BRUNA LEONEL GONÇALVES

**Uso de fontes de *Saccharomyces cerevisiae* na redução da excreção de
aflatoxina M₁ no leite de vacas leiteiras**

Pirassununga

2016

BRUNA LEONEL GONÇALVES

**Uso de fontes de *Saccharomyces cerevisiae* na redução da excreção de
aflatoxina M₁ no leite de vacas leiteiras**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciência da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin.

Pirassununga

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

G637u Gonçalves, Bruna Leonel
 Uso de fontes de *Saccharomyces cerevisiae* na redução
da excreção de aflatoxina M₁ no leite de vacas leiteiras
/ Bruna Leonel Gonçalves. -- Pirassununga, 2016.
 82 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Engenharia de Alimentos.
 Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.

 Orientador: Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin.

 1. Aflatoxinas 2. Descontaminação 3. Gado de leite
4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor”

DEDICATÓRIA

A minha família pelo amor e
paciência em todos os momentos
de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais esta conquista.

A toda a minha família que sempre me incentivou nesta caminhada. As meus pais Dauri Gonçalves e Maria Aparecida Leonel Gonçalves, pela torcida, pela ajuda, pelo carinho e pela paciência incansável. Ao meu irmão Juliano Leonel Gonçalves e ao meu noivo Ramon Tenffen Garcia pelos conselhos, conversas, força, risadas e bagunça juntos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin pela orientação, paciência, por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual e também pelos momentos de risadas e descontração.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela colaboração nos trabalhos.

A Roice, especialista do laboratório, pela ajuda com todas as análises cromatográficas e pela amizade.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos pela ajuda no experimento e pela amizade.

A estagiária Bruna Ferrari pela ajuda durante a execução do projeto.

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

A Ana Carolina Kindermann Corassin pela amizade, paciência e ajuda.

A todos os meus amigos, que mesmo de longe, sempre deram muito incentivo, para a formação de uma vida acadêmica.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP 2014/04027-3), pelo suporte financeiro durante todo o período do Mestrado.

EPIÍGRAFE

“Na vida, não vale tanto o que temos nem tanto importa, o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que construímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”. (Francisco Cândido Xavier)

RESUMO

GONÇALVES, B. L. **Uso de Fontes de *Saccharomyces cerevisiae* na Redução da excreção de Aflatoxina M₁ no leite de vacas leiteiras.** 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetivo da adição de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) residual, obtida da fermentação alcoólica de cana e cerveja contra a passagem de aflatoxina M₁ para o leite. Para tanto, foi realizado ensaio preliminar *in vitro* de remoção de AFB₁ em solução tampão fosfato pelas diferentes fontes de biomassa de SC (levedura de cana-de-açúcar seca e inativada, LCSI; levedura autolizada, LA; parede celular, PC; e co-produto de cervejaria parcialmente desidratado, CCPD), em temperatura ambiente pelos tempos de contato de 05, 10, 20 e 30 min. O ensaio *in vivo* foi realizado por meio de 20 vacas multíparas da raça holandesa que foram selecionadas em estágio médio de lactação. O delineamento experimental consistiu em dez tratamentos, um controle negativo, um controle positivo e dois tratamentos (com e sem inclusão de AFB₁) para cada uma das quatro diferentes fontes de SC, durante um período de 10 dias para avaliar a produção e a composição do leite, escore de condição corporal e bioquímica sérica. A análise de amostras de leite para quantificação de AFM₁ foi realizada empregando-se coluna de imunoafinidade para purificação associada a CLAE acoplada a espectrômetro de massa triplo quadrupolo. O valor do limite de quantificação de AFM₁ foi 0,5 µg kg⁻¹. Amostras de ração foram analisadas para quantificação de AFB₁ por meio de coluna de imunoafinidade para purificação associada a CLAE. O valor do limite de quantificação de AFB₁ foi de 0,5 µg.kg⁻¹. Através do estudo *in vitro* foi possível observar que a viabilidade celular não é pré requisito para adsorção e que o tempo de incubação não interfere na capacidade de adsorção de AFB₁. No estudo *in vivo*, não foi observado efeito da AFB₁ e nem das diferentes fontes de biomassa de SC sobre o escore de condição corporal, produção e composição do leite. A bioquímica sérica (AST, ALT e PT) avaliada foi similar entre os grupos não intoxicados e intoxicado com AFB₁. Os tratamentos LA e PC apresentaram maior capacidade de adsorção de AFB₁ em vacas leiteiras previamente intoxicadas.

Palavras chave: aflatoxinas, descontaminação, leite, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

GONÇALVES, B. L. **Use of sources of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce excretion of Aflatoxin M₁ in milk of dairy cows.** 2016. 81 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The aim of this study was to evaluate the protective effect of adding residual biomass of *Saccharomyces cerevisiae* (SC), obtained from the fermentation of sugarcane and beer against aflatoxin M₁ passage into milk. Therefore, preliminary *in vitro* test of AFB₁ removal in phosphate buffer solution by SC different biomass sources (inactive dry yeast sugarcane, IDYS, autolyzed yeast, AY; cell wall, CW and co- brewery partially dehydrated product, CBPDP) at room temperature for contact times of 05, 10, 20 and 30 min was performed. The *in vivo* assays were performed using 20 multiparous Holstein cows that were selected in mid lactation stage. The experimental design consisted of ten treatments, a negative control, a positive control and two treatments (with and without inclusion of AFB₁) for each of four different sources of SC, over a period of 10 days to evaluate the milk yield and composition, body condition score and serum biochemistry. Milk sample analysis for quantification of AFM₁ were carried out using an immunoaffinity column for purification associated with HPLC coupled to triple quadrupole mass spectrometer. The limit of quantification for AFM₁ was 0.5 µg. kg⁻¹. Feed samples were analyzed for AFB₁ quantification by immunoaffinity purification column associated with HPLC. The limit of quantification for AFB₁ was 0.5 µg.kg⁻¹. For *in vitro* study it was observed that the cell viability is not prerequisite for adsorption and the incubation time does not interfere with AFB₁ adsorption capacity. For *in vivo* study, there was no effect of AFB₁ nor the different SC biomass sources on body condition score, milk yield and composition. There was no significant difference between the originated AFB₁ levels from food samples in different days of the experimental period. Serum biochemical (AST, ALT, TP) evaluated was similar between the control group and intoxicated with AFB₁. The AY and CW treatments had higher adsorption capacity in dairy cows previously intoxicated.

Keywords: aflatoxins, decontamination, milk, *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Glândula mamária.	17
Figura 2. Ilustração dos segmentos que compõem a cadeia produtiva de leite.	18
Figura 3. Mapa do Brasil indicando as regiões com maior produção de leite.	21
Figura 4. Estruturas Furano e Cumarina.	25
Figura 5. Estruturas Químicas de algumas aflatoxinas e seus metabólitos.	26
Figura 6. Biotransformação metabólica da aflatoxina B ₁ no fígado.	28
Figura 7. Efeitos da aflatoxina em gado de leite.	32
Figura 8. Preparo do arroz para autoclavar.	41
Figura 9. Inoculação do arroz com <i>A. parasiticus</i>	42
Figura 10. Curva de calibração de AFB ₁	43
Figura 11. Cromatograma dos padrões de AFB ₁	43
Figura 12. Cápsula de toxina utilizada para intoxicação dos animais.	46
Figura 13. Processo de eluição da AFM ₁ em coluna de imunoafinidade.	49
Figura 14. Efeito da intoxicação de gado de leite com AFB ₁ com ou sem adição de fontes de biomassa de SC para redução da excreção dos níveis de AFM ₁ (µg/kg) no leite, ao longo do período experimental.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média de leite de diferentes raças de vaca (%).	17
Tabela 2. Caracterização das fontes de resíduo de fermentação alcoólica contendo células da levedura <i>Sacchararomyces cerevisiae</i>	38
Tabela 3. Delineamento experimental do ensaio <i>in vivo</i>	44
Tabela 4. Composição bromatológica média da dieta, durante o período experimental.	45
Tabela 5. Níveis de aflatoxina B ₁ em solução tampão fosfato salina (TFS) após adsorção de produtos à base de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – em diferentes tempos de contato.....	51
Tabela 6. Porcentagens de aflatoxina B ₁ adsorvidas a produtos à base de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes tempos de contato em TFS.	53
Tabela 7. Valores médios da concentração de aflatoxinas (µg/kg) nas rações coletadas nos dias 1, 5 e 10 do período experimental ¹	56
Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da composição do leite (%) durante os 10 dias do período experimental ¹	58
Tabela 9. Valores médios e desvio padrão da produção de leite (kg/dia) nos 10 dias do período experimental ¹	60
Tabela 10. Valores médios e desvio padrão da quantidade (ng/mL) de AFM ₁ presente no leite dia de cada tratamento.	63
Tabela 11. Valores médios da concentração de proteínas totais (g/L), AST (U/L) e ALT (U/L) (mg/dL) no sangue venoso dos animais nos dias 1, 5 e 10 do período experimental ¹	65
Tabela 12. Valores médios dos escores de condição corporal dos animais ao início e final do período experimental ¹	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AF	Aflatoxina
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
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCPD	Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
LA	Levedura autolisada
LCSI	Levedura de cervejaria seca e inativada
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Parede celular
PT	Proteína Total
RPM	Rotações por minuto
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica-pirúvica
TFS	Tampão fosfato salina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Objetivos Gerais	15
1.1.2 Objetivos Específicos	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Composição do leite	16
2.2 Cadeia Produtiva e Produção de Leite.....	18
2.3 Produção de Leite	19
2.4 Consumo de Leite no Mundo	21
2.5 Fungos e Micotoxinas.....	22
2.5.1 Aflatoxinas	23
2.5.2 Estruturas químicas das aflatoxinas.....	25
2.5.3 Toxicidade das aflatoxinas	25
2.6 Aflatoxina e bovinos leiteiros.....	28
2.6.1 Ocorrência de aflatoxinas na dieta de bovinos leiteiros	28
2.6.2 Efeitos tóxicos das aflatoxinas em bovinos leiteiros	30
2.7 Resíduos de aflatoxina M ₁ em leite	32
3. DESCONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS POR FONTES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	35
4. METODOLOGIA.....	38
4.1 Micro-organismos: aquisição e meio de cultivo.....	38
4.2 Preparo das diferentes fontes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC)	38
4.2.1 Caracterização bromatológica das diferentes fontes de biomassa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
4.2.2 Esterilização das leveduras.....	39

4.3 Ensaio de remoção de Aflatoxina B ₁ <i>in vitro</i>	39
4.3.1 Quantificação da AFB ₁ em solução TFS através de CLAE	40
4.4 Ensaio <i>in vivo</i>	41
4.4.1 Produção de aflatoxina B ₁	41
4.4.2 Animais, instalações e manejo.....	44
4.4.3 Delineamento experimental	44
4.4.4 Dietas Experimentais	45
4.4.5 Determinação de aflatoxinas na ração	46
4.5 Variáveis analisadas no experimento	47
4.5.1 Análise das amostras de leite.....	48
4.5.2 Bioquímica Sérica.....	50
4.5.3 Análise de escore corporal.....	50
4.6 Análise dos Resultados	50
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Remoção de AFB ₁ <i>in vitro</i>	50
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	54
5.2.1 Determinação de aflatoxina na ração.....	54
5.2.2 Análise de Leite	56
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	79

1. INTRODUÇÃO

Diversos alimentos destinados ao consumo humano e animal são susceptíveis ao ataque fúngico, tanto no campo quanto no período de armazenamento. Quando em condições favoráveis tais fungos podem produzir micotoxinas, produto de seu metabolismo secundário. A contaminação por micotoxinas depende de diversos fatores, tais como temperatura, humidade do ar, pH entre outros.

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por micélios ou esporos de fungos filamentosos (GONÇALVES et al., 2001). De todas as micotoxinas isoladas, uma das mais conhecidas e amplamente distribuída em alimentos, com propriedades tóxicas acentuadas são as aflatoxinas, produzidas predominantemente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (AN, 2005).

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas, bastante comuns em alimentos, podendo ser encontrada como contaminantes naturais em cereais (milho, trigo, sorgo e arroz), subproduto de cereais, bagaço de oleaginosas (algodão, coco, amendoim e girassol), mandioca e todo um conjunto de alimentos destinados a humanos tais como: frutas frescas, especiarias, oleaginosas e leite (BHAT et al., 2010). A presença desta toxina em alimentos causa sérios danos à saúde humana e animal (HERNANDEZ-MENDOZA; GARCIA; STEELE, 2009; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA; CORASSIN, 2014), isso se deve aos efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressivos e hepatotóxicos, que são influenciados por fatores como espécie, sexo, idade, estado nutricional, dose e período de exposição do organismo à toxina. Além disso, as aflatoxinas geram um impacto negativo em relação ao aspecto econômico uma vez que reduz a produtividade animal. Segundo Wilson et al. (2002) as perdas econômicas dos produtores de leite como causa dos efeitos tóxicos das aflatoxinas podem ser menos óbvias e mais difíceis de quantificar. Perdas por mortalidade, diminuição na produtividade e contaminação do leite podem ser estimadas de forma mais evidente quando comparadas a outros efeitos negativos ocasionados pela contaminação por micotoxinas, como infertilidade, redução na eficiência ruminal e alimentar, problemas imunológicos e perdas de desempenho como um todo dos animais.

Animais produtores de leite que consumam ração contaminada com aflatoxina B₁, irão excretar aflatoxina M₁ no leite. A presença de AFM₁ no leite e em produtos lácteos é uma preocupação global, pesquisas diversos países como Irã (GHAZANI, 2009); Turquia

(UNUSSAN, 2006); Siria (GHANEM; ORFI, 2009); Coreia do Sul (KIM et al., 2000) e Brasil (OLIVEIRA et al., 2010 e GARRIDO et. al., 2003) têm demonstrado uma alta frequência de AFM₁ em leite e produtos lácteos, além de concentrações elevadas, acima dos níveis permitidos pelo Mercado Comum Europeu (0,05 µg. kg⁻¹). Neste contexto, métodos de descontaminação são necessários para evitar resíduos nos alimentos e consequentemente riscos à saúde humana e animal.

A utilização de microrganismos para degradar aflatoxinas é uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação destas toxinas em alimentos e rações (ALBERTS et al., 2006). A SC é a levedura mais conhecida e de grande importância comercial, sendo amplamente utilizada na indústria de bebidas alcóolicas e de panificação. Além disso, segundo alguns estudos (EL-NEMAZI et al., 2004; SHETTY; JESPERSEN, 2006 e SHETTY et al., 2007) a SC é um dos microrganismos com maior capacidade de remoção de AFB₁. Shetty et al. (2007) analisaram 18 diferentes cepas de SC e observaram que 3 cepas apresentaram maior capacidade de remoção de AFB₁, postulando que dentro de um determinado gênero e ou espécie a capacidade de remoção de AFB₁ varia acentuadamente.

Nossa hipótese é que as quatro fontes de SC apresentariam capacidades diferentes em ligar aflatoxinas, e que esta capacidade seria maior em experimento *in vitro* que *in vivo*. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de quatro diferentes fontes de *Saccharomyce cerevisiae* (LA, CCPD, LCSi e PC) em ligar aflatoxinas, primeiramente *in vitro* e em seguida *in vivo*, visando a redução da excreção de AFM₁ no leite de vacas leiteiras.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito protetivo da adição de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) residual, obtida da fermentação alcoólica de cana e cerveja contra a passagem de aflatoxina M₁ para o leite.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a capacidade de adsorção *in vitro* das quatro diferentes fontes de biomassa de SC para remoção de AFB₁, em solução tampão fosfato salina a temperatura ambiente em tempos de contato de 05, 10, 20 e 30 min.;
- ✓ Avaliar a capacidade de adsorção *in vivo* das quatro diferentes fontes de biomassa de SC em vacas leiteiras previamente intoxicadas com AFB₁ para redução de AFM₁ no leite. Adicionalmente, avaliar o efeito da AFM₁ sobre a produção e a composição do leite, escore de condição corporal e bioquímica sérica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Composição do leite

O leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Segundo Chaves (2011) o leite é formado a partir do sangue dos animais por dois mecanismos básicos: filtração e síntese. O processo de síntese do leite ocorre na glândula mamária (figura 1), mais especificamente nos alvéolos (unidade estrutural e funcional básica da glândula mamária). A produção do leite ocorre a partir da filtração da água que passa diretamente no sangue, ao passo que os aminoácidos, ácidos graxos, açúcares e alguns minerais passam por processos bioquímicos de transformação, as quais ocorrem dentro das glândulas mamárias, originando os componentes do leite.

O leite é o primeiro alimento consumido pelo homem e um dos mais completos. Possui elementos essenciais, micronutrientes, aminoácidos e ácidos graxos em porções maiores que em qualquer outros produtos. O leite contém proteínas de alta qualidade, alto percentual de cálcio e algumas substâncias bioativas como enzimas, hormônios e citocinas (BRESSAN; MARTINS, 2003).

A água é o componente que apresenta maior proporção no leite bovino (87,30%), seguida da lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%), e sais minerais (0,72%) (SGARBIERI, 2004). Na água encontram-se em solução os demais compostos, alguns minerais estão na forma iônica, a lactose aparece como uma solução verdadeira, a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal e a gordura na forma de pequenos glóbulos dispersos, constituindo uma emulsão (WALSTRA; JENNES, 2002).

Segundo Chaves (2011) e Fox e Mcsweeney (1998) a composição do leite varia bastante de acordo com alguns fatores, tais como: 1) genéticos (espécie, raça e indivíduo), 2) fisiológicos (idade, ocorrência de doenças e período de lactação e 3) condições ambientais e de manejo (variações sazonais, temperatura ambiental, frequência de ordenhas diárias, alimentação, estado nutricional e balanço energético). A composição média do leite de diferentes raças de vacas pode ser observada na tabela 1.

Figura 1. Glândula mamária.

Fonte: Adaptado de: BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2. ed. London: Cab, 2010. 266 p.

Tabela 1. Composição média de leite de diferentes raças de vaca (%).

Raça	Gordura	Proteína	Lactose	Cinzas	Extrato Seco
Parda suíça	4,0	3,6	5,0	0,7	13,3
Holstein	3,5	3,1	4,9	0,7	13,3
Jersey	5,5	3,9	4,9	0,7	12,2
Holandesa	3,6	3,3	4,8	0,7	12,5

Fonte: Adaptado de ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 279.

As principais raças leiteiras presentes no rebanho brasileiro são: Holandesa, Pardo-suíça, Jersey, Gir e a mestiça Girolanda (3/8 Gir e 5/8 Holandesa), as quais são mais produtivas que as vacas Gir e mais rústicas que as Holandesas (AUAD; SANTOS; CARNEIRO, 2010).

Para Kelly (2010) o principal objetivo da produção de leite é promover alto nível nutricional à prole nos primeiros dias ou semanas de vida. No entanto, segundo este mesmo autor, com a domesticação das vacas leiteiras, ocorreu uma extensão do tempo de produção, com o propósito de alcançar uma maior produção de leite para suprir a alimentação humana e a fabricação de derivados lácteos. Atualmente uma grande quantidade de alimentos, consumidos em todo o mundo, tem a inclusão do leite de vaca como ingrediente no processo de fabricação.

2.2 Cadeia Produtiva e Produção de Leite

No que diz respeito à cadeia produtiva de leite, de acordo com Gomes e Leite (2001) os principais segmentos que compõem esta cadeia produtiva são: (a) indústria de insumos para a agropecuária, (b) produtores de leite, (c) captação e transporte da matéria prima, (d) transporte e distribuição de produtos processados e por fim, mercado e (e) consumidores observados na figura 2.

- (a) Produção de sementes, fertilizantes, rações, produtos veterinários, máquinas e equipamentos e prestação de serviço;
- (b) Unidades produtoras de leite – especializadas (só produzem leite) e unidades produtoras não especializadas;
- (c) Logística de captação e transporte a granel;
- (d) Cooperativas, pequenos laticínios, empresas nacionais e multinacionais. Necessidade de logística de distribuição, centros de distribuição e utilização de caminhões refrigerados ou não refrigerados isotérmicos.
- (e) Comércio atacadista e varejista, mercearias, padarias, lanchonetes, consumidores de um modo geral.

Figura 2. Ilustração dos segmentos que compõem a cadeia produtiva de leite.

Fonte: Propriedade do Autor (2015).

De acordo com Brasil (2010) a cadeia produtiva brasileira é caracterizada por ser uma grande geradora de emprego, renda e tributos. No que se refere à geração de empregos, Martins e Guilhoto (2001) frisam que a representatividade do leite e seus derivados é superior a setores como o da construção civil, siderurgia, indústria têxtil e de e automóveis, fato que indica a importância do setor na geração de emprego, renda e, consequentemente, tributos.

2.3 Produção de Leite

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2010) os maiores produtores de leite do mundo são os Estados Unidos (EUA), Índia, China, Rússia, Alemanha e o Brasil. Estes países são responsáveis por 56% de toda a produção mundial.

Os EUA sempre apresentaram destaque como os maiores produtores de leite, estando a concentração de da produção de leite mais concentrada nas regiões oeste e norte do país. Entre os anos de 2000 e 2008, a produção de leite nos EUA cresceu a uma taxa média de 1,7 % ao ano. Em 2008, a produção por animal era de 9,34 t/ ano, o que colocou o país em primeira posição no ranking de produtividade (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2010).

De acordo com Jesse et al. (2006) apesar de a Índia ser o segundo maior produtor de leite do mundo, a produção de leite serve como um subproduto agrícola ou atividade

suplementar para os pequenos produtores, o que explicaria o porquê do país apresentar baixos níveis de produtividade/produtor.

A China vêm se destacando na produção de leite nos últimos anos, em 2000 foi o 17º produtor de leite com 8,6 milhões de toneladas, em 2008 conquistou a posição de terceiro maior produtor mundial, alcançando um volume de 35,9 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2010). A estimativa da (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2010) é que para os anos posteriores a esse crescimento haja uma flutuação em queda de produção e retomada de crescimento.

A Rússia após anos enfrentando queda na produção de leite, retornou em 2005 por meio de um programa de subsídio do governo a crescer e aumentar a produtividade. Em 2008 a produção de leite atingiu 32 milhões de toneladas, com previsão de crescimento médio de 2 % para os próximos anos (FAO, 2010).

Segundo a (USDA, 2012) o mercado internacional de leite e produtos lácteos tem se expandido consideravelmente, principalmente nos países emergentes. Dados deste mesmo órgão apontam um aumento de 40% tanto na produção quanto no consumo de leite e produtos lácteos nos últimos 11 anos. Em relação ao cenário mundial, o Brasil conquistou no ano de 2010 a quinta posição dentre os principais países produtores de leite. Naquele ano, o país apresentou uma produção de 31,6 bilhões de litros, ficando atrás dos Estados Unidos (produção de 87,4 bilhões), da Índia (produção de 50,3); da China (produção de 36,0); e da Rússia (produção de 31,8). A produção mundial naquele ano foi de, aproximadamente, 600 bilhões de litros de leite (USDA, 2012).

De acordo com Embrapa (2010) entre os anos de 2000 e 2008 a produção de leite no Brasil cresceu continuamente a taxas anuais de 4,9 %. No ano de 2008 o Brasil foi o sexto maior produtor de leite do mundo e primeiro da América do Sul. No entanto, a produção leiteira no País ainda se caracterizava por grande heterogeneidade, tanto nas técnicas de produção quanto no rebanho e tipo de produtores (EMBRAPA, 2010). Cerca de 80% dos produtores de leite do Brasil foram classificados como pequenos e respondiam por apenas 27% do volume produzido, enquanto que 20% foram classificados como grandes, respondendo por 73% da produção.

A pecuária leiteira está presente em quase todos os municípios brasileiros, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) dos 5.564 municípios existentes no País, somente 67 não produzem leite. De acordo com o Censo Agropecuário (2006), 1,35 milhões, do total de 5,17 milhões de estabelecimentos agropecuários existentes no Brasil, dedicam-se à

atividade leiteira (BRASIL, 2010). Em termos de distribuição geográfica da produção de leite, pode-se observar (figura 3) maior concentração de produção nas regiões sul, sudeste e centro-oeste.

Nos últimos anos, o Brasil, vem alcançando importância entre os principais produtores de leite no mundo. Os destaques são o crescimento da demanda interna e também crescimento da produção acima da média mundial (IFCN, 2013). Segundo o IBGE (2014), no 2º trimestre de 2014, foram adquiridos pelas indústrias processadoras de leite, 5,7 bilhões de litros de leite, indicativo de aumento de 8,2 % em relação ao 2º trimestre de 2013.

Figura 3. Mapa do Brasil indicando as regiões com maior produção de leite.

Fonte: Propriedade do Autor (2015).

2.4 Consumo de Leite no Mundo

Existem poucos estudos descrevendo a prevalência e o hábito de consumo de leite no mundo. Apesar das diferenças em relação à dieta e a outros hábitos de estilo de vida, em outros países, assim como no Brasil, o leite é um importante componente alimentar. A partir das informações disponíveis na literatura, observa-se que o padrão de consumo de leite pela população brasileira varia de acordo com fatores individuais, socioeconômicos e demográficos (MUNIZ, 2010).

Mais de 6 bilhões de pessoas no mundo consomem leite e produtos lácteos; a maioria dessas pessoas vive em países em desenvolvimento. Desde o início dos anos 1960, o consumo *per capita*

de leite nos países em desenvolvimento quase dobrou. No entanto, o consumo de leite tem crescido mais lentamente do que o de outros produtos de origem animal (FAO, 2015).

De acordo com este mesmo autor o consumo *per capita* de leite é:

- Alto (maior que 150 kg per capita por ano) na Argentina, Armênia, Austrália, Costa Rica, Europa, Israel, Quirguistão, América do Norte e do Paquistão;
- Médio (entre 30 e 150 kg per capita por ano) na Índia, República Islâmica do Irã, Japão, Quênia, México, Mongólia, Nova Zelândia, África do Norte e do Sul, a maior parte do Oriente Médio e grande parte da América Latina (Brasil) e do Caribe
- Baixo (menor que 30 kg per capita por ano) em Vietnã, Senegal, a maioria da África Central e do Sudeste Asiático.

2.5 Fungos e Micotoxinas

Os fungos são microrganismos eucarióticos e unicelulares como as leveduras, ou pluricelulares como os fungos filamentosos e bolores, são multinucleados e heterotróficos (BAHT; RAI; KARIM, 2010; TRABULSI et al., 1999). Caracterizam-se por possuir parede celular de quitosana e a grande maioria apresenta crescimento filamentoso, sendo agrupados como micélio. Os fungos podem se desenvolver em quase todas as condições climáticas e em qualquer tipo de suporte sólido ou líquido, seu crescimento pode ocorrer em temperaturas entre 10 e 40°C, o intervalo de pH ótimo para crescimento é de 4 a 8 e atividade de água maior que 0,7 (BHAT et al., 2010; DINIZ, 2002).

Já é bem estabelecido há séculos que a atividade dos fungos ocasiona alterações no sabor e na qualidade dos alimentos. Algumas alterações são desejáveis, a exemplo na fabricação de queijo *Roquefort*, no entanto, em diversos outros casos, os fungos podem causar alterações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis (DIINIZ, 2002). Segundo Bata e Lasztity (1999) 400 fungos podem ser considerados como potencialmente toxigênicos, e cerca de 20 são conhecidos por produzir compostos tóxicos que causam efeitos adversos em animais e humanos.

Esses compostos tóxicos, denominados micotoxinas, são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos pelos micélios ou esporos de fungos filamentosos (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001). D'Mello e MacDonald (1997) propõem que a produção de micotoxinas limita-se a um número relativamente pequeno de fungos, sendo que

quanto mais complexo for o caminho para a síntese de uma micotoxina, menor o número de espécies de fungos que a produzem.

O termo micotoxina é originário de uma palavra grega “mykes” (fungo) e de uma palavra do latim “toxicum” (toxina ou veneno) (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001; OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). De acordo com Nierman et al. (2008) as micotoxinas são classificadas como o mais importante fator de risco não-infeccioso e crônico alimentar, superando os contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentares ou resíduos de pesticidas. A ingestão de alimentos contendo micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde humana e animal (SHEPHARD, 2008). Estes efeitos são denominados de micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo (PERAÍCA et al; 2000). Além disso, o efeito da micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida, podendo ser aguda (letal) ou crônica (MURPHY et al., 2006; NIERMAN et al., 2008).

Os efeitos adversos das micotoxinas sobre a produção agrícola são mencionados desde a antiguidade (VIRGILIUS, 1994). Nos séculos VIII e VII a.C. ocorria um festival denominado Robigalia em honra ao Deus Robigus, a quem era necessário pedir para proteger grãos e árvores. Este festival foi celebrado sempre no mês de abril, por ser a época do ano em que as plantações eram mais atacadas pelos fungos (PERAÍCA et al., 2000).

No século V a.C. as toxinas produzidas por *Fusarium* e a zearalenona foram consideradas o motivo para a erradicação dos etruscos e da peste em Atenas. Tempos depois, as toxinas do *Fusarium* causaram doenças em animais e humanos desde o período medieval na Europa até o período colonial na América (BARTOSZEK, 2006). Na idade média, o ergotismo ou fogo de Santo Antônio, causado pelo *Claviceps purpúrea* alcançou proporção de epidemia, e levou muitas pessoas à morte na Europa (VAN DONGEN; DE GROOT, 1955). Um maior interesse por micotoxinas iniciou-se em 1960, quando ocorreu um surto de micotoxicose com perus na Inglaterra (PERAÍCA et al., 2000).

Segundo Bath et al. (2010) atualmente já foram descobertas cerca de 400 tipos de micotoxinas, as quais são divididas em grupos com base na sua similaridade estrutural e em seus maiores efeitos tóxicos.

2.5.1 Aflatoxinas

De todas as micotoxinas isoladas, uma das mais conhecidas e amplamente distribuídas em alimentos, com propriedades tóxicas comprovadas são as aflatoxinas, produzidas predominantemente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (AN, 2005). De acordo com Alberts et al. (2006) as aflatoxinas podem ser produzidas por outras cepas de *Aspergillus*, como *A. nomius* e *A. tamarii*.

As aflatoxinas são micotoxinas que ocorrem naturalmente e seu nome, aflatoxina, é derivado da combinação de “a” designando o gênero *Aspergillus*, “fla” que designa a espécie *flavus* e toxina que significa veneno. A descoberta desta toxina aconteceu em 1960, na Inglaterra, devido à um surto, em perus, causado por uma doença desconhecida, denominada doença x. Tal doença foi causada pela ingestão de amendoim contaminado com *A. flavus*, o que levou a morte mais de 100 mil perus e outros animais envolvidos (BATH et al., 2010; PERAÍCA et al., 2000).

A ocorrência de aflatoxina em alimentos é inevitável e influenciada por fatores ambientais. A extensão de sua contaminação não é previsível podendo variar com as práticas agronômicas e susceptibilidade do produto à invasão do fungo durante as fases de pré-colheita, armazenamento e processamento (ARAÚJO, 2012). O *Aspergillus* spp. cresce em uma vasta variedade de substratos, e a maioria dos alimentos e rações são susceptíveis a invasão por cepas aflatoxigênicas, em qualquer estágio de produção, processamento ou estocagem (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). Neste contexto, as aflatoxinas podem ser encontradas como contaminantes naturais nos cereais (principalmente no milho, trigo, sorgo e arroz), subprodutos de cereais, bagaços de oleaginosas (algodão, amendoim, colza, coco, palmiste e girassol), mandioca e todo um conjunto de alimentos para humanos tais como frutas secas (nozes, amêndoas, castanha do Brasil), especiarias (pimenta, coentro, açafrão), oleaginosas e leite (BATH et al., 2010).

As aflatoxinas estão presentes no mundo inteiro, mas principalmente nas áreas de clima tropical. Sua formação em produtos agrícolas ocorre em condições de tempo quente e úmido, e em instalações de armazenagem deficiente ou inadequada. Os fatores de maior influência sobre o crescimento e a produção de aflatoxinas são a umidade relativa do ar superior a 80% e a temperatura, que é ótima para o crescimento do fungo entre 36 a 38 °C e para a produção máxima de toxina dentre 25 a 27 °C (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008) (ABBAS, 2005). A produção de aflatoxinas pode ser influenciada por alguns outros fatores tais como: composição de substrato, pH, teor de oxigênio e dióxido de carbono, competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante, estresse da planta e uso de fertilizantes ou fungicidas (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MAGAN; OLSEN, 2006).

2.5.2 Estruturas químicas das aflatoxinas

As aflatoxinas fazem parte de um grupo de compostos denominados furanocumarinas (Figura 4). Todos os compostos pertencentes a esse grupo possuem um núcleo, cumarina, associado ao furano e à lactona (Figura 5). As aflatoxinas do grupo B, G e M possuem estruturas químicas distintas, possuindo anel ciclopentenona, lactona insaturada e derivados hidroxilados de B₁ e B₂ respectivamente (ARAÚJO, 2012).

Figura 4. Estruturas Furano e Cumarina.

Fonte: Adaptado de ARAÚJO, J. M. A. Aflatoxinas. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 340-352.

2.5.3 Toxicidade das aflatoxinas

Segundo Bath et al. (2010) e Oliveira e Germano (1997) foram identificados cerca de 18 diferentes tipos de aflatoxinas, sendo as de maior interesse médico-sanitário as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). Estas toxinas são resultantes do metabolismo fúngico, no entanto, aflatoxicol, AFM₁, AFM₂ e AFQ₁ são produtos resultantes da biotransformação hepática da AFB₁ SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Considera-se a biotransformação da AFB₁ uma forma de desintoxicação, uma vez que os efeitos tóxicos dos metabólitos derivados são menores que os da AFB₁ (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

De acordo com Forrester (1990) entrada das aflatoxinas no organismo, ocorre comumente pela via digestiva e em decorrência de sua lipossolubilidade, tais toxinas, são absorvidas no trato gastrointestinal, sendo distribuídas aos diferentes órgãos, tais como: músculo, rins, tecido adiposo e, principalmente, fígado (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-

NETO, 2008). Segundo estes mesmos autores no fígado as aflatoxinas são biotransformadas pelo sistema enzimático das oxidases de funções mistas (figura 6). A biotransformação das aflatoxinas é um processo complexo, com múltiplas vias, tais como epoxidação, hidroxilação, desmetilação e redução (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Figura 5. Estruturas Químicas de algumas aflatoxinas e seus metabólitos.

Fonte: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ICHM. **Environmental health criterial 11**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 20 set. 2015.

Para Reddy, Odhav e Bhoola (2006) a biotransformação da AFB₁ tem sido estudada com maior interesse, pois tem uma grande afinidade com seus mecanismos tóxicos. Para manifestar seus efeitos tóxicos a AFB₁ precisa sofrer ativação metabólica (CHU, 1991), sua forma ativada é o composto denominado com 8,9-óxido de AFB₁. Este composto é bastante eletrofílico sendo capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, a exemplo do ácido

desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (LIN et al., 2006). A ligação AFB₁ 8,9-epóxido com o DNA origina os mecanismos básicos dos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos, pois a ligação covalente desse composto ao DNA resulta na formação do aduto aflatoxina-N⁷-guanina (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Segundo Hsieh e Atkison (1991) os adutos são responsáveis pela lesão bioquímica primária causada pelas aflatoxinas. De acordo com Lin et al. (2006) e Oliveira e Germano (1997) a ligação da 8,9-óxido de AFB₁ com o DNA modifica a estrutura deste e, como consequência, a sua atividade biológica, dando origem aos mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e de neoplasias ocasionadas pela AFB₁.

Além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB₁ inclui O- desalquilação, que dá origem a AFP₁, redução a aflatoxicol e ainda a hidroxilação, formando AFM₁, AFQ₁ e AFB_{2a}. Logo, as principais reações das aflatoxinas no metabolismo são hidroxilação, oxidação e demetilação (WU et al., 2009).

Segundo Araújo (2012) existe um grande interesse pelas aflatoxinas por duas razões: toxidez e carcinogenicidade. A aflatoxina é tóxica para a maioria dos animais, com valor LD₅₀ de 0,5 mg/ kg de peso de animais novos vivos. Sérios riscos à saúde humana e animal podem ser causados pelas aflatoxinas, já que estas apresentam efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressivos e hepatotóxicos (HERNANDEZ-MENDOZA; GARCIA; STEELE, 2009; OLIVEIRA et al., 2013). O conhecimento dos efeitos tóxicos das aflatoxinas é importante para o diagnóstico das toxicoses (BRUGERE-PICOUX, 1987), a toxicidade dessas toxinas varia de acordo com a espécie animal, a idade, o sexo, o estado nutricional, o tempo de exposição e a quantidade de toxina ingerida (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

A aflatoxicose é o envenenamento resultante da ingestão de níveis moderados a altos de aflatoxinas através de alimentos contaminados. No que diz respeito à saúde animal, várias espécies são sensíveis aos efeitos agudos e crônicos das aflatoxinas (OSWEILER, 1990). A aflatoxicose aguda é caracterizada pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, baixa conversão alimentar, interferência na capacidade reprodutiva, imunossupressão, hepatite aguda, icterícia progressiva rápida, edema nos membros, dores, vômitos, cirrose, hemorragias e morte (NIERMAN et al., 2008). A aflatoxicose crônica resulta em câncer, supressão imunológica e outras condições patológicas, sendo o fígado o órgão alvo primário (NIERMAN et al., 2008). Osweiler (1990) relata que os efeitos da toxicidade crônica se caracterizam por lesões hepáticas, mas em menor escala, incluindo câncer hepático e alterações

genéticas. Leeson et al. (1995) consideram o fígado como órgão mais afetado, com lesões decorrentes da necrose hemorrágica, proliferação das células dos ductos biliares e infiltração gordurosa dos hepatócitos.

Figura 6. Biotransformação metabólica da aflatoxina B₁ no fígado.

Fonte: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ICHM. **Environmental health criterial 11**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 20 set. 2015.

2.6 Aflatoxina e bovinos leiteiros

2.6.1 Ocorrência de aflatoxinas na dieta de bovinos leiteiros

A nutrição é um dos fatores mais importantes na produção de leite, que representam o principal custo nesta atividade. Exigências nutricionais de vacas leiteiras variam de acordo com

o estágio de prenhez e lactação. Cinco fases de alimentação distintos foram determinados para produção ótima, reprodução e saúde de vacas leiteiras: início da lactação - 0 a 70 dias pós-parto (pico de produção de leite); pico de consumo de matéria seca de - 70 a 140 dias pós-parto (declínio de produção de leite); e lactação tardia - 140 a 305 dias pós-parto (declínio de produção de leite); período seco - de 60 a 14 dias antes da próxima lactação / parto; período de transição - 14 dias antes do parto (GONÇALVES et al., 2015). Os nutrientes requeridos por vacas leiteiras são energia, fibra, proteína, água, vitaminas e minerais. O pasto fornece uma fonte equilibrada de alimentação, mas não é suficiente para manter as vacas leiteiras de alta produção. A energia é o fator decisivo na produção de leite: ela determina o rendimento e composição do leite, bem como o peso corporal. As principais fontes de energia na alimentação de vacas leiteiras são carboidratos e fibras (silagem de milho, milho moído, farelo de algodão, milho de alta umidade em grão, farelo de glúten de milho, farelo e casca de soja). Proteínas e gorduras em alimentos também podem ser utilizados como fontes de energia (GONÇALVES et al., 2015). Segundo a Embrapa (2002) a alimentação de vacas leiteiras é bastante complexa, a dieta completa destes animais é uma mistura de concentrados energéticos e proteicos e volumosos que podem ser de silagem, feno, pastagens e cana-de-açúcar (como os já supracitados), além de minerais e vitaminas (MARTINEZ, 2010).

Os bovinos leiteiros são geralmente criados em sistemas intensivos e semi-intensivos de criação, nestes sistemas os animais recebem o volumoso processado, sendo este constituído pelas etapas de fenação, ensilagem ou picagem das forragens. Esses processos constituem uma importante estratégia de estocagem para épocas de escassez devido ao clima, ou para reduzir as partículas do alimento e facilitar sua mistura ao concentrado, evitando assim seleção do alimento pelos animais (LUPATINI et al., 2004). Além da sazonalidade das forragens decorrente do clima, outro fator negativo em relação a produção animal é a alta propensão ao desenvolvimento de fungos nos alimentos, devido a temperaturas e umidade elevadas. Cuidados redobrados devem ser tomados desde a colheita do alimento, passando pelo transporte e estocagem, até o fornecimento para os animais (LUPATINI et al., 2004).

A ração animal é naturalmente contaminada, simultaneamente, por vários fungos, os quais são capazes de produzir diversas toxinas (ALONSO et al., 2013). De acordo com Fielder, Schutz e Geh (2001) e Bruerton (2001) é comum a presença de fungos em alimentos armazenados ou ensilados. Segundo estes mesmos autores várias espécies de fungos dos géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Claviceps*, *Mucor* e *Geotrichum*,

compõem a flora de armazenamento e são os principais responsáveis pela produção de micotoxinas encontradas em grãos e forragens.

As principais micotoxinas encontradas em silagens de diversos países compreendem as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), deoxinivalenol, zearalenona, toxina T-2 e fumonisinas (B₁ e B₂). Essas micotoxinas podem ocasionar diversos problemas aos animais, podendo levar à morte em casos mais severos (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003; ROBINSON, 2012; DIAZ, 2006).

A ocorrência de fungos toxigênicos, com a consequente produção de micotoxinas, está diretamente ligada aos fatores climáticos. Os fungos do gênero *Aspergillus* spp. desenvolvem-se principalmente em locais de clima mais quente, enquanto que a maioria das espécies de *Fusarium* e *Penicillium* spp. preferem locais de clima mais ameno (NOVISNKI; SCHMIDT, 2011). Existe, também, a possibilidade de ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas, o que pode conduzir à potencialização de seus efeitos tóxicos sobre o organismo susceptível.

De acordo com Gouroman e Bullerman (1995) desde que as aflatoxinas foram descobertas, diversas pesquisas têm sido descritas enfatizando os aspectos químicos e toxicológicos destas toxinas. A maioria dos estudos publicados no mundo tem sugerido a incidência de fungos em alimentos e silagem. A incidência dessas toxinas em *commodities* agrícolas está cada vez mais frequente, e tem gerado preocupação, pois além do risco de causar danos à saúde (humana e animal), também gera um impacto negativo na economia (RUSTOM, 1997; ALONSO et al., 2013).

2.6.2 Efeitos tóxicos das aflatoxinas em bovinos leiteiros

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia de maneira considerável, entre as espécies animais (APPLEBAUM et al., 1982). Segundo Fink-Gremmels (2008a) os efeitos das micotoxinas são mais graves em animais monogástricos e dependem da espécie e da susceptibilidade as toxinas dentro das espécies. De acordo com este mesmo autor, os ruminantes, no entanto, são considerados mais resistentes aos efeitos adversos das micotoxinas. Para Dien e Schatzmayr (2003) o fato de os ruminantes serem mais resistentes as micotoxinas está relacionado ao fato de que a microbiota do rúmen tem a capacidade de biotransformar as micotoxinas em metabólitos menos tóxicos. No entanto, segundo estes mesmos autores, isto

não é aplicável a todas as micotoxinas e, estes ainda ressaltaram que o impacto das micotoxinas em ruminantes é dependente da idade, sexo, raça e estado nutricional-imunitário do animal.

O gado leiteiro é altamente exposto à ação de micotoxinas devido a sua dependência de concentrados e volumosos conservados como feno ou silagem (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001). De acordo com (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY-EFSA, 2004) a população microbiana do rúmen tem a capacidade de metabolizar parte das toxinas ingeridas. No entanto, alguns metabolitos tóxicos, que escapam da degradação ruminal, podem ser excretados no leite, o que poderia causar um problema de saúde pública (EFSA, 2004; JOUANY; DIAZ, 2005).

Segundo Kuilman et al. (1998) o gado leiteiro quando consome rações contendo aflatoxina (principalmente AFB₁) tem uma parte desta degradada pelos microrganismos do rúmen, formando como metabólito resultante o aflatoxicol (figura 6). A fração não degradada, restante, é absorvida por difusão passiva (FINK-GREEMMELS, 2008b) e metabolizada no fígado onde ocorre a biotransformação para AFM₁ (composto hidroxilado da AFB₁), sendo excretada no leite e na urina (SINNHUBER et al., 1970; OATLEY et al., 2000; MURPHY, 2006).

As micotoxinas suprimem o sistema imunológico e afetam o funcionamento normal, principalmente, de órgãos como rúmen, trato intestinal, fígado, rins, sistema reprodutivo e nervoso. Inicialmente, as micotoxinas como aflatoxinas e tricotecenos atuam sobre o sistema imune (número de macrófagos, linfócitos e eritrócitos) e reduzem a resposta dos animais as intoxicações (RODRIGUES, 2011). Fink-Gremmels (2008a) relatou que em níveis mais elevados estas toxinas afetam a função do rúmen (reduzem a concentração de microrganismo ruminal e diminuem a motilidade) e de outros órgãos como: intestino, fígado, rim, sistema reprodutivo e tecido neural, tendo como efeito: cetose, síndrome do fígado gorduroso e consumo reduzido de matéria seca.

O gado leiteiro que consome alimentos ou rações contaminadas com altos níveis de aflatoxinas (especialmente AFB₁) apresenta efeitos adversos denominados de aflatoxicose, que pode ser aguda ou crônica (CARVALHO, 1995; CHASE et al., 2013). Os primeiros indícios de toxicidade por aflatoxinas incluem redução no consumo de ração seguido de perda de peso ou taxa mais lenta de ganho. Além disso, geralmente há um declínio na eficiência alimentar, aumento da susceptibilidade ao estresse e baixo desempenho reprodutivo. A aflatoxicose crônica caracteriza-se por baixa performance, anorexia, secagem e descamação da pele do focinho, prolapso do reto, danos no fígado, níveis elevados de componentes do sangue, edemas

na cavidade abdominal e redução da produção de leite. Adicionalmente, podem ocorrer alterações histopatológicas no fígado que incluem perda de glicogênio das células hepáticas, degeneração gordurosa, proliferação fibroblástica e edema perivascular (RODRIGUES, 2011).

Para Galtier (1998) são observados sinais de degeneração renal, o qual está relacionado à excreção de metabólitos oriundos da detoxificação hepática. Para Colvin et al. (1984) e Crockroft (1995) a intoxicação por aflatoxinas em bovinos de leite caracteriza-se por causar lesão das células do fígado, síndrome do fígado gorduroso, baixa conversão alimentar e significativa redução da produção de leite. Segundo Choudhary et al. (1998) as aflatoxinas reduzem a produção de leite, afetam a função do sistema imunitário e o metabolismo do rúmen. Para Diekman e Green (1992) a diminuição da eficiência da alimentação no gado de leite está atribuída ao comprometimento da função ruminal, através da redução da digestão de celulose e de ácidos graxos voláteis. Na figura 7 é possível visualizar de maneira resumida os efeitos das aflatoxinas no gado de leite.

Figura 7. Efeitos da aflatoxina em gado de leite.

Fonte: Propriedade do Autor (2016).

2.7 Resíduos de aflatoxina M₁ em leite

A presença de AFM₁ em leite e produtos lácteos é uma preocupação global, uma vez que estes produtos são frequentemente consumidos, principalmente por um percentual da

sociedade considerada imunossuprimida, idosos e crianças (FALLAH et al., 2009; PRANDINI, 2009). Evidências da exposição humana à AFM₁ através do consumo de leite e derivados têm sido demonstrados por meio de pesquisas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). No Irã, Ghazani (2009) realizou uma pesquisa com 50 amostras de leite analisados pelo método ELISA, 100% estavam contaminadas por AFM₁, destas 62% estava com níveis acima de 0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na Turquia, Unusan (2006) encontrou valores elevados em 129 amostras de leite UHT, 58,1% estavam contaminadas e 3,2% destas estavam acima de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na Síria, Ghanem e Orfi (2009) encontraram uma concentração média de 0,492 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em 126 amostras, das quais 80% ultrapassaram o limite estabelecido pela Comunidade Européia. Çelik, Sarimehmetoglu e Küplülü (2005), na Turquia, realizaram análises para a detecção AFM₁ em leite pasteurizado e obtiveram um resultado de 88,2% das amostras com contaminação, com níveis variando entre 0,0052 e 0,1275 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na Coreia do Sul, Kim et al. (2000) analisaram leite pasteurizado, leite em pó e iogurte, obtendo incidências de 76, 75 e 83 %, respectivamente.

No Brasil, as pesquisas a respeito da incidência de AFM₁ em leite e derivados indicam que esta toxina é frequente nestes alimentos, entretanto de um modo geral, em níveis relativamente baixos. Oliveira et al. (2010) relata, por meio de estudo realizado no leite de propriedades de São Paulo, um nível de AFM₁ variando entre 0,010 a 0,645 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (média de 0,144 $\mu\text{g.L}^{-1}$). A frequência da detecção de AFM₁ no leite foi de 36,7%. Becker et al. (2010) através de estudo realizado com marcas de leite comercializadas nos municípios de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu-PR, observaram que das 20 amostras de leite analisadas, 70% (14) apresentaram contaminação por aflatoxina M₁; porém, somente 3 (15%) apresentaram resultados acima de 0,010 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Garrido et al. (2003) analisou 139 amostras de leite, das quais 20,9% ultrapassaram o limite estabelecido pela União Europeia (0,05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), com níveis variando de 0,05 a 0,24 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Prado et al. (2000) através da avaliação de AFM₁ em 75 amostras de queijo minas, relata uma concentração de AFM₁ entre 0,02 a 6,92 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em 88% das amostras analisadas. Oliveira et al. (2008) analisando leite cru, descreveram níveis de AFM₁ que variaram de 0,01 a 0,645 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Shundo et al. (2009) através de estudo em 125 amostras de leite em pó, pasteurizado e UHT relataram concentrações de AFM₁ variando de 0,01 a 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em 95% das amostras analisadas.

A presença de AFM₁ no leite e em produtos lácteos é preocupante, pois é o alimento que demonstra maior potencial para a introdução de resíduos de aflatoxina na alimentação humana, podendo tornar-se um grave problema de saúde pública (GALVANO et al., 1996; PRANDINI, 2009). , Ademais, tratamentos térmicos como pasteurização e secagem não são

eficazes para causar redução de AFM₁, uma vez que esta toxina é termorresistente, e a sua distribuição no leite não é homogênea (GALVANO et al., 1996; PRANDINI, 2009). Mundialmente, em especial na União Europeia, a legislação é rigorosa em relação às concentrações máximas permitidas de contaminação com AFB₁ em alimentos para vacas leiteiras, e a concentração de AFM₁ no leite e produtos lácteos destinados ao consumo humano (GIMENO; MARTINS, 2006).

Além dos riscos à saúde, as aflatoxinas podem ocasionar um sério problema econômico, uma vez que os danos causados por elas estão relacionados a uma menor eficiência na produção agropecuária e industrial, como exemplo o menor rendimento e a perda de qualidade dos produtos contaminados (BATA; LASZITITY, 1999). Para os produtores de leite as perdas econômicas causadas pelos efeitos tóxicos das aflatoxinas podem ser menos óbvias e mais difíceis de serem quantificadas.

Devido aos riscos que as aflatoxinas causam a saúde humana e animal alguns programas de monitoramento de toxinas em alimentos e matérias-primas, bem como ações de regulamentação, têm sido criados em diversos países (CHU, 1991). Segundo Hans Van e Jonker (2004) as legislações para aflatoxina estão cada vez mais diversificadas e detalhadas, incluindo métodos de amostragem e metodologia analítica. De acordo com (ABBAS, 2005) nos países que possuem legislação específica para aflatoxinas os limites máximos tolerados para aflatoxina total (somas das aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂) variam entre 1 e 35 µg/ kg para alimentos e variam entre 0 e 50 µg/ Kg para rações. No caso de leite, AFM₁, os limites máximos tolerados, em todo o mundo, estão entre 0,05 e 0,5 µg/ kg.

No Brasil só há legislação que estabeleça limites máximos para aflatoxinas (BRASIL, 1996). A Resolução RDC 07/2011, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu limites máximos de AFM₁ admissíveis no leite fluído (0,5 µg/ kg), leite em pó (5,0 µg/ kg), queijo (2,5 µg/ kg) e aflatoxina total em amendoim e milho (20 µg/ kg) (BRASIL, 2011).

3. DESCONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS POR FONTES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

O receio com os impactos negativos das aflatoxinas tanto sobre a saúde, quanto sobre a economia levou à investigação de estratégias para prevenir sua formação em alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir sua biodisponibilidade destas toxinas em produtos contaminados (HERNANDEZ-MENDOZA; GARCIA; STEELE, 2009; CORASSIN et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014). Para evitar a contaminação por aflatoxinas, melhorias das práticas agrícolas são empregadas (realização de rotação de culturas, uso de fertilizantes no solo, escolha da data de plantio entre outros), agentes antifúngicos, engenharia genética (melhoramento genético e transgênicos) e técnicas de armazenamento (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001; PAYNE, 1999; MUNKVOLD, 2003; MIEDANER et al., 2006). Segundo Gratz, Mykkänen e El-Nemazi (2005) para redução de biodisponibilidade utiliza-se enteroadsorção, a qual é feita por meio da adição na dieta de compostos adsorventes inertes, agentes sequestrantes de micotoxinas, os quais evitam a adsorção da toxina no trato gastrointestinal dos animais. No entanto, segundo Hussein e Brasel (2001) este método tem uma aplicação limitada uma vez que os adsorventes usados podem alterar o valor nutricional absorvendo minerais e vitaminas.

Por último, para eliminar ou inativar, são utilizados métodos físicos, químicos e biológicos (BOVO et al., 2010). Os quais segundo Magan e Olsen (2006) devem possuir como características a completa inativação ou remoção da toxina, não produzir resíduos nos alimentos, destruir os esporos e as micelas de fungos, não alterar o valor nutritivo do alimento, ser de fácil utilização e possuir custo acessível.

Os métodos físicos de descontaminação de micotoxinas envolvem procedimentos como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes. Os métodos químicos utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas, como o uso de cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes antioxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio) ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia). No entanto, ambos os métodos possuem desvantagens, seja por não removerem de maneira eficiente, ou por apresentarem custos elevados (EL- NEMAZI et al., 1998). Já, os métodos biológicos, decorrem

da atuação de microrganismo, como por exemplo, leveduras, fungos filamentosos, bactérias entre outros, sobre as micotoxinas através de mecanismos como competição por nutrientes e espaço, interações e antibiose (FAZELI et al., 2009).

A utilização de microrganismos para degradar aflatoxinas é uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação destas toxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança (ALBERTS et al., 2006). Para Wu et al. (2009) os métodos de descontaminação biológicos vêm sendo bastante estudados, podendo tornar-se uma escolha muito promissora, desde que apresentem eficiência, especificidade, custo-benefício, e que sejam ambientalmente corretos. Dentre os diversos tipos de microrganismos que podem ser usados para a remoção de aflatoxinas do meio contaminado, as leveduras têm sido bastante estudadas e apresentam resultados promissores.

Para McKinney (2004) as leveduras são microrganismos não fotossintéticos com o núcleo separado e ciclo de vida complexo. São maiores que as bactérias, normalmente esféricas e se reproduzem por brotamento. Sua função 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, os quais são transformados principalmente em etanol, dióxido de carbono e biomassa quando em condições limitantes de oxigênio.

A SC é a levedura mais conhecida e de grande importância comercial, suas cepas são amplamente utilizadas na produção de bebidas alcóolicas e na indústria de panificação. Para Shetty e Jespersen (2006) a SC é um dos microrganismos mais eficaz para a ligação de AFB₁.

A capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* em remover AFB₁ tem sido demonstrada por meio de estudos *in vitro*. Shetty et al. (2007), analisaram 18 cepas de SC, e observaram que 3 cepas foram capazes de remover mais de 40 % da AFB₁ em solução tampão. Postula-se que dentro de um determinado gênero 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- NEMAZI et al., 2004).

A habilidade da SC em unir-se a aflatoxina do meio pode ser aumentada com alguns tratamentos físicos, químicos e enzimáticos. Shetty et al. (2007) observaram que o tratamento de células de SC com aquecimento a 60°C e a 120°C e com ácido clorídrico (2M) aumentaram a capacidade de remoção de AFB₁ do meio para 68,8%, 79,3% e 72,1%, respectivamente, contra 38,7% quando utilizado células viáveis da levedura isoladamente.

De acordo com Corassin et al. (2013), elevada eficiência ($> 90\%$) é alcançada na redução de AFM_1 em leite UHT tratado com *SC* em períodos relativamente curtos (30 e 60 min.) quando utilizado *SC* inativada por calor, sozinha ou em combinação com bactérias ácido lácticas. Para Bovo et al. (2010) além da viabilidade celular, outros fatores podem influenciar a capacidade de remoção de aflatoxinas pela *SC*, como a concentração bacteriana, especificidade da bactéria, temperatura de incubação, pH e adição de nutrientes.

4. METODOLOGIA

4.1 Micro-organismos: aquisição e meio de cultivo

Para a realização dos ensaios de remoção da AFB₁ em rações contaminadas, foram utilizadas quatro diferentes fontes de resíduo de fermentação alcoólica (levedura- de cana-de-açúcar seca e inativada, levedura autolisada, parede celular e co-produto de cervejaria parcialmente desidratado) contendo células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As fontes de resíduo de fermentação foram gentilmente doadas por duas usinas produtoras de etanol e uma cervejaria, localizadas na região de Araras e Pirassununga, estado de São Paulo.

As leveduras foram recebidas em pacotes de 5 quilogramas e 25 quilogramas na forma de pó, sendo armazenadas no laboratório a temperatura ambiente.

4.2 Preparo das diferentes fontes de *Saccharomyces cerevisiae* (SC)

4.2.1 Caracterização bromatológica das diferentes fontes de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*

Foi realizada a avaliação da composição centesimal da massa seca das quatro diferentes fontes de *Saccharomyces cerevisiae* segundo os Métodos Físico-Químicos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os resultados destas análises são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Caracterização das fontes de resíduo de fermentação alcoólica contendo células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Composição	LCSI^a	LA^b	PC^c	CCPD^d
Proteína Bruta (%MS¹)	37,6	35,0	35,3	40,8
Matéria Mineral (%MS)	8,1	7,0	7,2	6,8
Extrato Etéreo (%MS¹)	0,02	0,01	2,7	2,0
Fibra Bruta (%MS¹)	0,35	0,08	0,3	4,0
pH (mín)	4,5	5,0	5,0	6,5
Tiamina (B1) ppm	8,5	3,2	7,1	94,8

Riboflavina (B2) ppm	28,4	5,10	30,7	37,2
Piridoxina (B6) ppm	13,3	1,9	8,6	33,0
Colina (B7) ppm	1.205,3	1.320,2	603,2	4,930,2
Biotina (B8) ppm	2,12	0,4	4,1	4,8
Cobalamina (B12) ppm	0,003	0,002	0,006	0,005

^aLCSI – levedura de cana- de- açúcar seca e inativada; ^bLA – Levedura autolizada de cana- de-açúcar; ^cPC – Parede celular de cana- de-açúcar; ^dCCPD – Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ¹⁻ Matéria seca.

4.2.2 Esterilização das leveduras

Como as células de levedura inviabilizadas termicamente também apresentam a capacidade de remover AFB₁ do meio (CORASSIN et al., 2013), a biomassa de SC adquirida passou por esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos para posteriormente realizar-se a encapsulação.

A quantidade dada aos animais foi determinada com base no resultado obtido a partir da concentração de leveduras, realizada através de contagem em câmara de Neubauer. De acordo com os resultados obtidos por Shetty et al. (2007) para leveduras, foi adicionado para cada 5,0 µg de AFB₁ contida na ração, uma massa seca de SC contendo uma estimativa de 10¹⁰ células viáveis.

4.3 Ensaio de remoção de Aflatoxina B₁ *in vitro*

Foi utilizado padrão de AFB₁ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA), dissolvido em acetonitrila, o qual foi calibrado espectrofotometricamente através da técnica preconizada por Scott (1990) e diluído até a obtenção de uma solução estoque contendo aproximadamente 10,0 µg AFB₁/mL. Esta solução foi utilizada para o preparo de outra solução, denominada solução de trabalho, contendo cerca de 2,0 µg AFB₁/mL em solução tampão fosfato salina (TFS, pH 7,3), sendo a acetonitrila completamente evaporada através da injeção de gás nitrogênio e aquecimento em banho a 45°C antes da adição do TFS.

A realização do experimento foi conduzida com base no método utilizado por El-Nemazi et al. (1998). Uma quantidade de massa seca de *Saccharomyces cerevisiae* (de cada uma das quatro fontes avaliadas) contendo cerca de 1x 10¹⁰ células foi suspensa em 3,0 mL de solução TFS contendo a AFB₁ e incubada nos tempos de 05, 10, 20 e 30 minutos a 25°C. Após

o término do tempo de incubação, a solução contendo aflatoxina e os micro-organismos inviabilizados foi centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante obtido foi filtrado e analisado através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O experimento foi realizado em triplicata, sendo também incubados e analisados um controle positivo (AFB₁ em solução TFS) e controle negativo (somente SC).

4.3.1 Quantificação da AFB₁ em solução TFS através de CLAE

Para a quantificação da AFB₁ em solução TFS utilizando o sistema CLAE, não foi necessário nenhum procedimento de purificação do sobrenadante. As amostras foram injetadas diretamente no sistema CLAE (Shimadzu® – Tóquio, Japão) constituído de detector de fluorescência RF-10A XL (Shimadzu®), equipado com coluna 5 µm 4,6 x 150 mm (Phenomenex® ODS) e amostrador automático SIL-10AF (Shimadzu®), sendo que o sistema foi estabilizado por uma hora a um fluxo de 1 mL/min à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi uma solução de água, acetonitrila e metanol, na proporção de 60:20:20, com fluxo de 1 mL/ min. A detecção da excitação foi feita a um comprimento de onda de 360 nm e a emissão a 440 nm. O limite de quantificação utilizado foi 0,5 µg/ mL.

A quantificação do percentual de AFB₁ adsorvida foi efetuada através da equação 1.

$$A = \{ [B-C-D] / B \} * 100 \quad (1) \quad \text{[Equação 1]}$$

Em que,

A: percentual de AFB₁ adsorvida pela SC

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

C: área do pico cromatográfico da amostra (AFB₁ em solução TFS + SC)

D: área do pico cromatográfico do controle negativo (solução TFS + SC)

4.4 Ensaio *in vivo*

4.4.1 Produção de aflatoxina B₁

A produção de aflatoxina B₁ para a etapa *in vivo* do projeto foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (LMMA/FZEA/USP) de Pirassununga. A cepa de *Aspergillus parasiticus* (NRLL 2999) foi fornecida pela (USDA) e recebida pelo LMMA na forma de um pellet liofilizado acondicionado em uma ampola de vidro. Para reativação do fungo, o pellet foi mantido por um período de 24 horas em temperatura ambiente em um tubo contendo água peptonada previamente esterilizada. O procedimento utilizado para produção de aflatoxina B₁ foi o preconizado por Shotwell et al., (1966), utilizando-se a referida cepa de *A. parasiticus* cultivado em arroz. Para isto foi pesado 76 g de arroz em erlenmeyer de 500 mL, este arroz foi umedecido com 30 mL de água destilada, sendo deixado em repouso por 2 horas (figura 8). Após este período, os erlenmeyers com arroz foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Figura 8. Preparo do arroz para autoclavagem.

Fonte: Propriedade do Autor (2014).

Os grãos de arroz autoclavados foram inoculados com o *A. parasiticus* diretamente nos erlenmeyers (figura 9), logo foram deixados de repouso por 24 horas a 27°C, em ausência de

luz. Após, seguiram para a mesa agitadora (250 RPM, Tecnal TE-140), à temperatura ambiente, durante sete dias. Com o objetivo de parar o crescimento do fungo, os grãos de arroz foram umedecidos com 40 mL de clorofórmio, no próprio erlenmeyer, por um período de 24 horas. Depois disto o arroz foi transferido para bandejas (para facilitar a secagem) e colocado na estufa a 40 °C por 12h. O material de cultura foi seco, moído, homogeneizado, acondicionando hermeticamente em baldes com tampas de polietileno de alta densidade e armazenado a -20°C.

Figura 9. Inoculação do arroz com *A. parasiticus*.

Fonte: Propriedade do Autor (2014).

Os níveis de aflatoxinas foram confirmados nas amostras do material de cultura por análise em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se detector de fluorescência. A fim de possibilitar a quantificação de AFB₁, foi necessária a construção de uma curva no sistema CLAE. A curva padrão foi construída a partir da injeção de padrões de AFB₁ em quatro concentrações, sendo elas 10 ng/mL (padrão-1); 40 ng/mL (padrão-2); 160 ng/mL (padrão-3) e 640 ng/mL (padrão-4). A curva resultante de AFB₁ está demonstrada na Figura 10, obtendo um $r = 0,998$ para AFB₁. O cromatograma com os traços das quatro concentrações de padrão de AFB₁ está apresentado na Figura 11.

Figura 10. Curva de calibração de AFB₁.

Fonte: Propriedade do Autor (2014).

Figura 11. Cromatograma dos padrões de AFB₁.

Fonte: Propriedade do Autor (2014).

Para verificação do perfil de produção de aflatoxinas da cepa de *A. parasiticus*, foram amostrados 10 g após a devida homogeneização. A AFB₁ foi extraída em 100 mL de metanol a 70% em agitação a 240 RPM por 40 minutos. O eluato foi filtrado e separado 100 µL em vial, em duplicata, e adicionados 900 µL de metanol: água (1:1 v/v). Foram injetados 20 µL do eluato contido no vial, com fluxo de 1 mL/min e pressão média de 155 psi no sistema CLAE em eluição isocrática. Foi utilizada coluna 5µm C₁₈ 4,6 x 150 mm (Phenomenex® ODS) e uma pré-coluna 5µm 4 x 10 mm (Shim-pack) previamente condicionadas e estabilizadas com a fase móvel (água:acetonitrila:metanol 60:20:20) por uma hora a um fluxo de 1 mL/min em temperatura ambiente. O protocolo utilizado para produção de AFB₁ apresentou bons resultados, expressados pela alta concentração de AFB₁ encontrada por grama de arroz contaminado moído, concentração média foi de 58,3 mg AFB₁/kg de arroz contaminado.

4.4.2 Animais, instalações e manejo

Foram selecionadas 20 vacas multíparas da raça Holandesa em estágio médio de lactação (média de 195 dias em lactação), provenientes do rebanho da Universidade de São Paulo, Pirassununga. As análises dos dados de produção (média de produção na lactação e dias de lactação) e produtivos e dos componentes do leite (sólidos totais, gordura, proteína total e contagem de células somáticas) foram realizados para determinar a homogeneidade das vacas selecionadas.

As vacas foram confinadas em um galpão do tipo “free-stalls” do Setor de Bovinocultura Leiteira do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/ SP.

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, em equipamento de ordenha informatizado. Os animais intoxicados com aflatoxina tiveram seu leite recolhido separadamente para que não contaminasse completamente o sistema de ordenha. As produções diárias de leite de cada vaca foram medidas e registradas. A avaliação do escore de condição corporal foi realizada no momento da entrada dos animais e ao final do período experimental.

Todo o leite obtido da ordenha das vacas que ingeriram AFB₁ foi adicionado de hidróxido de sódio (NaOH) e posteriormente descartado.

4.4.3 Delineamento experimental

Foi utilizado um desenho experimental fatorial inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 2, em duplicatas (animais), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Delineamento experimental do ensaio *in vivo*.

Tratamento	Fonte	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aflatoxina B ₁
1	Controle negativo	0	0 mg/kg
2	Controle positivo	0	480µg
3	LCSI ^a	2 x 10 ^{10e}	0 mg/kg
4	LCSI ^a	2 x 10 ^{10e}	480µg
5	LA ^b	2 x 10 ^{10e}	0 mg/kg
6	LA ^b	2 x 10 ^{10e}	480µg
7	PC ^c	2 x 10 ^{10e}	0 mg/kg
8	PC ^c	2 x 10 ^{10e}	480µg
9	CCPD ^d	2 x 10 ^{10e}	0 mg/kg

10	CCPD ^d	2 x 10 ^{10e}	480µg
^a LCSI – levedura de cana- de- açúcar seca e inativada; ^b LA – Levedura autolizada de cana-de-açúcar; ^c PC – Parede celular de cana- de-açúcar; ^d CCPD – Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ^e Proporção de incorporação de SC: 10 ¹⁰ células para cada 1,0 µg de AFB ₁ .			

4.4.4 Dietas Experimentais

Durante os dez dias do período experimental os animais foram alimentados três vezes ao dia, sendo o primeiro fornecimento às 6 horas e o último às 18 horas. Os animais foram alimentados junto com os demais animais do setor de bovinocultura de leite. A dieta foi do tipo, total e única para todos os animais, a composição bromatológica é apresentada na Tabela 4. Nenhum dos grupos experimentais, precisou de suplementações.

A AFB₁ utilizada no experimento foi produzida no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da FZEA/USP, como citado no item 4.4.1.

Tabela 4. Composição bromatológica média da dieta, durante o período experimental.

Nutriente	Porcentagem
Matéria seca (%)	50,00
Proteína bruta (% MS¹)	16,00
Extrato etéreo (% MS¹)	4,00
Fibra em detergente ácido (% MS¹)	21,50
Fibra em detergente neutro (% MS¹)	36,50
Carboidratos não estruturais (% MS¹)	38,00
Matéria mineral (% Ms¹)	6,00

¹- Matéria seca

A aflatoxina administrada aos animais foi encapsulada (figura 12) para facilitar a veiculação aos mesmos, diminuir o risco de contaminação do ambiente e dos tratadores. Do primeiro ao terceiro dia de experimento os animais receberam somente aflatoxina, período de intoxicação. Do quarto ao sétimo dia do período experimental as vacas receberam aflatoxina junto com uma fonte de SC. Do oitavo ao décimo dia as vacas receberam somente fonte de SC, período de detoxificação.

A aflatoxina foi administrada as vacas de maneira fracionada, estas recebiam 2 cápsulas contendo 120 µg de AFB₁ no período matutino e 2 no período vespertino, sempre após as ordenhas, totalizando 480 µg de AFB₁. Este valor foi estipulado a partir da taxa de

metabolização dos animais oriundos de trabalhos publicados previamente, na qual variou entre 6 e 15 % da toxina ingerida.

Apesar de a toxina não ter sido misturada a ração, a determinação de aflatoxinas na ração foi realizada, o procedimento utilizado para esta determinação foi o preconizado pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Vicam) e a determinação foi feita através de CLAE, conforme Oliveira et al. (2008).

Os animais do experimento foram identificados com tornozeleiras na cor verde e vermelha, não contaminadas e contaminadas respectivamente. Além disso, foram colocados avisos alertando sobre a obrigatoriedade do uso de equipamentos de proteção individual (botas plásticas, aventais, toucas, luvas e máscaras de proteção).

Figura 12. Cápsula de toxina utilizada para intoxicação dos animais.

Fonte: Propriedade do Autor (2014).

4.4.5 Determinação de aflatoxinas na ração

A determinação de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) na ração, constituída de volumoso (silagem) e concentrado, foi efetuada mediante a utilização dos procedimentos preconizados pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Aflatest, Vicam) e sua determinação através do sistema de CLAE acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo com interface de electrospray (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com sistema de bomba binária e um injetor automático com interface com o espectrômetro de massa Xevo TQ-S equipado com uma fonte de ionização por electrospray Z-ortogonal (Waters Corporation, Milford, MA, EUA).

No laboratório, a amostra de ração (2,5 kg) foi previamente triturada e homogeneizada em moinho. Em seguida, a amostra analítica (50 g) foi colocada em um blender, juntamente com 5 g de cloreto de sódio (NaCl) e 100 mL de metanol-água (80+20). Logo, o extrato foi agitado durante 15 minutos a 4000 rpm, após isto, foi filtrado em papel de filtro, recolhendo-se 10 mL em um Becker. Foi adicionado ao extrato 40 mL de água ultra- purificada (Milli-Q, Millipore), após a mistura completamente homogeneizada foi feita a filtração (filtro de microfibra, 1,5 μ m, Millipore), foi recolhido 10 mL para a passagem através da coluna de imunoafinidade. Esta coluna foi adaptada ao manifold conectado a um sistema de vácuo (fluxo de 1 – 2 gotas/seg.). Após a eluição da amostra a coluna foi lavada por meio da passagem de 10 mL de água Milli-Q. Em seguida, foi passado 1 mL de metanol (grau CLAE), de maneira a eluir as aflatoxinas. O eluato foi recolhido em frasco âmbar, logo foi diluído com 1 mL de água ultra- purificada, para formar um solução de metanol-água (50+50), semelhante a fase móvel utilizada na corrida cromatográfica.

Os padrões de aflatoxina (SIGMA-ALDRICH) foram dissolvidos em solução de benzeno-acetonitrila (98+2) ou metanol, conforme o tipo, a solução com padrão foi calibrada espectrofotometricamente ($\lambda = 300\text{-}350$ nm) através da técnica preconizada por Scott (1990), para obtenção da concentração exata das toxinas. Após a calibração foi transferido 200 μ L de cada padrão para um frasco, evaporou-se até a secura, sob fluxo de nitrogênio, e logo foi ressuspenso em metanol grau CLAE, obtendo-se um solução de trabalho contendo aproximadamente 1,0 μ g AF/ mL. Estas soluções foram utilizadas para o preparo dos padrões da curva de calibração.

Para a separação cromatográfica foi utilizada coluna fenil-hexil (2,0 x 150 mm, 3 μ m) termostatizada a 50 °C. A fase móvel utilizada foi: (A) 0,1 % de ácido fórmico em água (v/v) e (B) 0,1 % ácido fórmico em acetonitrila (v/v). A composição inicial da fase móvel foi 30% do solvente B, mantendo-se por 10 minutos, sendo alterada para 95% de B e mantida por mais 1, 5 minutos, retrocedendo para 30% de B por mais 4 minutos. Os analitos foram detectados no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), sendo as transições observadas em: m/z 331 $\rightarrow$ 313 (G₂), 315 $\rightarrow$ 287 (B₂), 329 $\rightarrow$ 243 (G₁) e 313 $\rightarrow$ 285 (B₁). O limite de quantificação utilizado foi de 0,5 μ g.kg⁻¹.

4.5 Variáveis analisadas no experimento

4.5.1 Análise das amostras de leite

De acordo com as recomendações do *International Dairy Federation* (IDF) Standard (1996), diariamente foram coletadas (1^a e 2^a ordenhas) amostras de 500 mL de cada uma das vacas, diretamente do medidor, sendo transferida posteriormente para o frasco de coleta, formando uma única amostra composta diária por animal. As amostras diárias de cada uma das vacas foram submetidas às análises de composição e determinação de AFM₁.

Uma quantidade de 25 mL de leite, foi retirado da amostra composta diária de cada animal, para a realização das análises de composição de leite (concentrações de gordura e proteínas) através do equipamento Lactoscan Milk Analyzer (Milkotronic), metodologia de infravermelho.

A metodologia de infravermelho baseia-se na capacidade de absorção de radiação, em diferentes comprimentos de onda, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como: gordura e proteína, de acordo com a quantidade de energia absorvida. Esta metodologia estabelece que a absorbância da luz por uma solução, numa determinada espessura, é diretamente proporcional à concentração de um componente (BIGGS; JOHNSON; SJAUNJA, 1987).

A produção de leite, de cada animal, foi mensurada diariamente por meio do sistema de ordenha mecanizada. No caso dos animais que receberam suplementação com AFB₁ a produção foi mensurada por meio do sistema de ordenha balde ao pé.

A determinação de AFM₁ nas amostras de leite foi efetuada mediante a utilização dos procedimentos preconizados por Tuinstra, Ross e Van Trip (1993), com adaptações propostas pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Aflatest, Vicam) e determinação através de CLAE acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com sistema de bomba binária e um injetor automático com interface com o espectrômetro de massa Xevo TQ-S equipado com uma fonte de ionização por electrospray Z-ortogonal (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Conforme descrito abaixo:

A amostra analítica (25 mL) foi previamente aquecida a 37°C e submetida à centrifugação (1.250 x g) durante 15 min., logo, foi filtrada (filtro de microfibras 1,5 µm, Millipore) e o sobrenadante passado através da coluna de imunoafinidade para a retirada de impurezas contidas no mesmo. A coluna de imunoafinidade foi adaptada a uma seringa e acoplada a um *manifold*, que por sua vez estava conectado a uma bomba de vácuo (Modelo 131 tipo 2v, Primatec- Itu, SP, Brasil). Primeiramente passou-se pela coluna 20 mL do sobrenadante

a ser analisada a um fluxo de 2-3 mL/ min. Em seguida, lavou-se a coluna através da passagem de 20 mL de uma solução de água deionizada- metanol (9:1) e elui-se a toxina (AFM₁) passando 1 mL de metanol (grau CLAE). O eleuato foi recolhido em frasco âmbar e diluído com água ultra- purificada até formar uma solução metanol-água (7+3), semelhante a fase móvel utilizada na corrida cromatográfica (Figura 13).

O padrão de AFM₁ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) foi dissolvido em solução de benzeno-acetonitrila (9+1), logo, foi calibrado espectrofotometricamente ($\lambda = 350$ nm) através da técnica preconizada por Scott (1990), obtendo-se a concentração exata de AFM₁. Após a calibração foram transferidos 200 μ L do padrão para um frasco, evaporou-se até a secura sob fluxo de nitrogênio e ressuspendeu- se em volume conveniente de metanol grau CLAE, de maneira a obter uma solução de trabalho contendo 0,1 μ g AFM₁/mL. Esta solução foi utilizada no preparo dos padrões da curva de calibração (concentrações de 0,5 ng/mL, 1,0 ng/mL, 5,0 ng/mL e 10 ng/mL).

Figura 13. Processo de eluição da AFM₁ em coluna de imunoafinidade.

Fonte: Propriedade do Autor (2016).

Para a separação cromatográfica foi utilizada coluna fenil-hexil 2,0 x 150 mm, 3 μ m termostatizada a 50°C. A composição da fase móvel foi: (A) 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) e (B) 0,1% ácido fórmico em acetonitrila (v/v). A composição inicial da fase móvel foi 30% de solvente B sendo mantida por 10 min, logo, alterada para 95% de B e mantida por 1,5 min, retornando então para 30% de B por 4 min. O analito foi detectado no modo MRM, sendo

a transição observada em: m/z 329 $\rightarrow$ 273 (M_1). O limite de quantificação utilizado foi 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

4.5.2 Bioquímica Sérica

Nos dias 1, 5 e 10 do período experimental, foram colhidas amostras de sangue venoso por punção de veia coccígea. Este sangue foi analisado segundo metodologia descrita por Kaneko, Harvey e Bruss (1997) para determinação de proteína total, dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e proteína total (PT).

4.5.3 Análise de escore corporal

A avaliação do escore de condição corporal (ECC) foi feita segundo a metodologia visual descrita por Wildman et al., (1982), no momento da entrada dos animais no estudo e ao final do período experimental.

4.6 Análise dos Resultados

Os resultados do experimento foi submetido a 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, foi empregado o teste de *Least Significant Difference* (LSD).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Remoção de AFB₁ *in vitro*

Conforme explicado no item 4.3, foram obtidas as porcentagens de remoção de AFB₁ quando utilizado as fontes de SC, através das análises por CLAE, à temperatura de 25°C nos tempos de contato de 05, 10, 20 e 30 minutos. Os resultados encontrados para os ensaios de remoção estão descritos na tabela 5.

Na tabela 5 pode-se observar que baixos níveis de AFB₁ foram encontrados em solução TFS, enriquecida com 0,5 µg AFB₁ mL⁻¹, depois do tratamento com as células de levedura de cana-de-açúcar seca e inativada (LCSI) (1g, 10¹⁰ células mL⁻¹), com valores variando de não detectado (LOD: 0,01 µg mL⁻¹) a 0,035 ± 0,02 µg mL⁻¹. A segunda melhor resposta foi alcançada usando levedura autolizada de cana-de-açúcar (LA), com AFB₁ remanescente na solução TFS variando nos níveis de 0,025 ± 0,006 a 0,096 ± 0,005 µg mL⁻¹. Os tratamentos com parede celular de cana-de-açúcar (PC) e o co-produto de cervejaria parcialmente desidratado (CCPD) tiveram os níveis de AFB₁ na solução TFS variando nos níveis de 0,102 ± 0,011 a 0,217 ± 0,009 µg mL⁻¹, sendo considerados menos eficientes quando comparados com os dois supracitados.

Tabela 5. Níveis de aflatoxina B₁ em solução tampão fosfato salina (TFS) após adsorção de produtos à base de *Saccharomyces cerevisiae* – em diferentes tempos de contato.

AFB ₁ adicionada a TFS (µg mL ⁻¹)	LCSI	LA	PC	CCPD	Tempo de contato (min.)	AFB ₁ remanescente na TFS (µg mL ⁻¹)
	(g mL ⁻¹) ^a					
0,5	1,0	0	0	0	5	ND
0,5	1,0	0	0	0	10	0,021±0,003
0,5	1,0	0	0	0	20	0,022±0,005
0,5	1,0	0	0	0	30	0,035±0,002
0,5	0	1,0	0	0	5	0,046±0,008
0,5	0	1,0	0	0	10	0,025±0,006
0,5	0	1,0	0	0	20	0,034±0,003
0,5	0	1,0	0	0	30	0,096±0,005
0,5	0	0	1,0	0	5	0,199±0,011
0,5	0	0	1,0	0	10	0,217±0,009
0,5	0	0	1,0	0	20	0,164±0,004
0,5	0	0	1,0	0	30	0,139±0,009
0,5	0	0	0	1,0	5	0,190±0,010
0,5	0	0	0	1,0	10	0,110±0,013
0,5	0	0	0	1,0	20	0,163±0,008
0,5	0	0	0	1,0	30	0,102±0,011

LCSI – levedura de cana- de- açúcar seca e inativada; LA – Levedura autolizada de cana- de-açúcar; PC – Parede celular de cana- de-açúcar; CCPD – Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ^a um grama de cada produto à base de *S. cerevisiae* contendo 1,0 x 10¹⁰ células por mL⁻¹; * valores expressos como média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

A parede celular de SC é uma estrutura em bicamada, composta por $\beta(1,3)$ D-glucano e $\beta(1,6)$ D-glucano. A maioria das proteínas da parede celular (manoproteínas) estão covalentemente ligadas a $\beta(1,3)$ D-glucano por meio de cadeias de $\beta(1,6)$ D-glucano. Essas proteínas da parede celular (manoproteínas) consistem em uma classe muito heterogênea de glicoproteínas. A fração de hidrato de carbono pode representar até 90% das manoproteínas, sendo maior parte destes hidratos (50%) de mananoligossacárideos. As ligações químicas que originam a parede celular formam uma estrutura bastante dinâmica, respondendo de maneira rápida a mudanças no ambiente e estresse (AGUILAR-USCANGA; FRANCOIS, 2003; VAN DEN EDE; KLIS, 1999; KLIS et al., 2002). Analisando a composição química e natureza física da parede celular de SC, é possível perceber que a superfície da célula apresenta inúmeros locais sobre a sua superfície para adsorção física de moléculas (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Embora, os mecanismos envolvidos na capacidade da SC em ligar aflatoxinas não estejam completamente elucidados, atualmente acredita-se que o efeito adsorvente está atribuído à glucomanana esterificada, a qual é extraída da parede celular da levedura (BUENO et al., 2006; PARLAT; OZACAN; OGUZ, 2001; RAJU; DEVEGOWDA, 2000).

Através deste estudo *in vitro* ficou evidente que a viabilidade celular não é pré-requisito para a remoção da AFB₁ por SC. Bueno et al. (2006) e Lee et al. (2003) concluíram que tanto células viáveis quanto células não viáveis de SC possuem a mesma capacidade de ligar AFB₁, o que é consistente com os dados de remoção de AFB₁ por produtos à base de SC em TFS reportados neste estudo.

Na tabela 6 estão apresentadas as porcentagens de AFB₁ adsorvidas na solução TFS pelos quatro produtos à base de SC após diferentes tempos de contato. Em comparação com os tratamentos PC e CCPD, a LCSi e a LA tiveram maior capacidade de se ligar a AFB₁ em solução TFS ($P < 0,05$), embora não tenham sido observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tempos de contato para qualquer produto à base de SC avaliados. Fica difícil a comparação dos resultados alcançados com o de outros estudos porque não há dados prévios de remoção de AFB₁ por produtos à base de SC provenientes de cana-de-açúcar. No entanto, os resultados obtidos neste estudo foram maiores que o percentual de remoção relatado por Joannis-Cassan et al. (2011) em um estudo com produtos à base de SC (parede celular e levedura de cerveja) em pH 3 à 37°C por um tempo de contato de 15 minutos. Estes autores observaram que a remoção de AFB₁ variou de 2,5% a 49,3%, dependendo da concentração de toxina no meio, e do produto à base de SC utilizado. Além disso, observaram uma diminuição na adsorção

de toxinas quando a concentração inicial destas aumentou, e concluíram que a adsorção não é um fenômeno linear.

Shety, Halde e Jespersen (2007) testaram uma cepa de SC em concentrações de AFB₁ que variaram de 1 a 20 µg/mL e obtiveram resultado que corroboram com os de Joannis-Cassan et al. (2011); eles observaram que na concentração de 1 µg/mL, 69,1% de AFB₁ foi removida, na concentração de 5 g/mL, a taxa de remoção foi de 41%; e na concentração de 20 µg/mL, houve remoção de 34%. Madrigal-Santillán et al. (2006) em um estudo de adsorção realizado com milho contaminado (150, 300, 450 e 800 µg/kg) observaram uma relação inversamente proporcional entre a concentração da toxina e o processo de adsorção. Isto é, quanto maior for a concentração de AFB₁ no meio, menor será a eficácia da remoção de AFB₁ pela SC (16% a 66% para 800 µg /kg de AFB₁ versus 40 a 93 % para 150 µg/ kg de AFB₁). Estes mesmos autores concluíram que o processo de adsorção não altera a estrutura molecular da micotoxina, e que a diminuição das taxas de adsorção de AFB₁ observadas quando a concentração de toxina aumentava pode, em maior possibilidade, tiver sido causada por saturação dos sítios de adsorção da célula de SC. Esse fato pode justificar a não linearidade do processo de adsorção relatados pelos autores supracitados.

Além disso, fatores como tempo de incubação, o pH, o método de purificação da biomassa, e métodos de análise empregados, também podem influenciar o processo de adsorção (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2006).

Tabela 6. Porcentagens de aflatoxina B₁ adsorvidas a produtos à base de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes tempos de contato em TFS.

Produtos à base de <i>S. cerevisiae</i>	% de AFB ₁ adsorvida (média ± desvio padrão)			
	5 min	10 min	20 min	30 min
LCSI	99,3±0,2 ^a	97,9±0,1 ^a	97,8±0,8 ^a	96,5±1,1 ^a
LA	95,3±1,4 ^a	97,5±1,1 ^a	96,6±1,6 ^a	90,4±1,3 ^a
PC	80,1±0,5 ^b	78,3±0,9 ^b	83,6±0,7 ^b	86,1±0,8 ^b
CCPD	81,0±0,3 ^b	86,0±0,8 ^b	83,7±0,2 ^b	87,8±0,7 ^b

^{a-b} médias seguidas por letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ($P < 0,05$); LCSI: levedura de cana- de- açúcar seca e inativada; LA: Levedura autolizada de cana- de-açúcar; Pc: Parede celular de cana- de-açúcar; CCPD: Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado.

As porcentagens de adsorção reportadas em estudos prévios com cepas de SC de diferentes fontes em solução TFS e pH variaram de 16,4% a 82% (OLIVEIRA et al., 2013). As elevadas porcentagens de adsorção de AFB₁ observadas neste estudo podem ser uma consequência do elevado número de células viáveis nos produtos à base de SC. As porcentagens

de AFB₁ adsorvidas pela LCSi e LA foram similares aos dados prévios descritos para células de SC na descontaminação de AFB₁ em ração, como reportado por Devegowda, Arvind, Morton (1996) e Santin et al. (2003).

A Parede celular de SC é composta principalmente de polissacarídeos (80-90%), e sua resistência mecânica é devido a uma camada interna composta de β -D-glucanas, as quais são formadas por uma rede complexa de β -(1,3) D-glucanas, ramificados como β -(1,6) D-glucanas que têm um baixo nível de polimerização (JOUANY; YANNIKOURIS; BERTIN, 2005). Esta camada inferior está firmemente ligada a membrana plasmática por cadeias lineares de quitina, a qual tem uma função importante na insolubilidade da estrutura global e no revestimento de β -D-glucanas ramificadas. Ambas as cadeias de quitina e β -D-glucanas afetam a plasticidade da parede celular. A camada que envolve a parede celular da levedura é formada por manoproteínas, as quais têm um papel importante nas trocas com o ambiente externo. Toda esta estrutura é altamente dinâmica e podem variar de acordo com a linhagem da levedura, a fase do ciclo celular, e as condições de cultura, como pH, temperatura, oxigenação, concentração e natureza da fonte de carbono (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA, CORASSIN, 2014).

Assim, estas diferenças na composição da parede celular entre as diferentes linhagens de levedura podem ser relacionadas com variações na capacidade dos produtos à base de SC de adsorverem a AFB₁ neste estudo.

5.2 Ensaio *in vivo*

5.2.1 Determinação de aflatoxina na ração

Como já dito anteriormente no item 2.6.1, a ração animal é naturalmente contaminada, simultaneamente, por vários fungos, os quais são capazes de produzir diversas toxinas (ALONSO et al., 2013). Applebaum et al. (1982) ressaltaram que os alimentos como semente de algodão, farelo de algodão e milho, normalmente utilizados na alimentação de vacas leiteiras, são susceptíveis a contaminação por aflatoxinas. De acordo com Fielder, Schutz e Geh (2001) e Bruerton (2001) é comum a presença de fungos em alimentos armazenados ou ensilados. Whitlow, Hagler Jr. e Diaz (2010) relataram que o processo de fermentação de silagem e de

alimentos contaminados não destrói micotoxinas e, em alguns casos, pode levar à concentração das toxinas, como exemplos em grãos de milho.

As dietas apresentaram valores médios de contaminação por aflatoxinas compatíveis com o limite máximo permitido pela legislação brasileira (aflatoxinas totais máximo de 50 µg/kg). Neste contexto, não foram observadas diferenças significativas em relação aos valores de aflatoxinas ($P > 0,05$; Tabela 7), entre as amostras de ração coletadas em diferentes dias do período experimental, 1, 5 e 10. Os resultados encontrados foram diferentes dos relatados por outros autores. Sabino et al. (1988) realizaram um estudo a respeito da análise de AFB₁ em 308 amostras de rações coletadas em diferentes estados do país, entre os anos de 1980 a 1987. Estes autores relataram a presença de AF em 10,39% das amostras de rações analisadas. Purchio et al (1988) avaliaram a presença de AFB₁ e AFG₁ em 170 amostras de rações destinadas ao gado leiteiro, oriundas de Pelotas (RS) e Vale do Paraíba (SP). Essas toxinas foram encontradas em 10% das amostras de rações analisadas, em concentrações variáveis de 40 a 200 e 10 a 75 µg/kg, respectivamente para AFB₁ e AFG₁.

Corrêa et al. (1997) avaliaram a contaminação por aflatoxinas em rações destinadas ao gado leiteiro no Estado de São Paulo, e observaram que as AFB₁ e AFB₂ foram detectadas em 14,6% das 96 amostras de rações analisadas, em níveis variáveis de 11,5 a 287 µg/kg e 19 a 40µg/kg, respectivamente. Santos (2004) também avaliou a ocorrência destas toxinas em cevada utilizada na alimentação de bovinos leiteiros e verificou que 33,75% das amostras analisadas foram positivas, embora com baixos níveis de contaminação, variáveis de 1 a 3 µg/kg.

Bernardes, Nussio e Do Amaral (2012), relataram uma incidência de AFB₁ de 8,3% (3 das 36 amostras analisadas) em amostras de silagem de milho. Sassahara, Yanaka e Pontes Netto (2003), relataram uma contaminação por aflatoxina em ração comercial, na região norte do Estado do Paraná, superior a relatada por Bernardes, Nussio e Do Amaral (2012), de 20% (17 amostras das 85 analisadas).

Para Sassahara, Yanaka e Pontes Netto (2003) o preparo de rações nas propriedades pode aumentar o risco de intoxicação dos animais, uma vez que são utilizados grãos de diferentes procedências e sem garantia de controle dos níveis de micotoxinas. Além disso, outro fator que pode contribuir para o aumento da contaminação é a presença de roedores nos galpões em que as rações são armazenadas. A violação das embalagens pelos roedores facilita

o aumento de umidade, além do fato desses animais atuarem como carreadores dos fungos para o interior da embalagem.

Tabela 7. Valores médios da concentração de aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$) nas rações coletadas nos dias 1, 5 e 10 do período experimental¹.

Amostras	AFB₁	AFB₂	AFG₁	AFG₂
Dieta total dia 1	0,20 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,08	0,02 $\pm$ 0,01
Dieta total dia 5	0,21 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,01
Dieta total dia 10	0,22 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,01

¹ Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

5.2.2 Análise de Leite

5.2.2.1 Composição e Produção de Leite

Os valores médios das porcentagens dos componentes do leite gordura e proteína (tabela 8) encontrados foram compatíveis com a dieta fornecida aos animais, e estavam dentro das exigências da legislação brasileira em relação a composição do leite cru (BRASIL, 2006). Não foram determinadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as amostras de leite coletadas para as variáveis: gordura e proteína nos diferentes dias do período experimental e nem entre os diferentes tratamentos aos quais os animais foram submetidos. Desta maneira pode-se afirmar que nas condições deste ensaio, não houve efeito da AFB₁ e das diferentes biomassas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a composição do leite das vacas durante o período experimental.

De acordo com Barbirolli et al. (2007), as aflatoxinas podem ligar-se à algumas frações de proteína do leite, mas a redução da concentração de proteína do leite é, provavelmente, mais relacionada com o fato das aflatoxinas inibirem diretamente a síntese de proteínas (GARVICAN; CAJONE; RESS, 1973). Corroborando com este estudo, Barbirolli et al. (2007) e Kutz et al. (2009) relataram que as concentrações de proteína e gordura do leite não foram afetadas quando vacas leiteiras foram alimentadas AFB₁ adicionada a ração.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da composição do leite (%) durante os 10 dias do período experimental¹.

Tratamento			Dias de tratamento									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem aflatoxina	PC ^c	G ²	4,06 ± 0,09	3,67± 0,04	3,99± 0,32	4,94± 0,47	3,85± 0,16	3,71± 0,02	3,80± 0,14	3,57± 0,62	4,02± 0,40	4,23± 0,25
		P ³	3,08± 0,20	2,81± 0,18	2,97± 0,05	3,00± 0,05	2,92± 0,10	2,89± 0,06	2,89± 0,03	2,86± 0,02	2,96± 0,02	2,92± 0,03
	LA ^b	G ²	5,29 ± 0,08	4,58± 0,10	4,71± 0,12	3,23± 0,54	3,16± 0,57	3,85± 0,99	4,69± 0,30	2,84± 0,24	4,11± 0,08	4,98± 0,31
		P ³	2,89±0,08	2,83±0,00	2,82±0,02	2,79±0,05	2,75±0,01	2,67±0,14	2,82±0,02	2,75±0,04	2,79±0,04	2,81±0,00
	LCSI ^a	G ²	3,84± 0,52	4,69± 0,19	4,54± 0,20	4,29± 0,52	2,05± 0,83	2,44± 0,97	2,17± 0,70	2,98± 0,81	2,98± 0,81	2,51± 1,66
		P ³	3,03±0,13	3,01±0,14	3,48±0,39	2,97±0,13	2,88±0,11	2,91±0,04	2,93±0,05	2,85±0,02	2,80±0,02	2,82±0,02
	CCPD ^d	G ²	4,55± 0,21	4,40± 0,30	4,50± 0,21	4,05± 1,36	1,49± 0,57	3,49± 1,09	3,39± 0,59	4,23± 0,10	4,23± 0,10	1,30± 0,15
		P ³	3,03±0,02	2,94±0,04	2,93±0,05	2,84±0,11	2,85±0,05	2,91±0,05	2,90±0,04	2,80±0,07	2,80±0,07	2,86±0,12
	CN ^e	G ²	4,39± 1,05	4,14± 0,28	3,84± 0,04	4,64± 0,17	2,66± 1,06	2,87± 1,08	3,92± 0,91	3,54± 0,57	4,13± 0,02	3,30± 1,46
		P ³	3,01±0,01	3,07±0,03	3,03±0,04	3,08±0,03	2,99±0,10	2,87±0,06	2,96±0,02	2,94±0,06	2,98±0,10	3,02±0,08
Com aflatoxina	PC ^c	G ²	3,72± 1,11	3,06± 0,79	4,13± 1,24	4,07± 1,13	2,84± 0,42	2,83± 0,41	3,77± 0,75	2,91± 0,24	4,09± 0,52	4,12± 0,92
		P ³	2,80±0,04	2,95±0,09	3,10±0,24	3,07±0,25	3,05±0,23	3,05±0,23	3,07±0,23	3,05±0,26	2,98±0,29	2,88±0,13
	LA ^b	G ²	4,63± 1,19	4,02± 0,21	3,88± 0,13	4,23± 0,63	3,82± 1,07	3,43± 0,46	3,79± 0,01	3,57± 0,64	3,50± 0,37	3,74± 0,46
		P ³	2,76±0,00	2,99±0,22	3,63±0,82	2,86±0,08	2,87±0,05	2,87±0,05	2,90±0,09	2,93±0,03	2,75±0,18	2,81±0,05
	LCSI ^a	G ²	4,52± 0,39	4,58± 0,51	4,24± 0,55	5,03± 0,17	1,29± 0,05	3,87± 1,20	3,22± 0,205	4,27± 0,11	4,27± 0,11	1,16± 0,18
		P ³	3,10±0,29	3,12±0,26	3,09±0,26	3,05±0,27	3,02±0,28	3,19±0,28	2,99±0,28	2,90±0,23	2,90±0,23	2,84±0,29
	CCPD ^d	G ²	3,45± 0,34	2,81± 0,43	3,64± 0,44	3,28± 0,34	7,19± 2,23	4,51± 3,00	2,38± 0,07	4,41± 0,85	4,41± 0,85	1,31± 0,43
		P ³	2,98±0,00	2,98±0,04	2,98±0,08	2,91±0,09	2,93±0,03	2,87±0,03	2,88±0,04	2,82±0,04	2,82±0,00	2,82±0,00
	CP ^f	G ²	4,14± 1,07	3,21± 0,22	3,10± 0,11	3,61± 0,01	2,03± 0,98	3,04± 1,88	3,32± 0,60	3,22± 0,97	3,58± 1,33	2,88± 1,57
		P ³	2,85±0,05	2,94±0,04	2,94±0,02	2,96±0,03	2,95±0,01	2,95±0,05	2,97±0,06	2,84±0,14	2,82±0,12	2,89±0,05

¹ Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em duplicata; ² Gordura; ³ Proteína; ^a LCSI - Levedura de cana-de-açúcar seca e inativada; ^b LA- Levedura autolizada; ^c PC - Parede celular; ^d CCPD - Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ^e CN- Controle Negativo; ^f CP- Controle Positivo.

Os valores médios de produção de leite foram compatíveis com a dieta ofertada e genética dos animais. Como pode ser observado na tabela 9 não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a produção de leite nos diferentes dias do período experimental, entre os grupos com AFB₁ (480 µg/ dia) e sem AFB₁ e entre as diferentes fontes de SC. Pode-se afirmar que não houve influência da AFB₁ e das diferentes fontes SC na produção de leite durante o período experimental. Similar ao presente estudo, Queiroz et al. (2012) descreveram que não houve efeito do tratamento utilizado com AFB₁ sobre o consumo de matéria seca e produção de leite. Stroud (2006) não relataram mudanças na produção de leite após à alimentação com 170 µg de AFB₁/ kg de ração durante 11 dias de estudo, entretanto a toxina diminui a ingestão de matéria seca em 1,5 kg de matéria seca/dia em comparação com o consumo de matéria seca de vacas não suplementadas com AFB₁. Kutz et al. (2009) em um estudo com 24 vacas em estágio médio de lactação, com consumo diário de 2500 µg de AFB₁, relaram que a produção de leite não foi afetada pela dieta experimental fornecida.

Diferente do presente estudo, Gonzalez et al. (2004) relataram que uma concentração de 76,4 µg de AF por kg de ração (43,5 µg de AFB₁) foi suficiente para reduzir a produção média de leite de 14 para 11 litros/dia, porém em um período bem mais extenso de tratamento, 6 meses. Veldman et al. (1992) relataram uma significativa redução na produção de leite ao realizarem um estudo *in vivo* com 10 vacas holandesas fistuladas tratadas diariamente com 13 mg de AFB₁ via orifício ruminal por 7 dias.

A produção e composição dos animais, provavelmente, não foi alterada significativamente devido à dose utilizada para intoxicar os animais não ser alta (480 µg de AFB₁/dia) quando comparada a de outros estudos, e também devido ao período experimental (10 dias) não ser suficiente para causar alterações significativas.

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão da produção de leite (kg/dia) nos 10 dias do período experimental¹.

Tratamentos		Dias de tratamento									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem aflatoxina	PC ^c	21,2±4,70	21,8±3,75	20,9±3,55	21,3±3,55	17,0±5,90	21,9±3,90	21,2±2,50	20,5±2,10	19,4±4,03	21,3±4,70
	LA ^b	21,9±0,80	21,2±2,90	22,5±1,05	23,4±0,95	22,3±0,45	19,8±0,21	21,4±0,35	21,5±0,45	21,3±6,65	22,3±0,40
	LCSI ^a	23,0±0,80	23,4±1,25	19,7±4,00	21,9±0,64	24,1±1,65	22,5±2,70	16,2±0,55	23,4±1,00	22,3±0,49	22,1±0,15
	CCPD ^d	23,8±0,10	23,4±1,25	24,2±1,30	24,2±2,33	28,4±2,00	19,3±0,50	25,5±0,01	21,9±1,50	22,1±0,21	24,3±1,00
	CN ^e	20,7±2,50	20,1±1,50	21,1±3,80	28,1±4,59	18,5±2,40	18,7±2,30	18,6±4,15	19,5±2,05	24,3±2,33	19,3±2,85
Com aflatoxina	PC ^c	16,0±1,00	16,0±0,01	17,5±0,01	17,0±2,00	18,0±2,00	19,5±2,50	17,0±0,01	18,0±1,00	17,5±0,50	15,5±2,12
	LA ^b	17,0±1,00	14,5±1,50	20,5±2,50	18,7±0,75	16,0±3,00	16,5±2,50	16,5±2,30	17,5±1,50	16,0±2,00	17,0±0,00
	LCSI ^a	17,0±0,20	17,0±2,00	17,5±0,05	15,0±0,01	16,0±2,90	17,0±0,02	17,0±2,00	13,0±0,01	15,5±2,00	13,7±0,35
	CCPD ^d	19,0±2,40	18,7±3,30	19,7±4,00	20,0±0,01	18,0±0,02	14,5±0,30	17,0±3,90	17,5±0,70	18,1±1,65	16,0±1,41
	CP ^f	17,0±0,10	19,0±2,00	15,0±0,02	19,5±0,50	13,5±3,50	16,7±2,25	13,5±1,50	15,0±0,01	16,0±2,00	19,3±0,99

¹valores expressos em média das amostras analisadas em duplicata; ^aLCSI: Levedura de cana-de-açúcar seca e inativada; ^bLA: Levedura autolizada; ^cPC: Parede celular;

^dCCPD: Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ^eCN: Controle Negativo; ^fCP: Controle Positivo.

5.2.2.2 Determinação de Aflatoxina M₁ no leite

Nos tratamentos não intoxicados os níveis de AFB₁ no leite estavam abaixo do limite detecção, níveis muito baixos. Os resultados podem ser observados na tabela 10.

Em relação aos animais que foram submetidos à intoxicação com AFB₁ duas (PC e LA) das quatro fontes de biomassa de SC foram capazes de reduzir a contaminação, apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$). As demais fontes (LCSI e CCPD) não foram capazes de reduzir as concentrações de AFB₁ no leite durante o período experimental, mas ao ser observado os padrões de aumento e declínio nos níveis de AFB₁ nestes tratamentos em comparação com o tratamento controle positivo (figura 14), o aumento e o declínio foi similar ao que ocorre com o animal que não recebeu nenhuma fonte de biomassa de SC.

Os ruminantes possuem um metabolismo complexo e diversos fatores podem influenciar a capacidade de adsorção das leveduras, entre eles um dos mais importantes é a composição do líquido ruminal. Kiesling et al. (1984) demonstraram que 90 a 100% de um conjunto de micotoxinas foram metabolizadas pelos protozoários do rúmen e, por conseguinte, eles relataram estes como a mais importante população microbiana ruminal na biodegradação de micotoxinas. No entanto, alguns estudos indicam que a fração bacteriana do líquido ruminal tem capacidade significativa da degradação de micotoxinas (SCHATZMAYR et al., 2002; YANG, 2010).

Jouany e Diaz (2005) postularam que a população microbiana do rúmen é capaz de metabolizar a maioria das micotoxinas. Segundo estes mesmos autores parte da AFB₁ consumida é degradada pelo rúmen e resulta em um metabólito denominado aflatoxicol, tão tóxico quanto a AFB₁, e outra parte sofre reação de hidroxilação formando AFB₁, a qual é solúvel em água, sendo excretada no leite e urina (SHREEVE; PATTERSON; ROBERTS, 1979). Creppy (2002) relatou que cerca de 0,3 a 6,2 % da AFB₁ ingerida pelo gado através da ração é transformada em AFB₁, no entanto, Unusan (2006) e Ayar, Sert e Çon (2007) destacaram que esta taxa de conversão varia de animal para animal e de acordo com o dia-dia dos mesmos.

Mudanças na relação volumoso concentrado de uma dieta, com o fornecimento de mais concentrado rico em proteínas na dieta diária do que o necessário pode modificar a capacidade

de clivagem dos microrganismos do rúmen (XIAO et al., 1991; MULLER et al., 1999; LIU YANG, 2010).

Diaz et. al. (2004) relataram um baixo percentual de redução, 4%, quando observaram os efeitos da adição de glucomanna esterificada na proporção de 1,2% da matéria seca/dia em relação às concentrações de AFB₁ no leite de vacas alimentadas com 100 µg de AFB₁/ Kg de dieta. Similar ao descrito por Diaz et al. (2004), Kutz et al. (2009) avaliaram o efeito da adição de glucomana esterificada (MTB- 100, Alltech) na proporção de 0,5 % da dieta de matéria seca/dia sobre a concentração de AFB₁ no leite de vacas leiteiras alimentadas com 100 µg de AFB₁/ Kg/dia, e relataram um baixo percentual de redução (4%).

Com isto, no presente estudo os níveis de redução de AFB₁ encontrados podem ser devido ao efeito de adsorção das fontes de biomassa de SC, ou resposta individual da vaca, como exemplo a melhora da fermentação ruminal.

Figura 14. Efeito da intoxicação de gado de leite com AFB₁ com ou sem adição de fontes de biomassa de SC para redução da excreção dos níveis de AFB₁ (µg/kg) no leite, ao longo do período experimental.

Fonte: Propriedade do autor (2016).

Tabela 10. Valores médios e desvio padrão da quantidade ($\mu\text{g/kg}$) de AFM₁ presente no leite dia de cada tratamento.

Tratamentos		Dias de Tratamento									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem Aflatoxina ²	CN ^e	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹
	LA ^b	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹
	LCSI ^a	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹
	CCPD ^d	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹
	PC ^c	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹
Com Aflatoxina ²	CP ^f	ND ¹	2,25 $\pm$ 0,60*	1,88 $\pm$ 0,97*	2,23 $\pm$ 2,57*	3,80 $\pm$ 0,26*	1,82 $\pm$ 2,65*	1,40 $\pm$ 0,99*	0,58 $\pm$ 2,62*	ND ¹	ND ¹
	LA ^b	ND ¹	1,65 $\pm$ 0,49*	3,81 $\pm$ 3,35*	9,34 $\pm$ 1,34*	5,65 $\pm$ 3,43*	1,05 $\pm$ 4,42*	0,37 $\pm$ 0,58*	0,16 $\pm$ 0,03*	ND ¹	ND ¹
	LCSI ^a	ND ¹	1,94 $\pm$ 0,23*	3,83 $\pm$ 2,28*	2,31 $\pm$ 1,09*	1,85 $\pm$ 0,79*	3,48 $\pm$ 2,09*	3,12 $\pm$ 0,20*	0,97 $\pm$ 0,89*	0,37 $\pm$ 0,89*	ND ¹
	CCPD ^d	ND ¹	1,59 $\pm$ 0,33*	2,71 $\pm$ 2,65*	3,23 $\pm$ 2,29	3,34 $\pm$ 0,63	2,08 $\pm$ 0,91*	2,02 $\pm$ 2,88	0,77 $\pm$ 0,81*	0,26 $\pm$ 0,20*	ND ¹
	PC	ND ¹	2,22 $\pm$ 0,08*	3,90 $\pm$ 0,04*	1,84 $\pm$ 1,01*	1,37 $\pm$ 0,60*	0,34 $\pm$ 0,47*	0,16 $\pm$ 0,81*	0,14 $\pm$ 0,09	ND ¹	ND ¹

¹ Não detectado, valor abaixo do limite de quantificação (0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$); ² Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (amostras em duplicatas); ³ somatório de aflatoxina (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂); *Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia anterior de tratamento; ^a LCSI - Levedura de cana-de-açúcar seca e inativada; ^b LA- Levedura autolizada; ^c PC - Parede celular; ^d CCPD – Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ^e CN – Controle Negativo; ^f CP – Controle Positivo.

5.2.2.3 Bioquímica sérica

Como pode ser observado na tabela 11, os valores médios obtidos nas análises de bioquímica sanguínea, proteína total (PT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram considerados dentro dos padrões fisiológicos de vacas em lactação. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de PT, ALT e AST ($P>0,05$) quando analisadas por tratamentos experimentais e dias de período experimental.

Barringer e Doster (2001) descreveram um surto natural de aflatoxicose aguda em bezerros provocado pela ingestão de leite contaminado com AFB₁; estes pesquisadores observaram na análise de bioquímica sérica uma redução do nível de proteínas totais, albumina e globulina. No entanto, outros estudos demonstraram que AST, PT e albumina permanecem inalterados em casos de aflatoxicose em bovinos. Pierezan et al. (2012) através de estudo com bezerros (4-5 meses de idade) intoxicados com 1.250, 2500 e 5000 µg de AFB₁ por kg de ração durante dois meses relataram que não houve variações na atividade sérica de AST nem nos níveis de PT.

Lynch et al. (1970) em um estudo com 6 pares de bezerros, utilizaram concentrações de micotoxinas para a intoxicação experimental que variaram de 0,008 a 0,08 mg de AFB₁ por kg de peso vivo durante 6 semanas, e observaram que não houve alterações nos níveis de AST, PT e albumina.

Van Halderen et al. (1989) através do estudo de um surto que ocorreu em gado leiteiro, em que 7 em cada 25 animais intoxicados morreram, devido a dieta contaminada com milho com *Aspergillus flavus* (11,79 µg de AF/Kg), relataram que não houve alteração nos níveis de PT e albumina, porém observaram alterações histopatológicas no fígado de alguns animais.

No presente estudo não houve alteração nos níveis de AST, ALT e PT, provavelmente devido ao tempo de exposição dos animais à toxina não ter sido suficiente para alterar os valores da bioquímica sanguínea das vacas.

Tabela 11. Valores médios da concentração de proteínas totais (g/L), AST (U/L) e ALT (U/L) (mg/dL) no sangue dos animais nos dias 1, 5 e 10 do período experimental¹.

	Tratamentos	Proteínas totais (g/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	
Dia 1	Sem dição de AFB ₁	LCSI ^a	71,0 ± 2,0	79,6 ± 14,9	28,0 ± 2,3
		LA ^b	73,0 ± 1,0	87,2 ± 15,4	27,4 ± 4,1
		PC ^c	72,0 ± 1,0	65,4 ± 13,4	32,9 ± 1,8
		CCPD ^d	66,0 ± 3,0	79,1 ± 16,0	28,7 ± 3,9
		CN ^e	71,0 ± 2,0	54,5 ± 15,1	27,8 ± 2,7
	Com adição de AFB ₁	LCSI ^a	68,0 ± 2,0	92,9 ± 13,5	29,8 ± 3,4
		LA ^b	72,0 ± 1,0	80,1 ± 11,6	25,1 ± 2,3
		PC ^c	69,0 ± 3,0	89,5 ± 14,7	32,8 ± 3,1
		CCPD ^d	66,0 ± 2,0	93,1 ± 15,4	28,6 ± 4,7
		CP ^f	68,0 ± 4,0	85,2 ± 13,9	22,4 ± 2,5
Dia 5	Sem dição de AFB ₁	LCSI ^a	67,0 ± 2,0	74,7 ± 11,4	28,3 ± 2,1
		LA ^b	71,0 ± 3,0	72,8 ± 14,4	31,8 ± 2,8
		PC ^c	72,0 ± 2,0	64,8 ± 11,8	31,3 ± 1,5
		CCPD ^d	67,0 ± 3,0	87,6 ± 13,4	28,2 ± 2,7
		CN ^e	70,0 ± 1,0	65,5 ± 11,9	27,5 ± 1,6
	Com adição de AFB ₁	LCSI ^a	71,0 ± 3,0	87,9 ± 11,8	27,8 ± 2,4
		LA ^b	73,0 ± 1,0	85,7 ± 10,1	22,1 ± 3,3
		PC ^c	72,0 ± 1,0	91,5 ± 12,1	35,4 ± 1,8
		CCPD ^d	68,0 ± 1,0	87,1 ± 19,2	33,7 ± 2,1
		CP ^f	72,0 ± 2,0	82,4 ± 17,4	25,3 ± 2,3
Dia 10	Sem dição de AFB ₁	LCSI ^a	68,0 ± 3,0	86,1 ± 19,1	26,3 ± 1,8
		LA ^b	72,0 ± 3,0	78,9 ± 11,6	28,1 ± 2,3
		PC ^c	69,0 ± 2,0	72,4 ± 16,7	31,5 ± 3,4
		CCPD ^d	71,0 ± 2,0	77,1 ± 15,4	26,8 ± 1,9
		CN ^e	72,0 ± 2,0	55,7 ± 18,3	29,2 ± 1,5
	Com adição de AFB ₁	LCSI ^a	67,0 ± 3,0	95,1 ± 10,1	29,1 ± 2,2
		LA ^b	69,0 ± 3,0	82,8 ± 16,4	23,3 ± 1,6
		PC ^c	71,0 ± 2,0	87,3 ± 17,8	34,8 ± 2,3
		CCPD ^d	72,0 ± 2,0	95,1 ± 13,3	31,7 ± 2,1
		CP ^f	67,0 ± 2,0	87,2 ± 12,4	27,8 ± 1,9

¹ Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em duplicata; ^aLCSI: Levedura de cana-de-açúcar seca e inativada; ^bLA: Levedura autolizada; ^cPC: Parede celular; ^dCCPD: Co-produto de cervejaria parcialmente desidratado; ^eCN: Controle Negativo; ^fCP: Controle Positivo.

5.2.2.4 Análise de escore corporal

No presente estudo, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores médios dos escores de condição corporal nos diferentes dias do período experimental, entre os grupos com e sem AFB₁ e entre as diferentes fontes de biomassa (Tabela 12). Diante disso, não houve efeito da

intoxicação de AFB₁ e do uso de diferentes biomassas de *SC* sobre o escore de condição corporal durante o período experimental.

Tabela 12. Valores médios dos escores de condição corporal dos animais ao início e final do período experimental¹.

Tratamentos		Início	Final
Sem adição de AFB ₁	LCSI ^a	3,00 ± 0,25	3,00 ± 0,25
	LA ^b	3,00 ± 0,25	3,00 ± 0,25
	PC ^c	2,75 ± 0,50	2,75 ± 0,50
	CCPD ^d	3,00 ± 0,50	3,00 ± 0,50
	CN ^e	3,00 ± 0,25	3,00 ± 0,25
Com adição de AFB ₁	LCSI ^a	3,00 ± 0,50	3,00 ± 0,50
	LA ^b	3,00 ± 0,50	3,00 ± 0,50
	PC ^c	3,00 ± 0,25	3,00 ± 0,25
	CCPD ^d	2,75 ± 0,50	2,75 ± 0,50
	CP ^f	3,00 ± 0,25	3,00 ± 0,25

¹ Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em duplicata.

6. CONCLUSÃO

- Através do estudo *in vitro* foi possível observar que o tempo de incubação não interfere na capacidade de adsorção de AFB₁.
- Não houve efeito da AFB₁ e nem das diferentes fontes de biomassa de SC quando realizado o estudo *in vivo* sobre o escore de condição corporal, produção e composição do leite.
- A bioquímica sérica (AST, ALT e PT) avaliada foi similar entre os grupos não intoxicados e intoxicados com AFB₁.
- Os tratamentos LA e PC apresentaram maior capacidade de adsorção de AFB₁ em vacas leiteiras previamente intoxicadas.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K. **Aflatoxin and food safety**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- AGUILAR-USCANGA, B.; FRANCOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 268–274, 2003.
- ALBERTS, J. F. et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, p. 121-126, 2006.
- ALONSO, V. A. et al. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 637-643, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1111/jam.12178>>. Acesso em: 31 mar. 2014.
- AN, Z. **Handbook of industrial mycology**. New York: Marcel Dekker, 2005. v. 22.
- APPLEBAUM, R. S. et al. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products – a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, p. 752-777, 1982.
- ARAÚJO, J. M. A. Aflatoxinas. In: _____. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 340-352.
- AYAR, A.; SERT, D.; ÇON, A. H. A study on the occurrence of aflatoxin in raw milk due to feeds. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 27, p. 199–207, 2007.
- AUAD, A. M.; SANTOS, A. M. B.; CARNEIRO, A. V. **Manual de bovinocultura leiteira**. Brasília: LK Editora; Belo Horizonte: SENAR- AR/ MG; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010. 608 p.
- BAHT, 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**, Chicago, v. 9, p. 57-81, 2010.
- BARBIROLI, A. et al. Binding of aflatoxin M₁ to different protein fractions in bovine and caprine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 532-540. 2007.
- BARRINGER, S.; DOSTER, W. R. Case report-suspected M₁ aflatoxicoses on a western dairy calf ranch. **Bovine Practitioner**, Auburn, v. 35, p. 126-130. 2001.
- BARTOSZE, A. Genotoxic food components. In: MALEJKA-GIGANTI, D.; BARTOSZE, A.; BAER-DUBOWSKA, W. **Carcinogenic and anticarcinogenic food components**. New York: CRC Press, 2006. Cap. 4, p. 69-96.
- BATA, A. LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends Food Science and Technology**, v. 10, p.223-228, 1999.
- BECKER, T. A. et al. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 707-716. 2010.

BERNARDES, T. F.; NUSSIO, L. G.; DO AMARAL, R. C. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, Chichester, v. 67, p. 34-42, 2012.

BIGGS, D. A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L. O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. **International Dairy Federation. International Standard**, Brussels, n. 208, p. 21-29, 1987.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2. ed. London: Cab, 2010. 266 p.

BOVO, F. et al. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos, por bactérias ácido-láticas. **UNOPAR Científica – Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 12, n. 2, p. 15-21. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa 62**. Disponível em: <<http://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Láctea Brasil e definições de diferentes tipos de leite. Disponível em:<http://www.laticionio.net/inf_tecnicas.asp?cod=136>. Acesso: 18 mar. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Produção da Pecuária Municipal**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA nº 183, de 21 de março de 1996. Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 25 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09 de novembro de 1988. Adota limites máximos de micotoxinas para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 09 de novembro de 1988.

BRESSAN, M.; MARTINS, M. C. **Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios**. Milk Point 2003. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/seguranca-alimentar-nacadeia-produtiva-do-leite-e-alguns-de-seus-desafios-17367n.aspx>. Acesso em: 19 dez. 2014.

BRUERTON, K. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 17., 2001, Queensland. **Proceedings...** Queensland, 2001, p. 161-168.

BRUGERE-PICOUX, J. Biochimie clinique em pthologie aviarie. Interet et limites des dosages enzymatiques ches b poule. **Recuel Medicine Veterinari**, v. 163, p. 1091-1099, 1987.

BUENO, D. J. et al. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, p. 2148-2154, 2006.

CARVALHO, E. C. Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, Niterói, v. 2, p. 27-31, 1995.

ÇELIK, T. H.; SARIMEHMETOGLU, B.; KÜPLÜLÜ, Ö. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, n. 75, p. 57-65, 2005.

CHASE, L. E. et al. Aflatoxin M₁ in milk. In: **Dairy nutrition fact sheet**. Ithaca: Cornell University Cooperative Extension, 2013.

CHAVES, A. C. S. D. Leite. In: KOBITZ, M. G. B. **Matérias- primas alimentícias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 5. p. 148-184.

CHOUDHARY, P. L. et al. Effect of feeding aflatoxin B₁ on feed consumption through naturally contaminated feeds. **The Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 68, p. 400-401, 1998.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcionogenic potencial and preventive measures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 291-306, 1991.

COCKCROFT, P. D. Sudden death in dairy cattle with putative acute aflatoxin B poisoning. **Veterinary Record**, London, v. 136, art. 248, 1995.

COLVIN, B. M. et al. Aflatoxicosis in feeder cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 184, p. 956-958, 1984.

CORASSIN, C. H. et al. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. **Food Control**, Kidlington, v. 31, p. 80-83, 2013.

CORRÊA, B. et al. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 279-283, 1997.

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

DEVEGOWDA, G.; ARVIND, B. I. R.; MORTON, M. G. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoglicosacarides to counteract aflatoxicosis un broilers. In: AUSTRALIAN POULTRY SCIENCE SYMPOSIUM, 1996, Sydney. **Proceedings...** Sydney, 1996. p. 103-106.

DIAZ, D. E. et al. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 157, p. 233-241, 2004.

DIAZ, D. Mycotoxins contamination in silages. **Western dairy news**. 2006. Disponível em: https://www.msu.edu/~mdr/MYCOTOXINSinSilage_Diaz2006.pdf. Acesso em: 10 jul. 2015.

DIEKMAN, M. A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70. p. 1615-1627. 1992.

DIEN, H.; SCHATZMAYR, G. **Feed Mix**. v.11, 2003.

DINIZ, S. P. S. S. **Micotoxinas**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2002. 181 p.

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

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. **Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed**. Parma: EFSA-Q-2003-040, 2004.

EL- NEMAZI, H. et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 36, p. 321-326, 1998.

EL- NEMAZI, H. et al. Lactic acid bacteria as a tool for enhancing food safety by removal of dietary toxins. In: SALIMEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. cap. 12, p. 397-406.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema de alimentação**: dieta completa. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/alimentacao/15.html>>. Acesso em 28 jun. 2015.

_____. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. **Circular Técnica**, Juiz de Fora, 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32886/1/CT104-Kennya.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

FALLAH, A. A. et al. Determination of aflatoxin M₁ levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 47, p. 1872-1875, 2009.

FAZELI, M. R. et al. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.

FIELDER, K.; SCHUTZ, E.; GEH, S. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Germany, v. 204, p. 111-121. 2001.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, London, v. 176, p. 84-92, 2008a.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008b.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Dairy production and products**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/dairy-home/en/#.VciiInFVikp>>. Acesso em: 28 jul. 2015.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Kluwer Academic, 1998. 479 p.

FORRESTER, L. M. et al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 87, p. 8306-8310. 1990.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 6, n. 149, p. 549-554, 1998.

GALVANO, G. et al. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 738-741, 1998.

GARRIDO, N. S. et al. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk comercialized in Ribeirão Preto- SP, Brasil. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 20, n. 1, p. 70-73, 2003.

GARVICAN, L.; CAJONE, F.; RESS, K. R. The mechanism of action of aflatoxin B₁ on protein synthesis: observations on malignant, viral transformed and cells in culture. **Chemico-Biological Interactions**, Shannon, v. 7, p. 29-50, 1973.

GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in Syrian Market. **Food Control**, Guildford, v. 20, v. 6, p. 603-605, 2009.

GHAZANI, M. H. M. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 1624-1625, 2009.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. **Mycotoxins and mycotoxicosis in animals and humans**. Miami: Special Nutrients, INC., 2006. 127 p.

GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B. O relacionamento na cadeia agroindustrial do leite para os novos tempos. In: GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B.; CARNEIRO, A. V. (Org.). **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa, 2001. p. 139-165.

GONÇALVES, B. L. et al. The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* based products to bind aflatoxin B₁. **Food Control**, Kidlington, v. 47, p. 298-300, 2014.

GONÇALVES, B. L.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Mycotoxicoses in dairy cattle: a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, p. 752-760, 2015.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Divulgação Técnica do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, jan./dez. 2001.

GONÇALVEZ, E. et al. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 171-174, 2004.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, 1995.

GRATZ, S.; MYKKÄNEM, H.; EL-NEMAZI, H. Aflatoxin B₁ binding by mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2470-2474, 2005.

HANS, V. E.; JONKER, M. **Worldwide and European regulations for mycotoxins & analytical methods expected from**. Brussels: National Institute for Public Health and the Environment, 2004. 65 p. Disponível em: <<http://mycoglobe.ispa.cnr.it/Brussel/vanEgmond.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2015.

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**, Kidlington, v. 47, p. 1064-1068, 2009.

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 283, p. 525-532, 1991.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Shannon, v. 167, p. 101-134, 2001.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ICHM. **Environmental health criterial 11**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 20 set. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores IBGE**: estatística da produção pecuária, setembro de 2014. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201402_publ_completa.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2015.

JESSE, E. V. et al. **The dairy sector of India**: a country study. Madison: University of Wisconsin, 2006.

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**, Des Moines, v. 74, p. 1175-1185, 2011.

JOBIM, C. C.; BRANCO, A. B.; SANTOS, G.T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2003. p. 357-376.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas versus desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. p. 242-261.

JOUANY, J. P.; DIAZ, D. E. Effects of mycotoxins in ruminants. In: DIAZ, D. E. (Ed.). **The mycotoxins blue book**. Nottingham, UK: University Press, 2005. p. 295-321.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KELLY, A. L. Milk biochemistry. In: GRIFFITHS, W. **Improving the safety and quality of milk: milk production and processing**. Cambridge: Woodhead, 2010. v. 1, cap. 1, p. 2-26.

KIM, E. K. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 17, p. 59-64, 2000.

KIESSLING, K. H. et al. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 1070-1073, 1984.

KLIS, F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 26, p. 239-256. 2002.

KUILMAN, M. E. M. et al. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2707-2713, 1998.

KUTZ, R. E. et al. Efficacy of solis, novasilplus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M₁ levels in milk of early to mild lactation dairy cows fed aflatoxin B₁. **Journal Dairy Science**, New York, v. 92, p. 3959-3963, 2009.

LEE, Y. K. et al. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 426-430, 2003.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology Journal**, Berlin, v. 66, p. 1466- 1469. 1976.

LIN, W. C. et al. Inhibitory effect of CDA-II, a urinary preparation, on aflatoxin B₁-induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 44, n. 4, p. 546-551, 2006.

LUPATINI, G. C. et al. Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho (*Zea mays*, L.) para produção de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, p. 193-203, 2004.

LYNCH, G. P. et al. Responses of dairy calves to aflatoxin-contaminated feed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, p. 63-71, 1970.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E. et al. Antigen toxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B₁ contaminated corn. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 44, p. 2058-2063. 2006.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: detection and control**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

- MARTINEZ, J. C. **Formulação e rações para vacas leiteiras, parte 1**. Milkpoint. 2010. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/nutricao/formulacao-de-racoes-para-vacas-leiteiras-parte-1-66920n.aspx>>. Acesso em: 25 jun. 2015.
- MCKINNEY, R. E. **Environmental pollution control microbiology: a fifty-year perspective**. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- MIEDANER, T. et al. Stacking quantitative trait loci (QLT) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 112, p. 562-569, 2006.
- MULLER, G. et al. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in weaners. **Mycoses**, Chichester, v. 42, p. 495- 505, 1999.
- MUNIZ, L, C. **Consumo de leite entre adultos e idosos de Pelotas, RS: preferências e perfil dos consumidores**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- MUNKVOLD, G. P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 99-116, 2003.
- MURPHY, P. A. et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- 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**. New York: CRC Press, 2008. cap. 27, p. 457-472.
- NOVISNKI, C. O.; SCHMIDT, P. Níveis de micotoxinas em silagens de milho em cinco bacias leiteiras do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Anais...** Belém: UFRA, 2011.
- OATLEY, J. T. et al. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 8, p. 1133-1136, 2000.
- OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; LINO, C. M. (Orgs.). **Mycotoxins and their implications in food safety**. London: Future Science Ltd, 2014. v. 1, p. 6-19.
- OLIVEIRA, C. A. F. Animal health: mycotoxins. In: ALFEN, N. V. (Org.). **Encyclopedia of agriculture and food systems**. San Diego: Elsevier, 2014. v. 1, p. 358-377.
- OLIVEIRA, C. A. F. et al. Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. (Ed.). **Aflatoxins: recent advances and futures prospects**. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 59-92.
- 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**, Campinas, v. 30, p. 221-225, 2010.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 1, p. 147-152, 2008.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, 1997.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos**: alimentos de origem. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 85, p. 89-94, 1990.

PARLAT, S.; OZCAN, M.; OGUZ, H. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Research in Veterinary Science**, London, v. 71, p. 207-211, 2001.

PAYNE, G. A. Ear and kernel rots. In: WHITE, D. G. (Ed.). **Compendium of corn disease**. 3. ed. St. Paul: APS Press, 1999. p. 44-47.

PERAICA, M. et al. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Boletim de la Organización Mundial de Salud**, Genebra, n. 2, p. 80-92, 2000.

PIEREZAN, F. et al. Experimental aflatoxin poisoning in calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, p. 607-618, 2012.

PRADO, G. et al. Aflatoxin M₁ in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/ Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, 2000.

PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 47, p. 984-991, 2009.

PURCHIO, A. et al. Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ocratoxina A e esterigmatocistina) e correspondentes fungos micotoxigênicos em rações destinadas ao gado leiteiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 172-176, 1988.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M₁ concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B₁-contaminated diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 5901-5908, 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**, Abingdon, v. 41, p. 640-650, 2000.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 387, n. 1, p. 87-93, 2006.

ROBINSON, P. H. **Did the wet fall weather increase mycotoxin levels of your silage? California Dairy Newslatter**. Disponível em: <<http://www.progressiveforage.com/forage-types/silage/did-wet-fall-weather-increase-your-silages-mycotoxin-levels>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

RODRIGUES, I. Mycotoxin a menace to cows, producers. **Feedstuffs**, Bloomington, v. 83, n. 41, p. 1-3, 2011.

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais consumidos no estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, p. 81-85, 1988.

SANTIN, E. et al. Evaluation of the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 2, p. 241-344, 2003.

SANTOS, M. M. **Ocorrência de fungos filamentosos e micotoxinas em bagaço de cevada destinado à alimentação do rebanho bovino leiteiro do estado da Bahia**. 2004. 148 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2004.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; PONTES NETTO, D. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 63- 72, 2003.

SCHATZMAYR, G. et al. Evidence of ochratoxin A-detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid and soil samples as well as isolation of relevant microorganisms from these environments. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 18, p. 183-187, 2002.

SCOTT, P. M. Natural poisons. In: HELRICH, K. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. p. 1184-213.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro do leite. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.

SHREEVE, B. J.; PATTERSON, D. S. P.; ROBERTS, B. A. The “carry-over” of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. **Food and Cosmetics Toxicology**, Kidlington, v. 17, n. 2, p. 151-152, 1979.

SHETY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potencial micotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 17, p. 48- 55, 2006.

SHETY, P. H.; HALDE, B.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 41-46, 2007.

SHOTWEEL, O. L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, Washington, v. 14, p. 425-428, 1966.

SHUNDO, L. et al. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 20, p. 655- 657, 2009.

SINNHUBER, R. O.; LEE, D.J.; WALES, J.H.; LANDERS, M.K.; KEY, A.C. Aflatoxins M₁, a potent liver carcinogen for rainbow trout. **Federation Proceedings**. v. 29, p. 568-579, 1970.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO. J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2008.

STROUD, J. D. **The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets**. MS thesis - North Carolina State University, Raleigh, NC, 2006. Disponível em: <<http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/2007/1/etd.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

TRABULSI, L. R. et al. Biologia dos fungos. In: GOMPERTZ, O. F. et al. **Microbiologia médica**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-374.

TUINSTRA, L. G. M.; ROSS, A. H.; VAN TRIP, J. M. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 76, p. 1248-1254, 1993.

UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Production, supply and distribution online**. 2010. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 09 jun. 2014.

_____. **PSD online**. 2012. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

UNITED STATES. Food and Agriculture Organization (FAO). **Dairy production and products**. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/en/#.VWYH6_lViko>. Acesso em: 27 maio 2015.

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 1897-1900, 2006.

VAN DONGEN, P. W. J.; DE GROOT, A. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Shannon, v. 60, p. 109-116, 1955.

VAN HALDEREN, A. et al. A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the western Cape Province. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 60, p. 210-211, 1989.

VELDMAN, A. J. et al. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Animal Production**, Cambridge, v. 55, p. 163-168, 1992.

VICAM, L. P. **Aflatest® instruction manual**. Watertown, MA, USA: Vicam, 1999.

VIRGILIUS, P. M. **Georgike**. Velika Gorica: Papir, 1994.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 467 p.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal Dairy Science**, New York, v. 65, p. 495-501, 1982.

WILSON, D. M. et al. Biology and ecology of mycotoxigenic aspergillus species as related to economic and health concerns. In: DE VRIES, J. W.; TRUCKESSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Eds.). **Mycotoxins and food safety**. Dordrecht: Kluwer Academic Plenum Publications, 2002. p. 3-17.

WHITLOW, L. W.; HAGLER JR., W. M.; DIAZ, D. E. Mycotoxins in feeds. **Feedstuffs**, Bloomington, v. 74, p. 74-84, 2010.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 41, n. 1, p. 1-17, 2009.

XIAO, H. et al. Effect of a hay and a grain diet on the bioavailability of ochratoxin A in the rumen of sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 3715-3723, 1991.

YANG, L. **Effects of feed types on OTA biodegradation by Korean native goats**. 2010. Masters' Thesis - Seoul National University, Seoul, 2010.

APÊNDICE

Food Control 47 (2015) 298–300

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

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

Short communication

The *in vitro* ability of different *Saccharomyces cerevisiae* – Based products to bind aflatoxin B₁ Bruna Leonel Gonçalves¹, Roice Eliana Rosim¹, Carlos Augusto Fernandes de Oliveira¹, Carlos Humberto Corassin^{*}

Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2014

Received in revised form

7 July 2014

Accepted 15 July 2014

Available online 22 July 2014

Keywords:

AFB₁*Saccharomyces cerevisiae*

Yeast-based products

Decontamination

Binding

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the ability of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) – based products from sugar cane fermentation (dried yeast – DY, autolyzed yeast – AY, cell wall – CW) and from beer fermentation (brewery dehydrated residue – BDR) to bind aflatoxin B₁ (AFB₁) in phosphate buffer saline (PBS) spiked with 0.5 µg AFB₁ mL⁻¹. All SC cells were heat-killed (121 °C, 10 min) and then used for checking the effect of contact time (5, 10, 20 and 30 min) on toxin binding capacity. Compared to the CW and BDR treatments, DY and AY had higher ($p < 0.05$) capability to bind AFB₁ in PBS, although there were no differences ($p > 0.05$) among the contact times for any product evaluated. The mean percentages of AFB₁ bound by the DY were higher than AY, varying from 96.5% to 99.3% and from 90.4% to 97.5%, respectively, although the differences were not significant ($p > 0.05$). The SC-based products from sugar cane fermentation have a potential application for reducing levels of AFB₁ in contaminated food products. However, additional studies are needed to investigate the mechanisms involved in the removal process of toxin by SC and factors that affect toxin sequestration aiming the commercial application in food industry.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aflatoxins are secondary metabolites of low molecular weight produced by filamentous fungi, particularly *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius*, distinguished by their wide distribution in food and pronounced toxic properties (Moss, 1998). There are currently 18 similar compounds described by the term aflatoxin, but the most prevalent and toxic is the aflatoxin B₁ (AFB₁) (Murphy, Hendrich, Landgren, & Bryant, 2006). Domestic and laboratory species are sensitive to the acute toxic, mutagenic and carcinogenic effects of these compounds, with the liver as the target organ (Oliveira & Corrêa, 2010). Aflatoxins are also of great importance for the Public Health, as they are considered as one of the factors involved in the etiology of the human hepatocellular carcinoma (HCC), as a consequence of the ingestion of contaminated foods. This disease represents more than 80% of primary malignant tumors of the liver, and it is the 7th to 9th most common

type of cancer worldwide affecting men and women, respectively (Oliveira & Corassin, 2014).

Ideally, the best way to prevent aflatoxin contamination in the food chain is the adoption of improved agricultural practices and control of storage conditions of products. However, practical difficulties to effectively prevent contamination, along with the stability of aflatoxins under normal food processing conditions, have led to investigation on decontamination methods for food products (Wu et al. 2009).

The use of microorganisms offers an attractive alternative for the control or elimination of aflatoxins in foodstuffs (Alberts, Gelderblomb, Botha, & van Zyl, 2009; Corassin, Bovo, Rosim, & Oliveira, 2013), being *Saccharomyces cerevisiae* (SC) one of the most effective for binding AFB₁ (Shetty & Jespersen, 2006). Products based on SC (cell wall from baker and brewer yeasts, inactivated baker yeast, or alcohol yeast) have been studied, showing that in pH 3, at 37 °C and 15 min of contact, the removal of AFB₁ ranged from 2.5% to 49.3%, depending on the concentration of the toxin in the medium, and on the yeast-based product used (Joannis-Cassan, Tozlovanu, Hadjeba-Medjdoub, Ballet, & Pfohl-Leszkowicz, 2011).

Taking into consideration its huge availability worldwide, especially in the sugar cane and beer fermentation process, SC-

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 19 3565 4173; fax: +55 19 3565 4114.
E-mail addresses: carloscorassin@gmail.com, carloscorassin@usp.br (C.H. Corassin).
¹ Tel.: +55 19 3565 4179; fax: +55 19 3565 4284.

Efficiency of Different Sources of *Saccharomyces cerevisiae* to Bind Aflatoxin B₁ in Phosphate Buffer Saline

Goncalves BL, Rosim RE, Oliveira CAF and Corassin CH*

Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo Av Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil

*Corresponding author: Corassin CH, Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil; Tel: +55 19 3565-4145; Fax: +55 19 3565-4284; E-mail: carloscorassin@usp.br

Rec date: May 20, 2014; Acc date: Jun 26, 2014; Pub date: July 4, 2014

Copyright: © 2014 Goncalves BL, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Aflatoxins, a group of carcinogenic mycotoxins, can cause acute and chronic intoxications and also liver cancer in humans and animals. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most potent, having proven toxic properties. Biological decontamination of mycotoxins is one of the well-known strategies for management of mycotoxins in foods and feeds, presenting some advantages over physical and chemical methods. Among the different possible decontaminating microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae* is a potential group since it is widely used in preservation and food fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall consists of a network of β-1,3 glucan backbone with β-1,6 glucan side chains, which is attached to highly glycosylated mannoproteins making the external layer. Binding of different mycotoxins to yeast cell surface has been reported. This study was carried out to investigate the efficiency of *S. cerevisiae* to remove AFB₁ in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution (pH 7.3, 25°C). *Saccharomyces cerevisiae* concentration from four different sources (dried yeast of sugar cane, autolyzed yeast, cell wall and brewery dehydrated residue) was determined by a Neubauer-counting chamber, using 1x10¹⁰ non-viable cells for each 3.0 mL of PBS containing 0.5 μg L⁻¹ AFB₁. The assay was performed at contact times of 5, 10, 20 and 30 minutes. Among all analyzed yeasts, the dried yeast of sugar cane presented highest removal capacity of AFB₁, with an average reduction of 98.3%. Autolyzed yeast and brewery dehydrated residue presented extensive removal capacity, with averages of 93.8 and 84.6%. The yeast cell wall showed the lowest removal capacity (82%).

Keywords: AFB₁; *S. cerevisiae*; Decontamination; Binding; PBS

Introduction

Aflatoxins are one of the most important mycotoxins known, being *Aspergillus* species distributed worldwide, although their optimal growth conditions are relative humidity of 80-85% and temperature around 30°C. Aflatoxins are secondary metabolites of low molecular weight produced by filamentous fungi, particularly *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, distinguished by their wide distribution in food and pronounced toxic properties [1]. There are currently 18 similar compounds described by the term aflatoxin, but the most prevalent and toxic is aflatoxin B₁ (AFB₁) [2]. Aflatoxins are also of great importance for the Public Health, as they are main factors involved in the etiology of human hepatic cancer, as a consequence of the ingestion of contaminated foods.

After oral ingestion, AFB₁ is efficiently absorbed and bio transformed before urinary and fecal excretion. Enzymes of the cytochrome P₄₅₀ family are responsible for the biotransformation of absorbed aflatoxins. These enzymes convert AFB₁ into its carcinogenic form, AFB₁-8,9-epoxide, which bonds covalently to DNA and serum albumin, producing AFB₁-N₇-guanine and lysine adducts, respectively. The bond between AFB₁ and DNA modifies the structure and biological activity of DNA, leading to the basic mutagenic and carcinogenic mechanisms of the toxin. Besides being epoxidized, AFB₁ can be also oxidized into several other derivatives. The main hydroxylated metabolites are aflatoxin M₁ (AFBM₁), aflatoxin Q₁ (AFQ₁), a demethylated metabolite, aflatoxin P₁ (AFP₁), and a reduced

metabolite, aflatoxicol. The most important effect of aflatoxins on human health is the Hepatocellular Carcinoma (HCC). This disease represents more than 80% of primary malignant tumors of the liver, and it is the 7th to 9th most common type of cancer worldwide affecting men and women, respectively [3].

The best way to prevent aflatoxin contamination is the adoption of improved agricultural practices and control of storage conditions of products. However, practical difficulties to effectively prevent contamination, along with the stability of aflatoxins under normal food processing conditions, have led to investigation on decontamination methods for food products [4]. The use of microorganisms offers an attractive alternative for the control or elimination of aflatoxins in foodstuffs [5,6]. *Saccharomyces cerevisiae* (SC) is the most effective for binding AFB₁ [7], although several Lactic Acid Bacteria (LAB) strains have shown different capabilities for binding AFB₁ in phosphate buffer solutions and in milk [8,9]. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the ability of a SC strain from four different sources (dried yeast - DY, autolyzed yeast - AY, cell wall - CW and brewery dehydrated residue - BDR), to bind AFB₁ in Phosphate Buffer Saline (PBS) spiked with 0.5 ng mL⁻¹ AFB₁, during contact times of 5, 10, 20 and 30 minutes.

Materials and Methods

SC sources

Commercially available sugar cane yeast (dried yeast from sugar cane - DY, autolyzed yeast from sugar cane - AY, cell wall from sugar

Mycotoxicoeses in Dairy Cattle: A Review

B.L. Gonçalves, C.H. Corassin and C.A.F. Oliveira

Department of Food Engineering, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil

Corresponding Author: C.A.F. Oliveira, Department of Food Engineering, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi growing on several agricultural products in various stages of production, from planting to transportation and storage. Diseases caused by mycotoxins are called mycotoxicoeses and can affect several animal species, including ruminants. Mycotoxin contamination of dairy cattle diets is also a serious concern for human health, since some mycotoxin metabolites may be excreted in milk, especially the aflatoxin M₁. This study presents a review of current knowledge on the main mycotoxicoeses affecting dairy cattle, especially those caused by mycotoxins produced by species of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. The main toxic effects of aflatoxins, fumonisins and trichothecenes in dairy cows are presented, as well as the occurrence of toxigenic fungi and their respective mycotoxins in feed and silage for dairy cattle. A comprehensive description of prevention and decontamination strategies for mycotoxins in dairy feeds is also presented.

Key words: Aflatoxins, fumonisins, zearalenone, trichothecenes, occurrence, toxicity

INTRODUCTION

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi that grow naturally in several agricultural commodities, causing a wide range of toxic effects in vertebrates (Whitlow *et al.*, 2010). Exposure to toxins predominantly occurs by ingestion of contaminated foods, mainly cereals such as corn, wheat, sorghum, as well as silages produced from these cereals (Alonso *et al.*, 2013). The main toxigenic fungi species belong to the genus *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, which may grow in a wide range of environmental conditions and virtually in any type of food substrate. They can develop in temperatures from 10-40°C and at water activity higher than 0.7 and their optimum pH values range from 4-8 (Bhat *et al.*, 2010). The occurrence of toxigenic fungi species and the consequent production of mycotoxins are directly related with the environmental conditions. Species in the genus *Aspergillus* spp. mainly grow in hot climates, whereas most species of *Fusarium* and *Penicillium* spp. prefer milder climates (De Oliveira *et al.*, 2014). Simultaneous occurrence of two or more mycotoxins is also possible and may lead to additive or synergistic toxic effects on the susceptible organism.

Toxigenic fungi may contaminate foodstuffs in the different stages of production and transformation, from growth to transportation and storage and may be divided into two main groups: (a) Field fungi, including *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* species, (b) Storage fungi, such as *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus flavus*. According to Cigic and Prosen (2009) the most important mycotoxins found in forage and grains are produced by these fungi species.