UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDA BOVO

**Efeitos da adição de bactéria ácido-lática e resíduo de
fermentação alcoólica de cerveja em rações sobre o
desempenho de frangos de corte intoxicados com
aflatoxina B₁**

Pirassununga
2014

FERNANDA BOVO

Efeitos da adição de bactéria ácido-lática e resíduo de fermentação alcoólica de cerveja em rações sobre o desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B₁

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

B783e Boyo, Fernanda
Efeitos da adição de bactéria ácido-lática e resíduo
de fermentação alcoólica de cerveja em rações sobre o
desempenho de frangos de corte intoxicados com /
aflatoxina B₁.
Fernanda Boyo. -- Pirassununga, 2014.
120 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e

1. Lactobacillus rhamnosus 2. Saccharomyces
cerevisiae 3. Micotoxina 4. Descontaminação 5. Aves.
I. Título.

Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de
Oliveira.

Ao meu marido, Francis, por todo amor, paciência e compreensão, e aos meus pais, Luiz Renato e Maria Antonia, por todo o apoio e incentivo durante todos os anos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, minha família e por todas as conquistas alcançadas.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, pelos ensinamentos, e pela amizade ao longo de todos esses anos de trabalho juntos.

À minha família, por sempre me apoiar em todas as decisões, por todo o suporte e pelos momentos de felicidade.

A todos os meus amigos, pelos momentos de descontração e pelos incentivos para construção de uma vida acadêmica.

À Roice, especialista do laboratório, por toda a ajuda com as análises cromatográficas e pelos anos de amizade.

Ao professor Dr. Carlos Humberto Corassin, obrigada pela colaboração em todos os trabalhos e por nossa amizade.

À professora e amiga Dra. Andrezza Maria Fernandes, obrigada pelos ensinamentos, pela ótima convivência e por todos os momentos que passamos juntas nos EUA.

Aos queridos Dr. David Ledoux e Dr. George Rottinghaus, por me oferecerem a oportunidade de realizar parte do meu doutorado nos EUA e por todo suporte e amizade.

À Keliani, Pollyana, Daiane, Sarah, Diane, Mayra, Ligia, Alessandra, companheiras de laboratório, obrigada por todas as risadas, conversas, reclamações e experiências vividas nesses anos de convívio.

À Larissa, minha estagiária, por toda a ajuda e paciência durante a execução do projeto.

À Estela, pela ajuda desprendida durante a realização do meu projeto nos EUA, principalmente com as análises estatísticas, e também por nossa amizade.

Ao Rafael, Guilherme, Mariana e Pedro, muito obrigada pela amizade, pelo suporte no período que passei nos EUA e pela “força de trabalho” para execução do meu experimento com as aves, sem vocês nada teria sido feito.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela disponibilização do espaço para a realização do projeto e por todo suporte necessário.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro providenciado durante todo o período do doutorado.

"A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos."

Burrhus Frederic Skinner

Resumo

BOVO, F. **Efeitos da adição de bactéria ácido-lática e resíduo de fermentação alcoólica de cerveja em rações sobre o desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B₁**. 2014. 120f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O trabalho teve por finalidade avaliar o efeito da adição de cepa de bactéria ácido-lática e biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* resultante da fermentação alcoólica de cerveja em rações sobre o desempenho de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B₁ (AFB₁). Para este fim, selecionou-se a cepa bacteriana (*Lactobacillus rhamnosus*, LYO) que apresentou maior crescimento celular médio, sendo seca posteriormente. O resíduo da fermentação alcoólica (RFC) contendo *S. cerevisiae* foi obtido em microcervejaria, seco e triturado. Preliminarmente, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação da capacidade de remoção da AFB₁ pela LYO (inviabilizada por tratamento térmico a 121°C por 15 minutos, em solução ou seca por atomização ou por liofilização) e RFC em solução tampão (pH 3,0 e 6,0) a 25°C. O experimento *in vivo* foi conduzido utilizando-se 200 pintos machos de um dia de idade, provenientes de matrizes comerciais de frangos de corte. As aves foram distribuídas aleatoriamente em 8 tratamentos com 25 aves cada, em arranjo fatorial 2 x 2 x 2, correspondendo a dois níveis (0 e 2.000 µg/kg) de incorporação de AFB₁ às rações e dois níveis (0 e 1%) de incorporação de LYO (seca por atomização) e RFC. As aves receberam as rações experimentais do 1º ao 21º dia de vida. Semanalmente, avaliou-se o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e a conversão alimentar (CAL), e ao término do experimento, determinou-se a viabilidade das aves sobreviventes comparado ao total. Análises de bioquímica sérica aos 14 e 21 dias das aves incluíram a determinação de proteína total (PT), glicose (GLI), albumina (ALB), globulina (GLO), cálcio (CA), ácido úrico (AU) e as enzimas aspartato-amino-transferase (AST) e gama-glutamil-transferase (GGT). Ao final do período de intoxicação, todas as aves foram sacrificadas e pesadas, determinando-se o peso relativo do fígado, rins e bursa de Fabricius, além das análises histopatológicas desses órgãos. Nos ensaios *in vitro*, LYO em solução conseguiu remover a AFB₁ em 46,0% e 35,8% em pH 3,0 e 6,0, respectivamente,

enquanto que RFC mostrou-se capaz de adsorver a AFB₁ em 50,5% e 48,5% nos respectivos valores de pH. No entanto, LYO atomizada perdeu completamente sua capacidade de adsorção, enquanto que LYO liofilizada conseguiu manter a sua habilidade em adsorver a AFB₁ em 36,6% em pH 3,0 e 27,2% em pH 6,0. No estudo *in vivo*, os tratamentos com LYO isolada ou associada com RFC não apresentaram efeitos satisfatórios sobre as variáveis estudadas nos frangos de corte, exceto pelo aumento no CA, ALB, PT e GLO. O RFC resultou em uma maior amenização dos efeitos nos índices de produtividade e bioquímica sérica, como aumento do GP, ALB, PT, GLO e CA, além de diminuição das alterações histopatológicas, em comparação ao grupo controle. Os experimentos demonstraram que o RFC apresenta potencial para uso como aditivo anti-aflatoxinas para frangos de corte, e que novos estudos são necessários para viabilizar a produção em escala de LYO liofilizada para uso na alimentação animal.

Palavras-chave: *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, micotoxina, descontaminação, aves.

Abstract

BOVO, F. **Effects of addition of lactic acid bacteria and residue of beer alcoholic fermentation in diets on performance of broilers intoxicated with aflatoxin B₁**. 2014. 120f. Thesis (Ph D) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The study aimed to evaluate the effect of adding strain of lactic acid bacteria and biomass of *Saccharomyces cerevisiae* from the beer alcoholic fermentation in diets on performance of broilers intoxicated with aflatoxin B₁ (AFB₁). For this purpose, the bacterial strain (*Lactobacillus rhamnosus*, LYO), which presented higher cell growth, was selected and subsequently dried. The residue of alcoholic fermentation (RAF) containing *S. cerevisiae* was obtained in microbrewery, dried and ground. Preliminarily, it was accomplished *in vitro* tests to evaluate the capacity of AFB₁ removal by LYO (non-viable by heat treatment at 121°C for 15 minutes, in solution or dried by spray-drying or lyophilization) and RAF in buffer solution (pH 3.0 and 6.0) at 25°C. The *in vivo* test was conducted using 200 one day old male chicks, from arrays of commercial broilers. The birds were randomly assigned to 8 treatments with 25 birds each in a factorial 2 x 2 x 2, corresponding to two levels (0 and 2,000 µg/kg) of AFB₁ incorporation to feed and two levels (0 and 1%) of incorporation of LYO (spray-dried) and RAF. The chicks received the experimental diets from 1st to 21st days of life. Weight gain (WG), feed intake (FI) and calculation of feed conversion (FC) were assessed weekly and at the end of the experiment, it was determined the viability of the surviving broilers compared to the total. Serum biochemical analysis at days 14 and 21 included the determination of total protein (TP), glucose (GLU), albumin (ALB), globulin (GLO), calcium (CA), uric acid (UA) and the enzymes aspartate-aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl-transferase (GGT). At the end of the intoxication period, broilers of all treatments were sacrificed and weighed, determining the relative weights of liver, kidneys and bursa of Fabricius, beside the histopathological analysis of these organs. *In vitro* tests showed that LYO in solution could bind 46.0% and 35.8% of AFB₁ at pH 3.0 and 6.0, respectively, while RFC was able to bind 50.5% and 48.5% of AFB₁ the respective pH values. However, atomized LYO completely lost its adsorption capacity, whereas lyophilized LYO could maintain its ability to bind AFB₁ by 36.6% at pH 3.0 and 27.2% at pH 6.0. *In vivo* study results

demonstrated that the treatments with LYO, isolated or associated with RFC, showed no satisfactory effect on the variables analyzed in broilers, except for an increase in CA, ALB, PT and GLO. The use of RFC resulted in greater mitigation of effects on performance and serum biochemistry parameters, such as increased GP, ALB, PT, GLO and CA, besides the reduction of histopathological changes, compared to the control group. The experiments demonstrated that RFC has potential for use as anti-aflatoxin additive for broilers, and further studies are necessary to enable the scale production of LYO lyophilized for use in animal feed.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, mycotoxin, decontamination, poultry.

Lista de Figuras

Figura 1 – Participação nas exportações brasileiras dos principais tipos de carnes no ano de 2010..	23
Figura 2 – Distribuição por segmento do consumo de rações no Brasil em 2011.....	24
Figura 3 – Estrutura das principais aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂).....	28
Figura 4 – Países com e sem regulamentação para aflatoxinas até 2002.....	34
Figura 5 – Produção de cerveja.	47
Figura 6 – Equipamento <i>spray dryer</i> utilizado para secagem da cultura bacteriana.	52
Figura 7 – Metodologia utilizada para determinação de lactose (MILLER, 1959).	54
Figura 8 – Produtos obtidos ao longo do processo de secagem: A) Resíduo de fermentação alcoólica (RFC) coletado na cervejaria, B) RFC contendo leveduras antes da secagem, C) Massa de RFC seca e D) RFC seco e triturado.	55
Figura 9 – Fungo <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 em ágar PDA (A) e em arroz (B) para produção de aflatoxina.	59
Figura 10 – Sala isolada com as baterias metálicas para disposição das aves nos diferentes tratamentos.....	60
Figura 11 – Recebimento, pesagem e distribuição das aves com um dia de idade nos diferentes tratamentos.....	61
Figura 12 – Fluxograma da metodologia para determinação de aflatoxinas em rações.	64
Figura 13 – Curvas de concentração bacteriana.....	67
Figura 14 – Parede celular da levedura..	75
Figura 15 – Resultados de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ por <i>L. rhamnosus</i> (LYO) liofilizada.....	77
Figura 16 – Curva de concentração de <i>L. rhamnosus</i> (LYO) em meio contendo soro de leite.....	83
Figura 17 – Curva de concentração de lactose.	84

Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 3.000X do resíduo da fermentação alcoólica de cerveja (RFC) (A), *L. rhamnosus* (LYO) atomizada (B) e LYO liofilizada (C)..87

Figura 19 – Fígados, rins e bursas de Fabricius de frangos de corte aos 21 dias de idade. Tratamentos: A) Controle negativo (dieta basal, DB), B) Controle positivo (DB + AF), C) 1% *L. rhamnosus* (LYO), D) AF + 1% LYO, E) 1% resíduo de fermentação alcoólica de cerveja contendo *S. cerevisiae* (RFC), F) AF + 1% RFC, G) 0,5% LYO + 0,5% RFC, e H) AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC..... 101

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Ocorrência de aflatoxina em rações e seus ingredientes durante surto de aflatoxicose em frangos de corte.....	25
Tabela 2 – Ocorrência de AFB ₁ em ração disponível no comércio, segundo alguns trabalhos realizados no Brasil.	29
Tabela 3 – Efeitos das aflatoxinas sobre frangos de corte de acordo com a dose de exposição.	32
Tabela 4 – <i>Ranking</i> mundial de produção de cerveja em 2010, 2011 e 2012.....	45
Tabela 5 – Cepas bacterianas utilizadas nos testes de seleção da bactéria ácido-lática.....	48
Tabela 6 – Parâmetros de operação do <i>spray dryer</i> ¹ para secagem das células bacterianas.....	52
Tabela 7 – Composição do caldo MRS e meio contendo soro de leite.	53
Tabela 8 – Produtos comerciais a base de levedura utilizados em ensaio de adsorção de AFB ₁	56
Tabela 9 – Delineamento experimental do ensaio <i>in vivo</i> com frangos de corte.....	61
Tabela 10 – Composição e análise calculada da ração para frangos de corte.	63
Tabela 11 – Sistema de classificação baseado na gravidade das lesões associadas às aflatoxinas.	66
Tabela 12 – Equações das curvas de concentração bacteriana, coeficientes de determinação (R ²) e concentração bacteriana média no meio.....	68
Tabela 13 – Contagens médias nos processos de secagem de LYO e RFC.....	69
Tabela 14 – Resultados de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ pela LYO em solução.	70
Tabela 15 – Resultados de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ por LYO atomizada e RFC. ..	72
Tabela 16 – Resultados de adsorção da AFB ₁ por produtos a base de células de <i>S. cerevisiae</i>	79
Tabela 17 – Eficiência de adsorção <i>in vitro</i> do RFC ¹ (100 mg/10 ml) em adsorver diferentes quantidades de AFB ₁ em pH 3,0.	81

Tabela 18 – Eficiência de adsorção <i>in vitro</i> do RFC (100 mg/10 ml) em adsorver diferentes quantidades de AFB ₁ em pH 6,0.	81
Tabela 19 – Valores médios obtidos durante o crescimento de <i>L. rhamnosus</i> (LYO) em meio contendo soro de leite.	84
Tabela 20 – Caracterização bromatológica da LYO atomizada e RFC em base úmida.	86
Tabela 21 – Concentração de aflatoxinas nas rações produzidas.	89
Tabela 22 – Índices de produtividade alcançados por frangos de corte ¹ após 7 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.....	90
Tabela 23 – Índices de produtividade alcançados por frangos de corte ¹ após 14 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.....	91
Tabela 24 – Índices de produtividade alcançados por frangos de corte ¹ após 21 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.....	92
Tabela 25 – Índices de bioquímica sérica alcançados por frangos de corte ¹ após 14 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.	94
Tabela 26 – Índices de bioquímica sérica alcançados por frangos de corte ¹ aos 21 dias após consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.	95
Tabela 27 – Pesos relativos da bursa de Fabricius, rins e fígado de frangos de corte ¹ após 21 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.	99
Tabela 28 – Escores das alterações histopatológicas observadas no fígado e rins ¹ de frangos de corte ² após 21 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.....	100

Lista de Abreviaturas

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
ALB	Albumina
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato-amino-transferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Ácido úrico
BAL	Bactérias ácido-láticas
BI	<i>Bifidobacterium lactis</i> FLORA-FIT BI 07
°C	Graus Celsius
CA	Cálcio
CAL	Conversão alimentar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COR	Célula de levedura ativa utilizada na fermentação de cerveja
CR	Consumo de ração
DB	Dieta Basal
DL	Dose Letal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrossalicílico
ENM	Eritrócitos normocromáticos micronucleados
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GGT	Gama-glutamil-transferase
GLI	Glicose
GLO	Globulina
GP	Ganho de peso
H ₂ O	Água

HOR	Célula de levedura hidrolisada
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
kg	Kilograma
L	Litro
LEV	Célula de levedura inativa proveniente de fermentação de cerveja
LG	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323
LMMA	Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
LYO	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HOWARU® LYO 40 DCU
M	Molar
m	Metro
m ³	Metro cúbico
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MnSO ₄	Sulfato de manganês
MO	Mortalidade
MRS	de Man, Rogosa & Sharpe
N	Normal
ng	Nanograma
nm	Nanometro
NRRL	<i>ARS (Agriculture Research Service) Culture Collection</i>
PAL	Parede celular de levedura
PDA	Ágar Dextrose Batata
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PN	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PN 270
PT	Proteína total
R ²	Coeficiente de determinação
RFC	Resíduo da fermentação alcoólica de cerveja

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
S.E.M.	Erro padrão da media
SM	Célula de levedura inativa usada na fermentação de cana-de-açúcar
STCF	Solução tampão citrato-fosfato
TR	<i>Lactobacillus plantarum</i> TR 260
UFC	Unidades formadoras de colônias
USP	Universidade de São Paulo
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
Valor P	Nível descritivo
VMDL	<i>Veterinary Medical Diagnostic Laboratory</i>

Sumário

1. Introdução.....	19
2. Revisão de Literatura.....	22
2.1. Avicultura brasileira	22
2.2. Aflatoxinas.....	25
2.3. Propriedades toxicológicas das aflatoxinas.....	29
2.4. Legislação para aflatoxinas	33
2.5. Métodos de descontaminação de aflatoxinas	35
2.6. Uso de microrganismos para descontaminação de aflatoxinas	38
2.7. Obtenção de células de <i>S. cerevisiae</i> a partir da produção de cerveja.....	45
3. Materiais e Métodos.....	48
3.1. Aquisição, cultivo e seleção das bactérias	48
3.2. Ensaio preliminar <i>in vitro</i> de adsorção de AFB ₁ pela LYO em solução	49
3.3. Secagem do caldo contendo as células bacterianas.....	51
3.4. Produção de LYO utilizando meio de cultivo alternativo	53
3.5. Aquisição, contagem e secagem do resíduo da fermentação alcoólica de cerveja (RFC).....	55
3.6. Ensaio preliminar <i>in vitro</i> de adsorção de AFB ₁ pela LYO e RFC secos.....	56
3.7. Eficiência de adsorção da AFB ₁ pelo RFC	57
3.8. Caracterização bromatológica de LYO atomizada e RFC.....	57
3.9. Microscopia eletrônica de varredura de LYO e RFC secos.....	57
3.10. Produção de aflatoxina para uso no experimento <i>in vivo</i>	58
3.11. Ensaio <i>in vivo</i>	59
3.11.1. Animais, instalações e delineamento experimental	59
3.11.2. Manejo das aves.....	60
3.11.3. Preparo das rações experimentais	62
3.11.4. Variáveis analisadas no experimento	64

3.11.4.1. Índices de produtividade e bioquímica sérica.....	64
3.11.4.2. Análises histopatológicas	65
3.12. Análise dos resultados	66
4. Resultados e Discussão	67
4.1. Curvas de crescimento bacteriano	67
4.2. Contagem de células nos processos de secagem de LYO e RFC.....	69
4.3. Ensaio de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ com LYO em solução.....	69
4.4. Ensaio de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ com LYO atomizada e RFC	72
4.4.1. Ensaio de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ com LYO liofilizada	76
4.4.2. Ensaio de adsorção <i>in vitro</i> da AFB ₁ com produtos a base de levedura.....	78
4.4.3. Eficiência de adsorção de AFB ₁ pelo RFC.....	81
4.5. Produção de LYO em meio contendo soro de leite	82
4.6. Caracterização bromatológica de LYO atomizada e RFC.....	86
4.7. Microscopia eletrônica de varredura de LYO e RFC secos.....	86
4.8. Experimento <i>in vivo</i>	88
4.8.1. Concentração de aflatoxinas nas rações produzidas	88
4.8.2. Índices de produtividade e bioquímica sérica	89
4.8.3. Análises histopatológicas	98
5. Conclusões	103
6. Referências Bibliográficas	105

1. Introdução

A avicultura apresenta grande relevância no Brasil, pois dentro do complexo brasileiro de carnes, constitui-se na sua atividade mais dinâmica. Esse dinamismo está atrelado aos constantes ganhos de produtividade, sobretudo, através da melhora dos índices de conversão alimentar, ganhos nutricionais, pesquisa em genética, maior automação dos aviários e melhor manejo. Considerando-se o fato de que nas últimas duas décadas, a produção de frango de corte tem evoluído de forma bastante significativa e que a indústria avícola é uma das atividades agropecuárias mais importantes no Brasil, produzindo 12,65 milhões de toneladas de carne de frango e consumindo 37,2 milhões de toneladas de ração em 2012, torna-se imprescindível o fornecimento de produtos de qualidade e livres de quaisquer doenças ou contaminantes. Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais de rações, como as micotoxinas, especialmente as aflatoxinas.

As micotoxinas, metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por fungos filamentosos, são classificadas como o mais importante fator de risco não-infeccioso e crônico alimentar, sendo superior ao dos contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentares ou resíduos de pesticidas. Dentre as mais de 400 micotoxinas descobertas, as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, destacam-se devido à sua ampla distribuição em alimentos e por suas propriedades tóxicas acentuadas, sendo que a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais prevalente e tóxica. No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência em alimentos destinados ao consumo humano e animal, sobretudo em rações.

As aflatoxinas podem causar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e imunossupressivos em seres humanos e animais. Na avicultura, as principais manifestações relacionadas ao consumo de rações contaminadas por aflatoxinas incluem redução da produção e peso dos ovos, aumento da gordura hepática, alteração de enzimas séricas, fraqueza, ataxia, inchaço de órgãos como fígado e rins, e aumento da susceptibilidade aos desafios ambientais e microbiológicos. Não somente riscos à saúde podem ser causados pelas aflatoxinas, mas também sérios problemas econômicos, gerando perdas

milionárias, uma vez que acarretam menor eficiência na produção agropecuária e industrial, assim como menor qualidade e rendimento dos produtos.

Os impactos negativos causados pelas aflatoxinas impulsionaram a busca por novas estratégias para prevenir sua formação em alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir sua biodisponibilidade em produtos contaminados. Idealmente, a prevenção da contaminação deve ser feita já no campo, evitando-se a produção das aflatoxinas por fungos através de melhorias das práticas agrícolas e controle das condições de armazenamento dos produtos, além da utilização de agentes antifúngicos e engenharia genética. Entretanto, dificuldades práticas para prevenir a contaminação tornaram necessário o desenvolvimento de métodos de descontaminação de rações que sejam eficientes, específicos, práticos, possam ser utilizados em larga escala e apresentem um custo-benefício.

A utilização de microrganismos oferece uma alternativa interessante para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança, sendo que as bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras, principalmente *S. cerevisiae*, vêm sendo amplamente estudadas e tem demonstrado grande capacidade de remoção da AFB₁ em um meio contaminado. Esses microrganismos são capazes de fermentar açúcares, tendo o ácido láctico ou o álcool como produtos de seus metabolismos constantemente utilizados como agentes conservadores em produtos alimentícios fermentados, aumentando sua vida de prateleira e suas propriedades sensoriais. Portanto, além da utilização das bactérias e leveduras para a fermentação e conservação de alimentos, existe a possibilidade de utilizá-las como agentes descontaminantes de aflatoxinas, seja como parte de uma cultura *starter* ou como um componente purificado que pode ser adicionado aos alimentos destinados a humanos ou, ainda, em rações para animais sem comprometer suas características finais.

Com base nos aspectos mencionados e na escassez de dados existentes na literatura sobre a capacidade de BAL e leveduras, isoladas ou conjuntamente, em remover a AFB₁ de um meio contaminado, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de avaliar o efeito da adição de cepa de BAL e biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) obtida através do resíduo da fermentação alcoólica de cerveja (RFC) em rações sobre o desempenho de frangos de corte intoxicados com AFB₁.

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar uma cepa de BAL que apresente elevado crescimento celular em meio específico e realizar a secagem de suas células para que possa ser adicionada em ração de frangos de corte visando à adsorção de AFB₁;
- Avaliar a utilização de soro de queijo como meio para produção da cepa de BAL selecionada em escala e em elevada concentração bacteriana;
- Realizar ensaio preliminar de remoção de AFB₁ em solução tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,0) pela cepa de BAL (em solução e seca por atomização e liofilização) e por RFC, isoladas ou associadas, a temperatura ambiente pelo tempo de contato de 60 minutos;
- Comparar a capacidade de remoção de AFB₁ pelo RFC com produtos comerciais à base de células de levedura;
- Realizar ensaio de intoxicação de frangos de corte administrando-se a AFB₁, a BAL atomizada e RFC, isolados ou associados na ração, avaliando-se os índices de produtividade (ganho de peso corpóreo, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade) e de bioquímica sérica (proteína total, glicose, albumina, globulina, cálcio, ácido úrico e as enzimas aspartato-amino-transferase e gama-glutamyl-transferase);
- Determinar os pesos relativos do fígado, rins e bursa de Fabricius, bem como as alterações histopatológicas nos referidos órgãos, decorrentes da exposição das aves à AFB₁, com ou sem a adição da cepa de BAL atomizada e RFC nas rações contaminadas.

2. Revisão de Literatura

2.1. Avicultura brasileira

A avicultura é uma atividade de grande relevância no Brasil, pois dentro do complexo brasileiro de carnes, constitui-se na sua atividade mais dinâmica. O desenvolvimento dessa atividade ocorreu a partir do final da década de 1950, nos estados do Sudeste, principalmente em São Paulo. Posteriormente, na década de 1970, período em que houve profunda reorganização do complexo de carnes no Brasil, a atividade se deslocou para a região Sul (GIROTTTO e AVILA, 2003). Nas últimas duas décadas, a produção de frango de corte tem evoluído de forma bastante significativa no Brasil. O dinamismo da atividade avícola está atrelado aos constantes ganhos de produtividade, sobretudo, através da melhora dos índices de conversão alimentar, dos ganhos nutricionais, da pesquisa em genética, da maior automação dos aviários e de um melhor manejo (SOUSA e OSAKI, 2006).

Pode-se considerar que a indústria avícola no Brasil é uma das mais importantes atividades, pois emprega mais 3,6 milhões de pessoas direta ou indiretamente, respondendo por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. No ano de 2012, a produção avícola brasileira atingiu 12,65 milhões de toneladas, uma redução de 3,17% em relação à produção obtida no ano de 2011 de 13,05 milhões de toneladas. Essa produção garantiu ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, estando atrás apenas dos Estados Unidos (16,48 milhões de toneladas) e China (13,70 milhões de toneladas) (UBABEF, 2013).

O mercado consumidor interno brasileiro tem mudado seu hábito de consumo de carnes, passando de um país preponderantemente consumidor de carne bovina para consumidor da carne de frango. A conquista desse avanço no consumo foi possível graças à qualidade, imagem de produto saudável e preços acessíveis dos produtos (GIROTTTO e AVILA, 2003). Do volume total de frangos produzido pelo país, 69,8% foi destinado ao consumo interno, com um consumo per capita de carne de frango de 45 kg em 2012. O Brasil tem sido competente tanto na produção como na conquista do mercado exterior, pois mantém desde 2004 a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2012 com a marca de 3,92 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países, gerando uma receita de US\$ 7,6

bilhões (UBABEF, 2013). Pode-se observar na Figura 1 as participações dos principais tipos de carnes nas exportações brasileiras, sendo que a carne de frango é a que apresentou a maior fatia de mercado com 66,40% no ano de 2010.

Figura 1 – Participação nas exportações brasileiras dos principais tipos de carnes no ano de 2010. Adaptado de UBABEF (2013).

Demonstrada a importância da avicultura na economia brasileira e também na alimentação da população, torna-se essencial o fornecimento de produtos seguros e livres de quaisquer doenças ou contaminantes, sendo que a qualidade da ração administrada aos animais é um dos principais fatores que influenciarão na qualidade final do produto. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, a produção total de rações no ano de 2011 para todos os animais domésticos criados no Brasil foi de 64,6 milhões de toneladas, sendo que 57,6% desse total foram destinados à alimentação de aves (Figura 2). Das 37,2 milhões de toneladas de ração destinadas às aves, 86,6% foram consumidos por frangos (SINDIRAÇÕES, 2012).

A ração representa a maior parte do custo total de produção de frangos vivos (67%) e também do frango abatido (55%), sendo que o milho, principal ingrediente energético, participa normalmente com 60 a 65% da composição da ração e representa aproximadamente 40% do seu custo. A avicultura comercial consome de 30 a 40% de todo o milho produzido no país, sendo que dois terços dessa

quantidade são utilizados para a alimentação de frangos de corte e um terço para a produção de ovos (LAZZARI, 2004). Stringhini et al. (2000) comentam que o milho representa 65% da energia metabolizável e 22% da proteína na fase inicial de criação de frangos de corte. Dada essa importância, a expansão das grandes agroindústrias do setor avícola está quase sempre associada ao cultivo de milho.

Figura 2 – Distribuição por segmento do consumo de rações no Brasil em 2011. Adaptado de SINDIRAÇÕES (2012).

O milho é considerado um importante produto comercial devido ao seu alto conteúdo em carboidratos, principalmente o amido, e de outros componentes, como proteínas e ácidos graxos, sendo que, em condições inadequadas de armazenamento, pode sofrer perdas no valor quantitativo e qualitativo, devido principalmente ao ataque de pragas e fungos, desde o campo até a época de consumo (STRINGHINI et al., 2000), como pode ser observado na Tabela 1.

Em um sistema com elevado grau de tecnificação, tal como ocorre na avicultura de modo geral, qualquer fator que afete negativamente a produção, determina enormes prejuízos aos produtores. Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais de rações, como as micotoxinas, especialmente as aflatoxinas, que acarretam perdas consideráveis às criações de

aves (ROSMANINHO, OLIVEIRA e BITTENCOURT, 2001). Santurio (2000) relata que em análises de aflatoxinas realizadas na Universidade Federal de Santa Maria, entre os anos de 1986 e 2000, em 15.600 amostras de alimentos destinados principalmente ao consumo animal, 41,9% delas demonstraram que o milho analisado estava contaminado por aflatoxinas.

Tabela 1 – Ocorrência de aflatoxina em rações e seus ingredientes durante surto de aflatoxicose em frangos de corte.

Material	Frequência* de contaminação por aflatoxina (%)
Farelo de soja	5
Milho	30
Outros ingredientes	0
Ração após moagem	52
Ração no comedouro	91

*A frequência é uma porcentagem de amostras de cada material que continha aflatoxina.

Fonte: Hamilton (1985) apud Bryden (2012).

Pelo fato de o milho ser passível de contaminação por aflatoxinas torna-se imprescindível a busca por métodos de descontaminação que sejam eficientes e baratos, devido ao grande volume de comercialização, e que garantam a sua segurança alimentar, evitando o desenvolvimento de aflatoxicoses responsáveis por perdas econômicas na avicultura. O uso de microrganismos, como *BAL* e *S. cerevisiae*, como agentes descontaminantes de aflatoxinas tem sido cada vez mais estudado, objetivando-se encontrar cepas capazes de remover a aflatoxina e evitando-se, assim, seus efeitos deletérios nos animais. Os itens seguintes desta revisão de literatura abordam a importância e propriedades toxicológicas das aflatoxinas, assim como o uso de microrganismos para sua descontaminação.

2.2. Aflatoxinas

Dentre as mais de 100.000 espécies de fungos identificadas até o momento, mais de 400 podem ser consideradas potencialmente toxigênicas e cerca de 5% são conhecidas por produzir compostos tóxicos ou classes de compostos que causam

efeitos adversos em animais e humanos em diversas partes do mundo (BATA e LASZTITY, 1999). Esses compostos, denominados micotoxinas, são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos pelos micélios ou esporos de fungos filamentosos (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001), os quais são sintetizados durante o final da fase exponencial de crescimento e aparentemente não parecem ter significância biológica em relação ao desenvolvimento ou competitividade do fungo (KABAK, DOBSON e VAR, 2006). D'Mello e Macdonald (1997) sugerem que a produção de micotoxinas é geralmente limitada a um número relativamente pequeno de espécies de fungos, podendo ser toda espécie produtora ou apenas uma cepa específica, e, ainda, que quanto mais complexo for o caminho da síntese de uma micotoxina, menor o número de espécies que a produzem.

O termo micotoxina é derivado da palavra grega "Mykes" que significa fungo e da palavra latina "Toxicum" que significa veneno ou toxina (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001). As micotoxinas são classificadas como o mais importante fator de risco não-infeccioso e crônico alimentar, sendo superior ao dos contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentares ou resíduos de pesticidas. Homem e animais podem ser levados a quadros de intoxicação aguda ou crônica através da ingestão de micotoxinas, sendo a condição patológica resultante desta ingestão a micotoxicose (NIERMAN et al., 2008). Fatores que afetam a magnitude dessa toxicidade em seres humanos ou animais incluem espécies, modos de ação, metabolismo e mecanismos de defesa (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Aproximadamente 400 tipos de micotoxinas já foram descobertos, sendo estas geralmente divididas em grupos com base em similaridades estruturais e seus maiores efeitos tóxicos (BHAT, RAI e KARIM, 2010). De todas as micotoxinas isoladas, uma das mais conhecidas e amplamente distribuídas em alimentos, e que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas são as aflatoxinas (AN, 2005). Estas são predominantemente produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, mas também podem ser produzidas por outras cepas como *A. nomius*, *A. tamarii* e *A. pseudotamarii* (ALBERTS et al., 2006). A contaminação por fungos aflatoxigênicos pode ocorrer, direta ou indiretamente, em qualquer momento durante a produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento, sendo atingidos diversos tipos de alimentos, como cereais, frutas secas, especiarias, oleaginosas e leite (PARK e LIANG, 1993).

As aflatoxinas apresentam ocorrência mundial, principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical, sendo que as espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer em uma ampla variedade de substratos e sob diversas condições ambientais. A formação da toxina nos produtos agrícolas ocorre em condições de tempo quente e úmido, e em instalações de armazenagem deficiente ou inadequada, sendo que os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a produção de aflatoxinas são a umidade relativa, que na maioria dos casos a faixa requerida é de 88 a 95% (PARK e LIANG, 1993). *A. flavus* pode produzir aflatoxinas em uma ampla faixa de temperatura (12 a 34°C), sendo que a inibição da produção da toxina ocorre a 36°C e a sua produção máxima entre 28 e 30°C. Diferentemente, *A. parasiticus* possui uma temperatura mínima de crescimento de 6 a 8°C e máxima de 44 a 46°C, com a faixa de temperatura ótima entre 25 e 35°C (ABRAR et al., 2013).

De acordo com Bryden (2012), a quantidade de aflatoxina produzida dependerá de fatores físicos como atividade de água, umidade relativa do ar, temperatura e danos mecânicos; fatores químicos como dióxido de carbono, oxigênio, composição de substrato e presença de pesticidas e fungicidas; e fatores biológicos como variedades vegetais, estresse, infestação por insetos e quantidade de esporos. É importante lembrar que o nível de contaminação é cumulativo, portanto a época de colheita e as condições de secagem e armazenamento podem desempenhar um papel igualmente importante na produção de aflatoxina (PRANDINI et al., 2009).

Segundo Bhat, Rai e Karim (2010), até o momento foram identificados aproximadamente 18 tipos diferentes de aflatoxinas, sendo que as principais incluem as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). As aflatoxinas possuem uma estrutura policíclica derivada de um núcleo de cumarina ligada a um sistema bifurano, sendo que as aflatoxinas do tipo B estão ligadas a uma pentanona, enquanto que as do tipo G estão ligadas a uma lactona de 6 membros (Figura 3). As aflatoxinas são altamente solúveis em solventes pouco polares como metanol e clorofórmio, enquanto insuficientemente solúveis em água (ABRAR et al., 2013).

Figura 3 – Estrutura das principais aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂).

Quando AFB₁ é ingerida por animais domésticos através do consumo de rações contaminadas, parte dela é degradada resultando na formação de aflatoxicol e parte é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva, sofrendo biotransformação hepática e convertendo-se em AFM₁, que é excretada no leite, tecidos e outros fluidos biológicos desses animais (OATLEY et al., 2000; MURPHY et al., 2006). Creppy (2002) relata que da totalidade de AFB₁ ingerida através da ração, aproximadamente 0,3 a 6,2% é transformada em AFM₁ no leite, e Bakirci (2001) afirma que existe ainda uma relação linear entre a quantidade de AFM₁ no leite e a de ração contaminada por AFB₁ consumida pelos animais.

No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência em alimentos destinados ao consumo humano e animal, sobretudo em rações. Observa-se na Tabela 2 alguns estudos realizados em diferentes regiões brasileiras sobre a contaminação de rações com AFB₁ a partir do ano de 2001. Em uma compilação de estudos sobre a contaminação de amostras de milho por aflatoxinas e outras micotoxinas nos anos de 1990 a 2000, realizada por Salay e Mercadante (2002), observou-se que 11,5% das amostras de milho e derivados analisadas no estado de São Paulo estavam contaminadas, com nível máximo de contaminação de 1.600 ng/g. Essa contaminação foi menor do que as encontradas para os estados do Ceará (32,9%) e Paraíba (96,9%), e também menor que os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (média de 33,4%).

Tabela 2 – Ocorrência de AFB₁ em ração disponível no comércio, segundo alguns trabalhos realizados no Brasil.

Região brasileira	Concentração		Amostras contaminadas (%)	Referências
	Faixa (µg.kg ⁻¹)	Média (µg.kg ⁻¹)		
Diversas regiões brasileiras	0,2 a 129	9,4	38,3	Vargas et al. (2001)
Norte do Estado do Paraná	5,6 a 37,5	16,95	13,6	Sassahara, Yanaka e Netto (2003)
Estado do Rio de Janeiro	1,2 a 17,5	-	66,7	Oliveira et al. (2006)
Nordeste do Estado da Bahia	1,0 a 5,0	-	10	Almeida et al. (2009)
Nordeste do Estado de São Paulo	1,2 a 19,5	8,4	40	Oliveira et al. (2010)
Norte do Estado do Paraná	1,4 a 604	-	72,1	Rossi et al. (2013)

2.3. Propriedades toxicológicas das aflatoxinas

Sérios riscos à saúde humana e animal podem ser causados pelas aflatoxinas, já que os efeitos provocados por elas podem ser bioquímicos ou biológicos. As aflatoxinas afetam bioquimicamente a energia, carboidratos e lipídeos, assim como os ácidos nucleicos e o metabolismo de proteínas. Os efeitos biológicos podem ser carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressivos e hepatotóxicos (BAPTISTA et al., 2004), os quais são influenciados por fatores como espécie, sexo, idade, estado nutricional, efeito de outros produtos químicos, dose e período de exposição do organismo à toxina (MISHRA e DAS, 2003). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002), classifica a AFB₁ como pertencente ao Grupo 1, carcinogênica para humanos.

De acordo com Guan et al. (2011), as características físicas, químicas e biológicas da molécula de AFB₁ indicam dois grupos cruciais para a sua atividade toxicológica. Uma delas é a dupla ligação no carbono 8,9 do anel difurano, o qual é

responsável pelas interações com o DNA e proteínas, afetando as funções bioquímicas normais dessas macromoléculas e levando a efeitos deletérios em nível celular. O outro grupo crucial é o anel de lactona existente na porção cumarina, que é facilmente hidrolisado e, assim, vulnerável à degradação.

Aflatoxicose é o envenenamento resultante da ingestão de níveis moderados a altos de aflatoxinas em alimentos contaminados. Em humanos, a aflatoxicose aguda resulta em icterícia progressiva e rápida, edema nos membros, dores, vômitos, necrose, cirrose, ou em casos graves, insuficiência hepática aguda e morte (NIERMAN et al., 2008). Pode ser causada pela ingestão de aproximadamente 10 a 20 mg de aflatoxina em um adulto, tendo, de acordo com a DL_{50} , a seguinte ordem de toxicidade: $AFB_1 > AFM_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$ (LACIAKOVÁ et al., 2008). Já a aflatoxicose crônica resulta em câncer, supressão imunológica, e outras condições patológicas, sendo o fígado o órgão alvo primário (NIERMAN et al., 2008).

De acordo com Santini e Ritieni (2013), as aflatoxinas são consideradas moléculas lipofílicas, e sendo o fígado um órgão também lipofílico, todos os compostos transportados pela corrente sanguínea são armazenados e concentrados nos hepatócitos que, com um tempo prolongado de exposição, podem transformar-se em câncer. Hussein e Brasel (2001) enfatizam que para os seres humanos, o maior risco das aflatoxinas é a exposição crônica causando o carcinoma hepatocelular, que pode ser agravado pelo vírus da hepatite A.

Em Saúde Animal, várias espécies são sensíveis aos efeitos agudos e crônicos das aflatoxinas, sendo que em muitas espécies, os machos são mais susceptíveis que as fêmeas, ao passo que, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior em jovens que em adultos. A aflatoxicose aguda caracteriza-se pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, baixa taxa de crescimento e de conversão alimentar, redução no ganho de peso, interferência na capacidade reprodutiva, imunossupressão, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte. O fígado é o principal órgão afetado, com lesões decorrentes da necrose hemorrágica, congestão centrolobular, proliferação das células dos ductos biliares e infiltração gordurosa dos hepatócitos. Os efeitos de toxicidade crônica também se caracterizam por lesões hepáticas, porém, em menor escala, e incluem câncer hepático e alterações genéticas (OSWEILER, 1990; LEESON, DIAZ e SUMMERS, 1995). As aflatoxinas agem como agente intercalante do DNA ligando-se a bases de

guanina e conduzindo à morte celular ou à sua transformação em tumor (YIANNIKOURIS e JOUANY, 2002).

A aflatoxicose pode provocar, ainda, considerável redução nos níveis de proteínas plasmáticas, influenciando a produção de hemoglobina, o mecanismo de coagulação sanguínea e na síntese de importantes sistemas enzimáticos que, associados ao aumento da fragilidade capilar, provoca hemorragias generalizadas (ROSA et al., 2012). Tessari et al. (2006) explicam que um dos sinais mais importantes de toxicidade da aflatoxina em frangos de corte é a mudança nos seus órgãos internos. Fígado, baço e rim aumentam de tamanho, enquanto que a bursa de Fabricius e o timo diminuem.

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Com relação às espécies exploradas na avicultura comercial, a susceptibilidade é maior em patos, seguidos de perus, gansos, faisões e frangos (MULLER et al., 1970). As principais manifestações da aflatoxicose em aves incluem redução da produção e peso dos ovos, aumento da gordura hepática, alteração de enzimas séricas, fraqueza, ataxia, inchaço de órgãos como fígado e rins, e aumento da susceptibilidade aos desafios ambientais e microbiológicos, principalmente em relação a doenças como salmonelose e candidíase (ZAGHINI et al., 2005). Entre os efeitos de imunossupressão demonstrados em aves, destacam-se a aplasia do timo e da bursa de Fabricius, redução do número e da atividade das células T, supressão da atividade fagocitária e redução de componentes humorais, como complemento (C4), interferon e imunoglobulinas (PETSKA e BONDY, 1990; PIER, 1992; CELIK et al., 2000).

Em surtos de aflatoxicose no campo, uma das características mais marcantes é a má absorção que se manifesta como partículas de ração mal digeridas nas excretas das aves. Está associada com a esteatorréia ou excreção aumentada de lipídeos. Em frangos de corte, a esteatorréia é acompanhada por uma diminuição nas atividades específicas e totais da lipase pancreática, principal enzima digestiva das gorduras, e diminuição dos sais biliares, necessários tanto para a digestão como para a absorção de gorduras, levando à esteatose hepática (fígado gorduroso). Também se observa, em frangos e poedeiras que recebem ração contaminada com aflatoxina, extrema palidez das mucosas e pernas. Esta pigmentação deficiente parece ser resultado da menor absorção, diminuição no transporte e deposição

tecidual dos carotenóides da dieta sendo a aflatoxicose identificada como “síndrome da ave pálida” (SANTURIO, 2000).

Dilkin e Mallmann (2004) explicam que, além de reduzir a produção de ovos, a aflatoxicose também é responsável pela redução do tamanho dos ovos, bem como pela redução proporcional no tamanho das gemas, devido aos prejuízos causados na síntese protéica e lipídica. Mas a deposição de cálcio na casca dos ovos por si só não é afetada, podendo inclusive aumentá-la e dificultar a eclosão. A postura é afetada somente 14 dias após o início da intoxicação, enquanto a eclodibilidade começa a ser afetada imediatamente após o início do consumo de ração contaminada.

Os efeitos das aflatoxinas sobre o desempenho de frangos de corte estão demonstrados por alguns trabalhos destacados na Tabela 3. Mariani (1998) observou que o efeito das aflatoxinas nos frangos foi maior na fase inicial de crescimento, ou seja, quando as aves ingeriram aflatoxinas nos primeiros 21 dias de idade, mas o reflexo negativo sobre o ganho de peso foi irreversível até o abate aos 42 dias de idade.

Tabela 3 – Efeitos das aflatoxinas sobre frangos de corte de acordo com a dose de exposição.

AFB₁ na ração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Efeitos tóxicos das aflatoxinas	Referências
300	Imunossupressão sem efeitos clínicos aparentes, diminuição significativa de linfócitos T, albuminas e globulinas	Ghosh, Chauhan e Roy (1990)
500	Redução no ganho de peso e alterações histológicas no fígado	Giambrone et al. (1985)
3.000	Diminuição significativa na concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas e aspartato amino transferase	Franciscato et al. (2006)
3.000	Desuniformidade da estatura, redução no consumo de ração e ganho de peso, alterações em órgãos e tecidos	Giacomini et al. (2006)

Portanto, pode-se afirmar que os efeitos tóxicos das aflatoxinas causam sérios prejuízos econômicos para a indústria avícola, comprometendo a cadeia de produção devido às reduções na taxa de crescimento, eficiência alimentar, imunidade às doenças, taxas de postura de matrizes e peso de abate (RAWAL, KIM e COULOMBE, 2010). Dersjant-Li, Verstegen e Gerrits (2012) afirmam que, para cada aumento de 1 mg/kg de aflatoxina na dieta, ocorre uma diminuição de 5% na taxa de crescimento de frangos de corte. De acordo com relatório do Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola, perdas devido às aflatoxinas para a indústria avícola dos EUA ultrapassam US\$143 milhões ao ano (CAST, 1989). Nas safras anuais, os prejuízos podem ultrapassar US\$932 milhões devido à contaminação com micotoxinas e em esforços para impedir ou reduzir a contaminação (CAST, 2003).

2.4. Legislação para aflatoxinas

O conhecimento e o controle do nível e da distribuição de contaminantes em alimentos são objetivos mundiais de produtores, fabricantes, agências reguladoras e pesquisadores, devido ao elevado impacto econômico e sanitário na segurança alimentar e saúde humana e animal. Uma vez que é impossível eliminar totalmente a presença de substâncias indesejáveis e contaminantes, as concentrações máximas devem ser fixadas a um nível rigoroso que seja razoavelmente possível, considerando-se o risco relacionado ao consumo de alimentos. De acordo com van Egmond, Schothorst e Jonker (2007), diferentes fatores podem influenciar na definição de limites para micotoxinas, incluindo a disponibilidade de dados toxicológicos e de ocorrência, o conhecimento detalhado sobre a distribuição e as possibilidades de amostragem e métodos analíticos para matérias-primas e/ou produtos finais, além das questões sócio-econômicas, como a existência de legislação nos países com se realizarão as trocas comerciais, além da necessidade de uma demanda suficiente de alimentos.

Assim, com a finalidade de proteger a saúde pública, várias nações ao redor do mundo têm estabelecido padrões de segurança alimentar para os níveis máximos toleráveis de aflatoxinas presentes nos alimentos. No ano de 2002, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) apontou que aproximadamente 100 países possuíam legislação específica para a presença de

aflatoxinas em alimentos, produtos lácteos e/ou rações, sendo que a população total desses países representava aproximadamente 90% da população mundial (Figura 4). A mesma pesquisa ainda mostrou que as legislações para aflatoxina estão ficando cada vez mais diversificadas e detalhadas, incluindo os métodos de amostragem e a metodologia analítica (VAN EGMOND e JONKER, 2004).

Figura 4 – Países com e sem regulamentação para aflatoxinas até 2002. Fonte: Van Egmond e Jonker (2004).

De acordo com Wu e Guclu (2012), mais de 5 bilhões de pessoas no mundo estão sob o risco de exposição crônica às aflatoxinas em alimentos, sendo que o milho é uma das principais fontes de exposição humana e animal, pois além de ser amplamente consumido no mundo todo, é uma das culturas mais susceptíveis à contaminação por aflatoxinas. Nos países desenvolvidos, quantidades suficientes de alimentos combinados com regulamentos que monitoram os níveis de aflatoxina protegem as populações humanas da ingestão significativa de aflatoxinas. No entanto, nos países onde as populações enfrentam a fome ou onde os regulamentos não são aplicados ou inexistentes, pode ocorrer a ingestão rotineira de aflatoxina (SANTINI e RITIENI, 2013).

Nos países que possuem legislação para aflatoxinas, os níveis de tolerância para aflatoxina total (soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) variam entre 1 e 35 µg/kg para alimentos, sendo o valor médio de 10 µg/kg, e variam entre 0 e 50 µg/kg para

rações, com valor médio de 20 µg/kg (ABBAS, 2005). No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, estabeleceu limites máximos para as aflatoxinas em diversos alimentos, incluindo aqueles utilizados em rações animais, como é o caso da milho, com limite máximo de tolerância de 20 µg/kg (BRASIL, 2011).

2.5. Métodos de descontaminação de aflatoxinas

Impactos negativos das aflatoxinas sobre a saúde e a economia levaram à busca por soluções para prevenir sua formação em alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir sua biodisponibilidade em produtos contaminados (HERNANDEZ-MENDOZA, GARCIA e STEELE, 2009). Melhoria das práticas agrícolas, agentes antifúngicos, engenharia genética e controle do armazenamento são estratégias utilizadas para prevenir a contaminação (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001). Para reduzir a biodisponibilidade, utiliza-se a enteroadsorção, feita através da adição na dieta de compostos adsorventes nutricionalmente inertes, agentes sequestrantes de micotoxinas que evitam sua absorção no trato gastrointestinal dos animais, impossibilitando a sua distribuição para o órgão-alvo (GRATZ, MYKKÄNEM e EL-NEZAMI, 2005). Os níveis de adição de adsorventes em ração de frangos de corte podem variar entre os inúmeros trabalhos científicos realizados na área. Para os diversos tipos de adsorventes utilizados, como aluminossilicatohidratado de sódio de cálcio, bentonita de sódio, células de *S. cerevisiae*, glucomananas esterificadas, montmorilonita sódica, diatomácea, carvão ativado, entre outros, os níveis adicionados em dietas de frangos de corte variaram entre 0,05% e 1,5% (LEDOUX et al., 1999; ARAVIND et al., 2003; BATINA et al., 2005; DENLI e OKAN, 2006; ABOUSADI, ROWGHANI e HONARMAND, 2007; LI, SUO e SU, 2010).

Nos casos em que é necessária a eliminação ou inativação, isto é, realizar a descontaminação das aflatoxinas, utilizam-se métodos físicos, químicos e biológicos, que devem ter como características a completa inativação, destruição ou remoção da toxina; não produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos, preservando seu valor nutritivo e palatabilidade; destruir os esporos e as micelas de fungos para prevenir a produção ou o reaparecimento da toxina; não modificar as propriedades

físicas do alimento significativamente, possuir um custo acessível e ser de fácil utilização (BATA e LASZTITY, 1999; MAGAN e OLSEN, 2006).

Inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes são considerados métodos físicos de descontaminação de micotoxinas, enquanto que a cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio) ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia) são considerados como métodos químicos, isto é, métodos que utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas. Entretanto, ambos os métodos possuem desvantagens, seja por não removerem eficientemente, ou então, por apresentarem altos custos ou proporcionarem perdas nutricionais e organolépticas aos produtos (LINE e BRACKETT, 1995; EL-NEZAMI et al., 1998).

Os métodos biológicos decorrem da atuação de microrganismos, como por exemplo, leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas, entre outros, sobre as micotoxinas através de mecanismos como competição por nutrientes e espaço, interações e antibiose (FAZELI et al., 2009). Assim, uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança é a biodegradação de aflatoxinas utilizando microrganismos (ALBERTS et al., 2009). Os métodos de descontaminação biológicos podem ser uma escolha muito promissora, desde que sejam eficientes, específicos, práticos, possam ser utilizados em larga escala e apresentem um custo-benefício (RAHAIE et al., 2012). Dentre todos os microrganismos existentes, as bactérias ácido-láticas (BAL) e as leveduras representam grupos de destaque devido a sua larga utilização em fermentações e preservação de alimentos, além de também apresentam resultados bastante promissores para descontaminação de aflatoxinas.

As BAL são bactérias geneticamente diversas, que produzem ácido láctico como principal produto de seu metabolismo. São gram-positivas, catalase e oxidase negativas, não-esporogênicas e não se locomovem espontaneamente, além disso, crescem anaerobicamente, mas são aero-tolerantes. Obrigatoriamente fermentam açúcares e tendem a ser nutricionalmente exigentes requerendo aminoácidos específicos e vitaminas do complexo B como fatores de crescimento (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactococcus* são alguns exemplos de gêneros de BAL que são conhecidos por sua atuação como agentes conservadores em produtos alimentícios fermentados, como vegetais, cereais, produtos lácteos e cárneos.

Já as leveduras são microrganismos não fotossintéticos com o núcleo separado e ciclo de vida complexo. São maiores que as bactérias, normalmente esféricas, não apresentam motilidade e se reproduzem por brotamento. Seu papel principal é a realização da fermentação alcoólica, embora sejam capazes de produzir enzimas e vitaminas. O substrato primário para as leveduras são os açúcares fermentescíveis, transformados principalmente em etanol, dióxido de carbono e biomassa quando em condições limitantes de oxigênio (MCKINNEY, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais conhecida e comercialmente importante, sendo suas cepas amplamente utilizadas na produção de bebidas alcoólicas e indústria da panificação.

Assim, dois aspectos podem ser considerados quando se utilizam as BAL e as leveduras: a fermentação e a antibiose. No primeiro caso, a cultura iniciadora adicionada age sobre o substrato, resultando em benefícios ao alimento, e no segundo caso, a cultura iniciadora deve inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que causam danos ao produto ou à saúde humana. Fuchs et al. (2008) explicam que um dos efeitos identificados das BAL e leveduras é a proteção contra toxinas contidas nos alimentos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas aromáticas, espécies reativas de oxigênio e micotoxinas. Neste último caso, estudos têm demonstrado que esses microrganismos possuem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, ou ainda, possuem a habilidade de remover a micotoxina do meio minimizando a ação desta.

Destaca-se que a busca por microrganismos com características probióticas e com alta capacidade de remoção das micotoxinas poderá ajudar a reduzir os riscos de exposição a essas toxinas através dos alimentos, caracterizando-se como uma linha de pesquisa bastante promissora na área de micotoxicologia. Shetty e Jespersen (2006) afirmam que cepas de leveduras e BAL possuem alta capacidade de remoção de micotoxinas e podem ser usadas como parte de culturas *starter* na fermentação de alimentos e bebidas, tendo, portanto, capacidade fermentativa e descontaminante, e que componentes purificados dessas mesmas cepas podem ser usados em pequenas quantidades como aditivos alimentícios sem comprometerem as características do produto final.

2.6. Uso de microrganismos para descontaminação de aflatoxinas

Na década de 1960, Ciegler et al. (1966) foram os primeiros pesquisadores a realizarem estudos sobre a descontaminação de aflatoxinas por microrganismos. Foram avaliados cerca de 1.000 espécies, entre leveduras, fungos filamentosos, bactérias, actinomicetos, algas e esporos de fungos, sendo que apenas a bactéria *Flavobacterium aurantiacum* B-184 (conhecida atualmente como *Nocardia corynebacterioides*) conseguiu remover irreversivelmente as aflatoxinas da solução.

A partir da década de 1990, muitos outros estudos *in vitro* começaram a surgir nessa área, analisando-se inúmeras cepas microbianas a respeito da sua capacidade de remoção da AFB₁. El-Nezami et al. (1998) avaliaram a ação de 7 tipos de bactérias sobre AFB₁ e encontraram que *Lactobacillus rhamnosus* (cepas GG e LC-705) conseguiram remover eficientemente até 80% da micotoxina do meio. Haskard et al. (2001) analisaram 9 cepas de *Lactobacillus* e também concluíram que GG e LC-705 foram mais eficientes na remoção da AFB₁, chegando a 78,9% e 76,5%, respectivamente.

Peltonem et al. (2001) estudaram 15 tipos de BAL dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e 5 tipos de bifidobactérias, e obtiveram resultados de remoção da AFB₁ variando de 5,6 a 59,7%, sendo que *Lactobacillus amylovorus* (cepas CSCC 5160 e CSCC 5197) e *L. rhamnosus* LC 1/3 foram as que apresentaram melhores resultados, 59,7%, 57,8% e 54,6% respectivamente. Oatley et al. (2000) observaram que diferentes cepas de bifidobactérias removeram de 37 a 46% da AFB₁, e que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* removeram 46% e 37%, respectivamente. Pelos estudos apresentados pode-se observar que dentro de um dado gênero e/ou espécie, nem todas as cepas são equivalentes em termos de remoção da toxina, ao contrário, essa capacidade é característica apenas de linhagens específicas, com eficácia variando acentuadamente (EL-NEZAMI et al., 2004).

Assim como as BAL, as células de *S. cerevisiae* têm sido estudadas para avaliação de sua capacidade de remoção de aflatoxinas. Joannis-Cassan et al. (2011) analisaram produtos a base de *S. cerevisiae* (parede celular de levedura de cervejaria ou panificação, levedura inativa de panificação ou levedura alcoólica), e observaram que, a pH 3,0, 37°C e tempo de contato de 15 minutos, a remoção de AFB₁ variou entre 2,5 e 49,3% dependendo da concentração da toxina no meio e do produto de levedura utilizado. Shetty, Hald e Jespersen (2007) alcançaram

resultados similares para uma cepa de *S. cerevisiae* e concentração de AFB₁ variando entre 1 e 20 µg/ml, sendo removidos 69,1% da AFB₁ na concentração de 1 µg/ml, 41% a 5 µg/ml e 34% a 20 µg/ml.

A realização de ensaios *in vitro* em solução tampão normalmente encontra condições ideais e bastante controladas, sendo, então, importante realizar também os ensaios em matrizes alimentícias para que possam ser estudadas as possíveis interferências do meio no comportamento dos microrganismos e sua capacidade de adsorção da aflatoxina. Shahin (2009) testou a habilidade de remoção de AFB₁ de células viáveis e não-viáveis em diferentes óleos vegetais, e observou que as células viáveis de *Lactococcus lactis* removeram de 71 a 86,7% da AFB₁, enquanto que as células não-viáveis removeram 100% da toxina em todos os óleos. Ainda, as células viáveis de *Streptococcus thermophilus* removeram de 66,5 a 91,5% da toxina, e as não-viáveis de 81,7 a 96,8% da AFB₁. Rasic, Skrinjar e Markov (1991) adicionaram AFB₁ ao iogurte e leite acidificado, em concentrações de 1.000 e 1.400 µg/Kg, obtendo a redução da AFB₁ no iogurte de 97,8% e 90%, respectivamente, sendo que a diminuição máxima da AFB₁ ocorreu durante a fermentação do leite. Para o leite acidificado com os ácidos cítrico, láctico e acético, a redução da AFB₁ (concentração de 1.000 µg/kg) foi de 90%, 84% e 73%, respectivamente.

Biernasiak, Piotrowska e Libudzisz (2006) avaliaram a capacidade de bactérias probióticas e *S. cerevisiae* em remover a soma das aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) durante a fermentação de uma massa composta por farinhas de cevada, trigo e milho, e observaram que após 6 horas de fermentação a quantidade de aflatoxina havia diminuído em 18% e 33% para as massas adicionadas em 4 e 40 µg de aflatoxina, respectivamente, e após 24 horas de fermentação, diminuiu em 27% e 50%, respectivamente. Madrigal-Santillán et al. (2006) analisaram a capacidade de *S. cerevisiae* (0,1, 0,2 e 0,3%) em adsorver a AFB₁ em milho contaminado (150, 300, 450 e 800 µg/kg milho). O processo de adsorção foi dependente da concentração com relação inversamente proporcional, isto é, quanto maior a concentração de AFB₁ no meio, menor foi a eficiência de remoção da *S. cerevisiae* (16 a 66% de remoção a 800 µg/kg de AFB₁, contra 40 a 93% de remoção a 150 µg/kg de AFB₁), entretanto, quanto maior foi a quantidade adicionada de *S. cerevisiae* no meio, maior a adsorção da toxina (66 a 93% da AFB₁ removida a 0,3% de *S. cerevisiae*, contra 16 a 40% a 0,1% de *S. cerevisiae*).

Alguns tratamentos físicos, químicos e enzimáticos podem aumentar a habilidade das BAL e *S. cerevisiae* em unir-se à aflatoxina do meio. Azab et al. (2005) observaram que os tratamentos ácido (58,6 a 87,0%) e térmico (33,5 a 71,9%) aumentaram a capacidade de remoção da AFB₁ por cepas de *Lactobacillus* quando comparados à solução tampão (16,3 a 56,6%), enquanto que os tratamentos alcalino (8,3 a 27,4%) e com etanol (15,9 a 46,5%) diminuíram a quantidade de AFB₁ removida. Shetty, Hald e Jespersen (2007) concluíram que o tratamento de células de *S. cerevisiae* com aquecimento a 60°C e 120°C e com ácido clorídrico (2M) aumentou a capacidade de remoção da AFB₁ do meio para 68,8%, 79,3% e 72,1%, respectivamente, contra 38,7% pelas células viáveis da levedura. Os resultados obtidos por Rahaie et al. (2010) mostraram que células imobilizadas de *S. cerevisiae* (ATTC 9763) aumentaram sua habilidade em remover a AFB₁ em sementes de pistache após tratamentos ácido (60% e 73% para 10 e 20 ng/ml de AFB₁, respectivamente) e térmico (55% e 75%, respectivamente), comparativamente às células viáveis (40% e 70%, respectivamente).

Observa-se pelos estudos citados que as células bacterianas ou de levedura não-viáveis podem adsorver a aflatoxina do meio contaminado. Assim, supõe-se que ocorra uma união de natureza física entre a célula do microrganismo e a aflatoxina, ou seja, uma adesão aos componentes da parede celular, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, ao invés de ocorrer através de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo microbiano (LAHTINEN et al., 2004; JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005; SHETTY e JESPERSEN, 2006). Perkins (1999) explicam que a eficiência da adsorção depende da estrutura química tanto do adsorvente quanto da micotoxina. A polaridade das cargas elétricas na superfície das partículas, o tamanho dos poros e o pH dos adsorventes também podem afetar a adsorção de micotoxinas. No caso da aflatoxina, a qual possui uma carga positiva forte, esta poderá ser adsorvida por adsorventes polares.

Além da viabilidade celular, outros fatores podem influenciar a capacidade de remoção de aflatoxinas pelas células de BAL e de *S. cerevisiae*, como a concentração bacteriana e da aflatoxina no meio, especificidade do microrganismo, temperatura de incubação, pH do meio, tempo de contato do microrganismo com a toxina, adição de nutrientes, entre outros. Bovo, Corassin e Oliveira (2010), em revisão sobre o assunto, descrevem detalhadamente esses fatores. Vale destacar que a estabilidade do complexo BAL/AFB₁ e *S. cerevisiae*/AFB₁ é um fator crítico

para evitar a liberação da toxina durante passagem pelo trato gastrointestinal, resistindo aos principais estresses como baixo pH e presença de bile.

Farzaneh et al. (2012) observaram que *Bacillus subtilis* UTBSP1 apresentou efeitos significativos na remoção de AFB₁ (2,5 ppm) de um meio contaminado (52,67% e 80,53%, após 24 e 48 horas, respectivamente). Após os tempos de 72 e 96 horas não houve avanço significativo na quantidade de toxina removida. Gao et al. (2011) concluíram que *B. subtilis* (cepa ANSB060) removeu os diferentes tipos de aflatoxina em diferentes quantidades (81,5%, 60% e 80,7%, respectivamente para AFB₁, AFM₁ e AFG₁). Além disso, em ensaios simulando o ambiente gastrointestinal (pH 2,0 e 0,3% de sais biliares), células viáveis dessa mesma cepa foram capazes de sobreviver após 24 horas de incubação, e apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. aureus*.

Em relação à concentração de células bacterianas no meio, Bolognani, Rumney e Rowland (1997) observaram que uma concentração mínima de 5×10^9 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium longum* foi necessária para remover apenas 13% da AFB₁ em cerca de uma hora. El-Nezami et al. (1998) relataram que, para *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705), foi preciso uma concentração mínima de 2×10^9 UFC/ml para remover 50% da AFB₁, sendo que uma remoção maior aconteceu quando a concentração de BAL foi elevada para 10^{10} UFC/ml. Nesse mesmo estudo, os autores observaram que bactérias gram-positivas são melhores sequestradoras de aflatoxina do meio que bactérias gram-negativas, com taxas de remoção de 80% e 20%, respectivamente, sugerindo que a habilidade de remoção da toxina é dependente da estrutura da parede celular. Lee et al. (2003) afirmam que a concentração de aflatoxina no meio também influencia a taxa de adsorção da mesma, concluindo que quanto maior a sua concentração no meio maior é a taxa de remoção, tanto para as células viáveis quanto para as inviáveis.

Armando et al. (2011) concluíram que cepas de *S. cerevisiae* foram capazes de sobreviver nas condições gastrointestinais impostas e que a porcentagem de toxina removida variou entre as cepas (10^7 UFC/ml) e com a concentração de AFB₁ utilizada (16,4 a 82% de adsorção para 50 ng/ml de AFB₁; 21,3 a 48,7% para 100 ng/ml de AFB₁; e 20,2 a 65,5% para 500 ng/ml de AFB₁). Segundo Joannis-Cassan et al. (2011), a adsorção da aflatoxina diminui conforme aumenta sua concentração no meio, sendo que o processo de adsorção não é um fenômeno linear. Madrigal-Santillán et al. (2006) observaram, através da análise de densitogramas, que o

processo de adsorção não causa mudanças estruturais na molécula de micotoxina, e que uma possível causa da diminuição nas taxas de adsorção da AFB₁, conforme sua concentração aumenta no meio, é a saturação dos sítios de adsorção da célula de *S. cerevisiae*, sendo que outros fatores como tempo de incubação, pH, método de purificação da biomassa e métodos de análise podem influenciar nesse processo.

Slizewska e Smulikowska (2011) observaram que durante a fermentação de ração de frangos de corte utilizando BAL (3 cepas de *Lactobacillus*) e *S. cerevisiae*, resistentes ao suco gástrico e bile, removeu-se a AFB₁ em 55% na concentração de 1 mg/kg de AFB₁ no meio, e em 39% na concentração de 5 mg/kg de AFB₁ após 6 horas. Essa tendência de remoção foi mantida durante as horas seguintes de incubação, sendo que após 24 horas a quantidade de AFB₁ removida foi de 73% e 53%, respectivamente. Os autores consideram que, do ponto de vista prático, o tempo de 6 horas de fermentação é o mais importante, pois a passagem dos alimentos em frangos de corte varia entre 4 e 8 horas.

Entretanto, testes *in vitro*, apesar de serem muito úteis na identificação de potenciais agente sequestrantes de aflatoxinas e ajudar a determinar os mecanismos e condições favoráveis de adsorção, nem sempre são indicadores confiáveis de que BAL e *S. cerevisiae* manterão a AFB₁ adsorvida durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Assim, é importante que esses microrganismos sejam submetidos a avaliações *in vivo* a fim de testar sua eficácia em remover a AFB₁ em rações e determinar sua capacidade de manter a aflatoxina adsorvida, a exemplo do recomendado para adsorventes minerais empregados para micotoxinas.

Até o momento, poucos estudos *in vivo* abordando a remoção de AFB₁ pelas BAL foram publicados. Investigando a habilidade de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS em remover a AFB₁ de um meio líquido intestinal extraído do duodeno de frangos, encontrou-se que o acúmulo de AFB₁ no tecido intestinal reduziu-se em 74%, 63% e 37%, respectivamente (EL-NEZAMI et al., 2000). Gratz et al. (2006) em experimento com ratos observaram que após 24 horas da administração oral de *L. rhamnosus* GG e de AFB₁ houve um aumento significativo da excreção fecal de AFB₁ em 122% e de AFM₁ em 152%, sugerindo que a bactéria foi capaz de reter as aflatoxinas no interior do lúmen intestinal dos ratos. No entanto, é essencial garantir que bactérias capazes de adsorver aflatoxinas não adiram à mucosa intestinal e não resulte em uma exposição prolongada às toxinas (KANKAANPÄÄ et al., 2000).

Hathout et al. (2011) observaram que ratos tratados com ração adicionada de aflatoxina (3 mg/kg de ração) apresentaram um decréscimo significativo na ingestão de ração comparados ao grupo controle, contrariamente aos animais alimentados com dietas contendo *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus reuteri* (10 ml/kg de ração, sendo 1×10^{11} UFC/ml) e a aflatoxina. Consequentemente, os animais tratados com dieta contendo apenas aflatoxina apresentaram um menor peso corporal e um aumento significativo nos índices de transaminase, fosfatase alcalina, colesterol, triglicerídeos, lipídeos totais, creatinina, ácido úrico e óxido nítrico no soro e peroxidação lipídica no fígado e nos rins acompanhada de uma diminuição significativa na capacidade antioxidante total. Os tratamentos com as bactérias conseguiram induzir uma melhora significativa em todos os parâmetros bioquímicos e no quadro histológico do fígado, sendo *L. reuteri* mais eficaz que *L. casei*.

Estudos *in vivo* utilizando-se *S. cerevisiae* não são escassos como os de BAL, principalmente na avicultura. Geralmente, *S. cerevisiae* é adicionada às rações como promotora de desempenho, entretanto, essa levedura também tem apresentado efeitos benéficos contra a exposição à AFB₁. Stanley et al. (1993) observaram que a adição de 1% de *S. cerevisiae* à ração contaminada com 5 µg/g de AFB₁ evitou a perda de peso corporal, inchaço do fígado e coração e a diminuição das concentrações séricas de albumina e proteína total em frangos de corte. Parlat, Özcan e Oguz (2001) concluíram que a adição de *S. cerevisiae* em ração contendo aflatoxina diminuiu os efeitos deletérios sobre o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar de codornas japonesas, sendo que, comparado aos controles, o ganho de peso foi 37% menor quando as aves foram alimentadas com ração adicionada apenas de aflatoxina, contra 15% maior para ração contendo aflatoxina e *S. cerevisiae*. Os autores ainda relataram que a dieta contendo apenas *S. cerevisiae* proporcionou melhorias significativas em todos os parâmetros de crescimento investigados (cerca de 40%) em relação aos controles.

Yildiz, Parlat e Yildirim (2004) explicam que os efeitos prejudiciais das aflatoxinas na produção de ovos, consumo de ração e taxa de conversão alimentar podem ter sido causados por anorexia, apatia, inibição da síntese protéica e lipogênese. Além disso, a função hepática comprometida e os mecanismos de utilização de proteínas e lipídeos podem ter afetado os critérios de desempenho e a situação de saúde geral do animal. Raju e Devegowda (2000) complementam que os componentes da parede celular da *S. cerevisiae* são capazes de adsorver

micotoxinas, estimular o sistema imune e competir por sítios de ligação nos enterócitos inibindo a colonização do intestino por patógenos.

Em um estudo com camundongos, Madrigal-Santillán et al. (2006) observaram que a adição de AFB₁ na dieta (0,4 e 0,8 mg/kg) causou uma significativa redução no ganho de peso dos animais e um aumento de 85% (0,8 mg/kg) na taxa dos eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENM) após 3 semanas de ingestão comparados ao grupo controle. Quando administradas dietas contendo AFB₁ e *S. cerevisiae* (0,3%), o ganho de peso foi duas vezes maior que nas dietas contendo apenas a toxina e a taxa de ENM aumentou apenas 46% (0,8 mg/kg). Os autores explicam que uma redução no peso do animal é uma das consequências mais comuns para a ingestão de AFB₁, pois esta altera a atividade de diversas enzimas digestivas que dão origem à esteatorréia, hipocarotenoidismo, e uma diminuição dos níveis de bile, lipase pancreática, tripsina e amilase. Além disso, a biotransformação da AFB₁ dá origem a vários metabólitos, em particular o epóxido 8,9, que é relevante porque pode ligar-se covalentemente ao DNA e às proteínas, alterando processos enzimáticos, tais como a gluconeogênese, ciclo de Krebs ou sínteses de ácidos graxos (LEESON, DIAZ e SUMMERS, 1995). A taxa de ENM é utilizada para determinação da genotoxicidade da AFB₁, pois quantifica os cromossomos quebrados e os cromossomos inteiros anormalmente distribuídos para as células filhas, mostrando, portanto, que a AFB₁ é um potente mutagênico.

No entanto, Halász et al. (2009) explicam que os resultados obtidos até o momento podem ser tratados apenas como um primeiro passo no desenvolvimento de tecnologias adequadas e comercialmente aplicáveis, uma vez que a maioria dos experimentos foi realizada em condições modelo, isto é, ideais. Em muitos casos, as culturas de microrganismos normalmente não fazem parte da microflora dos alimentos e rações, o que pode causar problemas de segurança alimentar. Por isso, faz-se importante o desenvolvimento de produtos contendo as células microbianas inativadas e em uma forma fácil de aplicação, como por exemplo em pó, assim estas não serão capazes de alterar as características dos produtos e poderão atuar na adsorção da aflatoxina. Finalmente, o lado econômico da potencial tecnologia a ser desenvolvida deve ser clarificado.

2.7. Obtenção de células de *S. cerevisiae* a partir da produção de cerveja

Atualmente, *S. cerevisiae* é um dos principais microrganismos utilizados na fermentação alcoólica de bebidas. Sendo assim, o aproveitamento da biomassa de leveduras resultante da fermentação alcoólica, principalmente aquelas geradas na produção de cerveja, assim como de aguardente e etanol combustível produzidos a partir da cana-de-açúcar, torna-se uma alternativa bastante viável, já que existe grande disponibilidade destes resíduos no mercado brasileiro. A grande disponibilidade pode ser verificada através dos dados de produção brasileira dessas bebidas, já que foram produzidos 1,2 bilhão de litros de cachaça no ano de 2012 (IBRAC, 2013), 23,2 bilhões de litros de etanol combustível na safra de 2012/2013 (UNICA, 2013) e 13,3 bilhões de litros de cerveja em 2012 (OLIVON, 2013). A produção de cerveja brasileira garantiu ao país o 3º lugar no *ranking* mundial nos últimos 3 anos, como pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4 – *Ranking* mundial de produção de cerveja em 2010, 2011 e 2012.

Colocação	País	Produção de cerveja (bilhões de litros)		
		2010	2011	2012
1	China	44,830	48,988	49,020
2	Estados Unidos	22,898	22,648	22,931
3	Brasil	12,870	13,300	13,280
4	Rússia	10,293	9,814	9,740
5	Alemanha	9,568	9,554	9,461
6	México	7,988	8,150	8,250
7	Japão	5,810	5,600	5,546
8	Reino Unido	4,499	4,569	4,204
9	Polônia	3,600	3,600	3,780
10	Espanha	3,337	3,357	3,300

Fonte: Olivon (2013).

O processo convencional de fabricação de cerveja tem uma história extremamente longa, mais de 8.000 anos, podendo variar de acordo com a região do mundo e o tipo de cerveja a ser produzido (FERREIRA et al., 2010). Basicamente, a produção da cerveja se inicia com a maltagem da cevada, onde os

grãos de cevada são umedecidos, germinados pela ação de enzimas (α -amilase e β -amilase) e secos, transformando-se em malte. A intensidade da torrefação do malte influencia nas colorações e aromas dos diferentes tipos de cerveja. O malte é, então, moído, expondo o material amiláceo à ação enzimática, e segue para um tanque com água quente, onde é cozido para transformação do amido em açúcar fermentescível, resultando em um líquido turvo, grosso e adocicado, chamado de mosto. Em seguida, o mosto é filtrado para eliminar o bagaço de malte e bombeado para uma caldeira, sendo que a fervura intensa não só esteriliza o mosto como ajuda a definir a cor e sabor da cerveja. Nessa etapa, o lúpulo é adicionado contribuindo para o sabor amargo e aroma da cerveja (HUI, 2012).

Após o resfriamento em trocadores de calor a placas, procede-se à fermentação através da adição de leveduras (*S. cerevisiae*) que transformam os açúcares do mosto, como maltose e glicose, em álcool, gás carbônico e outros componentes. Esse processo é determinante para o sabor da cerveja e o controle da temperatura varia de acordo com os tipos de cerveja. A cerveja ganha sabor através da maturação a baixas temperaturas, que pode levar de uma a três semanas. Ocorre a sedimentação de algumas partículas em suspensão e desencadeiam-se algumas reações de esterificação que irão produzir alguns aromatizantes essenciais para a cerveja. Realiza-se uma nova filtração para eliminar partículas restantes em suspensão e adsorver substâncias que conferem cor desagradável, deixando a cerveja transparente e brilhante. A pasteurização pode ser feita antes do envasamento, no caso de barris, ou depois, no caso de garrafas e latas. O produto final é resfriado até temperatura ambiente e, então, comercializado (HUI, 2012). Observa-se na Figura 5, a ilustração das etapas produtivas da cerveja.

A levedura tem um impacto fundamental na qualidade da cerveja, pois não produz somente etanol e dióxido de carbono, mas também outros componentes como álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos sulfurados, os quais desempenham um papel chave no perfil sensorial da cerveja. Durante a fermentação, o número de células de leveduras aumenta de 3 a 6 vezes, dependendo das condições empregadas. Normalmente, a quantidade total de biomassa de levedura na cerveja é de 1,7 a 2,3 kg/m³ de produto final, com a 10 a 14% de sólidos totais, incluindo os sólidos da levedura, da cerveja e do mosto (FERREIRA et al., 2010).

Figura 5 – Produção de cerveja. Adaptado de Encyclopedia Britannica (2009).

Ao término do processo de fermentação, enquanto as leveduras utilizadas na fabricação do etanol combustível são reutilizadas constantemente durante toda a safra, pois passam por um processo de recuperação após a separação do etanol a fim de propiciar condições ótimas de fermentação e evitar infecções bacterianas; as leveduras provenientes da fabricação da cerveja normalmente não são reutilizadas em um novo processo ou são reutilizadas poucas vezes (4 a 6 vezes), já que o risco de contaminação e a perda de vitalidade aumentam a cada nova utilização dependendo do tipo de cerveja e condições de fermentação.

Portanto, a biomassa de leveduras resultante da fabricação da cerveja é um resíduo disponível em grandes quantidades que pode ser destinada para fins comerciais, como a adição em rações, pois é considerada um suplemento rico em proteínas, aminoácidos e vitaminas do complexo B para nutrição animal. Além disso, constitui uma alternativa interessante para a descontaminação de aflatoxinas em rações, diminuindo os efeitos tóxicos associados à sua ingestão pelos animais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Aquisição, cultivo e seleção das bactérias

As bactérias ácido-láticas utilizadas no presente projeto foram originadas de cepas previamente certificadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os isolados de BAL, identificados na Tabela 5 com as siglas PN e TR foram provenientes da coleção de culturas lácteas do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de Campinas/SP. Já os isolados identificados como LYO e BI foram gentilmente doados pela empresa Danisco Brasil Ltda., enquanto que a cepa de sigla LG foi obtida na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (Campinas/SP).

Tabela 5 – Cepas bacterianas utilizadas nos testes de seleção da bactéria ácido-lática.

Cepa	Bactéria	Sigla
PN 270	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	PN
TR 260	<i>Lactobacillus plantarum</i>	TR
HOWARU® LYO 40 DCU	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LYO
FLORA-FIT BI 07	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BI
ATCC 33323	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LG

As cepas bacterianas foram recebidas na forma liofilizada, sendo reativadas em caldo MRS (de Man, Rogosa & Sharpe – Acumedia®, Lansing/MI/EUA) a 37°C e conservadas sob temperatura de congelamento de -80°C. A cultura bacteriana foi adicionada de 20% de glicerol estéril (Synth® - Diadema/SP/Brasil), que possui a função de agente crioprotetor.

Para a reativação das cepas, estas foram descongeladas rapidamente, sendo repicadas em caldo MRS e incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas. As culturas foram repicadas em caldo MRS repetidas vezes até que as mesmas alcançassem uma concentração elevada de células. Sempre que as cepas bacterianas eram reativadas, sua pureza era examinada através de plaqueamento em profundidade em ágar MRS (Acumedia®, Lansing/MI/EUA) para verificação das colônias formadas e também por coloração de Gram. O plaqueamento em

profundidade foi realizado em duplicata, seguindo-se o procedimento sugerido pela American Public Health Association (APHA, 2004), sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de meio.

Visando a facilitar o trabalho de determinação da concentração de cada cepa bacteriana nos caldos preparados, foram construídas curvas de concentração bacteriana utilizando-se a técnica de turbidimetria, método que dá uma estimativa do crescimento bacteriano em tempo real através de medidas de densidade óptica. Após o crescimento das bactérias em caldo MRS por 24 horas a 37°C, foi criada uma curva de concentração correlacionando-se a medida da absorbância (em triplicata) encontrada em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC – Shanghai Lengguang Technology Co. Ltd, Shanghai/China) a 600 nm para cada diluição seriada realizada no próprio caldo MRS (diluído em 10 vezes devido à sua elevada turbidez) com o logaritmo da concentração bacteriana obtida através da contagem de colônias por plaqueamento em profundidade (BEGOT et al., 1996).

Finalmente, analisou-se o crescimento das 5 cepas de bactérias estudadas, selecionou-se apenas uma delas, a que apresentou maior crescimento, isto é, maior número de células por um determinado volume de meio. A bactéria *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU (LYO) foi a selecionada e, então, utilizada nas etapas seguintes do projeto.

3.2. Ensaio preliminar *in vitro* de adsorção de AFB₁ pela LYO em solução

Foi utilizado padrão de AFB₁ (Supelco™ - Bellefonte/PA/EUA), dissolvido em tolueno e acetonitrila (9:1), o qual foi calibrado espectrofotometricamente através da técnica preconizada por Scott (1990) e diluído de maneira a obter uma solução estoque contendo aproximadamente 10,0 µg AFB₁/ml. Esta solução foi utilizada no preparo de outras soluções de trabalho contendo cerca de 1,0 µg AFB₁/ml em solução tampão citrato-fosfato (STCF), pHs 3,0 e 6,0, sendo o solvente completamente evaporado por injeção direta de ar e aquecimento a 40°C.

A realização do experimento foi conduzida adaptando-se o método utilizado por El-Nezami et al. (1998). Após a incubação de LYO em caldo MRS a 37°C por 24 horas, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (600 nm) para determinação da

concentração de células bacterianas no meio através da curva de calibração construída previamente. Em seguida, um volume do caldo com a cultura de bactérias correspondendo a cerca de 1×10^{10} células foi centrifugado (CT-14000 – Cientec, Piracicaba/SP/Brasil) a 4.000 rpm por 5 minutos para a formação de *pellets* das bactérias. Os *pellets* formados foram lavados com água ultra-pura (Simplicity 185 – Millipore®, Billerica/MA/EUA) estéril e, então, ressuspensos em 1,5 ml de STCF contendo a AFB₁ para ambos os pHs analisados. Estas soluções foram incubadas pelo tempo de 60 minutos a temperatura ambiente em mesa agitadora a 180 rpm (TE-140 – Tecnal, Piracicaba/SP/Brasil).

Terminado o tempo de incubação, as células foram novamente centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante obtido foi analisado através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Adicionalmente, um controle negativo (células bacterianas suspensas em STCF) e um controle positivo (AFB₁ em STCF) foram incubados e analisados.

Também foram feitas análises das células bacterianas inviabilizadas, sendo que após a etapa de incubação em caldo MRS a 37°C por 24 horas e medição espectrofotométrica da concentração de bactérias, a cultura bacteriana foi autoclavada (Phoenix, Araraquara/SP/Brasil) a 121°C por 15 minutos para inviabilização celular. Em seguida, foram realizadas as mesmas etapas descritas acima a partir do recolhimento de um volume de caldo com a cultura de bactérias correspondendo a cerca de 1×10^{10} células.

Para a quantificação da AFB₁ em solução tampão, injetou-se o sobrenadante diretamente no sistema CLAE Shimadzu® (Tóquio/Japão) constituído de detector de fluorescência RF-10A XL, equipado com coluna Phenomenex ODS 5 μ m 4,6 X 150 mm e amostrador automático SIL-10AF, sendo que o sistema foi estabilizado por uma hora a um fluxo de 1 ml/minuto a temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi uma solução de água, acetonitrila e metanol na proporção de 60:20:20, com um fluxo de 1 ml/minuto. A detecção da excitação foi feita a um comprimento de onda de 360 nm e a emissão a 440 nm. O tempo de retenção da AFB₁ nas condições de análise especificadas foi de 10,5 minutos ($\pm 10\%$) e o limite de detecção foi de 0,01 ng/ml, considerando-se a concentração mínima de AFB₁ necessária para gerar um pico cromatográfico 3 vezes maior que o desvio padrão da linha de base dos cromatogramas. A quantificação do percentual de AFB₁ adsorvida pelos microrganismos foi efetuada através da Equação 1.

$$A = \left\{ \frac{[B-C-D]}{B} \right\} * 100 \quad (1)$$

Onde,

A: percentual de AFB₁ adsorvida pela LYO

B: área do pico cromatográfico do controle positivo (AFB₁ em STCF)

C: área do pico cromatográfico da amostra (AFB₁ em STCF + LYO)

D: área do pico cromatográfico do controle negativo (STCF + LYO)

3.3. Secagem do caldo contendo as células bacterianas

Após crescimento da LYO em caldo MRS, esterilizou-se em autoclave a 121°C por 15 minutos a fim de inviabilizar o metabolismo das células bacterianas, já que mesmo inviabilizadas essas mesmas células são capazes de remover a AFB₁ de um meio contaminado. Em seguida, procedeu-se à secagem por atomização utilizando-se *spray dryer* (MSD 1.0 – LabMaq, Ribeirão Preto/SP/Brasil) (Figura 6), sendo os parâmetros de operação do equipamento descritos na Tabela 6. Foi adicionada maltodextrina (MOR RER® 1910 – Corn Products Brasil, Mogi-Guaçu/SP/Brasil) na proporção de 15% a fim de facilitar o processo de secagem pelo equipamento já que o caldo contendo as células bacterianas possui uma porcentagem de sólidos extremamente baixa. Para determinação do rendimento do processo, levou-se em consideração a contagem bacteriana no meio, o volume de meio antes da secagem, as perdas durante o processo e o peso final após a secagem, incluindo-se a maltodextrina adicionada.

Adicionalmente, a título de comparação, foi realizada a secagem do caldo contendo as células bacterianas através de liofilização, um processo mais brando quando comparado com a atomização. O preparo da amostra foi realizado cultivando-se a bactéria em caldo MRS por 24 horas a 37°C e em seguida foi feita a autoclavagem a 121°C por 15 minutos. As células inativadas foram centrifugadas (Excelsa II 206 BL – Fanem, São Paulo/SP/Brasil) a 4.000 rpm por 5 minutos e, então, o sobrenadante foi totalmente retirado e os *pellets* bacterianos lavados com água ultra-pura para remoção de componentes restantes do caldo. Uma nova

centrifugação nas mesmas condições anteriores foi feita para retirada do excesso de água resultando em uma solução contendo as células bacterianas “concentradas”.

Figura 6 – Equipamento *spray dryer* utilizado para secagem da cultura bacteriana.

Tabela 6 – Parâmetros de operação do *spray dryer*¹ para secagem das células bacterianas.

Parâmetro	Condições de operação
Temperatura de entrada do ar na câmara de secagem	160°C
Temperatura de saída do ar na câmara de secagem	105°C
Velocidade de entrada do ar	2,5 m/s
Volume de alimentação do caldo de bactérias para atomização	10 ml/minuto
Vazão de ar do compressor	30 L/minuto

¹ *Spray dryer* MSD 1.0 (LabMaq, Ribeirão Preto/SP/Brasil).

A solução concentrada de células bacterianas foi congelada (-18°C) e então colocada em liofilizador por 24 horas (LC 1500 – Terroni Equipamentos Ltda., São

Carlos/SP/Brasil), onde, sob vácuo (bomba de vácuo DV-142N – JB Platinum, Aurora/IL/EUA) e aumento gradativo da temperatura (temperatura inicial do processo: -5,0°C, temperatura final do processo: 19,5°C), a água contida na amostra sofreu sublimação, passando diretamente da fase sólida à gasosa.

3.4. Produção de LYO utilizando meio de cultivo alternativo

Visando ao aumento da escala de produção e a utilização de um meio de cultivo mais barato, a cepa bacteriana foi cultivada em meio contendo soro de leite, o qual tem composição detalhada na Tabela 7. Para evitar a precipitação de proteínas durante a esterilização do soro em autoclave (121°C, 15 minutos), estas foram hidrolisadas com protease comercial, e para evitar a reação de Maillard, peptona e extrato de levedura bruto foram adicionados posteriormente, sob condições assépticas.

Tabela 7 – Composição do caldo MRS e meio contendo soro de leite.

Componentes da formulação	Caldo MRS	Meio com soro de leite¹
Peptona (g/L)	10	20
Extrato de levedura (g/L)	4	10
Extrato de carne (g/L)	8	-
Glicose (g/L)	20	-
Tween 80 (g/L)	1	-
Fosfato de potássio dibásico de hidrogênio (g/L)	2	-
Acetato de sódio.3H ₂ O (g/L)	5	-
Citrato tri-amônio (g/L)	2	-
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,2	0,2
MnSO ₄ .H ₂ O (g/L)	0,04	0,04
Soro de queijo em pó (g/L)	-	70
Enzima comercial ² (µL/L)	-	500

¹Desenvolvido por Brinques (2009).

²PROTEMAX 560L – Prozyn, São Paulo/SP/Brasil.

O experimento foi conduzido em erlenmeyers de 1 L a 37°C, sendo retiradas amostras de 25 ml no início e final do experimento a fim de quantificar a biomassa produzida através de espectrofotometria a 600 nm, determinar as concentrações de lactose e verificar o valor de queda do pH (PHS-3B – PHTEK, Curitiba/PR/Brasil) devido à formação de ácido láctico.

A lactose foi determinada utilizando-se o método DNS (ácido dinitrossalicílico) de Miller (1959) descrito na Figura 7. Foi utilizada como padrão a lactose P.A. (Synth, Diadema/SP/Brasil) e o reagente DNS foi preparado através da mistura de 50 ml de solução de hidróxido de sódio a 2 N, 2,5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro/RJ/Brasil) e 125 ml de água destilada. Após a completa dissolução, adicionou-se 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Qhemis, Indaiatuba/SP/Brasil) e completou-se o volume com água destilada até 250 ml, armazenando-se ao abrigo da luz.

Figura 7 – Metodologia utilizada para determinação de lactose (MILLER, 1959).

3.5. Aquisição, contagem e secagem do resíduo da fermentação alcoólica de cerveja (RFC)

O RFC, contendo as células de *S. cerevisiae*, foi adquirido em microcervejaria localizada na cidade de Araras/SP. As coletas foram realizadas em recipientes estéreis, sendo o resíduo transportado imediatamente para o Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) em Pirassununga/SP.

A determinação da concentração das células de levedura no RFC foi realizada através de contagem em Câmara de Neubauer (Bright Line – Laboroptik Ltd., Lancing/Reino Unido), sendo o resultado expresso em número de células por ml. Após o cálculo das células e do volume colhido de resíduo, procedeu-se à secagem em estufa de circulação forçada de ar (320-SE – Fanem, São Paulo/SP/Brasil) a 100°C até peso constante para obtenção de uma massa seca de RFC contendo as células de *S. cerevisiae*.

Finalizada a secagem, o produto final foi triturado em moinho (TE-631/2 – Tecnal, Piracicaba/SP/Brasil) e armazenado para posterior utilização nos ensaios de adsorção de AFB₁ *in vitro* e também para adição à ração de frangos de corte. Assim como para as células bacterianas, as células de *S. cerevisiae* contidas no RFC não precisam estar viáveis para atuar no processo de adsorção da AFB₁ em meio contaminado. Os produtos obtidos ao longo do processo de secagem estão ilustrados na Figura 8.

Figura 8 – Produtos obtidos ao longo do processo de secagem: A) Resíduo de fermentação alcoólica (RFC) coletado na cervejaria, B) RFC contendo leveduras antes da secagem, C) Massa de RFC seca e D) RFC seco e triturado.

3.6. Ensaio preliminar *in vitro* de adsorção de AFB₁ pela LYO e RFC secos

Nos ensaios subsequentes foi utilizado o mesmo padrão de AFB₁ dissolvido em STCF (pH 3,0 e pH 6,0) contendo 1 µg AFB₁/ml, como descrito no item 3.2. O experimento foi conduzido baseando-se no método de avaliação da eficiência de adsorventes em remover a AFB₁ de um meio contaminado descrito por Ledoux e Rottinghaus (1999) com algumas adaptações.

Assim, para a análise em cada um dos pHs, suspendeu-se 100 mg de massa seca (LYO ou RFC ou LYO + RFC) em 5 ml da STCF contendo a AFB₁ e incubou-se sob agitação a 180 rpm pelo tempo de 60 minutos a temperatura ambiente. Após o término do tempo de incubação, centrifugou-se a 4.000 rpm por 5 minutos, sendo recolhidos 2 ml do sobrenadante que foram analisados através de CLAE nas mesmas condições também descritas no item 3.2, sendo o cálculo da quantidade de AFB₁ adsorvida feito pela Equação 1. As análises foram realizadas em triplicata, sendo adicionalmente incubados e analisados um controle positivo (AFB₁ em STCF) e negativo (100 mg de LYO ou RFC ou LYO + RFC, todas suspensas em STCF).

A título de comparação e para um melhor entendimento do papel da parede celular da levedura no processo de adsorção da aflatoxina, foram também realizados ensaios de adsorção da AFB₁ em pH 3,0 e pH 6,0 com outros produtos comerciais à base de levedura, descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Produtos comerciais a base de levedura utilizados em ensaio de adsorção de AFB₁.

Identificação	Descrição
LEV	Célula de levedura inativa proveniente de fermentação alcoólica de cerveja
SM	Célula de levedura inativa proveniente de fermentação alcoólica de cana-de-açúcar
HOR	Célula de levedura hidrolisada
PAL	Parede celular de levedura
COR	Célula de levedura ativa utilizada na fermentação alcoólica de cerveja

3.7. Eficiência de adsorção da AFB₁ pelo RFC

Segundo Dawson, Evans e Kudupoje (2006), a adsorção é um processo dependente da concentração da micotoxina, da quantidade de adsorvente, e da afinidade relativa do adsorvente pela micotoxina. As isotermas de adsorção plotam a quantidade de micotoxina adsorvida por unidade de peso do adsorvente versus a concentração da micotoxina em solução no momento do equilíbrio e a temperatura constante. Portanto, podem ser utilizadas para comparar a capacidade de adsorção relativa e de afinidade dos adsorventes.

Assim, foram realizados ensaios de adsorção da AFB₁, segundo a metodologia descrita por Ledoux e Rottinghaus (1999), a fim de se avaliar a capacidade do RFC em se ligar a essa micotoxina. A concentração de RFC foi mantida constante (100 mg/10 ml) e variou-se a concentração da aflatoxina (2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 µg AFB₁/ml), para os pHs 3,0 e 6,0.

3.8. Caracterização bromatológica de LYO atomizada e RFC

A composição centesimal das massas de LYO atomizada e de RFC foi realizada no Laboratório de Bromatologia da FZEA/USP segundo os Métodos Físico-Químicos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Foram determinados a umidade, proteína bruta, cinzas, fibra bruta, gordura e carboidratos.

3.9. Microscopia eletrônica de varredura de LYO e RFC secos

As massas secas de LYO (atomizada e liofilizada) e RFC foram observadas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) para um melhor entendimento do efeito do processo de secagem sobre as células, assim como para avaliar a estrutura da superfície celular. Essa técnica é capaz de produzir imagens de alta resolução, oferecendo uma aparência tridimensional característica, sendo extremamente útil para avaliar a estrutura superficial da amostra. Assim, uma pequena quantidade de cada amostra foi depositada em uma fita condutiva de carbono de 8 mm (Ted Pella Inc., Redding, CA, EUA) e as observações foram

realizadas em microscópio TM 3000 Tabletop (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão) com um aumento de 3.000 vezes.

3.10. Produção de aflatoxina para uso no experimento *in vivo*

A AFB₁ utilizada no experimento *in vivo* foi produzida no VMDL da Universidade de Missouri, a partir do cultivo de cepa toxigênica de *Aspergillus parasiticus* (cepa NRRL 2999 – United States Department of Agriculture, Peoria/IL/EUA). O cultivo do fungo e a extração da toxina foram feitos seguindo-se a técnica descrita por Shotwell et al. (1966).

A cepa do fungo foi semeada em ágar PDA (Ágar Dextrose Batata – Merck, Darmstadt/Alemanha), deixando-a crescer por uma semana em ambiente escuro até que tomasse toda a placa (Figura 9A). Para produção da toxina pesou-se 76 g de arroz em erlenmeyers de 1 L e adicionou-se 30 ml de água destilada, deixando em repouso por 2 horas e, em seguida, autoclavou-se (Amsco 2011 – American Sterilizer Co., Mentor/OH/EUA) a 121°C por 15 minutos. Pedacos do ágar contendo o fungo já bastante desenvolvido foram adicionados aos erlenmeyers contendo o arroz esterilizado e deixados por 24 horas em um ambiente escuro a 27°C.

Os frascos foram agitados a 250 rpm (Modelo C10 – New Brunswick Scientific, Edison/NJ/EUA) em temperatura ambiente por 7 dias em sala escura para que o fungo pudesse se desenvolver no arroz e produzir a aflatoxina. Após esse período, adicionou-se 40 ml de clorofórmio a fim de parar o crescimento do fungo e transferiu-se todo o conteúdo para uma bandeja de alumínio, deixando-a na capela até completa evaporação do clorofórmio (Figura 9B). Finalmente, secou-se em estufa com circulação forçada (POM7-336G-3 – Blue M, Blue Island/IL/EUA) a 40°C por 24 horas e triturou-se em moinho (Fitzmill D – Fitzmill, Elmhurst/IL/EUA). O material produzido foi armazenado em baldes plásticos a -20°C até adição na ração.

As aflatoxinas foram manipuladas seguindo-se as orientações de biossegurança preconizadas por Trucksess (2000). O manuseio foi executado sempre em capela com exaustão tomando-se todas as precauções necessárias, devido a natureza eletrostática e tendência de dispersão na área de trabalho quando as toxinas estavam na forma sólida. Todos os materiais em contato com as aflatoxinas (ex.: vidrarias, materiais plásticos, etc.) foram lavados inicialmente com

metanol e solução de hipoclorito de sódio 1%, sendo mantidas em contato com esta solução por um período de 2 horas. Em seguida foram lavados com solução aquosa de acetona 5%, permanecendo em contato com esta solução por 30 minutos e posteriormente lavados completamente com água deionizada.

Figura 9 – Fungo *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 em ágar PDA (A) e em arroz (B) para produção de aflatoxina.

3.11. Ensaio *in vivo*

3.11.1. Animais, instalações e delineamento experimental

O experimento *in vivo* foi realizado no *Animal Science Research Center* da Universidade de Missouri (Columbia/MO/EUA). As aves foram alojadas em uma sala totalmente isolada contendo as baterias metálicas comerciais, constituídas de 5 andares (Figura 10). A disposição das aves nas gaiolas foi definida através de sorteio entre os diferentes tratamentos. As aves foram pesadas e identificadas individualmente, através de números colocados no metatarso das mesmas.

Todos os cuidados necessários foram tomados para o isolamento das aves durante o experimento, o descarte de resíduos como excretas e o descarte das aves após o abate ao final do experimento. O aviário experimental, durante todo o período de execução do experimento, esteve identificado com placas que alertavam sobre o tipo de experimento conduzido no local. Foram também colocados avisos alertando sobre a obrigatoriedade do uso de equipamentos de proteção individual. Estes equipamentos, tais como botas plásticas, aventais, toucas, luvas e máscaras de

proteção, foram utilizados por todas as pessoas que adentraram ao recinto, sendo descartados adequadamente ou então descontaminados após o uso.

Figura 10 – Sala isolada com as baterias metálicas para disposição das aves nos diferentes tratamentos.

Foram utilizados 200 pintos machos de um dia de idade, provenientes de matrizes comerciais de frangos de corte, linhagem comercial Ross 508, vacinados no incubatório contra doença de Marek, os quais foram criados até a idade de 21 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os tratamentos, em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2$, corresponderam a dois níveis (0 e 2.000 $\mu\text{g/kg}$) de incorporação de AFB₁ às rações, dois níveis (0 e 1%) de incorporação de LYO e dois níveis (0 e 1%) de incorporação de RFC, totalizando 8 tratamentos com 25 aves cada (Tabela 9), sendo utilizadas 5 repetições com 5 aves cada. Todas as aves receberam as rações experimentais formuladas desde o 1º dia de vida.

3.11.2. Manejo das aves

As aves foram manejadas de acordo com os procedimentos rotineiros de aviação comercial, como acesso à água e ração *ad libitum*, além de luz (24h/dia) e aquecimento inicial. Todas as aves foram pesadas no primeiro dia do experimento,

distribuídas aleatoriamente nos 8 tratamentos contendo 25 aves cada (Figura 11) e alojadas nos boxes experimentais. A temperatura foi anotada diariamente, utilizando-se termômetro de bulbo seco, apenas para efeito de controle. Todos os dias, observou-se o nível das rações nos comedouros e de água nos bebedouros.

Tabela 9 – Delineamento experimental do ensaio *in vivo* com frangos de corte.

Tratamento	Descrição ¹ (por kg de ração)
A	Controle Negativo (0 AFB ₁ + 0 LYO + 0 RFC)
B	Controle Positivo (2.000 µg AFB ₁)
C	1% LYO
D	1% RFC
E	1% LYO + 1% RFC
F	2.000 µg AFB ₁ + 1% LYO
G	2.000 µg AFB ₁ + 1% RFC
H	2.000 µg AFB ₁ + 0,5% LYO + 0,5% RFC

¹LYO: *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU; RFC: resíduo da fermentação alcoólica de cerveja contendo células de *S. cerevisiae*.

Figura 11 – Recebimento, pesagem e distribuição das aves com um dia de idade nos diferentes tratamentos.

Semanalmente, as aves foram pesadas e era realizada a lavagem dos bebedouros, além da remoção das excretas, as quais eram descartadas adequadamente a fim de evitar qualquer tipo de contaminação. Os procedimentos para descarte dos resíduos produzidos durante a condução do experimento foram realizados sob a orientação e normas da Universidade de Missouri.

3.11.3. Preparo das rações experimentais

A ração experimental foi formulada de acordo com os níveis nutricionais rotineiramente praticados na criação comercial de frangos de corte pelo National Research Council (NRC, 1994). Foi elaborada à base de milho e soja, sendo isoprotéica e isocalórica; sua formulação, assim como os níveis de proteína bruta e energia metabolizável podem ser observados na Tabela 10.

As rações foram preparadas em misturador helicoidal (H600 – Hobart, Troy/OH/EUA) com capacidade para 30 kg de ração, sendo batidas por 15 minutos para garantir sua homogeneidade. Após a mistura das rações com a micotoxina, foram colhidas amostras de 250 g para posterior confirmação dos níveis de aflatoxina. As rações dos diferentes tratamentos foram preparadas na semana anterior ao início do experimento e armazenadas a 4°C até sua utilização.

A determinação de aflatoxinas totais ($B_1+B_2+G_1+G_2$) nas amostras de ração foi efetuada mediante a utilização dos procedimentos preconizados pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Trilogy PuriTox^{SR} Columns – Trylogy Analytical Laboratory, Washington/MO/EUA). O fluxograma descrevendo toda a metodologia utilizada encontra-se na Figura 12.

Para a análise de aflatoxinas em rações por CLAE utilizou-se o sistema Elite LaChrom (Hitachi High Technologies America Inc., Schaumburg/IL/EUA) com detector de fluorescência L-2485, amostrador automático L-2200 e coluna Hyperclone 3µm 100 x 4,6 mm. Conjuntamente, foi utilizado KobraCellTM (R-Biopharm Rhône Ltd., Glasgow/Escócia) a 50 µA. A fase móvel era constituída de 2.300 ml de água destilada, 500 ml de metanol, 500 ml de acetonitrila, 1,2 g de brometo de potássio e 360 µl de ácido nítrico. O fluxo foi estabilizado a 0,9 ml/minuto e detecção da excitação foi feita a 360 nm e a emissão a 440 nm. Para comparação, utilizou o padrão de aflatoxinas total (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 na proporção de 4/1/4/1)

dissolvido em acetonitrila na concentração total de 5 µg/ml (Trilogy Analytical Laboratory, Washington/MO/EUA). Os limites de detecção para todas as aflatoxinas analisadas foi de 5 ng/ml.

Tabela 10 – Composição e análise calculada da ração para frangos de corte.

Ingredientes	Quantidade (%)
Milho	52,23
Farelo de soja	34,57
Óleo de soja	6,00
Farinha de carne	3,26
Areia (inerte) ¹	1,20
Dical PO4	1,07
Calcário	0,82
Sal comum	0,41
Suplemento vitamínico-mineral ²	0,25
DL metionina	0,19
Análise Calculada	
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.200
Proteína (%)	23,00
Metionina (%)	0,54
Metionina + cistina (%)	0,90
Cálcio (%)	1,00
Fósforo disponível (%)	0,45

¹Areia (inerte): para substituição por aflatoxina B₁ e/ou LYO e/ou RFC.

²Poultry Premix NB-3000 – Nutra Blend, LLC (Neosho/MO/EUA). Composição: manganês (4,0%), zinco (4,0%), ferro (2,0%), cobre (4,5 g/kg), iodo (600 mg/kg), selênio (60 mg/kg), vitamina A (3.111.111 UI/kg), vitamina D3 (1.111.111 UI/kg), vitamina E (6.666,7 UI/kg), vitamina B12 (4,4 mg/kg), menadiona (333,3 mg/kg), riboflavina (2,7 g/kg), tiamina (444,4 mg/kg), ácido D-pantotênico (2,7 g/kg), niacina (11,1 g/kg), vitamina B6 (555,6 mg/kg), ácido fólico (277,8 mg/kg), colina (155,6 g/kg), biotina (13,3 mg/kg).

Figura 12 – Fluxograma da metodologia para determinação de aflatoxinas em rações.

Todos os materiais e equipamentos utilizados foram submetidos à descontaminação com solução de hidróxido de sódio a 10% e posteriormente lavados com detergente alcalino. Em todas as etapas de manipulação da micotoxina, seja na sua produção, adição à ração ou durante a alimentação das aves, todas as pessoas usaram equipamentos de proteção individual como botas plásticas, aventais, luvas e máscaras de proteção, sendo esses materiais descartados após o uso ou então descontaminados adequadamente.

3.11.4. Variáveis analisadas no experimento

3.11.4.1. Índices de produtividade e bioquímica sérica

O ganho de peso (GP) foi avaliado semanalmente, assim como o consumo de ração (CR) e o cálculo da conversão alimentar (CAL). Foi determinada a mortalidade (MO) dos animais, expressa em porcentagem das aves mortas ao término do

experimento, em relação ao total. Amostras de sangue de 2 aves de cada uma das 5 replicatas de cada tratamento foram colhidas no 14º dia através de punção venosa e no 21º dia através de punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm a 10°C por 30 minutos (Sorvall RC3B Plus, DuPont, Wilmington/DE/EUA) para obtenção do soro, que foi analisado automaticamente (Analisador Kodak Ektachem, Eastman Kodak Co., Rochester/NY/EUA) para determinação de proteína total (PT), glicose (GLI), albumina (ALB), globulina (GLO), cálcio (CA), ácido úrico (AU) e as enzimas aspartato-amino-transferase (AST) e gama-glutamil-transferase (GGT).

3.11.4.2. Análises histopatológicas

Ao final do período de intoxicação, as aves de todos os tratamentos foram sacrificadas e pesadas, sendo 2 aves necropsiadas para observação geral das vísceras. O fígado, rins e bursa de Fabricius foram removidos e submetidos à pesagem. A partir do peso individual absoluto de cada órgão, calculou-se o respectivo peso relativo.

Após a pesagem, fragmentos dos referidos órgãos de 5 aves de cada tratamento foram colhidos e submetidos às análises histopatológicas no VMDL da Universidade de Missouri. Para isso, foram fixados em formalina, embebidos em parafina, seccionados em 4 µm e corados com hematoxilina e eosina (LUNA, 1968). Após serem examinados microscopicamente, foram atribuídas pontuações (escores) às amostras analisadas utilizando-se o sistema de classificação descrito na Tabela 11, o qual, de acordo com Neeff et al. (2013) é baseado na gravidade das lesões associadas às aflatoxinas.

Tabela 11 – Sistema de classificação baseado na gravidade das lesões associadas às aflatoxinas.

Escore	Descrição
1	Seção sem lesão (não notável)
2	Lesões são compatíveis com aflatoxicose suave, afetando menos de 20% do parênquima hepático
3	Lesões são compatíveis com aflatoxicose leve, afetando de 20 a 40% do parênquima hepático
4	Lesões são compatíveis com aflatoxicose moderada, afetando de 40 a 60% do parênquima hepático
5	Lesões são compatíveis com aflatoxicose grave, afetando de 60 a 80% do parênquima hepático
6	Lesões são compatíveis com aflatoxicose severa, afetando mais de 80% do parênquima hepático

Fonte: Adaptado de Neeff et al. (2013).

3.12. Análise dos resultados

Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS® (SAS INSTITUTE, 1992) para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis estudadas nos diferentes tratamentos. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher, adotando-se nível de rejeição $\alpha = 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Curvas de crescimento bacteriano

As curvas de concentração bacteriana, apresentadas na Figura 13, foram construídas através da correlação entre as medidas de absorbância obtidas e o plaqueamento em profundidade das bactérias. Observa-se que as equações exponenciais adequaram-se perfeitamente aos dados, já que todos os valores do coeficiente de determinação (R^2) das mesmas foram maiores que 0,99. A Tabela 12 apresenta as equações e os valores de R^2 obtidos para cada bactéria, assim como a concentração bacteriana média no meio.

Figura 13 – Curvas de concentração bacteriana.

Pelos dados obtidos, pode-se observar que a bactéria que apresentou maior crescimento celular médio diferindo significativamente das demais foi *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU (LYO). A escolha de uma bactéria que apresentasse maior concentração celular no meio foi baseada no fato de que o

processo de adsorção da AFB₁ pela bactéria provavelmente ocorre através de uma união de natureza física com a mesma, ou seja, uma adesão aos componentes da parede celular bacteriana, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, ao invés de ocorrer através de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo da bactéria (BATA e LASZTITY, 1999; LAHTINEN et al., 2004; SHETTY e JESPERSEN, 2006). Sendo assim, partiu-se do princípio de que quanto maior for o número de células bacterianas no meio, maior será a quantidade de aflatoxina adsorvida pelas bactérias.

Tabela 12 – Equações das curvas de concentração bacteriana, coeficientes de determinação (R²) e concentração bacteriana média no meio.

Bactéria ¹	Equação	R ²	Concentração média (UFC/ml) ²
PN	$y = 2 \times 10^{-8} e^{2,232x}$	0,997	$3,4 \times 10^8$ ^d
TR	$y = 8 \times 10^{-9} e^{2,213x}$	0,994	$2,9 \times 10^9$ ^b
LYO	$y = 1 \times 10^{-8} e^{2,143x}$	0,999	$4,3 \times 10^9$ ^a
BI	$y = 2 \times 10^{-8} e^{2,088x}$	0,995	$1,8 \times 10^9$ ^c
LG	$y = 5 \times 10^{-9} e^{2,439x}$	0,997	$5,2 \times 10^8$ ^d

¹PN: *L. rhamnosus* PN 270; TR: *L. plantarum* TR 260; LYO: *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU; BI: *B. lactis* FLORA-FIT BI 07; LG: *L. gasseri* ATCC 33323.

²Média de 8 determinações da contagem bacteriana por turbidimetria.

^{a-d} Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

El-Nezami et al. (1998) relataram que, para *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705), foi preciso uma concentração mínima de 2×10^9 UFC/ml para remover 50% da AFB₁, sendo que uma remoção maior aconteceu quando a concentração de BAL foi elevada para 10^{10} UFC/ml. Bolognani, Rumney e Rowland (1997) observaram que uma concentração mínima de 5×10^9 UFC/ml de *L. acidophilus* ou *B. longum* foi necessária para remover apenas 13% da AFB₁ em cerca de uma hora. Kabak e Var (2008) concluíram que houve um aumento significativo na quantidade de AFM₁ removida quando a quantidade de células passou de 10^7 UFC/ml (0 a 5,02%) para 10^8 UFC/ml (10,22 a 26,65%), indicando que a população bacteriana é um fator crítico para a remoção de aflatoxina pelas BAL.

4.2. Contagem de células nos processos de secagem de LYO e RFC

A contagem das células após o processo de secagem de LYO e de RFC foi calculada considerando-se a contagem do número de células microbianas existentes em 1 ml de meio antes da secagem, o volume produzido (bactérias) ou coletado (leveduras) e o peso final da matéria seca. A fim de padronizar o resultado obtido para ambos os microrganismos em 1×10^{10} UFC/g ou células/g, adicionou-se maltodextrina MOR RER® 1910 (Corn Products Brasil, Mogi-Guaçu/SP/Brasil) na quantidade necessária até chegar-se à concentração desejada. Encontram-se na Tabela 13 os valores obtidos para a contagem do número de bactérias e leveduras antes (UFC/ml ou células/ml, respectivamente) e após a secagem (UFC/g ou células/g, respectivamente) e a porcentagem de maltodextrina adicionada. Pode-se observar que, tanto para a bactéria quanto para a levedura, a contagem do número de células foi elevada antes mesmo da secagem, resultando, consequentemente, em um número também elevado de células por grama de massa seca obtida.

Tabela 13 – Contagens médias nos processos de secagem de LYO e RFC.

Produtos¹	Contagem antes da secagem (por ml)	Contagem após a secagem² (por g)	Maltodextrina adicionada³ (%)
LYO (UFC)	$3,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	35,25
RFC contendo <i>S. cerevisiae</i> (células)	$3,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^{10}$	54,12

¹LYO: *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU; RFC: resíduo da fermentação alcoólica de cerveja contendo células de *S. cerevisiae*.

²Valor calculado.

³Maltodextrina MOR RER® 1910 (Corn Products Brasil, Mogi-Guaçu/SP/Brasil) adicionada para alcançar 1×10^{10} UFC/g ou células/g no produto final.

4.3. Ensaios de adsorção *in vitro* da AFB₁ com LYO em solução

Os resultados obtidos nos testes de adsorção da AFB₁ pela LYO cultivada em caldo MRS encontram-se na Tabela 14. Pode-se observar que a LYO inviabilizada

apresentou uma capacidade de adsorção da AFB₁ significativamente maior que a LYO na sua forma viável para ambos os pHs. A maior capacidade de adsorção pelas células fisicamente inviabilizadas contra as células bacterianas viáveis indica uma união de natureza física, provavelmente através de ligações de hidrogênio, iônicas ou hidrofóbicas, e não por um processo metabólico (BATA e LASZTITY, 1999; LAHTINEN et al., 2004; VARGA e TÓTH, 2005; SHETTY e JESPERSEN, 2006).

Tabela 14 – Resultados de adsorção *in vitro* da AFB₁ pela LYO em solução.

LYO ¹	Adsorção da AFB ₁ (%) ^{2,3}		Valor P
	pH 3,0	pH 6,0	
Viável	20,9 ± 5,0	18,4 ± 4,6	0,5568
Inviável ⁴	46,0 ± 8,8	35,8 ± 7,7	0,2072
Valor P	0,0128	0,0285	

¹LYO: *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU.

²Percentual de AFB₁ removida de uma solução tampão citrato-fosfato contendo 1,0 µg AFB₁/ml.

³Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

⁴Inviabilização através de esterilização a 121°C por 15 minutos.

Ringot et al. (2007) explicam que a complexidade da estrutura microbiana implica na existência de várias maneiras para a toxina ser capturada pelas células. A sorção na superfície da célula é uma interação físico-química rápida e que pode ser reversível entre a toxina e os grupos funcionais da superfície da célula, baseada na adsorção física, trocas iônicas e complexação, não sendo dependente do metabolismo. As paredes celulares de microrganismos são compostas principalmente por polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que oferecem grupos funcionais abundantes tais como grupos carboxila, hidroxila, fosfato e amina, assim como sítios de adsorção hidrofóbicos como cadeias de carbono alifáticas e anéis aromáticos.

Haskard et al. (2001) e El-Nezami et al (1998) analisaram células viáveis de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC-705) obtendo cerca de 80% de remoção da AFB₁ de um meio contaminado. Peltonem et al. (2001) também estudaram células viáveis de *L. rhamnosus* (E-97800, LC 1/3 e CSCC 2420) chegando a porcentagens de remoção da AFB₁ de 22,7%, 54,6% e 33,1%, respectivamente. Pode-se observar que dentro de um dado gênero e até mesmo de uma determinada espécie, nem todas as cepas

são equivalentes em termos de remoção da toxina, ao contrário, a capacidade de remoção da aflatoxina é uma característica apenas de linhagens específicas, com sua eficácia variando acentuadamente (EL-NEZAMI et al., 2004). Turbic, Ahokas e Haskard (2002) complementam que a ligação da bactéria com um substrato depende da capacidade deste em “encaixar-se” no sítio ativo, e que os mecanismos de adsorção podem variar de acordo com a bactéria e também com o substrato.

Não foram observadas diferenças significativas entre os pHs para a LYO nas formas viável e inviável. Haskard, Binnion e Ahokas (2000) também não observaram mudança na quantidade de AFB₁ adsorvida por células viáveis de *L. rhamnosus* GG quando o pH do meio foi variado (2,5 a 8,5). A estabilidade do complexo LYO/AFB₁ em uma ampla faixa de pH é um fator importante para o uso desses microrganismos com o fim de remover a aflatoxina em alimentos, já que a liberação da toxina durante a passagem gástrica teria implicações negativas para a saúde, de modo que o complexo formado deve resistir aos principais estresses ambientais causados pelo trato gastrointestinal, como a variação do pH e a presença de bile.

Tanto os polissacarídeos quanto os peptidoglicanos da parede celular bacteriana devem ser muito afetados pelo tratamento térmico, já que o calor pode causar a desnaturação de proteínas ou a formação de produtos da reação de Maillard, comprometendo a integridade estrutural da parede celular, isto é, diminuindo sua espessura, reduzindo ligações cruzadas e aumentando o tamanho dos poros. Essas perturbações permitem que a AFB₁ se vincule à parede celular bacteriana e aos componentes da membrana plasmática, os quais não estavam disponíveis quando a célula bacteriana estava intacta (HASKARD et al., 2001).

Peltonem et al. (2001) compararam a habilidade de células viáveis e tratadas termicamente de bifidobactérias em remover a AFB₁ do meio e observaram que enquanto as células viáveis removeram de 4 a 56% da AFB₁, as células inviáveis removeram de 12 a 82%. Azab et al. (2005) avaliando a influência de tratamentos de inativação sobre a capacidade de 4 tipos de *Lactobacillus* spp. em adsorver a AFB₁, observaram que os tratamentos ácido (58,6 a 87,0%) e térmico (33,5 a 71,9%) aumentaram a capacidade de remoção quando comparados à solução tampão (16,3 a 56,6%), enquanto que os tratamentos alcalino (8,3 a 27,4%) e com etanol (15,9 a 46,5%) diminuíram a quantidade de aflatoxina adsorvida. Rahaie et al. (2012) observaram que células viáveis e tratadas termicamente de *L. rhamnosus* GG foram capazes de adsorver 35% e 85% da AFB₁ (10 ng/ml) do meio, respectivamente.

4.4. Ensaios de adsorção *in vitro* da AFB₁ com LYO atomizada e RFC

Na Tabela 15 estão descritos os resultados de adsorção *in vitro* de LYO seca por atomização e RFC seco em estufa, isolados ou conjuntamente. Observa-se que a porcentagem de AFB₁ removida pelo RFC foi significativamente maior que LYO e LYO+RFC. Após passar pelo processo de atomização, LYO perdeu completamente a sua capacidade de remoção da AFB₁ em pH 3,0 e reduziu para 1,2% em pH 6,0.

Tabela 15 – Resultados de adsorção *in vitro* da AFB₁ por LYO atomizada e RFC.

Produto ¹	Adsorção da AFB ₁ (%) ^{2,3}		Valor P
	pH 3,0	pH 6,0	
LYO	0,0 ± 0,0 ^c	1,2 ± 1,1 ^c	0,3739
RFC	50,5 ± 3,6 ^a	48,5 ± 2,5 ^a	0,4628
LYO + RFC ⁴	31,5 ± 5,3 ^b	29,2 ± 3,9 ^b	0,5690
Valor P	<,0001	<,0001	

¹LYO: *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU; RFC: resíduo da fermentação alcoólica de cerveja contendo células de *S. cerevisiae*.

²Percentual de AFB₁ removida de uma solução tampão citrato-fosfato contendo 1,0 µg AFB₁/ml.

³Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

⁴Mistura de 50% LYO + 50% RFC.

^{a-c} Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Uma das possíveis hipóteses para a perda total da capacidade de adsorção da AFB₁ pela LYO atomizada são os danos severos na parede celular da bactéria causados pelo uso de elevada temperatura durante o processo de atomização, já que as temperaturas de entrada e saída do ar foram de 160°C e 105°C, respectivamente. É sabido que o processo de secagem por atomização diminui consideravelmente a viabilidade celular, entretanto nesse caso, isso a princípio não seria um problema já que as células bacterianas estavam inviabilizadas previamente à secagem. De acordo com Lievens e van't Riet (1994), assume-se geralmente que existem quatro principais locais primários onde os danos térmicos podem causar injúrias, DNA, RNA (incluindo ribossomos - rRNA), proteínas (enzimas) e a membrana celular. Os autores explicaram que não apenas um único fator, mas, provavelmente, uma multiplicidade de fatores pode causar os danos celulares. Teixeira et al. (1997) observaram que durante o aquecimento a temperaturas

superiores a 65°C, a desnaturação dos ribossomos e/ou proteínas, bem como danos na parede celular podem ser responsáveis por danos térmicos irreversíveis.

Corcoran et al. (2004) concluíram que a membrana citoplasmática é um dos locais mais suscetíveis de lesão celular durante o processo de atomização, e que o estresse térmico não é o único responsável por isso; a desidratação, exposição ao oxigênio e estresse osmótico também são fatores agravantes aos danos celulares. Segundo Ananta, Volkert e Knorr (2005), a água presente nas células contribui para a estabilidade celular, e sua remoção pode causar alterações irreversíveis na integridade estrutural e funcional da membrana bacteriana. Os mesmos autores ainda afirmam que quanto maior a temperatura utilizada durante a atomização, maiores são os danos causados à membrana celular. Adicionalmente, Peighambardoust, Tafti e Hesari (2011) afirmam que as células ficam em contato com um grande volume de ar durante a atomização, o que consequentemente provoca a oxidação lipídica da membrana. -Mendoza, Guzman-de-Peña e Garcia (2009) explicam que a integridade da parede celular bacteriana é importante no processo de remoção de aflatoxina para células viáveis e inviáveis. Em seu estudo com AFB₁, puderam verificar que tanto a parede celular bacteriana quanto seus fragmentos purificados foram capazes de remover a aflatoxina do meio, entretanto, quando ocorreu a perda ou destruição da parede celular (total ou parcial) em resposta a tratamentos enzimáticos, uma diminuição significativa da capacidade de remoção foi observada.

Não foram encontrados na literatura trabalhos similares que utilizassem a bactéria inviabilizada por atomização ou na forma seca para a remoção da AFB₁ do meio, pois a grande maioria desses trabalhos adquiriu a bactéria na forma viável e liofilizada, a qual foi reativada e então inviabilizada através de tratamentos térmicos, ácidos, enzimáticos ou outros, sempre mantendo a bactéria em solução, sem passar pelo processo de secagem. Optou-se por realizar a secagem da bactéria por atomização, pois este é um processo relativamente barato e bastante utilizado na indústria de alimentos, além disso, a comercialização da bactéria nessa forma facilitaria o transporte e as condições de armazenamento e poderia ser adicionada diretamente na ração, sendo que a adsorção da aflatoxina ocorreria dentro do sistema gastrointestinal do animal. Ainda, caso se alcançasse êxito nesse processo, existiria a possibilidade de uso das células bacterianas secas em produtos alimentícios, sendo que nesse caso as células secas poderiam ser adicionadas de

duas maneiras distintas. Na primeira maneira, aplicada para produtos líquidos, as células bacterianas secas seriam adicionadas por um determinado período de tempo, a adsorção da toxina ocorreria sem causar danos ou fermentações no produto e, em seguida, as células seriam retiradas do meio resultando em um produto descontaminado total ou parcialmente. A segunda maneira seria aplicada em produtos sólidos, sendo que as células bacterianas secas seriam utilizadas como aditivos alimentícios e o processo de adsorção da aflatoxina ocorreria no trato gastrointestinal, assim como na ração para os animais.

Em relação à adsorção da AFB₁ pela levedura, Jouany, Yiannikouris e Bertin (2005) sugerem que os β -D-glucanos são os componentes da parede celular responsáveis pela complexação da toxina, sendo que a organização reticular dos β -D-glucanos e sua distribuição entre β -(1,3) e β -(1,6)-D-glucanos desempenha um papel importante nessa eficácia. Esses mesmos autores explicam que a parede celular da *S. cerevisiae* é composta principalmente por polissacarídeos (80 a 90%) e sua resistência mecânica é devido às cadeias de β -(1,3) e β -(1,6)-D-glucanos. A camada interior está firmemente ligada à membrana plasmática por meio de cadeias lineares de quitina, que tem papel significativo na insolubilidade da estrutura global e no empacotamento dos β -D-glucanos, sendo que ambos influenciam na plasticidade da parede celular. Já a camada externa da parede celular das leveduras é formada por manoproteínas que desempenham um papel importante nas trocas com o meio ambiente exterior (Figura 14). Os mesmos autores ainda mostraram que ligações de hidrogênio fracas e ligações de van der Waals estão envolvidas na formação química complexa entre as micotoxinas e os β -D-glucanos. Em relação à AFB₁, observaram que o anel aromático, os grupos lactona e cetona da forma polar da AFB₁ ou as ligações químicas com as unidades de glicose na única hélice dos β -D-glucanos é que o mantem a toxina ligada aos glucanos.

Toda a estrutura da parede celular é altamente dinâmica e pode variar de acordo com a cepa de levedura, fase do ciclo celular e condições de cultivo, tais como pH, temperatura, taxa de oxigenação, natureza do meio, e concentração e fonte de carbono. Sendo assim, essas diferenças na composição da parede celular entre as cepas de levedura relacionam-se com a sua capacidade de ligação com a toxina (JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005). Huwig et al. (2001) e Kabak, Dobson e Var (2006) explicam ainda que a característica mais importante da adsorção é a estrutura física do adsorvente, ou seja, a carga total e distribuição de

carga, o tamanho dos poros, a área de superfície acessível e as propriedades físico-químicas. Por outro lado, propriedades das moléculas a serem adsorvidas como polaridade, solubilidade, tamanho e forma desempenham um papel significativo também.

Figura 14 – Parede celular da levedura. Fonte: Adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/antifungals.html>.

A inviabilização celular a partir de aquecimento pode aumentar a permeabilidade da camada externa da parede celular da levedura devido à suspensão de alguns dos mananos da superfície da célula, levando ao aumento da disponibilidade dos sítios de ligação que estavam ocultos. Além disso, inúmeras alterações físico-químicas acontecem na parede da célula durante o tratamento térmico, resultando em sítios de ligação mais expostos. A continuidade na remoção da aflatoxina, mesmo após aplicação do tratamento térmico, confirma mais uma vez que a viabilidade celular não é um fator significativo para a remoção da aflatoxina do meio (Rahaie et al., 2010).

Shetty, Hald e Jespersen (2007) utilizaram uma cepa de *S. cerevisiae*, proveniente da fabricação de cerveja a base de sorgo, e observaram que suas células tratadas termicamente (120°C) conseguiram remover 79,3% da AFB₁ presente em uma solução de pH 6,0 após um tempo de contato de 20 minutos. As mesmas células da levedura, quando viáveis, conseguiram remover a AFB₁ em 38,7% quando o tempo de contato foi de 5 minutos e em 69,1% após 3 horas. Rahaie et al. (2012) observaram que células de *S. cerevisiae* tratadas termicamente foram capazes de adsorver 55% e 75% da AFB₁ do meio (10 e 20 ng/ml,

respectivamente). Contrariamente, Joannis-Cassan et al. (2011) obtiveram menores resultados de remoção de AFB₁ em sua análise com células viáveis de levedura, pois quando aplicadas concentrações de aflatoxina próximas a 1 µg/ml (a mesma utilizada neste trabalho), chegou-se a 29% de remoção.

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de adsorção da AFB₁ entre os pHs 3,0 e 6,0. Raju e Devegowda (2002) também não observaram diferenças entre os mesmos pHs 3,0 e 6,0 quando utilizaram glucomananos esterificados, produtos derivados da parede celular da levedura, na proporção de 0,1% para remoção de AFB₁ (300 ng/ml) (80,68% e 82,54%, respectivamente). Igualmente, Diaz et al. (2002) não encontraram diferenças na remoção de AFB₁ por glucomananos esterificados entre os pHs analisados (3, 7, 10 e pH não ajustado após adição de 1% do produto).

Quando avaliados conjuntamente, LYO e RFC apresentaram cerca de 30% de capacidade de adsorção da AFB₁, um valor médio entre aqueles encontrados para esses produtos utilizados isoladamente. Devido ao fato de a bactéria ter perdido completamente a sua capacidade de adsorção da aflatoxina por causa dos danos causados pelo processo de atomização, e como utilizou-se 50% de LYO e 50% de RFC na composição da mistura, já era esperada uma diminuição considerável na área superficial da parede celular existente para o processo de adsorção, dividindo-se praticamente pela metade. Novamente, não foram encontrados na literatura artigos similares para comparação, já que todos os artigos publicados na área utilizam BAL ou *S. cerevisiae* isoladamente.

4.4.1. Ensaio de adsorção *in vitro* da AFB₁ com LYO liofilizada

Na Figura 15 estão os resultados de adsorção da AFB₁ pela LYO seca pelo processo de liofilização. Contrariamente à LYO seca por atomização, mesmo após o processo de secagem, a bactéria liofilizada ainda manteve a capacidade de adsorver a AFB₁ do meio ($36,6 \pm 7,2\%$ e $27,2 \pm 5,3\%$ para os pHs 3,0 e 6,0, respectivamente), sendo que não existiu diferença significativa entre os valores obtidos.

Figura 15 – Resultados de adsorção *in vitro* da AFB₁ por *L. rhamnosus* (LYO) liofilizada.

Para realizar o processo de liofilização, é necessário primeiramente congelar as amostras para, depois, estas serem secas através da sublimação da água. Durante o congelamento, cristais de gelo extracelulares são formados e aumentam a osmolaridade extracelular, de modo que, assim que o gelo se forma fora da célula em solução, a desidratação celular começa. Conforme a temperatura cai, as concentrações das soluções intracelular e extracelular irão aumentar até que o ponto eutético seja alcançado (MENG et al., 2008). Os cristais de gelo podem ser grandes demais e acabarem por danificar a estrutura da célula, principalmente a parede celular da bactéria (MORGAN et al., 2006). Além disso, de acordo com Carvalho et al. (2004), o processo de liofilização (a secagem propriamente dita) de culturas bacterianas pode ter como consequências danos na parede celular, na membrana celular, no DNA, assim como ocorrer a oxidação lipídica da membrana. Todos esses fatores podem ser considerados como as causas de uma menor adsorção da AFB₁ pela LYO liofilizada quando comparada com o valor de adsorção da aflatoxina pela LYO inviabilizada antes da secagem, porém esse resultado ainda é maior que o encontrado para a LYO na forma viável (Tabela 6).

El-Nezami et al. (1998) observaram que células pré-cultivadas de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) removeram significativamente mais AFB₁ do meio do que as células liofilizadas, embora a remoção mais eficiente de AFB₁ foi alcançada pelas bactérias tratadas termicamente. Os autores especularam que as

diferenças entre as bactérias pré-cultivadas e as bactérias liofilizadas podem estar relacionadas com as mudanças nos componentes da parede celular bacteriana que ocorrem durante o pré-cultivo, o que poderia aumentar a capacidade das bactérias em remover a AFB₁.

Apesar de o processo de liofilização conseguir manter a capacidade de LYO em adsorver a AFB₁, este é um processo bem mais caro quando comparado à atomização, pois de acordo com Peighambardoust, Tafti e Hesari (2011), os custos fixos de operação de um *spray dryer* equivalem a 12% dos custos de operação de um liofilizador. Porém, o fator que mais inviabiliza a secagem por liofilização é o rendimento extremamente baixo encontrado para o processo, já que para obter aproximadamente 1 g de LYO liofilizada, foram necessários cerca de 1.000 ml de caldo contendo as células de bactérias, embora a concentração celular resultante seja extremamente elevada ($8,2 \times 10^{11}$ UFC/g de produto seco).

4.4.2. Ensaios de adsorção *in vitro* da AFB₁ com produtos a base de levedura

A fim de comparar a eficiência de adsorção *in vitro* da AFB₁ pelo RFC, analisou-se adicionalmente 5 amostras de produtos comerciais contendo células de *S. cerevisiae* ou derivados destas, sendo que os resultados obtidos estão descritos na Tabela 16.

Observa-se, pela análise dos resultados apresentados, que os produtos utilizados conseguiram adsorver a AFB₁ de 45,5 a 69,4% em pH 3,0 e de 24,0 a 63,8% em pH 6,0. As amostras com maiores valores de adsorção da aflatoxina em pH 3,0 e 6,0 foram HOR e PAL com resultados bastante próximos, sendo que estas não diferiram significativamente entre si. RFC foi capaz de adsorver a AFB₁ em 55,0% em pH 3,0 e em 49,2% em pH 6,0, não diferindo significativamente de LEV e SM, porém apresentando valores maiores que os encontrados para COR em ambos os pHs analisados. Apenas os produtos LEV, HOR e COR diferiram significativamente quando comparados os valores obtidos para os pHs 3,0 e 6,0.

Tabela 16 – Resultados de adsorção da AFB₁ por produtos a base de células de *S. cerevisiae*.

Produtos ¹	Adsorção da AFB ₁ (%) ^{2,3}		Valor P
	pH 3,0	pH 6,0	
RFC	55,0 ± 5,0 ^b	49,2 ± 4,5 ^b	0,2096
LEV	56,3 ± 4,2 ^b	45,9 ± 2,5 ^b	0,0212
SM	53,2 ± 2,0 ^b	49,7 ± 2,6 ^b	0,1351
HOR	69,4 ± 0,9 ^a	60,0 ± 4,6 ^a	0,0256
PAL	66,7 ± 2,6 ^a	63,8 ± 1,2 ^a	0,1578
COR	45,5 ± 2,8 ^c	24,0 ± 1,3 ^c	0,0003
Valor P	<,0001	<,0001	

¹RFC: Célula de levedura inativa de fermentação alcoólica de cerveja, LEV: Célula de levedura inativa de fermentação alcoólica de cerveja, SM: Célula de levedura inativa de fermentação alcoólica de cana-de-açúcar, HOR: Célula de levedura hidrolisada, PAL: Parede celular de levedura, COR: Célula de levedura ativa de fermentação alcoólica de cerveja.

²Percentual de AFB₁ removida de uma solução tampão citrato-fosfato contendo 1,0 µg AFB₁/ml.

³Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

^{a-c} Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

A maior porcentagem de remoção obtida por HOR e PAL pode ser devido ao fato de que ambas as amostras são compostos derivados da célula da levedura, células da levedura hidrolisada e parede celular da levedura, respectivamente, e não a célula intacta como nos demais produtos. Como mencionado anteriormente, a parede celular da *S. cerevisiae* possui uma estrutura altamente dinâmica, que pode variar de acordo com a cepa de levedura, sendo composta principalmente por cadeias de β-(1,3) e β-(1,6)-D-glucanos, assim como por quitina e manoproteínas. Além do tratamento térmico, a separação e purificação da parede celular da levedura dos outros componentes celulares, como citoplasma e organelas, ou a hidrólise da célula podem expor um número maior de unidades de β-D-glucanos, as quais não estavam disponíveis anteriormente quando a célula da levedura estava intacta. Essas mudanças estruturais fazem com que ocorra uma maior remoção da micotoxina do meio contaminado (JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005).

Fruhauf et al. (2012) analisaram 30 produtos comerciais compostos por diferentes níveis de parede celular de leveduras e compostos inorgânicos, sendo que quanto maior o nível de cinzas, menor o conteúdo de mananoligossacarídeos e

β -glucanos. Os autores observaram que a eficácia de remoção de AFB₁ estava relacionada com o conteúdo de cinzas, sendo que os oito produtos com mais de 30% de cinzas apresentaram valores de adsorção da toxina maiores que 90%, enquanto que oito dos dez produtos com menos de 10% de cinzas não apresentaram taxas de adsorção maior que 25% em todos os meios testados (pH 3,0 e 6,0 e suco gástrico). Esses resultados são contrários aos descritos anteriormente, mostrando que os mananoligossacarídeos e β -glucanos não contribuíram para a eficácia na adsorção da AFB₁.

Utilizando células intactas e viáveis de *S. cerevisiae*, Armando et al. (2011) observaram porcentagens de remoção da AFB₁ (500 ng/ml) variando entre 20,2% e 65,5% dependendo da cepa utilizada. Shetty, Hald e Jespersen (2007) analisaram 18 cepas viáveis de *S. cerevisiae*, provenientes de massa de milho fermentada e da produção de cerveja de sorgo e concluíram que 7 cepas removeram de 10% a 20% da AFB₁ do meio, 8 cepas removeram de 20% a 40% e 3 cepas removeram mais de 40%, mostrando a mais uma vez a dependência em relação à cepa. Esses resultados foram similares ao encontrado para as células viáveis e íntegras presentes no produto COR (43,98% e 54,86%, para pHs 3,0 e 6,0 respectivamente).

Os produtos contendo células de levedura inativas e íntegras (RFC, LEV e SM) apresentaram valores de adsorção da AFB₁ maiores que o produto contendo células ativas e íntegras de levedura (COR). Como citado anteriormente, a inviabilização celular a partir de tratamento térmico pode aumentar a permeabilidade da camada externa da parede celular da levedura devido à suspensão de alguns dos mananas da superfície da célula, levando ao aumento da disponibilidade dos sítios de ligação que estavam ocultos. Além disso, inúmeras alterações físico-químicas acontecem na parede da célula durante o tratamento térmico, resultando em sítios de ligação mais expostos (RAHAIE et al., 2010).

Assim, os resultados obtidos nas análises *in vitro* demonstram que os produtos a base de células de levedura testados possuem a capacidade de remover parcialmente a AFB₁ do meio. O processo de remoção foi dependente das condições nas quais as células ou parte delas foram produzidas, incluindo sua viabilidade e integridade, além da especificidade de cada cepa.

4.4.3. Eficiência de adsorção de AFB₁ pelo RFC

As porcentagens de adsorção de diferentes quantidades de AFB₁ (2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 µg/ml) pelo RFC (100 mg/10 ml) nos pHs 3,0 e 6,5 encontram-se nas Tabelas 17 e 18, respectivamente. Essas análises foram realizadas com a finalidade de se verificar a eficiência de adsorção da AFB₁ pelo RFC, sendo que, para ambos os pHs, quanto maior a concentração inicial de AFB₁ no meio, maior foi a quantidade de AFB₁ adsorvida pelo RFC.

Tabela 17 – Eficiência de adsorção *in vitro* do RFC¹ (100 mg/10 ml) em adsorver diferentes quantidades de AFB₁ em pH 3,0.

Concentração de RFC (mg/10 ml)	Concentração inicial de AFB ₁ (µg/ml)	Concentração de AFB ₁ em solução (CLAE) (µg/ml)	AFB ₁ ligada (%)	AFB ₁ adsorvida (mg AFB ₁ /g RFC)
100	2,0	1,0601	47,0	0,094
100	4,0	1,1728	70,7	0,283
100	8,0	1,6060	79,9	0,639
100	16,0	10,6025	33,7	0,540
100	32,0	22,4190	29,9	0,958

¹Resíduo da fermentação alcoólica de cerveja contendo células de *S. cerevisiae*.

Tabela 18 – Eficiência de adsorção *in vitro* do RFC (100 mg/10 ml) em adsorver diferentes quantidades de AFB₁ em pH 6,0.

Concentração de RFC (mg/10 ml)	Concentração inicial de AFB ₁ (µg/ml)	Concentração de AFB ₁ em solução (CLAE) (µg/ml)	AFB ₁ ligada (%)	AFB ₁ adsorvida (mg AFB ₁ /g RFC)
100	2,0	1,1680	41,6	0,083
100	4,0	2,5260	36,9	0,147
100	8,0	4,9707	37,9	0,303
100	16,0	10,5920	33,8	0,541
100	32,0	22,4674	29,8	0,953

¹Resíduo da fermentação alcoólica de cerveja contendo células de *S. cerevisiae*.

De acordo com Pizzolitto et al. (2011), esse comportamento sugere fortemente que os microrganismos têm um número limitado de sítios de ligação para a AFB₁, e que o número de sítios de ligação nunca será suficiente para adsorver toda a toxina presente no meio. El-Nezami et al. (1998) também observaram que o processo de adsorção da aflatoxina é dependente do número de células e que o aumento desse número nunca foi suficiente para adsorver mais de 90% da micotoxina presente no meio, indicando que o processo atingiu o equilíbrio entre as aflatoxinas ligadas (sítios ocupados) e as não ligadas (sítios livres) e que, portanto, um processo reversível pode estar envolvido na descontaminação da AFB₁. Ramos e Hernández (1996) concluíram que o adsorvente deve ter uma elevada afinidade com a micotoxina em questão, resultando na formação de um complexo forte, reduzindo, assim, a possibilidade de qualquer ruptura desse complexo, o que resultaria na absorção subsequente desses metabólitos fúngicos pelo sistema gastrointestinal.

Pizzolitto et al. (2012) concluíram que a quantidade de AFB₁ adsorvida por células de *S. cerevisiae* é dependente da concentração da micotoxina no meio. Os autores observaram ainda que a curva de adsorção isotérmica mostra-se linear para baixas concentrações de AFB₁ enquanto que em concentrações elevadas, sofre uma transição para um patamar (*plateau*). Joannis-Cassan et al. (2011) também observaram que a adsorção da AFB₁ por produtos a base de levedura não é um fenômeno completamente linear e que a quantidade de β -D-glucanos não é a única explicação para a variação na proporção de AFB₁ adsorvida, pois a adsorção também é favorecida pela conformação da parede celular, que difere entre as cepas de leveduras. Para AFB₁, a forma do adsorvente é um parâmetro importante porque essa micotoxina é uma molécula aromática plana que exibe uma afinidade mais elevada por adsorventes planares.

4.5. Produção de LYO em meio contendo soro de leite

A fim de tornar viável a produção de LYO em maior quantidade e também de forma mais econômica, optou-se por usar um meio contendo soro de leite, material resultante do processamento de determinados produtos lácteos, geralmente disponível em abundância. Assim, para facilitar a contagem do número de células

bacterianas em crescimento no meio, construiu-se uma curva de concentração bacteriana utilizando-se espectrofotometria a 600 nm (Figura 16). A partir dos dados obtidos, gerou-se uma equação exponencial, que foi utilizada para o cálculo da concentração bacteriana no meio. Observa-se que esse tipo de equação adequou-se perfeitamente aos dados, já que o valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,998.

Figura 16 – Curva de concentração de *L. rhamnosus* (LYO) em meio contendo soro de leite.

Para um maior controle das condições de crescimento de LYO no meio contendo soro de leite, além da determinação da concentração bacteriana, realizou-se a medição da concentração da lactose e também do pH. Para a determinação da lactose, construiu-se também por uma curva de concentração espectrofotometria a 540 nm (Figura 17), que gerou uma equação linear com R^2 de 0,995, mostrando também uma perfeita adequação dos dados à equação. Na Tabela 19 estão descritos parâmetros como a concentração bacteriana, lactose e pH iniciais e finais, além da capacidade de adsorção da AFB₁ pela LYO crescida em meio contendo soro de leite e inviabilizada a 121°C por 15 minutos.

Figura 17 – Curva de concentração de lactose.

Tabela 19 – Valores médios obtidos durante o crescimento de *L. rhamnosus* (LYO) em meio contendo soro de leite.

Parâmetros		Valores ¹
Concentração bacteriana		6,9 x 10 ⁹ UFC/ml
Lactose ²	Inicial	63,8 g/l
	Final	35,3 g/l
pH ²	Inicial	6,1
	Final	3,5
Adsorção ³ de AFB ₁	pH 3,0	43,7%
	pH 6,0	25,8%

¹Análises realizadas em triplicata.

²Determinação inicial antes da adição da bactéria no meio e final após de 24 horas de crescimento.

³Porcentagem de aflatoxina adsorvida pelas células termicamente inativadas de uma solução tampão contendo 1µg AFB₁/ml.

Analisando o valor obtido para a concentração bacteriana em meio com soro de leite, verifica-se que este foi maior que o encontrado para o crescimento bacteriano em caldo MRS (3,2 x 10⁹ UFC/ml), comprovando-se que o meio escolhido pode substituir perfeitamente o caldo MRS para a produção de LYO, sem causar nenhum tipo de prejuízo. Além disso, comparando-se com os dados descritos na

Tabela 14, LYO também manteve a sua capacidade de adsorção de AFB₁ em solução em pH 3,0 (43,7% para LYO produzida em meio com soro de leite e 46,0% para a LYO produzida em caldo MRS), porém em pH 6,0 esse valor foi menor (25,8% e 35,8% para a LYO produzida em meio com soro de leite e caldo MRS, respectivamente), porém ainda maior que o observado para a LYO viável produzida em caldo MRS (18,4%).

Em relação à concentração de lactose no meio, esta caiu aproximadamente pela metade, de 63,9 g/L para 35,3 g/L, enquanto que o pH caiu de 6,13 para 3,48. A queda em ambos os parâmetros é decorrente da acidificação do meio devido à produção de ácido láctico pelas células bacterianas. Segundo Fu e Mathews (1999), o pH ótimo para o crescimento celular e produção de ácido láctico utilizando-se a lactose como substrato por *Lactobacillus plantarum* está entre 5 e 6. Mesmo o pH ficando abaixo da faixa ideal para um crescimento celular ótimo, ainda assim LYO foi capaz de ultrapassar a concentração celular obtida em caldo MRS.

Arauz et al. (2012) explicam que a produção de BAL é um processo meticuloso devido à sua exigência em nutrientes. Em estudos de bancada, as BAL são normalmente cultivadas em meios padrão de laboratório, como o MRS, porém o uso desses meios em larga escala torna-se bastante caro. Assim, os meios de cultura complexos e caros devem ser substituídos por meios de cultura mais simples e baratos que ajudem a melhorar as vantagens comerciais de produção das BAL, já que, de acordo com Rodrigues, Teixeira e Oliveira (2006) o meio de cultura pode representar 30% do custo de uma fermentação microbiana. Burns et al. (2008) observaram que a utilização do soro de leite tem como principais motivadores seu valor nutricional e custo razoável. Além disso, evitam-se possíveis problemas ambientais devido à deposição de sua elevada carga de matéria-orgânica, pois, de acordo com Mizubuti (1994), 50.000 litros de soro de leite, se forem lançados como efluentes, equivalem ao esgoto de uma cidade de 25.000 habitantes.

Assim, o principal desafio para as tecnologias e processos futuros é a busca por baixos custos de produção e a sustentabilidade ambiental. No caso de LYO, a bactéria terá que ser liofilizada para poder manter a sua capacidade de adsorção da AFB₁. Sendo a liofilização um processo mais caro que a atomização, o uso de um meio de cultura mais barato, no caso um meio que contenha soro de leite, contribuirá para a diminuição dos custos de produção de LYO, o que ajudará a tornar esse produto comercialmente viável.

4.6. Caracterização bromatológica de LYO atomizada e RFC

Podem ser observadas na Tabela 20 as caracterizações bromatológicas em base úmida encontradas para LYO atomizada e RFC. Percebe-se que o valor final para a umidade em ambos os produtos foi bastante baixo e que os nutrientes que mais se destacam são os carboidratos com 84,8% e 73,9% e a proteína bruta com 6,5% e 17,9% para LYO e RFC, respectivamente. O elevado valor em carboidratos para LYO e RFC é possivelmente devido à também elevada adição de maltodextrina para a padronização do número de células em 1×10^{10} por grama.

Tabela 20 – Caracterização bromatológica da LYO atomizada e RFC em base úmida.

Produto ¹	Umidade (%)	Proteína bruta (%)	Cinzas (%)	Fibra bruta (%)	Gordura (%)	Carboidratos (%)
LYO	6,2	6,5	2,4	0,1	0,1	84,8
RFC	5,1	17,9	2,3	0,7	0,1	73,9

¹LYO: *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU; RFC: resíduo da fermentação alcoólica de cerveja contendo células de *S. cerevisiae*.

4.7. Microscopia eletrônica de varredura de LYO e RFC secos

Na Figura 18 (A, B e C) estão as imagens obtidas por MEV com aumento de 3.000 vezes para o RFC, LYO seca por atomização e LYO seca por liofilização, respectivamente. Analisando-se a imagem obtida para o RFC (Figura 18A), percebe-se que os componentes do resíduo da fermentação alcoólica prevalecem devido ao seu tamanho ser maior que as células de levedura. Na Figura 18B, é possível visualizar apenas as moléculas de maltodextrina, adicionadas com a finalidade de facilitar o processo de secagem por *spray dryer*, e alguns componentes do caldo MRS. A ausência de células intactas de LYO nas amostras atomizadas é consequência da sua destruição durante o processo de atomização, provavelmente por causa do uso de alta temperatura. Contrariamente, na Figura 18C, pode-se observar perfeitamente que as células de LYO liofilizadas permaneceram intactas,

indicando que o processo de liofilização é mais brando e capaz de preservar a estrutura das células bacterianas e sua habilidade em adsorver as aflatoxinas.

Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 3.000X do resíduo da fermentação alcoólica de cerveja (RFC) (A), *L. rhamnosus* (LYO) atomizada (B) e LYO liofilizada (C). Na imagem obtida para o RFC (A), pode-se observar a prevalência dos compostos do resíduo da fermentação alcoólica (setas verdes) quando comparado com as células de levedura (setas azuis). Para a LYO atomizada (B), não é possível observar as células bacterianas, apenas as moléculas de maltodextrina (setas vermelhas) e os componentes residuais do caldo MRS (setas amarelas). Para a LYO liofilizada (C), como não foi adicionada a maltodextrina, é possível visualizar as células bacterianas (bacilos) como aglomerados (setas laranjas).

A alta concentração de células de LYO liofilizadas pode ser melhor observada através da imagem produzida por MEV, porém não foi possível visualizar as células

de LYO atomizadas, as quais foram destruídas. Isso enfatiza a importância da integridade da célula bacteriana, porque as células podem estar inativadas (mortas), mas, após o processo de secagem, elas precisam estar intactas para poder realizar a adsorção da aflatoxina. Assim, alternativas para a secagem de LYO por atomização na tentativa de se causar menos danos à parede celular bacteriana seriam o uso de menores temperaturas durante o processo de secagem ou a utilização de agentes protetores como sorbitol, leite desnatado, soro, trealose, glicerol, betaína, sacarose, glicose, lactose e polímeros como dextrana e polietilenoglicol (Hubálek, 2003). Logicamente, será necessária a avaliação do comportamento do agente protetor durante a secagem em *spray dryer*, além da verificação de uma possível interferência no processo de adsorção da aflatoxina.

Em relação às células de levedura presentes no RFC, para uma melhor visualização e até uma melhor eficiência de adsorção da AFB₁, poderia ter-se realizado a separação das células dos demais componentes do RFC. Entretanto, o objetivo deste trabalho foi a utilização do RFC na sua forma bruta e apenas passando pelo processo de secagem. A introdução de uma etapa adicional tornaria o processo mais dispendioso, além de já existir no mercado produtos que contêm as células de levedura purificadas com as mais diversas aplicações.

4.8. Experimento *in vivo*

4.8.1. Concentração de aflatoxinas nas rações produzidas

Na Tabela 21 estão descritos os valores encontrados para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ nas rações produzidas e utilizadas no experimento *in vivo*. Observa-se que o nível de 2 mg/kg de AFB₁ foi atingido em todas elas e que os demais níveis das outras aflatoxinas estão todos menores que o nível de AFB₁.

Tabela 21 – Concentração de aflatoxinas nas rações produzidas.

Tratamento	Definição	Aflatoxinas (mg/kg)			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
A	Controle Negativo	0	0	0	0
B	Controle Positivo (Somente AF ¹)	2,079	0,088	0,926	0,010
C	1% LYO	0	0	0	0
D	AF + 1% LYO	2,490	0,109	1,122	0,016
E	1% RFC	0	0	0	0
F	AF + 1% RFC	2,156	0,090	0,907	0,010
G	0,5% LYO + 0,5% RFC	0	0	0	0
H	AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC	2,205	0,092	0,942	0,011

¹AF = Mistura das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

²Tratamentos são a adição de aflatoxinas (AF) em 2 mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

4.8.2. Índices de produtividade e bioquímica sérica

Os índices de produtividade analisados no experimento *in vivo* estão descritos nas Tabelas 22, 23 e 24 para o 7º, 14º e 21º dia de idade dos frangos de corte, respectivamente. Observa-se que todos os parâmetros analisados no 7º dia de vida das aves não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos estudados, foram encontradas diferenças apenas para o GP e CR no 14º e 21º dias.

Analisando-se o GP, percebe-se que a adição de LYO seca às rações não trouxe benefícios para as aves, apenas a adição de RFC aos 21 dias de idade foi significativamente eficiente em amenizar os efeitos da aflatoxina sobre esse parâmetro, embora não tenha se igualado ao grupo do controle negativo (DB). Enquanto o tratamento contendo apenas aflatoxina reduziu o GP em 18,5%, a adição de RFC reduziu em apenas 9,4%, sugerindo que o RFC pode ajudar na melhora desse índice de produtividade quando a aflatoxina está presente na dieta, pois, segundo Tessari et al. (2006), a diminuição do GP é o efeito econômico mais significativo da aflatoxicose em aves.

Tabela 22 – Índices de produtividade alcançados por frangos de corte¹ após 7 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ²		GP (g)	CR (g)	CAL	MO ³ (%)
DB		132,43	145,87	1,103	4,00
DB + AF		138,24	148,16	1,072	0,00
DB + 1% LYO		143,92	153,52	1,066	0,00
DB + AF + 1% LYO		130,20	140,12	1,078	0,00
DB + 1% RFC		133,64	146,00	1,095	0,00
DB + AF + 1% RFC		142,12	152,64	1,075	0,00
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		142,04	151,96	1,070	0,00
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		135,68	147,12	1,085	0,00
ANOVA	S.E.M	5,10	4,87	0,01	0,03
	P-value	0,4537	0,5666	0,4836	0,4493

¹Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

²Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB) .

³Estatística baseada nos valores transformados da mortalidade.

Em relação ao CR, nenhum dos tratamentos contendo aflatoxina adicionadas de LYO e/ou RFC foi significativamente diferente do controle positivo (DB+AF). Entretanto, os tratamentos com adição de RFC (com e sem aflatoxina) também não diferiram entre si, mostrando que embora a adição de RFC não tenha conseguido manter os níveis de CR alcançados pelo grupo do controle negativo (DB), foi capaz de proporcionar um pequeno aumento no parâmetro. A CAL não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos para nenhum dos 3 dias estudados.

Os resultados obtidos por Santin et al. (2003) mostram que o CR e o GP para frangos de corte aos 42 dias também foram negativamente afetados pela adição de aflatoxina na ração (1 mg/kg) e que a adição de *S. cerevisiae* (0,20%) não amenizou os efeitos negativos da aflatoxina sobre o GP, entretanto aumentou a CAL. Basmacioglu et al. (2005) também observaram que frangos de corte consumindo rações contendo 2 mg/kg de aflatoxina até o 21º dia de vida apresentaram baixo GP, sendo que esse efeito ocorreu progressivamente a partir da primeira semana em diante. Além disso, os autores afirmam que os efeitos adversos das aflatoxinas sobre a CAL e o GP ocorrem devido à anorexia, apatia, inibição da síntese de

proteínas e lipogênese. Tessari et al. (2006) explicam que as aflatoxinas são conhecidas por causar perturbações no metabolismo de proteínas, podendo ser esse um dos principais fatores responsáveis pelo reduzido GP das aves.

Tabela 23 – Índices de produtividade alcançados por frangos de corte¹ após 14 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ²		GP (g)	CR (g)	CAL	MO ³ (%)
DB		419,54 ^{ab}	517,18 ^a	1,233	4,00
DB + AF		360,72 ^c	434,92 ^c	1,207	0,00
DB + 1% LYO		410,48 ^{ab}	496,52 ^{ab}	1,219	0,00
DB + AF + 1% LYO		343,64 ^c	422,92 ^c	1,235	0,00
DB + 1% RFC		406,44 ^{ab}	494,60 ^{ab}	1,221	0,00
DB + AF + 1% RFC		381,68 ^{bc}	462,20 ^{bc}	1,211	0,00
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		430,60 ^a	511,04 ^a	1,186	0,00
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		346,09 ^c	424,71 ^c	1,229	12,00
ANOVA	S.E.M	15,72	14,84	0,02	0,07
	P-value	0,0010	<,0001	0,7979	0,5311

¹Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

²Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

³Estatística baseada nos valores transformados da mortalidade.

^{a-b}Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Não foram encontrados estudos utilizando a adição de LYO em ração de frango de corte nas mesmas condições utilizadas neste trabalho. Hernandez-Mendonça et al. (2011) estudaram o efeito da suplementação oral de *Lactobacillus reuteri* em reduzir a absorção intestinal de AFB₁ em ratos e observaram que a bactéria em questão foi capaz de adsorver a micotoxina no trato gastrointestinal, principalmente no duodeno. Ainda foi observado que não houve diferenças significativas para o GP entre os grupos analisados. El-Nezami et al. (2000) investigaram a habilidade de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) em adsorver a AFB₁ de um meio líquido intestinal extraído do duodeno de frangos, e observaram que a concentração de AFB₁ reduziu 54% e 44%, respectivamente, em apenas 1 minuto. Os autores ainda verificaram que o acúmulo de AFB₁ no tecido intestinal

apresentou redução de 74% e 63%, respectivamente, mostrando que essas bactérias podem afetar a biodisponibilidade da aflatoxina.

Tabela 24 – Índices de produtividade alcançados por frangos de corte¹ após 21 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ²		GP (g)	CR (g)	CAL	MO ³ (%)
DB		845,50 ^a	1.117,59 ^a	1,322	8,00
DB + AF		688,95 ^d	889,74 ^c	1,294	4,00
DB + 1% LYO		802,12 ^{ab}	1.031,48 ^{ab}	1,291	0,00
DB + AF + 1% LYO		696,32 ^{cd}	908,92 ^c	1,303	12,00
DB + 1% RFC		795,52 ^{ab}	1.031,44 ^{ab}	1,297	0,00
DB + AF + 1% RFC		766,24 ^{bc}	979,69 ^{bc}	1,279	12,00
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		828,80 ^{ab}	1.060,84 ^{ab}	1,279	0,00
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		709,37 ^{cd}	893,46 ^c	1,260	20,00
ANOVA	S.E.M.	25,88	31,42	0,02	0,10
	P-value	0,0003	<,0001	0,5559	0,0527

¹Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

²Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

³Estatística baseada nos valores transformados da mortalidade.

^{a-b}Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Segundo Bryden (2012), durante a aflatoxicose o corpo do animal distribui os nutrientes de maneira diferente, ao invés de direcionar para o crescimento e desenvolvimento, direciona para o sistema imunológico, o que contribui ainda mais para uma produtividade reduzida após a exposição à micotoxina. Adicionalmente, a ingestão diária de aflatoxina pode reduzir a eficácia dos programas de vacinação, já que prejudica o sistema imune diminuindo a imunidade mediada pelas células e induzindo a uma resposta inflamatória.

Quando analisado o índice de MO dos frangos de corte observa-se que também não houve diferenças significativas entre os tratamentos para os 3 dias estudados. Entretanto, percebe-se que nas duas primeiras semanas de vida dos animais houve somente mortes nos tratamentos do controle negativo (DB) e de LYO+RFC+AF. Já aos 21 dias das aves, a MO aumentou consideravelmente,

porém, a definição das causas dessa MO torna-se difícil, pois tanto podem ter ocorrido apenas pela presença da aflatoxina na ração e consequente diminuição da imunidade das aves, quanto por hemorragia causada pela coleta de sangue realizada no 14º dia através de punção venosa.

Segundo Doerr et al. (1974), a aflatoxina possui a capacidade de aumentar o tempo de coagulação do sangue e, ainda, segundo Rosa et al. (2012), a aflatoxicose pode provocar considerável redução nos níveis de proteínas plasmáticas, influenciando a produção de hemoglobina, o mecanismo de coagulação sanguínea e na síntese de importantes sistemas enzimáticos que, associados ao aumento da fragilidade capilar, provoca hemorragias generalizadas. Assim, a associação entre o fato de ter-se machucado algumas das aves através da realização da punção venosa e a presença da aflatoxina no sangue pode ter dificultado a coagulação do mesmo e as aves vieram a óbito por causa da hemorragia.

Nas Tabelas 25 e 26 encontram-se os índices de bioquímica sérica aos 14 e 21 dias de vida das aves, respectivamente. Observa-se que a GLI apresentou diferenças significativas entre os tratamentos apenas no 21º dia, sendo que o tratamento com adição de LYO foi o que apresentou maior valor, embora não tenha diferido significativamente do controle negativo (DB) e dos tratamentos com adição de RFC ou LYO+RFC. As dietas adicionadas de aflatoxina e LYO e/ou RFC não apresentaram diferenças significativas entre elas, mostrando a ineficiência dos produtos estudados em amenizar os efeitos da aflatoxina sobre a GLI.

Os índices de ALB, PT e GLO tiveram comportamento parecido tanto aos 14 quanto aos 21 dias dos frangos de corte. No 14º dia, o tratamento com adição de RFC+AF conseguiu amenizar os efeitos adversos da aflatoxina nos parâmetros estudados, pois mesmo diferindo significativamente ao controle negativo (DB), foram maiores do que o controle positivo (DB+AF). Quando comparados os tratamentos com e sem aflatoxina para cada um dos produtos adicionados (LYO e RFC, isolados ou conjuntamente), observa-se que a redução nos valores obtidos variou de 45,9 a 70,7% para ALB, 36,4 a 54,6% para PT e de 30,3 a 43,8% para GLO.

Tabela 25 – Índices de bioquímica sérica alcançados por frangos de corte¹ após 14 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ²		GLI (mg/dL)	ALB (g/dL)	PT (g/dL)	GLO (g/dL)	CA (mg/dL)	AST (IU/L)	GGT (U/L)	AU (mg/dL)
DB		234,90	0,97 ^a	2,52 ^a	1,55 ^a	10,15 ^a	188,60	8,60	6,12
DB + AF		235,90	0,33 ^{cd}	1,05 ^c	0,72 ^c	8,90 ^d	227,90	6,25	5,79
DB + 1% LYO		242,90	0,99 ^a	2,48 ^a	1,49 ^a	10,08 ^a	206,30	10,50	6,31
DB + AF + 1% LYO		226,10	0,44 ^{bc}	1,33 ^{bc}	0,89 ^{bc}	9,30 ^{bc}	192,13	9,60	7,77
DB + 1% RFC		228,90	0,98 ^a	2,50 ^a	1,52 ^a	10,15 ^a	182,20	9,90	6,88
DB + AF + 1% RFC		243,50	0,53 ^b	1,59 ^b	1,06 ^b	9,52 ^b	198,75	8,00	5,57
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		239,80	0,92 ^a	2,29 ^a	1,37 ^a	9,97 ^a	177,70	9,60	6,58
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		226,20	0,27 ^d	1,04 ^c	0,77 ^c	8,97 ^{cd}	182,63	9,60	5,83
ANOVA	S.E.M.	11,35	0,05	0,11	0,13	22,48	0,99	0,91	0,08
	Valor P	0,9112	<,0001	<,0001	<,0001	0,8088	0,1586	0,7303	<,0001

¹Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

²Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

^{a-b}Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Tabela 26 – Índices de bioquímica sérica alcançados por frangos de corte¹ aos 21 dias após consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ²		GLI (mg/dL)	ALB (g/dL)	PT (g/dL)	GLO (g/dL)	CA (mg/dL)	AST (IU/L)	GGT (U/L)	AU (mg/dL)
DB		266,60 ^{abc}	1,04 ^a	2,62 ^a	1,58 ^a	10,66 ^{ab}	224,30 ^{cd}	11,10	5,57
DB + AF		235,10 ^d	0,48 ^d	1,47 ^d	0,99 ^d	9,82 ^d	326,00 ^{abc}	11,90	6,21
DB + 1% LYO		282,00 ^a	0,97 ^{ab}	2,43 ^{ab}	1,46 ^b	10,88 ^a	228,70 ^{cd}	12,70	6,90
DB + AF + 1% LYO		238,10 ^{cd}	0,64 ^c	1,92 ^c	1,28 ^c	10,32 ^{bc}	293,80 ^{bcd}	12,20	6,95
DB + 1% RFC		258,50 ^{abcd}	0,99 ^{ab}	2,44 ^{ab}	1,45 ^b	10,55 ^{ab}	197,80 ^d	12,60	5,70
DB + AF + 1% RFC		239,40 ^{bcd}	0,61 ^c	1,95 ^c	1,19 ^c	10,01 ^{cd}	340,60 ^{ab}	12,50	5,25
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		270,10 ^{ab}	0,92 ^b	2,37 ^b	1,45 ^b	10,49 ^{ab}	238,20 ^{bcd}	11,90	6,21
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		231,10 ^d	0,40 ^d	1,15 ^e	0,72 ^e	9,82 ^d	408,60 ^a	13,20	6,54
ANOVA	S.E.M.	10,89	0,03	0,07	0,15	37,35	1,19	0,69	0,04
	Valor P	0,0136	<,0001	<,0001	<,0001	0,0044	0,9543	0,5996	<,0001

¹Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

²Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

^{a-b}Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Já no 21º dia, os tratamentos adicionados de LYO+AF e RFC+AF foram capazes de reverter os efeitos causados pela presença de aflatoxina na dieta para ALB e PT igualando-se significativamente ao controle negativo (DB). Os mesmos tratamentos foram eficientes em diminuir os efeitos causados pela aflatoxina no índice de GLO, porém não conseguiram igualar-se significativamente ao controle negativo, embora a diferença estatística com o controle positivo (DB+AF) tenha sido significativa. Assim, novamente comparando-se os tratamentos com e sem aflatoxina para cada um dos produtos adicionados (LYO e RFC, isolados ou conjuntamente), observa-se que os valores reduziram-se de 34,0 a 56,5% para ALB, 20,1 a 51,5% para PT e de 12,3 a 50,3% para GLO.

Em relação ao CA, pode-se observar que no 14º dia tanto a adição de LYO quanto de RFC foram capazes de amenizar os efeitos da aflatoxina sobre esse parâmetro. Percebe-se que o resultado encontrado para RFC foi melhor que LYO, porém ambos ainda foram significativamente menores que o controle negativo (DB). No 21º dia, observa-se que o tratamento adicionado de LYO+AF igualou-se significativamente ao controle negativo (DB), revertendo mais uma vez os efeitos adversos da toxina. Santurio (1999) observaram que frangos de corte intoxicados com aflatoxina (3 mg/kg) tiveram a concentração de CA diminuída em uma média de 20,6% comparado ao grupo controle, sendo que essa diminuição provavelmente foi causada pelo efeito das aflatoxinas sobre a função renal das aves.

Os resultados obtidos para a AST diferiram significativamente apenas no 21º dia, mostrando que a presença da aflatoxina na dieta causa um aumento no nível da enzima no organismo das aves, porém esses mesmo dados foram inconclusivos, pois não houve diferença significativa entre os controles negativo (DB) e positivo (DB+AF). Para a GGT e o AU, os resultados apresentados no 14º e no 21º dia não foram estatisticamente diferentes. Santurio (1999) também não encontraram influência da aflatoxina sobre a GGT, porém observaram um aumento de 74% na concentração de AU e de 96% para os triglicerídeos.

Raju e Devegowda (2000) observaram uma redução de 25,4% na PT de frangos de corte (35 dias) intoxicados com aflatoxina, enquanto que a adição de glucomanana esterificado foi capaz de aumentar esse parâmetro em 14,7%. Os autores também observaram que a aflatoxina causou um aumento de 19,4% na enzima GGT. Modirsanei et al. (2004) também encontraram uma redução na PT de frangos de corte intoxicados com aflatoxina em 1 mg/kg de ração. Segundo os

pesquisadores, as aflatoxinas causam uma inibição da síntese de proteína por alteração do metabolismo de proteínas e sua união com o DNA, o que não permite a replicação e a transcrição do RNA. O mecanismo para os efeitos protetores das células de *S. cerevisiae* contra a aflatoxina parece envolver o sequestro da toxina no trato gastrointestinal e consequente quimissorção a estas células, sendo posteriormente eliminados.

Assim como neste trabalho, Stanley et al. (1993) também encontraram uma redução no valor da ALB após a ingestão de aflatoxina (5 mg/kg) por frangos de corte aos 28 dias (0,66 g/100ml), entretanto, a inclusão de 1% de *S. cerevisiae* elevou esse valor para 0,88 g/100ml. Stanley et al. (2004) estudaram a influência da ingestão de aflatoxina (3 mg/kg) sobre matrizes de frango de corte e observaram uma redução nos níveis de PT, GLO, ALB, CA e fósforo. A adição de resíduo contendo células de levedura (910 g/ton) à ração contendo a micotoxina elevou a concentração desses parâmetros para níveis não significativamente diferentes do grupo controle. Matur et al. (2010) observaram aumento nos níveis de GGT após ingestão de 100 µg/kg de aflatoxina por matrizes de frango de corte. Por outro lado, os níveis de AST, PT, triglicerídeos, colesterol, uréia e creatinina não foram alterados significativamente.

De acordo com Shi et al. (2006), a diminuição dos níveis de PT e ALB são indicativos de aflatoxicose, e o aumento das atividades de GGT e AST tem sido relatados como indicadores sorológicos sensíveis de toxicidade hepática e renal. Deve-se salientar que os sinais clínicos da aflatoxicose dependem da idade das aves e do seu estado nutricional e de saúde no momento da exposição à ração contaminada. Franciscato et al. (2006) complementam que, além da diminuição dos níveis de PT e ALB, os níveis de colesterol, GLI, AU, fósforo inorgânico e CA também diminuem devido à toxicidade das aflatoxinas, sendo isso também observado nesse trabalho. Del Bianchi et al. (2005) também encontraram uma redução nos valores de ALB quando os animais receberam 2.450 g AFB₁/kg + 10 mg FB₁/kg. A redução na proteína plasmática provocada pela intoxicação por aflatoxina resulta no bloqueio da síntese de RNA e, consequentemente, na inibição da síntese de proteínas no fígado.

Santurio (2000) explica que uma das causas das aflatoxinas serem extremamente tóxicas para aves é sua rápida absorção pelo trato gastrointestinal, evidenciada através do aparecimento das aflatoxinas imediatamente após sua

ingestão. Uma vez absorvida, a AFB₁ é imediatamente ligada, de forma reversível, à ALB e, em menor escala, a outras proteínas, espalhando-se pelos tecidos, especialmente o fígado. Depois de depositada no fígado, as aflatoxinas são biotransformadas pelo sistema microssomal hepático em metabólitos tóxicos reativos com habilidade de se ligar de forma covalente com constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA, além de alterarem a síntese de proteínas no tecido hepático, o que provoca o mau funcionamento do fígado.

4.8.3. Análises histopatológicas

Encontram-se na Tabela 27 os resultados obtidos para os pesos relativos da bursa de Fabricius, rins e fígado de frangos de corte com 21 dias. Para a bursa de Fabricius não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados, mostrando que a aflatoxina não é capaz de afetar esse órgão. Rins e o fígado exibiram comportamento parecido, sendo que nem LYO nem RFC foram capazes de reverter o aumento do peso relativo causado pela ingestão de aflatoxina (aumento médio de 51,6% e 35,3%, respectivamente).

Raju e Devegowda (2000) também observaram aumento significativo nesses mesmos órgãos após ingestão de aflatoxina por frangos de corte após 35 dias, sendo que os rins aumentaram em 26,5% e o fígado em 17,8%. Contrariamente, Modirsanei et al. (2004) não encontraram diferença no peso relativo do fígado de frangos de corte intoxicados com aflatoxina em relação ao grupo controle, assim como para o baço e para a bursa de Fabricius. Porém, o peso relativo do timo foi significativamente aumentado nas aves alimentadas com AFB₁. Del Bianchi et al. (2005) não observaram diferenças significativas nos pesos relativos dos órgãos analisados (coração, fígado, bursa de Fabricius, timo, pâncreas, proventrículo e rins) em relação a todos os tratamentos estudados. A análise histológica dos fígados revelou áreas focais de necrose e a presença de um infiltrado inflamatório nas aves alimentadas com 50 e 2.450 g de AFB₁/kg.

Tabela 27 – Pesos relativos da bursa de Fabricius, rins e fígado de frangos de corte¹ após 21 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ²		Peso Relativo (g/kg de peso vivo)		
		Bursa	Rins	Fígado
DB		0,2408	0,8868 ^b	2,8880 ^b
DB + AF		0,2844	1,3105 ^a	3,9704 ^a
DB + 1% LYO		0,2360	0,9050 ^b	2,7832 ^b
DB + AF + 1% LYO		0,2564	1,2922 ^a	3,5830 ^a
DB + 1% RFC		0,2630	0,8546 ^b	2,7680 ^b
DB + AF + 1% RFC		0,2498	1,2698 ^a	3,6400 ^a
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		0,2558	0,8562 ^b	2,7196 ^b
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		0,2616	1,4006 ^a	3,8968 ^a
ANOVA	S.E.M.	0,02	0,06	0,13
	Valor P	0,6906	<,0001	<,0001

¹Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

²Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

^{a-b}Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Na Tabela 28 podem ser observados os escores das alterações histopatológicas dos rins e fígado segundo critérios adaptados de Neeff et al. (2013), sendo que 1 representa que não houve mudança significativa no órgão, aumentando até 6, que representa mudanças severas causadas pela aflatoxicose. Não foram encontradas alterações histopatológicas na bursa de Fabricius para os diferentes tratamentos aplicados, motivo pelo qual esta não está descrita na mesma tabela. Apenas o fígado apresentou diferenças significativas entre os tratamentos estudados, sendo que o tratamento contendo RFC+AF foi capaz de reverter as alterações causadas pela presença da aflatoxina na dieta.

Na Figura 19, pode-se observar as alterações histopatológicas causadas pela presença de aflatoxina na dieta dos tratamentos B, D, F e H, sendo que o fígado apresentou a alteração na sua coloração, tornando-se mais pálido. Ledoux et al. (1999) ressaltam que o fígado é considerado o principal órgão alvo para a aflatoxicose, sendo que seu peso relativo em frangos de corte normalmente é aumentado mais do que qualquer outro órgão, mesmo em baixas concentrações de

aflatoxina, tornando-se pálido e com margens arredondadas. Tessari et al. (2006) complementam que além do fígado, baço e rins também aumentam de tamanho, enquanto que a bursa de Fabricius e o timo diminuem. Santurio (2000) explica que o grau de infiltração gordurosa no fígado depende da dose e do tempo de intoxicação pelas aflatoxinas, chegando a 68% de aumento em frangos de corte.

Tabela 28 – Escores das alterações histopatológicas observadas no fígado e rins¹ de frangos de corte² após 21 dias de consumo de ração contendo aflatoxinas e/ou LYO e/ou RFC.

Tratamentos ³		Escore	
		Fígado	Rins
DB		1,4 ^b	1,4
DB + AF		3,2 ^a	1,6
DB + 1% LYO		1,2 ^b	1,0
DB + AF + 1% LYO		3,6 ^a	1,6
DB + 1% RFC		1,6 ^b	1,2
DB + AF + 1% RFC		2,0 ^b	1,0
DB + 0,5% LYO + 0,5% RFC		1,4 ^b	1,0
DB + AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC		3,6 ^a	1,0
ANOVA	S.E.M.	1,35	1,20
	Valor P	<,0001	0,1136

¹Escores de alterações histopatológicas, 1 (nenhuma mudança significativa) a 6 (mudanças severas).

²Média de 4 replicatas de 2 frangos cada.

³Tratamentos com adição de aflatoxinas (AF) em 2mg/kg, *L. rhamnosus* (LYO) e resíduo de fermentação alcoólica contendo células de *S. cerevisiae* (RFC) à dieta basal (DB).

^{a-b}Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Após a análise das lâminas contendo fragmentos dos órgãos, observou-se que não houve lesões microscópicas significativas evidentes nas seções da bursa de Fabricius tanto para os tratamentos com e sem adição de aflatoxina, e no fígado e rins do controle negativo (DB) ou aves alimentadas somente com LYO ou RFC, isolados ou associados. Lesões leves, moderadas ou graves indicativas de aflatoxicose foram observadas nas seções do fígado e rins examinados nas aves alimentadas com aflatoxinas (tratamentos: DB+AF, AF+LYO, AF+RFC e

AF+LYO+RFC). As lesões hepáticas incluíram múltiplas infiltrações de heterófilos, linfócitos e macrófagos, sendo que havia uma fibrose leve e proliferação dos ductos biliares nas áreas do trato portal, além de uma vacuolização hepato-celular. A adição de LYO e LYO+RFC às dietas contendo a aflatoxina não foi eficaz na redução da severidade das lesões do fígado, já que o escore para ambos os tratamentos foi 3,6, porém RFC aplicado isoladamente conseguiu amenizar os efeitos provocados pela aflatoxina, já que o escore alcançado foi de 2,0. Finalmente, para os rins, as lesões encontradas nas aves que receberam aflatoxina caracterizaram-se por infiltrações intersticiais de heterófilos, infiltrações nodulares de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas. Alguns dos túbulos estavam dilatados e frequentemente continham cilindros celulares ou hemáceas. Apesar da identificação das lesões nos rins, não foram encontradas diferenças significativas para os escores dos tratamentos com e sem aflatoxina.

Figura 19 – Fígados, rins e bursas de Fabricius de frangos de corte aos 21 dias de idade. Tratamentos: A) Controle negativo (dieta basal, DB), B) Controle positivo (DB + AF), C) 1% *L. rhamnosus* (LYO), D) AF + 1% LYO, E) 1% resíduo de fermentação alcoólica de cerveja contendo *S. cerevisiae* (RFC), F) AF + 1% RFC, G) 0,5% LYO + 0,5% RFC, e H) AF + 0,5% LYO + 0,5% RFC.

Çelik et al. (2001) observaram aumento do fígado de codornas intoxicadas com AFB₁, e mesmo a adição de 0,1% de *S. cerevisiae* não amenizou esse efeito.

Segundo os autores, esse padrão histológico é caracterizado pela lesão dos hepatócitos e necrose acompanhada de vários graus de inflamação lobular e portal, similarmente ao observado no presente estudo. No estudo de Karaman et al. (2005), a ingestão de aflatoxina (2 mg/kg) por frangos de corte (21 dias) causou degeneração moderada a severa da gordura nos hepatócitos do fígado e no epitélio tubular dos rins, além de depleção folicular na bursa de Fabricius, timo e baço. A adição de glucomananas de levedura na proporção de 0,5 e 1 g/kg diminuiu a severidade das mudanças histopatológicas, ligeiramente e moderadamente, respectivamente. O número de órgãos afetados também diminuiu no grupo que recebeu 1 g/kg de glucomananas, comparado ao grupo que recebeu apenas a aflatoxina.

Santin et al. (2003) também não observaram melhoras nas análises histopatológicas de aves que receberam as rações adicionadas de aflatoxina e parede celular de *S. cerevisiae* (0,2%). Assim como no presente trabalho, o fígado das aves apresentou peso relativo maior, coloração amarelada, vacuolização severa, megalocitose dos hepatócitos e hiperplasia do epitélio biliar (escore 3). Os autores relataram que a Bursa de Fabricius mostrou-se com menor peso relativo, depleção linfo-folicular e células degeneradas, contrariamente ao observado no presente estudo.

Pier (1992) e Dilkin e Mallmann (2004) explicam que quando a afltoxina é ingerida em níveis mais elevados e prolongados, o fígado apresenta degeneração gordurosa, necrose lobular com incremento de células basofílicas na periferia do lóbulo, proliferação dos ductos biliares e cirrose. A icterícia da carcaça, associada ao fígado edemaciado e amarelado são indicativos de intoxicação. Também ocorre uma diminuição do tempo de coagulação sanguínea, podendo observar-se coleções líquidas sanguinolentas nas cavidades bem como em mucosas e hemorragias em massas musculares. Segundo Bryden (2012), a aflatoxina é conhecida por alterar a absorção de lipídeos, além de sua síntese e transporte para tecidos extra-hepáticos. A composição de ácidos graxos do fígado é significativamente alterada durante a aflatoxicose, mas a amplitude dessa mudança pode reduzida através da inclusão de biotina na dieta.

5. Conclusões

- *Lactobacillus rhamnosus* (LYO) apresentou maior crescimento celular médio em caldo MRS, cujas células inviabilizadas em solução foram capazes de remover parcialmente a AFB₁ do meio em pH 3,0 e 6,0;
- As células de LYO secas por atomização perderam sua capacidade de adsorção de AFB₁, indicando que as altas temperaturas de secagem prejudicam a manutenção estrutural da célula bacteriana;
- A secagem das células de LYO por liofilização mostrou-se um processo adequado, pois a bactéria conseguiu manter a sua capacidade em adsorver a AFB₁, uma vez que sua parede celular manteve-se intacta; entretanto, o baixo rendimento e o custo do processo ainda são barreiras para sua aplicação comercial;
- A utilização do soro de leite na composição de meio de crescimento para bactérias ácido-láticas é uma alternativa mais econômica, o que poderá contribuir para a diminuição dos custos de produção desses microrganismos, tornando-se uma opção mais barata para produção das bactérias secas por liofilização.
- O resíduo da fermentação alcoólica da cerveja seco (RFC), contendo células de *Saccharomyces cerevisiae* íntegras e inativas, foi capaz de remover parcialmente a AFB₁ nos ensaios *in vitro* em pH 3,0 e 6,0;
- Os produtos comerciais contendo componentes da célula da levedura extraídos e purificados (célula de levedura hidrolisada e parede celular de levedura) apresentaram maior eficiência de adsorção da AFB₁ em pH 3,0 e 6,0;
- Os resultados obtidos no experimento *in vivo* indicam que o RFC pode melhorar alguns efeitos tóxicos em frangos de corte causados pelas aflatoxinas, tais como: ganho de peso, albumina, proteína total, globulina e cálcio, além da diminuição de alterações histopatológicas em comparação ao grupo controle;

- Os tratamentos com LYO, isolada ou associada ao RFC, não apresentaram efeitos satisfatórios sobre as variáveis estudadas nos frangos de corte, exceto pelo aumento nos índices de cálcio, albumina, proteína total e globulina.
- Os experimentos demonstraram que o RFC apresenta potencial para uso como aditivo anti-aflatoxinas para frangos de corte, e que novos estudos são necessários para viabilizar a produção em escala de LYO liofilizada para uso na alimentação animal.

6. Referências Bibliográficas

ABBAS, H.K. *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton: CRC Press, 2005.

ABOUSADI, M.A.; ROWGHANI, E.; HONARMAND, M.E. The efficacy of various additives to reduce the toxicity of aflatoxina B₁ in broiler chicks. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v.8, n.2, p.144-150, 2007.

ABRAR, M. et al. Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, toxicity and remedies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.53, n.8, p.862-874, 2013.

ALBERTS, J.F. et al. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v.109, p.121-126, 2006.

ALBERTS, J.F. et al. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v.135, p.47-52, 2009.

ALMEIDA, A.V.A.F. et al. Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.76, n.3, p.353-358, 2009.

AN, Z. *Handbook of industrial mycology*. v.22. New York: Marcel Dekker, 2005.

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, v.15, p.399-409, 2005.

[APHA] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of dairy products*. 17.ed. Washington, DC: APHA, 2004.

ARAVIND, K.L. et al. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, v.82, p.571-576, 2003.

ARAUZ, L.J. et al. Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. *Annals of Microbiology*, v.62, p.419-426, 2012.

- ARMANDO, M.R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin Journal*, v.4, n.1, p.59-68, 2011.
- AZAB, R.M. et al. Detection and estimation of aflatoxin B₁ in feeds and its biodegradation by bacteria and fungi. *Egyptian Journal of Natural Toxins*, v.2, p.39-56, 2005.
- BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxina M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, v.12, p.47-51, 2001.
- BAPTISTA, A.S. et al. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.20, p.475–481, 2004.
- BASMACIOGLU, H. et al. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech Journal of Animal Science*, v.50, n.1, p.31–39, 2005.
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Science and Technology*, v.10, p.223-228, 1999.
- BATINA, P.N. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. *Ciência Rural*, v.35, n.4, p.826-831, 2005.
- BEGOT, C. et al. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, v.25, p.225-232, 1996.
- BHAT, R.; RAI, R.V.; KARIM, A.A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p.57-81, 2010.
- BIERNASIAK, J.; PIOTROWSKA, M.; LIBUDZISZ, Z. Detoxification of mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens. *Mycotoxin Research*, v.22, n.4, p.230-235, 2006.

- BOLOGNANI, F.; RUMNEY, C.J.; ROWLAND, I.R. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, v.35, p.535-545, 1997.
- BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. *UNOPAR Científica – Ciências Biológicas e da Saúde*, v.12, n.2, p.15-21, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº7 de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – D.O.U., de 22 de Fevereiro de 2011.
- BRINQUES, G.B. *Otimização da produção de probióticos em biorreatores e suas aplicações em sistemas alimentícios sob a forma imobilizada*. 2009. 118f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, v.173, p.134-158, 2012.
- BURNS, P. et al. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, v.61, n.2, p.156-164, 2008.
- CARVALHO, A.S. et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p.835-847, 2004.
- CAST, 1989. Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: economic and health risks. CAST, Ames, IA. p. 116.
- CAST, 2003. Council of Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. CAST, Ames, IA. p. 139.
- CELIK, I. et al. Efficacy of polyvinylpolypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Poultry Science*, v.41, n.4, p.430-439, 2000.
- ÇELIK, K. et al. Evaluation of dry yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) compounds in the feed to reduce aflatoxin B₁ (AFB₁) residues and toxicity to japanese quails

(*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Applied Animal Research*, v.20, n.2, p.245-250, 2001.

CIEGLER, A. et al. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.14, n.6, p.934-939, 1966.

CORCORAN, B.M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, v.96, p.1024-1039, 2004.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, v.127, p.19-28, 2002.

DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. 2006. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/undersanding-adsorption-characteristics-yeast-t249/p0.htm>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

DEL BIANCHI, M. et al. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in broiler chickens. *Poultry Science*, v.84, p.1835-1840, 2005.

DENLI, M.; OKAN, F. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxina B₁ in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*, v.36, n.4, p.222-228, 2006.

DERSJANT-LI, Y.; VERSTEGEN, M.W.A.; GERRITS, W.J.J. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, v.16, p.223-239, 2003.

DIAZ, D.E. et al. Aflatoxin binders I: *In vitro* binding assay for aflatoxina B₁ by several potential sequestering agents. *Mycopathologia*, v.156, p.223-226, 2002.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 2004, Piracicaba. Anais... Piracicaba, USP/ESALQ, p.32-35. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/142z.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, v.69, p.155-166, 1997.

- DOERR, J.A. et al. A survey of T-2 toxin, ochratoxin, and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chickens. *Poultry Science*, v.53, p.1728-1734, 1974.
- EL-NEZAMI, H. et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, v.36, p.321-326, 1998.
- EL-NEZAMI, H. et al. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection*, v.63, n.4, p.549–552, 2000.
- EL-NEZAMI, H. et al. Lactic Acid Bacteria as a Tool for Enhancing Food Safety by Removal of Dietary Toxins. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3.ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2004. Cap. 12, p.397-406.
- ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. The process of beer production, 2009. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/58378/beer?overlay=true&assemblyId=70929>>. Acesso em: 20 mai. 2012.
- FARZANEH, M. et al. Aflatoxin B₁ degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control*, v.23, p.100-106, 2012.
- FAZELI, M.R. et al. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, v.72, n.1, p.189–192, 2009.
- FERREIRA, I.M.P.L.V.O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, v.21, p.77-84, 2010.
- FRANCISCATO, C. et al. Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.11, p.1573-1577, 2006.
- FRUHAUF, S. et al. Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxina B₁ and zearalenone. *Food Additives and Contaminants: Part A*, v.29, n.2, p.217-231, 2012.

- FU, W.; MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, v.3, p.163-170, 1999.
- FUCHS, S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.1398–1407, 2008.
- GAO, X. et al. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁ and G₁ detoxification. *European Food Research and Technology*, v.232, p.957-962, 2011.
- GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H.V.S.; ROY, S. Immunosuppression in broilers under experimental aflatoxicosis. *British Veterinary Journal*, v.146, p.457-462, 1990.
- GIACOMINI, L. et al. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.234-239, 2006.
- GIAMBRONE, J.J. et al. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. *Poultry Science*, v.64, p.852-858, 1985.
- GIROTTTO, A.F.; AVILA, V.S. Embrapa Suínos e Aves – Sistemas de Produção de Frangos de Corte, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaoDeFrangodeCorte/Importancia-economica.html>. Acesso em: 16 dez. 2013.
- GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELICIO, J.D. *Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999*. Divulgação Técnica do Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal, São Paulo, v.63, n.1/2, p.15-19, jan./dez. 2001.
- GRATZ, S.; MYKKÄNEM, H.; EL-NEZAMI, H. Aflatoxin B₁ binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. *Journal of Food Protection*, v.68, n.11, p.2470–2474, 2005.
- GRATZ, S. et al. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B₁ in rats. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.11, p.7398-7400, 2006.
- GUAN, S. et al. Microbial strategies to control aflatoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal*, v.4, n.4, p.413-424, 2011.

- HALÁSZ, A. et al. Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Reviews International*, v.25, n.4, p.284-298, 2009.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, v.128, p.39–49, 2000.
- HASKARD, C.A. et al. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.7, p.3086-3091, 2001.
- HATHOUT, A.S. et al. Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. *Toxicon*, v.58, p.179-86, 2011.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, p.1064–1068, 2009.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; GARCIA, H.S. Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p.395–403, 2009.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A. et al. Effect of oral supplementation of *Lactobacillus reuteri* in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B₁ in rats. *Journal of Basic Microbiology*, v.51, p.263 – 268, 2011.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, v.46, p.205–229, 2003.
- HUI, Y.H. Beer production in the United States: regulatory requirements. In: HUI, Y.H.; EVRANUZ, E.Ö. *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. CRC Press, 2012. Cap.34, p.565-578.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, p.101–134, 2001.
- HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, v.122, p.179-188, 2001.

[IARC] International Agency for Research on Cancer – World Health Organization. *IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, v.82, p.171, 2002.

[IBRAC] Instituto Brasileiro da Cachaça. *Estatísticas – Mercado Interno*, 2013. Disponível em: <<http://www.ibraccachacas.org/>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

[IAL] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 1^aed. digital. São Paulo, 2008. 1020p. Disponível em: <www.ial.sp.gov.br>. Acesso em: 08 out. 2010.

JOANNIS-CASSAN, C. et al. Binding of zearalenone, aflatoxin B₁, and ochratoxin A by yeast-based products: a method for quantification of adsorption performance. *Journal of Food Protection*, v.74, n.7, p.1175–1185, 2011.

JOUANY, J.P.; YIANNIKOURIS, A.; BERTIN, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva Zootechnica*, v.8, p.26-50, 2005.

KABAK, B.; DOBSON, A.D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.46, n.8, p.593-619, 2006.

KABAK, B.; VAR, I. Factors affecting the removal of aflatoxin M₁ from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, v.43, p.617–624, 2008.

KANKAANPÄÄ, P. et al. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 Model. *Journal of Food Protection*, v.63, n.3, p.412–414, 2000.

KARAMAN, M. et al. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*, v.46, n.3, p.394-400, 2005.

LACIAKOVÁ, A. et al. Aflatoxins and possibilities for their biological detoxification. *Medycyna Weterynaryjna*, v.64, n.3, 2008.

LAHTINEN, S.J. et al. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, v.21, p.158–164, 2004.

- LAZZARI, M.R. Avicultura de corte no Brasil: uma comparação entre as regiões sul e centro-oeste. *Indicadores Econômicos FEE*, v.31, n.4, p.259-290, 2004.
- LEDOUX, D.R. et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, v.77, p.204-210, 1999.
- LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. In vitro and in vivo testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. In: *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the 15th Annual Symposium*. (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds), Nottingham University Press, UK. p.369-379, 1999.
- LEE, Y.K. et al. Kinetics of Adsorption and Desorption of Aflatoxin B₁ by Viable and Nonviable Bacteria. *Journal of Food Protection*, v.66, n.3, p.426–430, 2003.
- LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. Guelph: University Books, 1995.
- LI, J.J.; SUO, D.C.; SU, X.O. Binding capacity for aflatoxina B₁ by different adsorbents. *Agricultural Sciences in China*, v.9, n.3, p.449-456, 2010.
- LIEVENSE, L.C.; VAN'T RIET, K. Convective drying of bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.51, p.71-89, 1994.
- LINE, J.E.; BRACKETT, R.E. Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, v.58, n.1, p.91-94, 1995.
- LUNA, G.L. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces*. 3^a ed. McGraw-Hill: New York/NY, 1968.
- MADRIGAL-SANTILLÁN, E. et al. Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B₁ contaminated corn. *Food and Chemical Toxicology*, v.44, p.2058–2063, 2006.
- MAGAN, N.; OLSEN, M. *Mycotoxins in food: detection and control*. Boca Raton: CRC Press, 2006.

- MARIANI, G.V.C. *Efeito de aflatoxinas sobre o desempenho produtivo de frangos de corte em diferentes períodos de desenvolvimento corporal*. 1998. Dissertação (Mestrado). Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria. 1998.
- MATUR, E. et al. The effects of *Saccharomyces cerevisiae* extract on the weight of some organs, liver, and pancreatic digestive enzyme activity in breeder hens fed diets contaminated with aflatoxins. *Poultry Science*, v.89, p.2213–2220, 2010.
- MCKINNEY, R.E. *Environmental pollution control microbiology: a fifty-year perspective*. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- MENG, X.C. et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, v.106, p.1406-1416, 2008.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.26-428, 1959.
- MISHRA, H.N.; DAS, C. A Review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.43, n.3, p.245–264, 2003.
- MIZUBUTI, I.Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. *Semina: Ciências Agrárias*, v.15, n.1, p.80-94, 1994.
- MODIRSANEI, M. et al. Efficacy of dietary natural zeolite and *Saccharomyces cerevisiae* in counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Journal of Applied Animal Research*, v.26, n.1, p.39-44, 2004.
- MORGAN, C.A. et al. Preservation of micro-organisms by drying: a review. *Journal of Microbiological Methods*, v.66, p.183-193, 2006.
- MULLER, R.D. et al. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poult to graded levels of aflatoxin. *Poultry Science*, v.49, p.1346-1350, 1970.
- MURPHY, P.A. et al. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, v.71, n.5, p.51-65, 2006.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Poultry. 9^a ed. National Academy Press, Washington/DC, 1994.

- NEEFF, D.V. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxina residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxina B₁. *Poultry Science*, v.92, p.131-137, 2013.
- NIERMAN, W.C. et al. Mycotoxin Production and Prevention of Aflatoxin Contamination in Food and Feed. In: GOLDMAN, G.H.; OSMANI, S.A. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. CRC Press, 2008. Cap. 27, p.457-472.
- OATLEY, J.T. et al. Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection*, v.63, n.8, p.1133–1136, 2000.
- OLIVEIRA, G.R. et al. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, v.162, p.355–362, 2006.
- OLIVEIRA, C.A.F. et al. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do Estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.1, p.221-225, 2010.
- OLIVON, B. Os países que mais produziram cerveja em 2012. 2013. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/os-paises-que-mais-produziram-cerveja-em-2012>>. Acesso em: 22 dez. 2013.
- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? *Veterinary Medicine*, v.85, n.1, p.89-94, 1990.
- PARK, D.L.; LIANG, B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science and Technology*, v.41, p.334-342, 1993.
- PARLAT, S.S.; ÖZCAN, M.; OGUZ, M. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnixcoturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Research in Veterinary Science*, v.71, p.207-211, 2001.
- PEIGHAMBARDOUST, S.H.; TAFTI, A.G.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v.22, p.215-224, 2011.

- PELTONEM, K. et al. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.2152–2156, 2001.
- PERKINS, B.W. *Clay chemistry and adsorbability of mycotoxins*, 1999. Disponível em: <http://www.mycoad.com/eng_5_15.htm>. Acesso em: 06 jan. 2014.
- PETSKA, J.J.; BONDY, G.S. Alteration of immune function following mycotoxin exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.68, n.7, p.1009-1016, 1990.
- PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science*, v.70, p.3964-3967, 1992.
- PIZZOLITTO, R.P.; BUENO, D.J.; ARMANDO, M.R.; CAVAGLIERI, L.; DALCERO, A.M.; SALVANO, M.A. *Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism*. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G. (ed.). *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. InTech, 2011. Cap.16. Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/20397.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2013.
- PIZZOLITTO, R.P. et al. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v.47, n.10, p.933-941, 2012.
- PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, p.984–991, 2009.
- RAHAIE, S. et al. Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, p.82-90, 2010.
- RAHAIE, S. et al. Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. *International Journal of Food Science and Technology*, v.47, p.1647-1653, 2012.
- RAJU, M.V.L.N.; DEVEGOWDA, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, v.41, n.5, p.640-50, 2000.

- RAJU, M.V.L.N.; DEVEGOWDA, G. Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. *Journal of Animal Science*, v.15, n.7, p.1051-1056, 2002.
- RAMOS, A.J.; HERNÁNDEZ, E. *In vitro* aflatoxin adsorption by means of montmorillonite silicate: a study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science and Technology*, v.62, p.263–269, 1996.
- RASIC, J.L.; SKRINJAR, M.; MARKOV, S. Decrease of aflatoxins B₁ in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia*, v.113, p.117–119, 1991.
- RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE JR, R. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, v.89, p.325-331, 2010.
- RINGOT, D. et al. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry*, v.40, p.3008–3016, 2005.
- RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, v.32, p.135-142, 2006.
- ROSA, A.P. et al. Desempenho de frangos de corte oriundos de matrizes de cortes submetidas a dietas contendo aflatoxinas e glucomananos esterificados como adsorvente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.2, p.347-352, 2012.
- ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.68, n.2, p.107-114, 2001.
- ROSSI, C.N. et al. Assessment of exposure of broiler chicken in Brazil to mycotoxins through naturally contaminated feed. *Food Security*, v.5, p.541–550, 2013.
- SALAY, E.; MERCADANTE, A.Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control*, v.13, p.87–92, 2002.
- SANTIN, E. et al. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxina in broilers. *International Journal of*

Poultry Science, v.2, n.5, p.341-344, 2003.

- SANTINI, A.; RITIENI, A. *Aflatoxins: risk, exposure and remediation*. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. (ed.). *Aflatoxins – Recent advances and future prospects*. InTech, 2013. Cap.16. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/>> . Acesso em: 06 jan. 2014.
- SANTURIO, J.M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *British Poultry Science*, v.40, n.1, p.115-119, 1999.
- SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.2, n.1, p.1-12, 2000.
- SAS INSTITUTE. SAS® User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC., 1992.
- SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K.; NETTO, D.P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na região norte do Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v.24, n.1, p.63-72, 2003.
- SCOTT, P.M.. Natural poisons. In: HELRICH, K., editors. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15.ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC); 1990. p.1184-213.
- SHAHIN, A.A.M. Removal of aflatoxin B₁ from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *International Journal of Agriculture and Biology*, v.9, n.1, p.71-75, 2007.
- SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*, v.17, p.48–55, 2006.
- SHETTY, P.H.; HALD, B.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.113, p.41–46, 2007.
- SHI, Y.H. et al. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, v.129, p.138-148, 2006.

- SHOTWELL, O.L. et al. Production of aflatoxin on rice. *Applied Microbiology*, v.15, p.425-428, 1966.
- SINDIRAÇÕES – Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, Boletim Informativo do Setor, maio, 2012. Disponível em: <<http://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor>>. Acesso em: 16 dez. 2013.
- SLIZEWSKA, K.; SMULIKOWSKA, S. Detoxification of aflatoxin B₁ and change in microflora pattern by probiotic in vitro fermentation of broiler feed. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v.20, p.300–309, 2011.
- SOUSA, D.P.; OSAKI, M. Caracterização do mercado internacional de carne de frango: Brasil X Estados Unidos, 2006. Disponível em: <[http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/ Sober_Danusa.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/Sober_Danusa.pdf)>. Acesso em: 22 mai. 2012.
- STANLEY, V.G. et al. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, v.72, n.10, p.1867-1872, 1993.
- STANLEY, V.G. et al. The impact of yeast culture residue on the suppression of dietary aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. *Journal of Applied Poultry Research*, v.13, p.533–539, 2004.
- STRINGHINI, J.H. et al. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.1, p.191-198, 2000.
- TEIXEIRA, P. et al. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*, v.83, p.219-226, 1997.
- TESSARI, E.N.C. et al. Effects of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *British Poultry Science*, v.47, n.3, p.357-364, 2006.
- TRUCKSESS, M.W. Natural Toxins. In: HORWITZ, W. (Ed). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC). p.1184-213, 2000.
- TURBIC, A.; AHOKAS, J.T.; HASKARD, C.A. Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Additives and Contaminants*, v.19, n.2, p.144-152, 2002.

- UBABEF – União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2013, 2013. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabefnovo/index.php>>. Acesso em: 16 dez. 2013.
- [UNICA] União da Indústria de Cana-de-açúcar. *UnicaData – Histórico de Produção e Moagem*, 2013. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 02 jan. 2014.
- VAN EGMOND, H.P.; JONKER, M.A. Worldwide regulations on aflatoxins – The situation in 2002. *Toxin Reviews*, v.23, p.273-293, 2004.
- VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food - Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.389, p.147–157, 2007.
- VARGA, J.; TÓTH, B. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.53, n.2, p.189-203, 2005.
- VARGAS, E.A. et al. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenone and fumonisin B₁ in Brazilian corn. *Food Additives and Contaminants*, v.18, n.11, p.981-986, 2001.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. *Dairy Science and Technology*. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- WU, F.; GUCLU, H. Aflatoxin regulations in a network of global maize trade. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0045151>>. Acesso em: 17 dez. 2013.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, v.51, p.81–99, 2002.
- YILDIZ, A.O.; PARLAT, S.S.; YILDIRIM, I. Effect of dietary addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on some performance parameters of adult Japanese quail (*Coturnixcoturnix japonica*) induced by aflatoxicosis. *Revue de MédecineVétérinaire*, v.155, n.1, p.38-41, 2004.
- ZAGHINI, A. et al. Mannanoligosaccharides and aflatoxin B₁ in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B₁ and M₁ residues in eggs, and aflatoxin B₁ levels in liver. *Poultry Science*, v.84, p.825–832, 2005.