, the cell viability was analyzed by trypan blue assay. The results represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm SEM. ***P < 0.05 compared to the control and AFB₁ group and #P < 0.05 compared to the bentonite treatment groups.

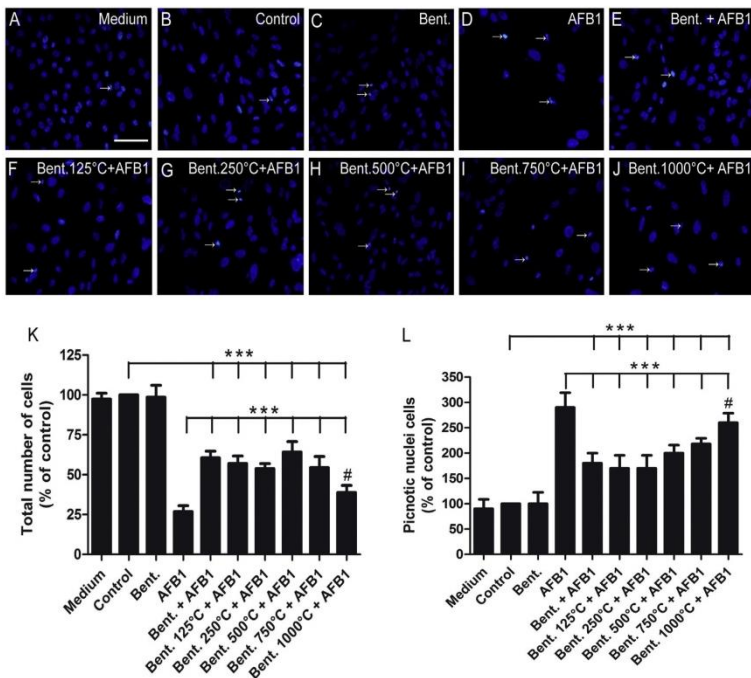


Fig. 6. Natural and thermal treatment of bentonites affects stem cell death. Secondary quail trunk NC cell cultures were incubated with medium, DMSO (control group), 0.6 mg/mL of natural bentonite, 30 μ M of AFB₁ or 0.6 mg/mL of bentonite (natural or calcined at 125, 250, 500, 750 and 1000 °C) concomitantly added with 30 μ M of AFB₁. After 4 days of treatment, the total number of cell nuclei was determined by DAPI staining (A–K) and cell death was analyzed by quantification of picnotic cells (A–J). The results represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm SEM. ****P* < 0.05 compared to the control and AFB₁ group and #*P* < 0.05 compared to the bentonite treatment group.

that the interlayer space was around 1.0 nm when the heat treatment temperature increased from 125 to 750 °C and broke at 1000 °C.

In our study, we observed that natural bentonite can effectively reduce aflatoxin toxicity (decreases 30% AFB₁-available). Temperatures greater than or equal to 500 °C cause rupture of the structure and thus decrease adsorption (less than 4% at a temperature of 1000 °C – by HPLC analyses). These findings are in accord with Aytas et al. [16], when bentonite was calcinated at 400 °C, the uranium adsorptive capacity is highest but decreases above 400 °C. Likewise, Stagnaro et al. [24] showed that the adsorption of Cd by native bentonite was reduced slightly by thermal treatments up to 450 °C and decreased strongly when the temperature applied to the solid was superior.

Recently, we have shown that bentonite could prevent cell death induced by AFB₁ [8], in which the effect is probably related to the adsorption capacity of this clay. Similarly, heat-treated bentonite (at 125 to 750 °C) was able to protect NC stem cells against AFB₁. No significant variation was observed for this treatment, demonstrating that calcinated bentonites are able to protect NC cells from damage caused by AFB₁. The treatment at 1000 °C also protects NC cells from death, however this treatment was lower when compared to other bentonites. Other factors may interfere with adsorption ability, like changes in the duration of calcination (greater than 4 h) or an increase in the calcination temperature [15,16]. Additionally, acids, and basic, organic and

metallic ion treatments [5,42,43] also need to be considered as alternatives that are able to maximize the adsorption capacity of the material and hence optimize the use and economic feasibility of bentonite in combating poisoning caused by mycotoxins or as alternatives in the production of new drugs.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Duo Translations for proofreading the manuscript; LCME-UFSC; Professor André Báfica for making the equipment facility (funded by Nanobiotec Capes) available to us. This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Ministério da Ciência e Tecnologia/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/ CNPq/ Brazil), MCT/INFRA (Brazil), PRONEX/CNPq, Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC, SC, Brazil).

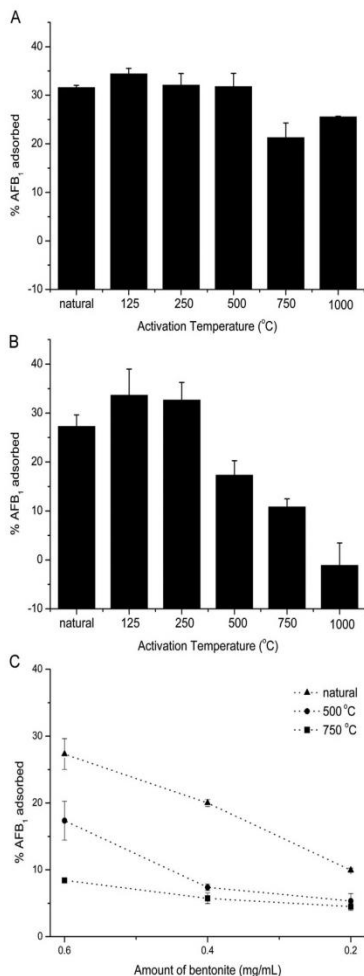


Fig. 7. Increasing calcination temperature on bentonite reduces the adsorption capacity of AFB₁. Natural bentonite or calcined (0.6 mg/mL) was added with 30 μM of AFB₁. After 24 h, the adsorption was analyzed by UV/visible (A); HPLC (B). Different concentrations of bentonite were also evaluated (C). The results represent the mean of three independent experiments performed in duplicate ± SEM.

References

- J. Nones, H.C. Riella, A.C. Trentin, J. Nones, Effects of bentonite on different cell types: a brief review, *Appl. Clay Sci.* 105–106 (2015) 225–230.
- I. Kannewischer, M.G.T. Arvide, G.N. White, J.B. Dixon, Smectite clays as adsorbents of aflatoxin B₁: initial steps, *Clay Sci.* 12 (2006) 199–204.
- S. Abbès, J.B. Salah-Abbès, M.M. Hetta, M. Ibrahim, M.A. Abdel-Wahhab, H. Bacha, R. Oueslati, Efficacy of Tunisian montmorillonite for in vitro aflatoxin binding and in vivo amelioration of physiological alterations, *Appl. Clay Sci.* 42 (2008) 151–157.
- S. Abbès, J.B. Salah-Abbès, K. Nahdi, R.B. Yunes, M.M. Hetta, A.A. El-Kady, M.A. Abdel-Wahhab, R. Oueslati, Inactivation of cadmium induced immunotoxicological alterations in rats by Tunisian montmorillonite clay, *Int. J. Immunopharmacol.* 7 (2007) 750–760.
- A. Dakovic, S. Matijasevic, G.E. Rottinghaus, D.R. Ledoux, P. Butkeraits, Z. Sekulic, Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite, *Colloids Surf. B* 66 (2008) 20–25.
- J.B. Dixon, I. Kannewischer, M.G.T. Arvide, A.L.B. Velazquez, Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: an introductory plan, *Appl. Clay Sci.* 40 (2008) 201–208.
- W.F. Jaynes, R.E. Zartman, W.H. Hudnall, Aflatoxin B₁ adsorption by clays from water and corn meal, *Appl. Clay Sci.* 36 (2007) 197–205.
- J. Nones, J. Nones, H.G. Riella, N.C. Kuhnen, A. Trentin, Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin, *Appl. Clay Sci.* 104 (2015) 119–127.
- N. Hanioka, Y. Nonaka, K. Saito, T. Negishi, K. Okamoto, H. Kataoka, S. Narimatsu, Effect of aflatoxin B₁ on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in HepG2 cells, *Chemosphere* 89 (2012) 526–529.
- W.B. Shim, H. Mun, H.A. Joong, J.A. Obiri, D.H. Chung, M.G. Kim, Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B₁ in corn samples, *Food Control* 36 (2014) 30–35.
- R.A. Tower, S.Y. Qian, M.B. Kadiscka, R.P. Mason, In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 1330–1340.
- G.M. Meissonnier, P. Pinton, J. Laffitte, A.M. Cossalter, Y.Y. Cong, P. Wild, G. Bertin, P. Galtier, I.P. Oswald, Immunotoxicity of aflatoxin B₁: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 231 (2008) 142–149.
- A. Hamidi, R. Mirnejad, E. Yahaghi, V. Behnad, A. Mirhosseini, S. Amani, S. Sattari, E.K. Darian, The aflatoxin B₁ isolating potential of two lactic acid bacteria, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (2013) 732–736.
- J. Nones, J. Nones, A. Trentin, The flavonoid hesperidin protects neural crest cells from death caused by aflatoxin B₁, *Cell Biol. Int.* 37 (2013) 181–186.
- E. Bojemueller, A. Nennemann, G. Lagaly, Enhanced pesticide adsorption by thermally modified bentonites, *Appl. Clay Sci.* 18 (2001) 277–284.
- S. Aytas, M. Yurtlu, R. Donat, Adsorption characteristic of U(VI) ion onto thermally activated bentonite, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 667–674.
- M.G. Vieira, A.F. Almeida Neto, M.L. Gimenes, M.G. da Silva, Removal of nickel on Bole bentonite calcined clay in porous bed, *J. Hazard. Mater.* 176 (2010) 109–118.
- K. Emmerich, Spontaneous rehydroxylation of a dehydroxylated *cis*-vacant montmorillonite, *Clay Clay Miner.* 48 (2000) 405–408.
- Y. Sariyaka, M. Onal, B. Baran, T. Alendraglu, The effect of thermal treatment on some of the physicochemical properties of a bentonite, *Clay Clay Miner.* 48 (2000) 557–562.
- S.Y.M. Stagnaro, C. Volzone, M.L. Rueda, Influence of thermal treatment on bentonite used as adsorbent for Cd, Pb, Zn retention from mono-solute and poly-solute aqueous solutions, *Mater. Res.* 15 (2012) 1–5.
- Y.E. Moudalhir, A. Elmcharawi, R. Mahboub, A. Gil, S.A. Korli, Equilibrium modeling for the adsorption of methylene blue from aqueous solutions on activated clay minerals, *Desalination* 250 (2010) 335–338.
- R.M.T. Sánchez, M.J. Genet, E.M. Gaigneaux, M.S. Alfonso, S. Yunes, Benzimidazole adsorption on the external and interlayer surfaces of raw and treated montmorillonite, *Appl. Clay Sci.* 53 (2011) 366–373.
- M.S. Yilmaz, Y. Kalpakci, S. Piskin, Thermal behavior and dehydroxylation kinetics of naturally occurring sepiolite and bentonite, *J. Therm. Anal. Calorim.* 114 (2013) 1191–1199.
- S.Y.M. Stagnaro, M.L. Rueda, C. Volzone, J. Ortiga, Structural modification of a lamellar solid by thermal treatment. Effect on the Cd and Pb adsorptions from aqueous solution, *Procedia Mater. Sci.* 1 (2012) 180–184.
- A. Trentin, C. Glavieux-Pardanaud, N.M. Le Douarin, E. Dupin, Self-renewal capacity is a widespread property of various types of NC precursor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 4495–4500.
- J. Nones, A.P. Costa, R.B. Leal, F.A. Gomes, A.C. Trentin, The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival, *Cell Tissue Res.* 350 (2012) 305–315.
- H. Youn, J.C. Jeong, Y.S. Jeong, E.J. Kim, S.J. Um, Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor- κ B signaling in h460 lung cancer cells, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (2013) 944–951.
- S. Al-Asheh, F. Banat, L. Abu-Aitah, Adsorption of phenol using different types of activated bentonites, *Sep. Purif. Technol.* 33 (2003) 1–10.
- C. Bertagnonli, S.J. Kleinbim, G.M.C. da Silva, Preparation and characterization of a Brazilian bentonite clay for removal of copper in porous beds, *Appl. Clay Sci.* 53 (2011) 77–79.
- C. He, E. Makovicky, B. Osback, Thermal stability and pozzolanic activity of raw and calcined mixed-layer mica/smectite, *Appl. Clay Sci.* 17 (2000) 141–161.
- R. Pfrkryl, Z. Weisshauptová, Hierarchical porosity of bentonite-based buffer and its modification due to increased temperature and hydration, *Appl. Clay Sci.* 47 (2010) 163–170.
- M. Holtzer, A. Bobrowski, S. Zymankowska-Kumon, Temperature influence on structural changes of foundry bentonites, *J. Mol. Struct.* 1004 (2011) 102–108.
- O. Zuzana, M. Annamária, D. Silvia, B. Jaroslav, Effect of thermal treatment on the bentonite properties, *Abh. Teh. Nauky* 7 (2012) 49–56.
- L.F. Gótic, V.F. Freitas, I.A. Santos, M. Barabach, F.J. Análisi, R.Y. Miyahara, P.W.C. Sarvezcu, Cobalt-modified Brazilian bentonites: preparation, characterisation, and thermal stability, *Appl. Clay Sci.* 51 (2011) 187–191.
- V. Vimonos, B. Jin, C.W.K. Chow, C. Saint, Enhancing removal efficiency of anionic dye by combination and calcination of clay materials and calcium hydroxide, *J. Hazard. Mater.* 171 (2009) 941–947.

- [36] L. Zeng, S. Wang, X. Peng, J. Geng, C. Chen, M. Li, Al-Fe PILC preparation, characterization and its potential adsorption capacity for aflatoxin b1, *Appl. Clay Sci.* 83–84 (2013) 231–237.
- [37] A.M. Rashid, Metakaolin as cementitious material: history, scours, production and composition, *Constr. Build. Mater.* 41 (2013) 303–318.
- [38] S. Belkhir, M. Guenza, S. Chouikh, Y. Boucheffa, Z. Mekhalif, J. Delhalle, C. Colella, Textural and structural effects of heat treatment and γ -irradiation on Cs-exchanged NaX zeolite, bentonite and their mixtures, *Microporous Mesoporous Mater.* 161 (2012) 115–122.
- [39] M. Tamişan, A. Vulpoş, E. Vanea, V. Simon, Textural properties of the medical Algo clay as influenced by calcination, *Appl. Clay Sci.* 50 (2010) 418–422.
- [40] L. Li, J. Dong, R. Lee, Preparation of α -alumina-supported mesoporous bentonite membranes for reverse osmosis desalination of aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 273 (2004) 540–546.
- [41] Y. Deng, A.L.B. Velázquez, F. Billes, J.B. Dixon, Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite, *Appl. Clay Sci.* 50 (2010) 92–98.
- [42] P. Komadel, J. Madejová, Acid activation of clay minerals, in: F. Bergaya, B.K.G. Theng, G. Lagaly (Eds.), *Handbook of Clay Science*, Elsevier, Amsterdam 2006, pp. 263–287.
- [43] A.E.I. Elkhalfah, S. Maitra, M.A. Bustam, T. Murugesan, Effects of exchanged ammonium cations on structure characteristics and CO₂ adsorption capacities of bentonite clay, *Appl. Clay Sci.* 83–84 (2013) 391–396.

ANEXO D

International Journal of Applied Research and Technology (IJRT)
ISSN 2277-0585

<http://www.esxpublishers.com/index.php/journals>

(IJRT is now indexed in: , DOAJ, Open J Gate, Electronic Journal Library, New Jour, Science central.com, Ulrichs web, Dayang Journal System and many more under processing)

Acceptance Letter

Title: **Calcination of Brazilian Bentonite Affects Its Structural Properties and Reduces Ability to Bind AFB₁.**

Edition: Vol. 5, No. 4; April 2016

Dear Author,

We are pleased to inform you that your manuscript is accepted for publication in the next edition of International Journal of Applied Research and Technology which is published by Exxon Publishers, USA.

With Regards,

Professor W. P. Simmons

Editor-in-Chief

International Journal of Applied Research and Technology

CALCINATION OF BRAZILIAN BENTONITE AFFECTS ITS STRUCTURAL PROPERTIES AND REDUCES ABILITY TO BIND AFB₁

Authors: Janaína Nones¹; Jader Nones²; Humberto Gracher Riella¹; Anicleto Poli³; Nivaldo Cabral Kuhnen¹

Address:

¹Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

²Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

³Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

- **Keywords:** Bentonite, thermally modified, adsorption, aflatoxin B₁, textural properties, thermal analysis

22 Pages

4.161 Words

04 Figures

#Corresponding author:

Dr. Jader Nones

Address: Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Phone: 55 48 3721-4738/ 9915-0819

Email: jadernones@gmail.com

Financial Support: CNPq, CAPES

Running title: adsorption of aflatoxins, structural modification of bentonite by thermally treated, structural characteristics of bentonite and its influence on adsorption of mycotoxins

Highlights

- Thermal stabilities of bentonite changes after calcination;
- Calcination reduces surface area of bentonites and increases pore diameter and particle size distribution;
- Thermally modified bentonite decreased maximum adsorption capacity of aflatoxin B₁.

Abstract

Clays, such as bentonites, have been efficient mycotoxin sequestering agents when included in animal feed. The ability of bentonite particles to adsorb mycotoxins (e.g. aflatoxin B₁ - AFB₁) depends on their structural characteristics, which can be affected by thermal treatment. Therefore, the aim of this study was to evaluate how temperature (125 until 1000°C) may affect phase transformation, texture, and particle size distribution of Brazilian bentonite, as well as the adsorption of AFB₁. Through thermal analysis, our results have shown that bentonite samples reduced water loss (by dehydration and dehydroxylation process), 5% for natural bentonite and less than 1% for bentonite treated up to 1000°C. Therefore, the temperature treatments (125 to 1000°C) have decreased pore volume, surface area and increased pore diameter. Mean distribution of natural bentonite particle size was 19.96 μm, which increased to 26.08, 28.15 and 30.73 μm, for bentonite treated at 500, 750 and 1000°C, respectively. The structural changes of bentonites affected its maximum AFB₁ adsorption capacity (Q_{max}). Natural bentonite showed higher Q_{max} (0.60 mol kg⁻¹) and this value reduced to 0.29 and 0.13 mol kg⁻¹ for bentonite treated at 500 and 750°C, respectively. Our results help understand the bentonite-aflatoxin binding mechanism, which can minimize the harmful effects of these contaminants when added to animal and human diets.

1. Introduction

Mycotoxin contaminated feed can cause serious diseases to farm animals, which might suffer and even die, resulting in substantial financial impact (Huwig et al., 2001; Juan-García et al., 2013; Smith and Girish, 2012). Among all mycotoxins, aflatoxin B₁ (AFB₁) is considered the most potential toxic substance (Armorini et al., 2015; Georgiadou et al., 2012; Shim et al., 2014).

AFB₁ is produced by *Aspergillus*. When present in feed, it can cause damages to embryonic development (Nones et al., 2013; 2015a) and affect animal performance, immune function and productivity in farms (Juan-García et al., 2013; Nones et al., 2014). In some cases, pathological effects in organs and tissues can be noted, mainly in the liver and kidney (Lu et al., 2013).

Some measures have been adopted to avoid those negative effects of aflatoxins, including the addition of clay, such as bentonites, in animal feed. Bentonite clay is an absorbent aluminum phyllosilicate, abundantly found in nature. Its low cost and great availability makes it a good option for such purpose (Nones et al., 2015 a,b). Bentonite is the most commonly used manner of protecting animals against the harmful effects of contaminated feed (Abbès et al., 2010; Devreese et al., 2012; Huwig et al., 2001; Jaynes et al., 2007; Marroquín-Cardona et al., 2011; Nones et al., 2015 a,c; Pappas et al., 2014) due to its ability to sequester toxins (e.g. AFB₁) from the gastrointestinal tract (Daković et al., 2005; Pappas et al., 2014).

The structure and properties of bentonites can be modified by heating (Heller-Kallai, 2013; Nones et al., 2015c; Noyan et al., 2008; Tan et al., 2004; Zivica and Palou, 2015). The temperature can collapse its structure (Sabir et al., 2001; Toor et al., 2015) and alter its surface area, pore and interlayer water (Heller-Kallai, 2013; Noyan et al., 2006). This fact may affect its adsorption capacity (Bertagnolli et al., 2011; Mulder et al., 2008; Nones et al., 2015c). Therefore, the aim of this present research was to assess the physical and chemical changes, due to thermal treatment, of the properties (phase transformation, texture, particle size distribution) of bentonite extracted from the South region of Brazil, as well as how it may affect maximum AFB₁ adsorption capacity.

Our results showed that temperature affects the structure of bentonite, including changes in water interlayer space, surface area, pore diameter and particle size distribution. All of these changes have affected the AFB₁ adsorption capacity of bentonite. Despite the fact that the thermal treatment did not increase the adsorption capacity of bentonite, our results should provide some understanding on the adsorption effect of natural bentonite, which is important against the harmful effects of mycotoxins on human and animal diets.

2. Material and Methods

2.1 Bentonite samples

Bentonite samples were collected in the city of Criciúma, located in the state of Santa Catarina, in Brazil. The samples were washed with distilled water to remove any impurities and were dried in an electric oven at 60°C for 8 hours. Bentonite calcination temperatures were 125, 250, 500, 750 and 1000°C for 4 hours, as described by Nones et al. (2015c). Afterwards, bentonite samples were diluted in water for the analysis of adsorption. AFB₁ (Sigma) was kept in a stock solution of acetonitrile at 500 µM. For the analysis of adsorption, AFB₁ was diluted in water at 0.1, 1, 3, 10 and 30 µM.

2.2 Characterization of samples

2.2.1 Thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry

Thermal stability and phase transformations of bentonite samples were analyzed by thermogravimetric analysis (TGA), Differential Thermal Analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) (Netzsch's STA 449F3 - Jupiter). The samples were prepared in aluminum holders and measurements were performed from 25 to 1000°C, with a heating rate of 20°C/min.

2.2.2 Textural analysis

Specific surface areas were determined by N₂ adsorption-desorption (Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area analysis using automated Quantachrome Instruments (Autosorb-1). The samples were out-gassed at 250°C for 12 hours under nitrogen prior to adsorption measurement with the multi-point method. Pore distributions and pore volume were calculated using the adsorption branch of the N₂ isotherms based on the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) pore size analyzer.

2.2.3 Particle size distribution

Bentonite particle size distribution was determined by laser diffraction/scattering particle size analysis (Cilas 1064). Greatly diluted suspensions (about 0.1 wt.% of solids) were added into the instrument,

which were conditioned with dispersants and dispersed in ultrasound for 60 s.

2.2.4 AFB₁ isothermal adsorption by bentonite

Adsorption of AFB₁ molecules was assessed by isothermal adsorption assay and analyzed using the Langmuir equation (Nones et al., 2015a). Bentonite samples were added to 200 μL of AFB₁-solution (0.1, 1, 3, 10, 30 μM) and left in solution with concentration of 0.6 mg/mL. Samples were stored overnight and then centrifuged (1500 CFN-II Vision) at 4000 rpm for 30 min. The amount of adsorbed AFB₁ was determined in the supernatant by HPLC analysis. An aliquot of the original AFB₁ test solution was used as HPLC standard. HPLC analyses were performed on a Waters e2795 AllianceBio Separation Module composed of a quaternary pump with a refrigerated autosampler coupled to a Waters 2475 fluorescence detector ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$). The column was a Polaris C18A, Metachem, with 5 μm particle size, 150 mm × 4.6 mm, protected by an Alltech 20 × 2 mm guard column. The mobile phase water: acetonitrile (50:50) was pumped at a flow rate of 0.7 mL/min. Chromatograms were obtained and integrated with the Empower® 2 software (Waters Co). Percent AFB₁ bound by the bentonites was calculated from the difference between the initial and final AFB₁ concentrations in the aqueous supernatant after equilibrium. The adsorption capacity was evaluated by plotting the adsorption data using the linear form of the Langmuir equation:

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{k_d Q_{max}} + \frac{C_{eq}}{Q_{max}}$$

First, Q_{max} and k_d were determined, where C_{eq} is the equilibrium concentration, q is the amount of AFB₁ adsorbed, k_d is a distribution coefficient, and Q_{max} the maximum adsorption capacity.

3. Results

3.1 Calcination provides phase transformations in the dehydration and dehydroxylation

In order to investigate the effects of temperature in bentonite samples, thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning

calorimetry (DSC) and differential thermal analysis (DTA) assays were determined (**Fig. 01**).

A total mass loss of around 5% was found for natural bentonite in the TGA analysis (**Fig. 01 A**). Similar results were observed for bentonite treated at 125 and 250°C, where mass losses were 7.04 and 5.11%, respectively (**Fig. 01 B-C**). A lower value mass loss was found at temperatures above 500°C (around 2%), reaching its minimum value at 1000°C (less than 1%) (**Fig. 01 D-F**).

The Differential Thermal Analysis (DTA) analysis showed two significant peaks of mass loss (**Fig. 01 A-D**). The first peak of mass loss, at around 88°C, refers to the loss of water by dehydration. The second mass loss was around 489°C and most likely corresponds to the typical dehydroxylation of minerals, which causes structural alterations.

Corroborating the results obtained by DTA, it was possible to observe characteristic peaks of dehydration (around 60°C) and dehydroxylation (around 480°C) by DSC curves (**Fig. 01 A-F**).

3.2 Temperature changes surface area and pore size of bentonite

Table 01 shows differences in the textural properties of the bentonite samples. The specific surface area of the natural bentonite ($30.10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) decreased after thermal treatment (until $2.16 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). However, mean pore diameter increased, changing from 8.80 to 37.67 nm, for natural and treated bentonite (1000°C), respectively. Furthermore, the pore volume of the bentonite samples slightly decreased.

Nitrogen adsorption–desorption isotherms for the natural bentonite and sample prepared at different temperatures were analyzed. All of the samples yielded type IV isotherms, which are indicative of mesoporous materials. As shown in **Fig. 02 A**, increased calcination temperature decreases the volume of adsorbed nitrogen.

The pore size distribution of bentonite samples showed a maximum distribution at a pore radius of 3.6 nm (**Fig. 02 B**). A slight change was observed in the heights of pore size distribution (natural, 125, 250, 750°C), with a slight decrease at 500 °C. The calcination of bentonite at 1000°C decreased the heights of the maxima in the pore size distribution curves.

Fig. 02 C displays the multipoint BET plots. The 0.05 to 0.26 linearity range of data over relative pressure (P/P_0) is suitable for the BET analysis to determine the textural properties of bentonite samples.

3.3 Average particle size distribution of bentonite increases by calcination

Particle size distribution (PSD) of natural bentonite and thermal treatment bentonites were also investigated and displayed in **Fig. 03 A-F**. The distributions are presented in particle accumulation (undersize) and particle distribution in the range. PSD of natural bentonite and thermal treatment samples (125 to 1000°C) showed that the latter (1000°C) contained slightly coarser particles compared to the former (125°C).

The average distribution of the particle size of natural bentonite was in the range of 19.96 µm, while with the treatment there are fine grains of bentonite mainly distributed around 1.59 and 12.79 µm (**Fig. 03 A**).

Heat treatment at 125°C and 250°C slightly affected the mean distribution of particle size, which was 20.11 µm and 20.83 µm, respectively (**Fig. 03 B-C**). However, thermal treatment caused an increase in the mean distribution of particle size to 26.08, 28.15 and 30.73 µm, for bentonite treated at 500, 750 and 1000°C, respectively (**Fig. 03 D-F**).

3.4 Thermal treatment of bentonite affects its ability to bind AFB₁

Chromatographic assays were performed to quantify the AFB₁ adsorption of the bentonite samples. For this purpose, chromatography conditions were standardized (mobile phase, flow, wavelength) and adapted to polarity and the characteristics of the column and AFB₁. The chromatogram of AFB₁ standard is shown in **Fig. 04 A**, which was characterized by retention times of 3.7 min. The calibration curve for AFB₁ was obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area (n = 2) versus AFB₁ concentrations (0.1, 1, 3, 10, 30 µM) (**Fig. 04 B**). Through this analysis, it was possible to observe a good linearity of the calibration curve (linearity coefficient $R^2 = 0.9991$) for AFB₁.

After these parameters had been established, different concentrations of AFB₁ were exposed to natural and thermally treated bentonites (500 and 750°C). Adsorption of AFB₁ was evaluated by fitting the data points collected for experimental analysis using the Langmuir model (**Fig. 04 C**).

Maximum adsorption capacity (Q_{\max}) for natural bentonite was 0.60 mol kg^{-1} and 0.29 and 0.13 mol kg^{-1} for bentonite treated at 500 and 750°C , respectively.

4. Discussion

The results reported in this research demonstrated the structure, surface area, pore size and particle distribution of bentonite affected by thermal treatment. These physico-chemical changes have also affected the maximum adsorption capacity of AFB_1 .

We have recently demonstrated that Brazilian bentonite is efficient to adsorb AFB_1 (Nones et al., 2015 a,c). Furthermore, we suggested that aflatoxin molecules occupied the interlayer space of montmorillonite (a clay mineral that is the main component of bentonite), probably forming complexes with metals. In this study, we have assessed the structural parameters of bentonite, modified by thermal treatment, and how they have affected mycotoxin binding with AFB_1 .

Thermogravimetric analysis (TGA/DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) are used to provide a better understanding of water loss content due to the calcination of clays (Taylor-Lange et al. (2014). Our results showed two endothermic peaks (DTG / DSC) of water loss, the first at around $60\text{-}88^{\circ}\text{C}$ and the second at $480\text{-}488^{\circ}\text{C}$. According to Daković et al. (2008) and Vieira et al. (2010), the first endothermic peak refers to the loss of physisorbed water and water molecules bound to the interlayer cations elements (dehydration), volatile compounds and organic material. The second endothermic peak was probably associated with the dehydroxylation of the layer silicate minerals (Daković et al. 2008; Vieira et al. 2010). Likewise, the second endotherm peak shown in DSC analysis (around 400 to 750°C) also indicates the dehydroxylation of the bentonite (Zivica and Palou, 2015).

Thermal analysis has shown that the higher the calcination temperature of bentonite, the lower amount of water present in the samples. Similar results were reported by Taylor-Lange et al. (2014), when montmorillonite was calcined at 830°C resulted in over a 90% reduction in the endothermic valley area relative to non-calcined samples.

Desorption of interlayer water of clays closes the interlayer spaces and causes a denser packing of the particles and consequently decreased the specific surface area (Bojemueller et al., 2001; Noyan et al., 2006, Souri et al., 2015). The specific surface area decreased

drastically on calcination from 650 to 930°C, due to the increasing agglomeration of illite (a type of clay minerals) (He et al., 1995). Corroborating with these results, we found that the surface area of the natural bentonite ($30.10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) decreases after thermal treatment over 500°C (reaching $2.16 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ at 1000°C).

The porosity of clay mineral aggregates are closely linked to their water content

(Heller-Kallai, 2013; Toor et al., 2015). In accordance with results described by Basoglu and Balci (2010), we found that the mean mesopore diameters of all samples varied from 3.54 to 3.92 nm. After the thermal treatment, a decrease in the adsorbed volume of bentonite occurred, due to pore contraction or collapse (Yılmaz et al., 2013). Furthermore, it is possible to consider that calcination may have increased clay microporosity, expanding the micropores, by releasing bond water, originating mesopore-type (Vieira et al., 2010).

Likewise, particle size distribution (PSD) of bentonite was affected by increases in calcination temperature. Such increases in PSD are associated with particle agglomeration (He et al., 2000), suggesting that smectite layers would become less accessible to the AFB₁ molecules, which enter the interlayer spaces (Mulder et al., 2008). Maximum adsorption capacity of these particles was determined (by Langmuir model) to confirm that structural parameters of bentonite may affect the ability to bind AFB₁.

We have recently shown that the amount of bentonite in contact with AFB₁ affects the percentage of AFB₁ adsorbed. In that study, we showed that interlayer space and the amount of water present in the samples also affects the amount of adsorbed AFB₁ (Nones et al., 2015c). These findings support the idea that aflatoxin molecules occupy the interlayer space of montmorillonite (Nones et al., 2015a).

We showed that the thermal treatment reduced the Q_{max} of natural bentonite to 0.60 for 0.13 mol kg^{-1} (bentonite treated at 750°C). Although bentonite treated at 750°C is not considered a good AFB₁ adsorbent, according to criteria proposed by Dixon et al. (2008), which considers that a good AFB₁ adsorbent need to have Q_{max} higher than 0.3 mol kg^{-1} .

In despite of this, the information we obtained on the structure of this material indicates that higher surface area, lower pore size and particle size and higher amount of water in interlayer space, probably increase the ability of bentonite to bind the mycotoxin AFB₁. Therefore, the choice of effective treatments that can improve these specific

characteristics of bentonite are crucial to expand the application of this material to prevent the toxic effects of mycotoxins.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Duo Translations for proofreading the manuscript; Professor André Báfica for making the equipment facility (funded by Nanobiotec Capes) available to us. This study has been supported by grants provided by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), Ministry of Science and Technology/ The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (MCT/CNPq/Brazil) and The Santa Catarina State Support Foundation for Research (FAPESC, SC, Brazil).

Tables

Table 01. Textural properties of natural and thermally treated bentonite.

Bentonite	Specific surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Average pore diameter (nm)	Pore volume ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)
Natural	30.10	8.80	0.066
125°C	29.47	8.93	0.066
250°C	29.21	9.64	0.070
500°C	25.89	9.40	0.061
750°C	20.02	12.39	0.062
1000°C	2.16	37.61	0.020

Legends

Figure 01. Calcination provides phase transformations in the dehydration and dehydroxylation. After thermal treatment, bentonite particles were analyzed by thermogravimetric analysis. Natural (A), 125°C (B), 250°C (C), 500°C (D), 750°C (E) and 1000°C (F).

Figure 02. Temperature changes surface area and pore size of bentonite. The samples were out-gassed at 250°C for 12 hours under nitrogen prior to adsorption measurement with the multi-point method. After this, nitrogen adsorption–desorption isotherms (A), pore size distributions (B) and multipoint BET plot (C) were determined.

Figure 03. Average particle size distribution of bentonite increases by calcination. The particle size distribution of bentonites was determined by laser diffraction/scattering particle size analysis. Natural (A), 125°C (B), 250°C (C), 500°C (D), 750°C (E) and 1000°C (F).

Figure 04. Thermal treatment of bentonite changes its ability to bind AFB₁. Natural bentonite or calcined (500 and 750°C) was added with AFB₁ (0.1, 1, 3, 10, 30 µM). HPLC chromatograms of an AFB₁ standard (A), calibration curves for AFB₁ (B) and adsorption isotherms of AFB₁ by bentonite samples (C) was determined after 24 hours. Results represent the mean of duplicate experiments ± SEM.

References

- Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Abdel-Wahhab, M.A., Ouslati, R. (2010). Immunotoxicological and biochemical effects of aflatoxins in rats prevented by Tunisian montmorillonite with reference to HSCAS, *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, 32, 514-522.
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A., Roncada, P. (2015). Occurrence of aflatoxin B1 in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling, *Food Control*, 50, 858-863.
- Basoglu, F.T., Balci, S. (2010). Micro-mesopore analysis of Cu²⁺ and Ag⁺ containing Al-pillared bentonite, *Appl. Clay Sci*, 50, 73-80.
- Bertagnolli, C., Kleinübing, S.J., Silva, M.G.C. (2011). Preparation and characterization of a Brazilian bentonite clay for removal of copper in porous beds, *Appl. Clay Sci*, 53, 73-79.
- Bojemueller, E., Nennemann, A., Lagaly, G. (2001). Enhanced pesticide adsorption by thermally modified bentonites, *Appl. Clay Sci*, 18, 277-284.

Daković, A., Matijašević, S., Rottinghaus, G.E., Ledoux, D.R., Butkeraitis, P., Sekulić, Ž. (2008). Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite, *Colloids Surfaces B*, 66, 20-25.

Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Dondur, V., Rottinghaus, G.E., Medaković, V., Zarić, S. (2005). Adsorption of mycotoxins by organozeolites, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 46, 20-25.

Devreese, M., Osselaere, A., Goossens, J., Vandenbroucke, V., Baere, S., Backer, P., Croubels, S. (2012). Interaction between tylosin and bentonite clay from a pharmacokinetic perspective, *Vet J.*, 194, 437-439.

Dixon, J.B., Kannewischer, I., Arvide, M.G.T., Velazquez, A.L.B. (2008). Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: an introductory plan, *Appl Clay Sci*, 40, 201-208.

Georgiadou, M., Dimou, A., Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: a farm to storage study, *Food Control*, 26, 580-586.

He, C., Makovicky, E., Osbaeck, B. (1995). Thermal stability and pozzolanic activity of calcined illite, *Appl. Clay Sci*, 9, 337-354.

He, C., Makovicky, E., Osbæck, B. (2000). Thermal stability and pozzolanic activity of raw and calcined mixed-layer mica/smectite, *Appl. Clay Sci*, 17, 141-161.

Heller-Kallai, L. (2013). Thermally Modified Clay Minerals. In: Bergaya, F., Lagaly G. (Eds) Handbook of Clay Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 411-433.

Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents, *Toxicol Lett*, 122, 179-188.

Jaynes, W.F., Zartman, R.E., Hudnall, W.H. (2007). Aflatoxin B₁ adsorption by clays from water and corn meal, *Appl Clay Sci*, 36, 197-205.

Juan-García, A., Manyes, L., Ruiz, M.J., Font, G. (2013). Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review, *Food Chem Toxicol*, 56, 40-59.

Lu, J.W., Yang, W.Y., Lin, Y.M., Jin, S.L.C., Yuh, C.H. (2013). Hepatitis B virus X antigen and aflatoxin B1 synergistically cause hepatitis, steatosis and liver hyperplasia in transgenic zebrafish, *Acta Histochem*, 115, 728-739.

Marroquín-Cardona, A., Deng, Y., Garcia-Mazcorro, J.F., Johnson, N.M., Mitchell, N.J., Tang, L., Robinson, A., Taylor, J.F., Wang, J.S., Phillips, T.D. (2011). Characterization and safety of uniform particle size NovaSil clay as a potential aflatoxin enterosorbent, *Appl Clay Sci*, 54, 248-257.

Mulder, I., Velazquez, A.L.B., Arvide, M.G.T., White, G.N., Dixon, J.B. (2008). Smectite clay sequestration of aflatoxin b: particle size and morphology, *Clay Clay Miner*, 56, 558-570.

Nones, J., Nones, J., Riella, H.G., Kuhnen, N.C., Trentin, A. (2015a). Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin B1, *Appl Clay Sci*, 104, 119-127.

Nones, J., Nones, J., Riella, H.G., Poli, A., Trentin A.G., Kuhnen, N.C. (2015c). Thermal treatment of bentonite reduces aflatoxin b₁ adsorption without affecting stem cell death, *Mat Sci Eng C*, 55, 530-537.

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, 7-13.

Nones, J., Nones, J., Trentin, A. (2013). Flavonoid hesperidin protects neural crest cells from death caused by aflatoxin B₁, *Cell Biol Int*, 37, 181-186.

Nones, J., Riella, H.G., Trentin, A.G., Nones, J. (2015b). Effects of bentonite on different cell types: A brief review, *Appl Clay Sci*, 105-106, 225-230.

Noyan, H., Onal, M., Sarikaya, Y. (2006). The effect of heating on the surface area, porosity and surface acidity of a bentonite, *Clay Clay Miner*, 54, 375-381.

Noyan, H., Önal, M., Sarkaya, Y. (2008). Thermal deformation thermodynamics of a smectite mineral, *J Therm Anal Calorim*, 91, 299-303.

Pappas, A.C., Tsiplakou, E., Georgiadou, M., Anagnostopoulos, C., Markoglou, A.N., Liapis, K., Zervas, G. (2014). Bentonite binders in the presence of mycotoxins: results of *in vitro* preliminary tests and an *in vivo* broiler trial, *Appl Clay Sci*, 99, 48-53.

Sabir, B.B., Wild, S., Bai, J. (2001). Metakaolin and calcined clays as pozzolans for concrete: a review, *Cement Concrete Comp*, 23, 441-454.

Shim, W.B., Mun, H., Joung, H.A., Ofori, J.A., Chung, D.H., Kim, M.G. (2014). Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B1 in corn samples, *Food Control*, 36, 1-30.

Smith, T.K., Girish, C.K. (2012). Prevention and control of animal feed contamination by mycotoxins and reduction of their adverse effects in livestock. In: *Gremmels F.* (Eds) *Animal Feed Contamination*, Elsevier, Amsterdam, pp. 326–351.

Souri, A., Fard, F.G., Naghizadeh, R., Veisheh, S. (2015). An investigation on pozzolanic activity of Iranian kaolins obtained by thermal treatment, *Appl Clay Sci*, 103, 34-39.

Tan, O., Yilmaz, L., Zaimoglu, A.S. (2004). Variation of some engineering properties of clays with heat treatment, *Mater Lett*, 58, 1176-1179.

Taylor-Lange, S.C., Rajabali, F., Holsomback, N.A., Riding, K., Juenger, M.C.G. (2014). The effect of zinc oxide additions on the performance of calcined sodium montmorillonite and illite shale supplementary cementitious materials, *Cement Concrete Comp*, 53, 127-135.

Toor, M., Jin, B., Dai, S., Vimonses, V. (2015). Activating natural bentonite as a cost-effective adsorbent for removal of Congo-red in wastewater, *J Ind Eng Chem*, 21, 653-661.

Vieira, M.G.A., Almeida Neto, A.F., Gimenes, M.L., Silva, M.G.C. (2010). Removal of nickel on bofe bentonite calcined clay in porous bed, *J Hazard Mater*, 176, 109-118.

Yılmaz, M.S., Kalpaklı, Y., Piskin, S. (2013). Thermal behavior and dehydroxylation kinetics of naturally occurring sepiolite and bentonite, *J Therm Anal Calorim*, 114, 1191-1199.

Zivica, V., Palou, M.T. (2015). Physico-chemical characterization of thermally treated bentonite, *Compos Part B- Eng*, 68, 436-445.

Figure 1

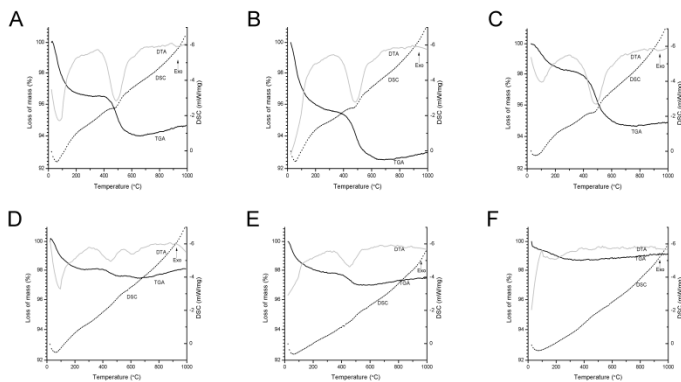
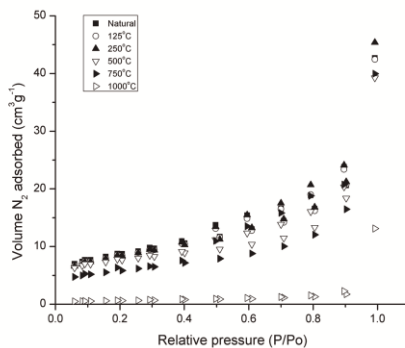
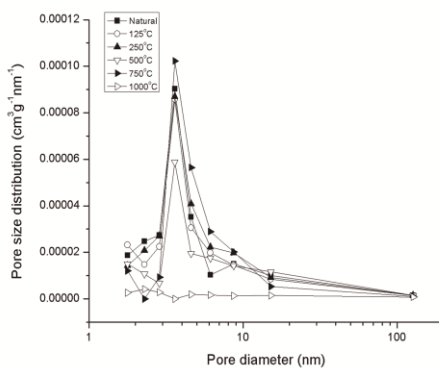


Figure 2

A



B



C

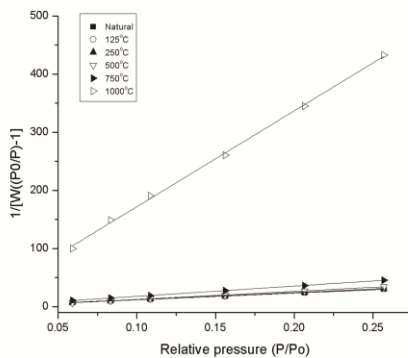


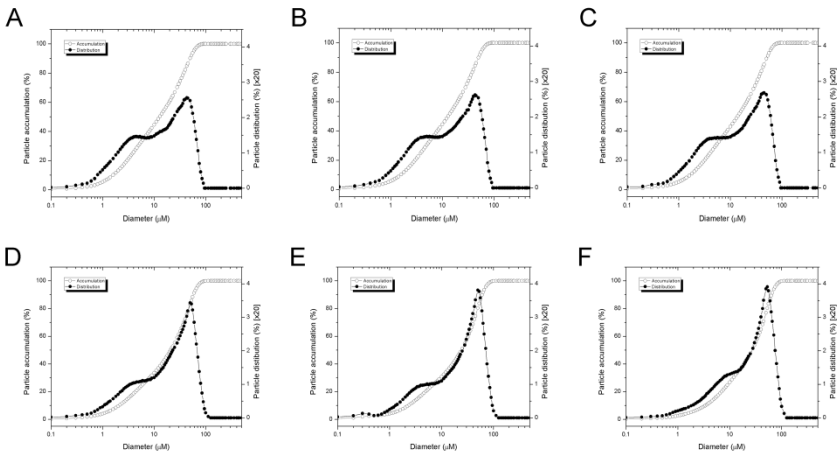
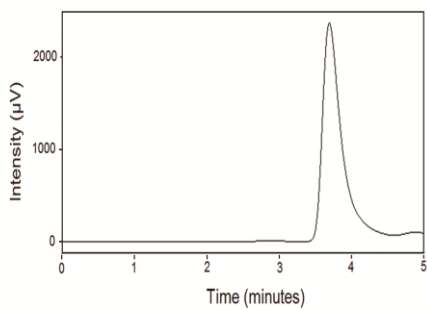
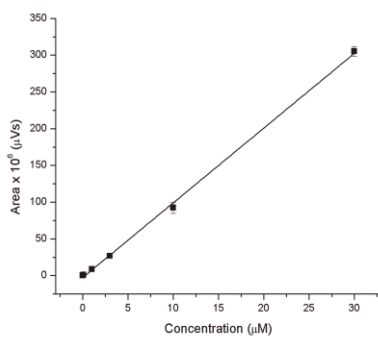
Figure 3

Figure 4

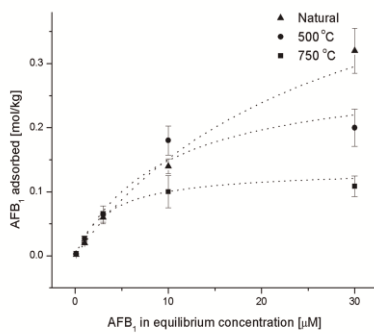
A



B



C



ANEXO E

Assunto **Your recent submission to COLSUB**
De Colloids and Surfaces B
<esubmissionssupport@elsevier.com>
Remetente <ees.colsub.0.377bfe.e6af907a@eesmail.elsevier.com>
Para <janaina.nones@posgrad.ufsc.br>
Data 22.02.2016 14:27



Dear Dr. Janaina Nones,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces
Corresponding Author: Jader Nones
Co-Authors: Janaina Nones; Anicleto Poli; Andrea G Trentin; Humberto G Riella; Nivaldo C Kuhnen
Title: ORGANOPHILIC TREATMENTS OF BENTONITE INCREASE THE ADSORPTION OF AFLATOXIN B1 AND PROTECTS STEM CELLS AGAINST CELLULAR DAMAGE

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at jadernones@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/colsub/1.asp?i=114225&l=XL4QV5IT>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

ORGANOPHILIC TREATMENTS OF BENTONITE INCREASE THE ADSORPTION OF AFLATOXIN B₁ AND PROTECTS STEM CELLS AGAINST CELLULAR DAMAGE

Authors: Janaína Nones¹; Jader Nones²; Anicleto Poli³; Andrea Gonçalves Trentin²; Humberto Gracher Riella¹; Nivaldo Cabral Kuhnen¹

Address:

¹ Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

² Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

³ Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

- **Keywords:** Bentonite, surfactant, organo-clay, adsorption, aflatoxin B₁, cellular survival, stem cells.

22 Pages

5.498 Words

06 Figures

#Corresponding author

Dr. Jader Nones

Address: Department of Cell Biology, Embryology and Genetics,
Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Tel.: 55 48 3721-4738/ 9915-0819

E-mail: *jadernones@gmail.com*

Financial Support: CNPq, INNT, FAPESC, and CAPES

Running title: bentonite, organo-bentonite, aflatoxin B₁, adsorption, stem cells

Highlights

- Organophilic treatments of bentonite with benzalkonium chloride (BAC) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) increased AFB₁ adsorption;
- The organophilic treatments were more efficient at 2% concentration of BAC and CTAB than at 6% concentration, and at 30°C than at 60°C;
- The new materials (organic bentonites) did not cause toxicity in neural crest stem cells;
- The new materials protected the neural crest stem cells against damage cause by AFB₁;
- Organic bentonites (BAC and CTAB) offer new prevention strategies against aflatoxicoses in animals and humans.

ABSTRACT

Bentonite clays exhibit high adsorptive capacity for contaminants, including *aflatoxin B₁* (AFB₁), a mycotoxin responsible for causing severe toxicity in several species including pigs, poultry and man. Organophilic treatments is known to increase the adsorption capacity of bentonites, and the primary aim of this study was to evaluate the ability of Brazilian bentonite and two organic salts - benzalkonium chloride (BAC) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) to adsorb AFB₁. Both BAC and CTAB treatment (at 30 °C and 2% of salt concentration) were found to increase the adsorption of AFB₁ significantly compared with untreated bentonite. After organophilic bentonite treatments with BAC or CTAB, a vibration of C–H stretch (2850 and 2920 cm⁻¹) were detected. A frequency of the Si–O stretch (1020 and 1090 cm⁻¹) was changed by intercalation of organic cation. Furthermore, the interlayer spacing of bentonite increases to 1.23 nm (d₀₀₁ reflection at 2θ = 7.16) and 1.22 (d₀₀₁ reflection at 2θ = 7.22) after the addition of BAC and CTAB, respectively. Another aim of the study was to observe the effects of these two bentonite salts in neural crest stem cell cultures. The two materials that were created by organophilic treatments were not found to be toxic to stem cells. Furthermore the results indicate that the two

materials tested may protect the neural crest stem cells against damage caused by AFB₁.

1. Introduction

Bentonites are argillaceous materials in clay, which contain a high rate montmorillonite (2:1 type aluminosilicate), that can be effectively employed as adsorbents for many pollutants and contaminants [1] and [2]. Previously researches have demonstrated the effectiveness of this material against toxicity caused by mycotoxins [3], [4] and [5], due to the ability of bentonites to bind these toxic substances - e.g. aflatoxin B₁ (AFB₁) [4], [6], [7], [8] and [9].

AFB₁, which is produced by different fungal species [10] and [11] is highly toxic to humans [7], [12] and [13] as well as to several animal species such as pigs [14] and poultry [15]. AFB₁ has been reported to cause serious biochemical and structural alterations in different organs, including liver, lungs, kidneys and heart [16], [17] and [18], as well as it carcinogenic [19]. In the early stages of mammalian embryonic development, AFB₁ may disturb nerve cell functions and cause damage in the central nervous system [4], [20], [21], [22] and [23].

Bentonite given as a feed additive reduces the impact of mycotoxins by adsorbing mycotoxins in the gastrointestinal tract and thus preventing absorption of the toxin [9], [24], [25] and [26]. The efficacy of bentonite to adsorb aflatoxins and other organic molecules depends on the crystal structure, chemical properties of the molecules and the surface properties of the clay [8], [27] and [28]. The adsorption capacity of bentonite can be increased by intercalation of organic molecules into their interlayer surface, including quaternary ammonium compounds [29], [30], [31] and [32].

The quaternary ammonium compounds (QAC) are cationic surfactants, with the alkyl chain of 16–20 carbon atoms, and the most used organic source to prepare organoclays [31], [33] and [34]. The structure of QAC contains at least one hydrophobic hydrocarbon chain linked to a positive charged nitrogen atom [R₄N⁺], and other alkyl groups which are mostly short-chained substituents such as methyl or benzyl groups [35].

Some studies have reported that bentonite modified by QACs, such as benzalkonium chloride (BAC) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) show an increase adsorption capacity for textile dye [28] and [36], aromatic compounds [37] and petroleum-derived fuels [38]. This increased capacity for adsorption of organic compounds results from the conversion of hydrophilic to hydrophobic characteristics of clay by incorporation of surfactants [2], [39], [40], [41] and [42].

It has been reported that organo-modification of bentonite clay can increase the adsorption capacity for mycotoxins [6] and [43]. There is however no information available regarding the effects of this treatment on Brazilian bentonites and its ability to increase the binding capacity for AFB₁.

The knowledge on the effects of bentonites or surfactants on cells or cell cultures is scarce [4], [44] and [45]. Moreover, there are to our knowledge no data reported from *in vitro* studies of the effects of organo-modified bentonites on stem cells.

This paper is the first report on the adsorption capacity for AFB₁ of Brazilian bentonite treated with two organic salts (BAC and CTAB). Furthermore it reports the result from toxicity studies of organic bentonites (BAC e CTAB) alone and in combination with AFB₁ using neural crest stem cell culture as a study model.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Bentonite samples, characterized by Nones et al. [4] and [8], were collected in the city of Criciúma, located in the State of Santa Catarina, Brazil. The samples were washed with distilled water to remove any impurities and were dried in an electric oven at 60°C for 8 hours, as described by Nones et al. [4]. Then, the bentonite samples were kept in a stock solution of 40 mg/mL diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at -20 °C, for cell assay, or in methanol for adsorption study. AFB₁ (Sigma) was kept in a stock solution of 500 µM and, for the tests it was diluted in DMSO or water at 30 µM for cell assay and adsorption study, respectively.

2.2. Preparation of organobentonites

The organobentonites were synthesized according to the following process: 5 g of bentonite was first added to 50 mL of distilled water at 30 or 60 °C and stirred until they were thoroughly dispersed. Desired amounts of benzalkonium chloride (BAC) and

cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were mixed in 50 mL distilled water at 30 or 60 °C for 30 min. Then the modifying agents were added to the bentonite suspension under vigorous stirring. The mixed suspensions were stirred at 30 or 60 °C for 4 h and then stored at room temperature (around 25 °C) overnight. After that, the resulting products were washed with distilled water and dried at 80 °C. The added amounts of BAC and CTAB were 2 or 6% of the bentonite's weight.

2.3. Factorial design

In this study, 2² factorial design was used in order to analyze if BAC or CTAB was able to increase AFB₁ adsorption when submitted in different temperature and concentration. The adsorption of AFB₁ was determined as average of three parallel experiments analyzed. The details about factorial design with the low (-1) and high (+1) levels are presented in **Table 1**. The results were evaluated using the program Statistica (version 8.0), when the effects (temperature and concentration) and interactions between them were evaluated.

2.4. Bentonite characterization

The surface morphology of bentonite was investigated using a JEOLJSM-6390LV scanning electron microscope (SEM). Bentonite's structural composition was analyzed by infrared absorption assay (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). FTIR of bentonite was obtained using a Agilent Technologies Spectrum– Cary 600 Series. FTIR spectra were taken in the range from 4000 to 400 cm⁻¹ in the transmission mode in KBr pellets. The XRD analysis of the bentonite samples was made with the accelerating voltage of 40 kV and 30 mA, Cu K α ($\lambda = 0.154178$ nm) radiation ranging from 0 to 20° and 2 θ scan rate of 0.05°/s (PanAnalytical X'Pert PRO Multi Purpose). Then, the interlayer spacing of each sample was calculated using Bragg's law:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \text{ (equation 1)}$$

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

2.5. Aflatoxin B₁ adsorption

Adsorption of AFB₁ molecules was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a modified method described by Nones et al. [8]. To that end, bentonite samples were added to 200 μ L of AFB₁-solution (30 μ M) where a 0.6 mg/mL concentration was obtained. Samples were stored overnight at 25°C, without light

control, and then centrifuged (1500 CFN-II Vision) at 4000 rpm for 30 min. The amount of adsorbed AFB₁ was determined in the supernatant with HPLC analysis. An aliquot of the original AFB₁ test solution was used as the HPLC standard. HPLC analyses were performed on a Waters e2795 AllianceBio Separation Module composed of a quaternary pump with a refrigerated auto sampler coupled to a Waters 2475 fluorescence detector ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$). The column was a Synergi Hydro-RP, 4 μm particle size, 150 mm \times 2.0 mm, protected by a security guard column (both Phenomenex, Torrance, USA). The mobile phase water: acetonitrile (50:50) was pumped at a flow rate of 0.2 mL/min. Chromatograms were obtained and integrated with the Empower® 2 software (Waters Co., Milford, USA). Percent AFB₁ bound by the bentonites was calculated from the difference between the initial and final AFB₁ concentration in the aqueous supernatant after equilibrium.

2.6. Quail NC cell cultures

Quail NC cell cultures were performed and characterized as previously described by Trentin et al. [46] and Nones et al. [20] and [47]. Briefly, neural tubes obtained from quail embryos (18–25 somite stage) were dissected at the trunk level and plated in plastic culture dishes (Corning). After 24 h, emigrated NC cells were harvested for secondary plating (400 cells per well of a 96-well plate). Cultures were maintained for an additional 4 days in a medium containing: α -minimum essential medium (α -MEM; Gibco) enriched with 10% fetal bovine serum (Cultlab), 2% chicken embryonic extract, penicillin (200 U/mL) and streptomycin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (all from Sigma). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was changed every 2 days. Each culture was incubated with DMSO (control group) or 0.6 mg/mL of natural or organic treatment (BAC and CTAB) bentonite. In order to determine the role of bentonite on cell survival, AFB₁ (30 μM), was added – alone or concomitantly – to cells treated with a specific concentration (0.6 mg/mL) of natural or organic-bentonite.

2.7. Cell viability

2.7.1 Trypan blue assay: The viability of NC cells was determined by trypan blue as described by Youn et al. [48]. First of all, NC cells were treated with natural or organic-bentonite (0.6 mg/mL), AFB₁ (30 μM) alone or in combination with other treatments, for 4 days, and subsequently collected by centrifugation. After washing in PBS, cells

were stained with 0.4% trypan blue solution at room temperature for 3 min, and cells were then counted using a hemocytometer and a light microscope. At least one thousand cells were observed and the percentages of unstained (viable) and stained (nonviable) cells were determined.

2.7.2 MTT assay: Viability of NC were also determined by 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Two hours before completing NC treatment with natural or organic-bentonite (0.6 mg/mL), AFB₁ (30 µM) alone or in combination with other treatments, 0.5 mg/mL of MTT was added to the medium of incubation. After the incubation, the medium from each well was gently removed by aspiration and 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to each well followed by incubation and shaking for 10 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in DMSO and measured at 490 and 630 nm. Only viable cells are able to reduce MTT.

2.8. Quantitative and statistical analysis for cell assay (MTT and Trypan blue assay)

Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, using GraphPad Prism 4.0 software. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The experiments were performed in triplicate and each result represents the mean of at least three independent experiments.

3. Results

3.1. Bentonite's morphology does not change after the organic treatments with BAC or CTAB

Our results show that bentonite treated with BAC (**Figure 1 A-D**) and CTAB (**Figure 1 E-H**) was made up of individual particles, most of which had clearly recognizable contours that tended to form thick and large agglomerates. Furthermore, the results also showed that the temperature or concentration of quaternary ammonium salts did not change the bentonite morphology.

3.2. Organic treatments were able to cause vibration of C-H and Si-O bands by intercalation of organic cation

As shown in **Figure 2**, the infrared spectra's for the both organic bentonites (**Figure 1A** - BAC or **Figure 2B** - CTAB) were

similar. The bands around 3417 and 1640 cm^{-1} were assigned to water molecules. The broad bands attributed to Al–Al–OH appeared in the region of 3620 and 913 cm^{-1} while the band attributed to Si–OH appeared in the region of 3705 cm^{-1} . The bands at 2850 and 2920 cm^{-1} attributed to symmetric and asymmetric vibration of C–H stretch. Comparing the spectra of organophilic bentonite between natural bentonite [4] it is possible observe changes in the frequency of the Si–O stretching (1020-1090 cm^{-1}) caused by the BAC or CTAB incorporation. Indeed, **Figure 2 (A-B)** also show other functional groups of bentonites, like Al-OH-Mg, Si-O-Al and Si-O-Si.

3.3. Organic bentonite treatments increase AFB₁ adsorption

Our results showed that the bentonite treated with 2% of BAC at 30 °C (BAC302) showed a higher percent of AFB₁ adsorption (76.9%) than bentonite treated with 2% of BAC at 60 °C (BAC602) (70.3%) (**Figure 3 A**). The higher concentrations of BAC (6% of bentonite mass) did not result in increased AFB₁ adsorption capacity by bentonite, showing values around 36.5 and 31.6% for BAC306 and BAC606 bentonite, respectively (**Figure 3 A**).

The treatment with CTAB also resulted in increased AFB₁ adsorption, however, this treatment was less effective than BAC treatments (**Figure 3 A-B**). Lower concentration and temperature of CTAB (2% at 30 °C) showed the highest adsorption capacity (55.2% of AFB₁ adsorption) compared with higher concentration and higher temperature. The samples CTAB306, CTAB602, CTAB606 showed 38.9, 45.6 and 18.9% of AFB₁ adsorption, respectively.

The F-values showed in Table 2 were significantly different ($P < 0.05$) for both salts that were tested. The BAC and CTAB concentration obtained F-values around 559.5 and 44.6, respectively. For temperature, the F-values that were obtained for BAC and CTAB were 11.8 and 23.9, respectively. The interaction between these factors was not statistically different. These conclusions were also confirmed by Student's t-test, as showed in Table 3.

3.3. Bentonite treated with organic salts increases the protective effect against stem cell damage caused by AFB₁

By trypan blue assay, we observed a reduction in cell viability (74.3% decrease compared to the control group) after treatment with aflatoxin (**Figure 4 A**). This effect was partially reversed by co-administration of AFB₁ and a natural bentonite, increasing cell viability in 49.0% compared to the AFB₁-

treated group. The co-administration of the new materials that was created, BAC302 and CTAB302 (organic bentonites) totally reversed the toxicity cause by AFB₁ showing 93.7 and 94.3% of cell viability, respectively. These results were similar to the control group.

To double-check this result, MTT assay was also realized (**Figure 4 B**). The treatment with mycotoxin (AFB₁) resulted in 0.16 of absorbance and the co-administration of natural bentonite with AFB₁ increased this value to 0.30 of absorbance. As showed in the trypan blue assay, the bentonite treatment with BAC302 or CTAB302 (concomitantly with AFB₁) was able to reverse the damage caused by AFB₁. The cell viability was increased to values equally to the control group (0.36 of absorbance to BAC302 and 0.38 of absorbance to CTAB302, respectively).

3.4. Changes in the interlayer space of bentonite are probably related with the effected that was observed

The natural bentonite interlayer was 0.97 nm [8] and it increased to 1.23 nm (d_{001} reflection at $2\theta = 7.16$) and 1.22 (d_{001} reflection at $2\theta = 7.22$) after the addition of BAC and CTAB, respectively (**Figure 5**).

4. Discussion

The present study demonstrated that bentonite extracted from the South of Brazil treated with organic salts (BAC e CTAB) promote AFB₁ adsorption. Moreover, our data show that these materials result in reduced toxicity in NC cells previously treated with AFB₁.

The organic treatments and the binding of surfactants at the clay interface are strongly influenced by a number of factors: 1) the nature of the structural groups on the clay surface, 2) the molecular structure of the surfactant, and 3) the temperature and concentration [49]. In the first part, is important to consider whether the clay surface contains highly charged sites or essentially nonpolar groups, and what atoms these sites or groups consist of [50]. On the other hand, it is also important to consider whether the surfactant is ionic, hydrophobic and whether its chain is long or short [50]. In addition to assessing the influence of these parameters on the binding between bentonite and two cationic surfactants (CTAB and BAC), our work also evaluated the influence of temperature and concentration in this process.

The results presented in this work showed that the bentonite samples treated at lower temperatures demonstrated higher ability for AFB₁ adsorption (BAC302 CTAB302) than the samples treated at

higher temperature (BAC602 e CTAB602). This was probably due to better incorporation of the surfactant at lower temperatures, meaning that the process of organophilization bentonite (with CTAB or BAC) was more efficient at lower temperatures (30 °C). Our results are in accordance with the works of other researches who have observed similar effects, when an increase in temperature leads to decrease the efficiency of ionic surfactants adsorption by adsorbent interface [49], [51] and [52]. Indeed, according to Gürses et al. [52], an increase in temperature leads to extend layer and increases the thermal motion of each clay particle, which causes a decrease in the diffusion of salt ions from bulk phase to the solid surface. In other words, an increase in temperature causes an increase in the entropy of the system which results in a decrease of aggregate organization on the surface of the adsorbent [50], which affects the interaction between the surfactant and adsorbent (clay).

Another factor that influences the organophilic clays ability to adsorb AFB₁ is the surfactant concentration. The lower concentration of surfactants has the greater tendency to adsorb at the clay surface or interfaces [49] and [51]. The higher concentrations of surfactant may saturate the surface of the clay. After saturation, molecular aggregates of surfactants form, and, in many cases, the molecules tend to pack as a sphere in the bulk of the solution (a micelle) [2] and [52]. The solute (bentonite) is incorporate in these micro reservoirs (micelles), which lead to decreased removal efficiency of organic compounds [2]. These findings are in accordance with our results, and probably explain why the adsorption capacity was better at the lower concentrations (BAC302; CTAB302) than at the higher concentrations (BAC306 and CTAB306).

The organophilization process also affects the polarity of the bentonite particles, from hydrophilic to hydrophobic [31], [41], [53], [54] and [55]. This change can be proven by the stretching vibrations of C–H groups. Other studies have reported the same results, when organobentonite is obtained, the asymmetric and symmetric stretching vibrations of C–H groups was appeared in the region at 2920 and 2850 cm⁻¹, respectively [28], [56], [57] and [58]. Changes were also observed in frequency of the Si–O stretching (1020-1090 cm⁻¹), what it can be attributed to an increase of the interaction between the surfactant and silicate surfaces [59] and [60]. It has previously been reported that organophilization of clays improve their organic adsorption capacity [6], [55], [61] and [62], and our results showing that organophilization of bentonite resulted in increased AFB₁ adsorption capacity are in accordance with the findings of the other researchers.

Recently, our group has shown that the protective effect of bentonite against aflatoxin toxicity induced in stem cells [4] and [8] may be resulting from bentonite's ability to adsorb aflatoxins [4] and [8]. Furthermore our results indicate that aflatoxin molecules occupy the interlayer space of montmorillonite (a clay mineral which is the main component of bentonite), and thus forming complexes with metals, which results in reduced AFB₁ availability and, consequently, reduced NC cell damage caused by that the toxin [4].

Our results also indicate that bentonite and bentonite salts are not toxic to NC cells *in vitro* at the concentrations studied. Abbès et al. [3] reported that the addition of Mt reduced AFB₁ related mortality in a colon-cancer cell line. Indeed, Maisanaba et al. [63] reported no cytotoxic effects of this clay mineral (at 0–125 µg/mL) on human colon-cancer cell line. However, as described by Nones et al. [4] and [5] and Maisanaba et al. [45] the effect that was observed in our work can probably be dose dependent.

Indeed, corroborating with our previous results, in this research we observed an increase in the interlayer space of bentonite, probably due the intercalation of organic surfactant between layers of clays [33], [53], [54] and [64]. Furthermore, the frequency of the Si–O stretching have changed, which can facilitated the binding of AFB₁ with bentonite. According to the results from our previous study [4], aflatoxin forms complexes with bentonite by binding with these metals. Our results supports the suggestion that aflatoxin molecules occupy the interlayer space of organic-bentonite, probably by forming complexes with metals, which results in completely reduction of AFB₁ availability and, consequently, of NC cell damage caused by that mycotoxin.

Our results show that both organic treatments (BAC or CTAB) improve the ability of bentonite to adsorb AFB₁. Moreover, the results also show that these compounds protect stem cells from damages induced by AFB₁. In conclusion, the results indicate that bentonite salts used as feed additive may represent a novel strategy to prevent aflatoxicosis in animals fed on aflatoxin contaminated feed.

Acknowledgements

We would like to thank LCME-UFSC; Professor André Báfica for making the equipment facility (funded by Nanobiotec Capes) available to us and Dr Arne Flåøyen for valuable criticism of the manuscript. This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq/Brazil), MCT/INFRA (Brazil), PRONEX/CNPq, Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC, SC, Brazil).

References

- [1] A. Alemdar, O. Atıca and N. Güngör, *Mater. Lett.*, 43 (2000) 57.
- [2] A. Khenifi, B. Zohra, B. Kahina, H. Houari and D. Zoubir, *Chem. Eng. J.*, 146 (2009) 345.
- [3] S. Abbès, J.B. Salah-Abbès, M.M. Hetta, M. Ibrahim, M.A. Abdel-Wahhab, H. Bacha and R. Oueslati, *Appl. Clay Sci.*, 42 (2008) 151.
- [4] J. Nones, J. Nones, H. G. Riella, N. C. Kuhnen and A Trentin, *Appl. Clay Sci.*, 104 (2015a) 119.
- [5] J. Nones, H. G. Riella, A. G. Trentin and J. Nones, *Appl. Clay Sci.*, 105-106 (2015b) 225.
- [6] W. F. Jaynes and R. E. Zartman, *Toxins*, 3 (2011) 551.
- [7] J. Fowler, W. Li and C. Bailey, *Toxins*, 7 (2015) 3455.
- [8] J. Nones, J. Nones, H. G. Riella, A. Poli, A. G. Trentin, N. C. Kuhnen, *Mat. Sci. Eng. C- Bio. S.*, 55 (2015c), 530.
- [9] A. L. Barrientos-Velázquez, S. Arteaga, J. B. Dixon and Y. Deng, *Appl. Clay Sci.*, 120 (2016) 17.
- [10] A. A. El-Nekeetya, S. H. Abdel-Azeimb, A. M. Hassanb, N. S. Hassand, S. E. Alya and M. A. Abdel-Wahhaba, *Toxicology Reports*, 1 (204) 319.
- [11] A. Cui, H. Hua, T. Shao, P. Song, Q. Kong, T. Luo and Y. Jiang, *Tumor Biol.*, 36 (2015) 6507.
- [12] A. Daković, S. Matijašević, G. E. Rottinghaus, D. R. Ledoux, P. Butkeraitis and Ž. Sekulić, *Colloid Surface B*, 66 (2008) 20.

- [13] J.D. Groopman and G.N Wogan, in: J.D. Groopman and G.N Wogan (Eds.), *Aflatoxin: A Global Public Health Problem*, Vol.1, Elsevier, Amsterdam, 2016.
- [14] J. C. Fu, Q. Chen, J. Du, B. M. Shi and A.S. Shan, *Livest. Sci.*, 157 (2013) 218.
- [15] S. Rawal, J.E. Kim and R. Coulombe Jr, *Res. Vet. Sci.*, 89 (2010) 325.
- [16] X.Y. Han, Q.C. Huang, W. F. Li, J. F. Jiang and Z.R. Xu, *Livest. Sci.*, 119 (2008) 216.
- [17] K. Kanchana, H. B. Hedhayathullahkhan, A. Vedagiri, S. Palanivelu and S. Panchanatham, *Biomed. Prev. Nutr.*, 3 (2013) 233.
- [18] J.E. Mulder, G.S. Bondy, R. Mehta and T.E. Massey, *Toxicol. Appl. Pharm.*, 275 (2014) 96.
- [19] L. L. Bedard and T. E. Massey, *Cancer Lett.*, 241 (2006) 174.
- [20] J. Nones, J. Nones and A. Trentin, *Cell Biol. Int.*, 37 (2013)181.
- [21] J. Nones, J. Nones and A. Trentin, *Biotemas*, 28 (2015d) 1.
- [22] N. G. Bahey, H. O. A. Elaziz and K. K. S. Gadalla, *Tissue and Cell*, 47 (2015) 559.
- [23] T. Tanaka, S. Mizukami, Y.H. Baba, N. Onda, Y. S. Konishi, T. Yoshida and M. Shibutani, *Toxicology*, 336 (2015) 59.
- [24] A.P. Magnoli, L. Tallone, C.A.R. Rosa, A.M. Dalcero, S.M. Chiacchiera and R.M.T. Sanchez, *Appl. Clay Sci*, 40 (2008) 63.
- [25] C.C. Harvey and G. Lagaly, in: F. Bergaya and G. Lagaly (Eds.), *Industrial applications*, Vol.5, Elsevier, Amsterdam, 2013, Chapter 4.2.
- [26] A.C. Pappas, E. Tsiplakou, M. Georgiadou, C. Anagnostopoulos, A.N. Markoglou, K. Liapis and G. Zervas, *Appl. Clay Sci*, 99 (2014) 48.

- [27] A. Daković, M. Tomašević-Čanović, V. Dondur, G. E. Rottinghaus, V. Medaković and S. Zarić, *Colloid Surface B*, 46 (2005) 20.
- [28] B. Zohra, K. Aicha, S. Fatima, B. Nourredine and D. Zoubir, *Chem. Eng. J.*, 136 (2008) 295.
- [29] S. Elemen, E. P. A. Kumbasar and S. Yapar, *Dyes Pigments*, 95 (2012) 102.
- [30] A. Baglieri, A. Reyneri, M. Gennari and M. Nègre, *J Environ Sci Health B*, 48 (2013) 776.
- [31] B. Sarkar, M. Megharaj, D. Shanmuganathan and R. Naidu, *J Hazard Mater*, 261 (2013) 793.
- [32] B. Schampera, R. Šolc, D. Tunega and S. Dultz, *Appl. Clay Sci*, 120 (2016) 91.
- [33] L. B. Paiva, A. R. Morales and F. R. V. Díaz, *Appl. Clay Sci*, 42 (2008) 8.
- [34] W.H. Yu, Q. Q. Ren, D. S. Tong, C. H. Zhou and H. Wang, *Appl. Clay Sci*, 97-98 (2014) 222.
- [35] C. Zhang, F. Cui, G. Zeng, M. Jiang, Z. Yang, Z. Yu, M. Zhu and L. Shen, *Science Total Environ*, 518–519 (2015) 352.
- [36] M. Kıranşan, R. D. C. Soltani, A. Hassani, S. Karaca and A. Khataee, *J. Taiwan Inst. Chem. E.*, 45 (2014) 2565.
- [37] B. Chen, W. Huang, J. Mao and S. Lv, *J Hazard Mater*, 158 (2008) 116.
- [38] C. Bertagnolli and M. G. C. Silva, *Mat. Res.*, 15 (2012) 253.
- [39] M. Akçay and G. Akçay, *J Hazard Mater*, 113 (2004) 189.
- [40] L. Groisman, C. Rav-Acha and Z. Gerstl, *J Environ Qual*, 33 (2004) 1930.

- [41] C. H. Ko, C. Fan, P. N. Chiang, M. K. Wang and K. C. Lin, *J Hazard Mater*, 149 (2007) 275.
- [42] N. Jović-Jovičić, A. Milutinović-Nikolić, P. Banković, Z. Mojović, M. Žunić, I. Gržetić and D. Jovanović, *Appl. Clay Sci*, 47 (2010) 452.
- [43] M.A. Abdel-Wahhab, E.S. El-Denshary, A.A. El-Nekeety, K.G. Abdel-Wahhab, M.A. Hamzawy, M.F. Elyamany, N.S. Hassan, F.A. Mannaa, M.N.Q. Shaiea, R.A. Gado and M.F. Zawrah, *Soft Nanoscience Letters*, 5 (2015b) 21.
- [44] A. Souza-Machado, J. G. Valverde, J. S. Santana-Junior, L. G. Barreto, G. S. Nonato, K. F. Hagenbeck, D. V. Xavier and J. M. Brasil, *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol*, 31 (2008) 1.
- [45] S. Maisanaba, K. Hercog, M. Filipic, Á. Jos and B. Zegura, *J Hazard Mater*, 304 (2016) 425.
- [46] A. Trentin, C. Glavieux-Pardanaud, N.M. Le Douarin and E. Dupin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101 (2004) 4495.
- [47] J. Nones, A.P. Costa, R.B. Leal, F.C.A. Gomes, A.G. Trentin, *Cell Tissue Res.*, 350 (2012) 305.
- [48] H. Youn, J.C. Jeong, Y.S. Jeong, E.J. Kim and S.J. Um, *Biol. Pharm. Bull*, 36 (2013) 944.
- [49] M. J. Rosen, *Surfactants and interfacial phenomena*, third edition, John Wiley & Sons, New York, 2004.
- [50] P. C. Pavan, E. L. Crepaldi, G. A. Gomes and J. B. Valim, *Colloids Surfaces A*, 154 (1999) 399.
- [51] S. Paria and K.C Khilar, *Adv. Colloid Interfac.*, 110 (2004) 75.
- [52] A. Gürses, S. Karaca, F. Aksakal and M. Açıkyıldız, *Desalination*, 264 (2010) 165.
- [53] Y. Xi, Z. Ding, H. He and R. L. Frost, *J. Colloid Interf. Sci.*, 277 (2004) 116.

- [54] Y. Xi, R. L. Frost, H. He, T. Kloprogge and T. Bostrom, *Langmuir*, 21 (2005a) 8675.
- [55] P. Baskaralingam, M. Pulikesi, D. Elango, V. Ramamurthia and S. Sivanesan, *J Hazard Mater*, 128 (2006) 138.
- [56] W. Abdallah and U. Yilmazer, *Thermochimica Acta*, 525 (2011)129.
- [57] A. K. Rahardjo, M. J. J. Susanto, A. Kurniawan, N. Indraswati and S. Ismadji, *J Hazard Mater*, 190 (2011)1001.
- [58] L.K. Ong, F.E. Soetaredjo, A. Kurniawan, A. Ayucitra, J.C. Liu and S. Ismadji, *Chem. Eng. J.*, 241 (2014) 9.
- [59] S. Karaca, A. Gürses and M. E. Korucu, *J. Chem.*, 2013 (2013) 1.
- [60] Y. Xi, Z. Ding, H. He and R. L. Frost, *Spectrochim. Acta A*, 61 (2005b) 515.
- [61] R. Koswojo, R. P. Utomo, Y.H. Ju, A. Ayucitra, F.E. Soetaredjo, J. Sunarso and S. Ismadji, *Appl. Clay Sci*, 48 (2010) 81.
- [62] M.N. Carvalho, M. Motta, M. Benachour, D.C.S. Sales and C.A.M. Abreu, *J Hazard Mater*, 239–240 (2012) 95.
- [63] S. Maisanaba, D. Gutiérrez-Praena, S. Pichardo, F.J. Moreno, M. Jordá, A.M. Cameán, S. Aucejo and A. Jos, *J. Appl. Toxicol.*, 34 (2014) 714.
- [64] M. F. Mota, M. G. F. Rodrigues and F. Machado, *Appl. Clay Sci*, 99 (2014) 237.

Table**Table 1.** Experiment design for organic salts intercalation in natural bentonite.

Experiment	Sample	Reaction temperature (°C)	Concentration of salt (%)
<i>Benzalkonium chloride (BAC)</i>			
1	BAC302	30 (-1)	2 (-1)
2	BAC306	30 (-1)	6 (+1)
3	BAC602	60 (+1)	2 (-1)
4	BAC606	60 (+1)	6 (+1)
<i>Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)</i>			
1	CTAB30	30 (-1)	2 (-1)
	2		
2	CTAB30	30 (-1)	6 (+1)
	6		
3	CTAB60	60 (+1)	2 (-1)
	2		
4	CTAB60	60 (+1)	6 (+1)
	6		

Table 2. Analysis of variance for aflatoxin B₁ adsorption.

Factor	SS	df	MS	F	P
BAC					
(1) Temperature	99.1	1	99.1	11.8	0.0*
(2) Concentration	4685.3	1	4685.3	559.5	0.0*
1 by 2	2.0	1	2.0	0.2	0.6
Error	66.9	8	8.4		
Total	4853.5	11			
CTAB					
(1) Temperature	710.15	1	710.15	23.9279	0.0*
	9		9	0	
(2) Concentration	1322.7	1	1322.7	44.6	0.0*
1 by 2	98.7	1	98.7	3.3	0.1
Error	237.4	8	29.7		
Total	2369.0	11			

SS= sum of squares; df= degree of freedom; MS= mean square. *P<0,05

Table 3. Student's t-test for aflatoxin B₁ adsorption.

Factor	Effect	Standard error	T	P
BAC				
(1) Temperature	-5.7	1.7	-3.4	0.0*
(2) Concentration	-39.5	1.7	-23.6	0.0*
1 by 2	0.8	1.7	0.5	0.6
CTAB				
(1) Temperature	-15.9	3.1	-4.9	0.0*
(2) Concentration	-20.9	3.1	-6.7	0.0*
1 by 2	-5.7	3.1	-1.8	0.1

*P<0,05

Legends

Figure 1. SEM image of organo-bentonites after treatments with different temperatures and concentrations. BAC302 (A), BAC306 (B), BAC602 (C), BAC606 (D), CTAB302 (E), CTAB 306 (F), CTAB602 (G), CTAB606 (H). Scale bar = 10 μ m.

Figure 2. Intercalation of organic cation provides changes in FTIR spectra. BAC (A) and CTAB (B).

Figure 3. Organic treatments on bentonite increase AFB₁ adsorption. Bentonite treated with benzalkonium chloride - BAC (A) and cetyltrimethylammonium bromide - CTAB (B) (0.6mg/mL) was added with 30 μ M of AFB₁. After 24h, the adsorption was analyzed by HPLC. The results represent the experiments performed in triplicate \pm SEM.

Figure 4. Bentonite previously treated with organic salts prevents the damage caused by AFB₁ on NC. Secondary quail trunk NC cell cultures were incubated with DMSO (control group), 0.6 mg/mL of natural bentonite, 30 μ M of AFB₁ or 0.6 mg/mL of bentonite (natural or organic-bentonite - BAC302 and CTAB302) concomitantly added with 30 μ M of AFB₁. After 4 days of treatment, the cell viability was

analyzed by trypan blue assay (A) and MTT assay (B). The results represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm SEM. *** $P < 0.01$ compared to the control group, ** $P < 0.05$ compared to the AFB₁ group and # $P < 0.05$ compared to the natural bentonite + AFB₁ treatment group.

Figure 5. XRD assay of organo-bentonites after BAC302 (A) e CTAB302 (B) treatments. M - Montmorillonite, K - Kaolinite, Mc - Muscovite, Q - Quartz.

Graphical abstract

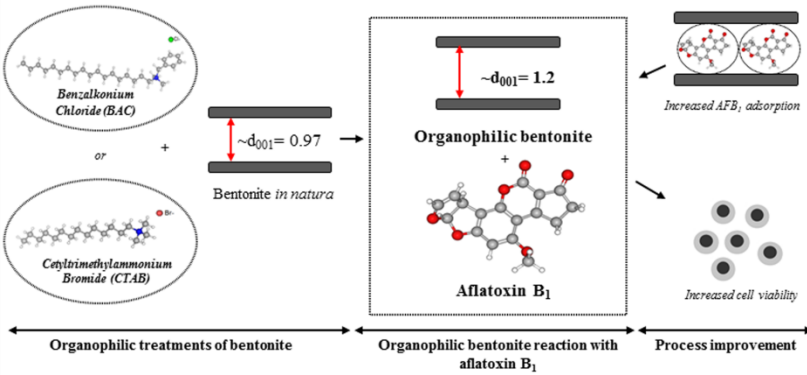


Figure 1

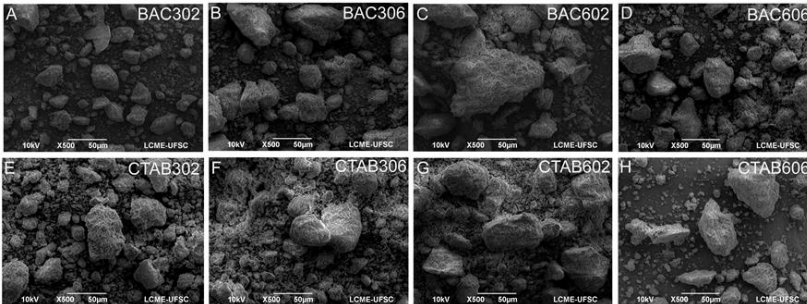


Figure 2

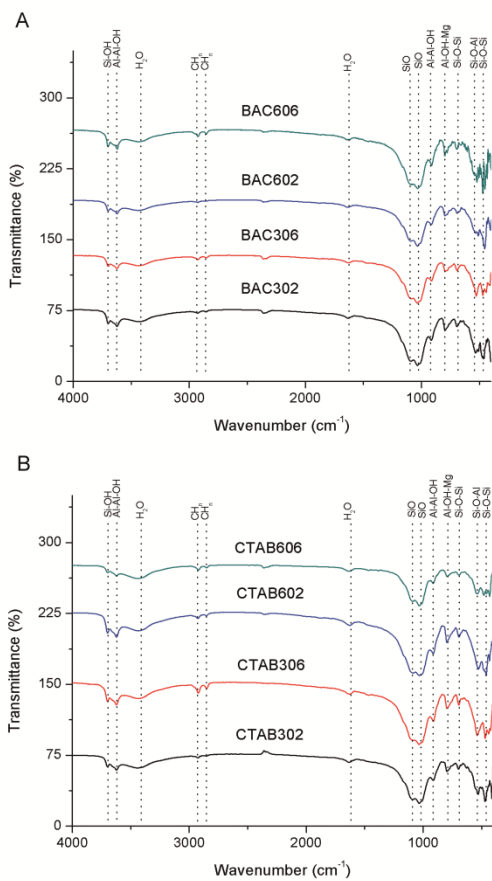


Figure 3

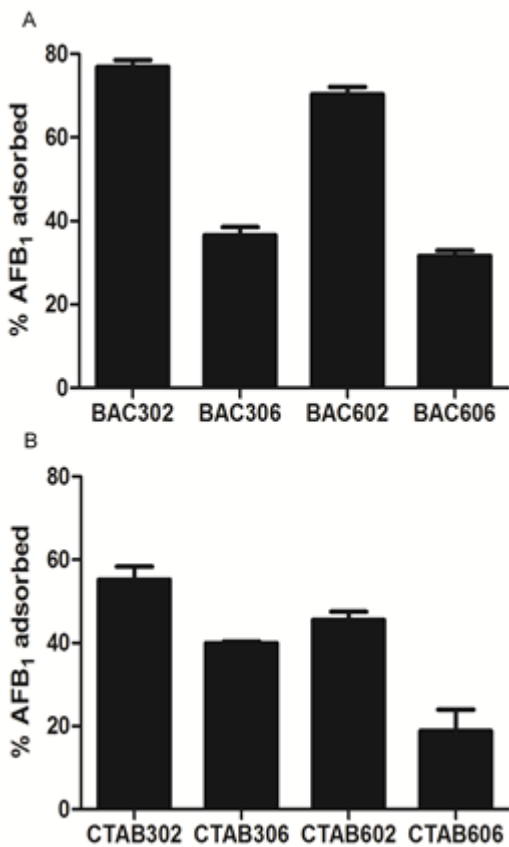


Figure 4

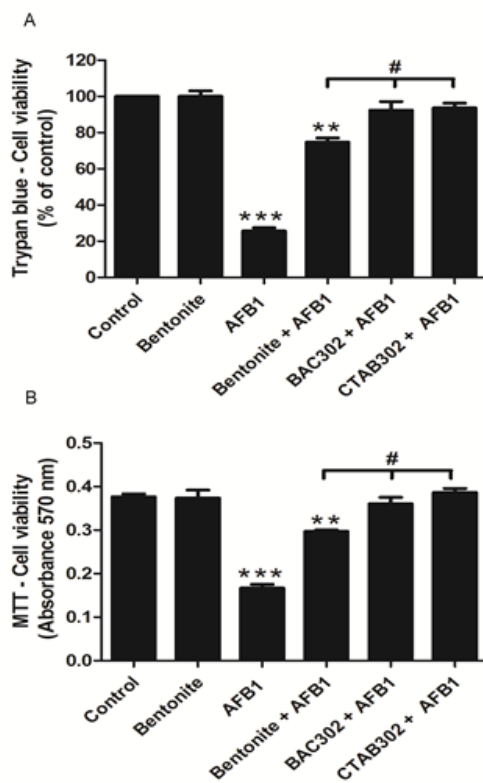


Figure 5