UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDA BOVO

Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M_1

Pirassununga
2011

FERNANDA BOVO

Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M_1

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 Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2011

Aos meus pais, Luiz Renato e Maria Antonia, por todo o apoio, incentivo e amor dados durante todos os anos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, pelos ensinamentos, e por toda a contribuição para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

À minha família, por todo o apoio e por todos os momentos de felicidade durante a minha vida inteira.

Ao meu noivo Francis, por todo o amor, carinho e paciência dedicados a mim durante todos esses anos.

A todos os meus amigos, que sempre souberam me incentivar a continuar meus estudos e construir uma vida acadêmica.

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

À Estela, pela ajuda desprendida durante o projeto, principalmente com as análises estatísticas, e também por nossa amizade.

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

À Carolina, por me ajudar a compreender melhor o funcionamento das bactérias.

Às estagiárias Monique e Thaiane, por toda a ajuda durante a execução do projeto.

À Riana, obrigada pela amizade, por toda a ajuda e por sua companhia nas viagens diárias até Pirassununga.

À Cristina, Eliane, Graziela, Rafaella e Renata, pela amizade e por todo o tempo que passamos juntas durante esse período.

À Izildinha Moreno do TECNOLAT – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de Campinas/SP, e à Danisco do Brasil Ltda., pela doação das cepas bacterianas para a realização desse projeto.

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

À CAPES, pelo suporte financeiro providenciado durante todo o período do mestrado.

"Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação."

John Dewey

RESUMO

BOVO, F. **Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M_1**. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de cepas de bactérias ácido-láticas (BAL) em remover a aflatoxina M_1 (AFM_1) em solução tampão fosfato salina (TFS) e em amostras de leite. Nos ensaios com TFS, verificou-se a influência do tempo de contato (15 min. ou 24 horas) entre as células de sete cepas de BAL e AFM_1, as diferenças entre a eficiência de remoção das bactérias viáveis e inviabilizadas termicamente, e a estabilidade do complexo BAL/AFM_1 formado. As três cepas de BAL com maior percentual (> 33%) de remoção da AFM_1 nos ensaios com TFS foram re-avaliadas utilizando-se leite UHT (*ultra-high-temperature*) desnatado artificialmente contaminado com AFM_1. Para isso, foram utilizadas somente células inviabilizadas termicamente, verificando-se o efeito da temperatura (4^oC ou 37^oC) sobre a capacidade de remoção da toxina por 15 minutos. A remoção média da AFM_1 pelas cepas de BAL em TFS variou entre 5,60±0,45 e 45,67±1,65% (n=3), sendo que as células inviáveis obtiveram percentuais de remoção de AFM_1 significativamente maiores que as células viáveis, em ambos os tempos de contato analisados (15 min. ou 24 horas), não havendo diferença significativa entre os tempos. Observou-se que o complexo BAL/AFM_1 obtido nos ensaios com TFS é instável, pois 40,57±4,66 a 87,37±1,82% da AFM_1 retida pela bactéria foram recuperados em solução após a lavagem do complexo com TFS. As três cepas de BAL com maior percentual de remoção da AFM_1 em TFS (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Bifidobacterium lactis*) não apresentaram diferenças significativas nos ensaios com leite UHT a 37ºC. Somente *B. lactis* apresentou maior capacidade de remover a AFM_1 do leite UHT a 4ºC. Os resultados demonstraram que a remoção de AFM_1 empregando-se as BAL em alimentos é viável para reduzir as concentrações da toxina a níveis seguros. Entretanto, estudos adicionais são necessários a fim de investigar os mecanismos envolvidos na remoção da toxina pelas BAL com vistas à aplicação em indústrias de alimentos.

Palavras-chave: Aflatoxina M_1, Bactérias ácido-láticas, Descontaminação, Leite

ABSTRACT

BOVO, F. **Evaluation of the efficiency of lactic acid bacteria for the decontamination of aflatoxin M_1**. 2011. 69p. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

The purpose of this study was to evaluate the ability of strains of lactic acid bacteria (LAB) to remove aflatoxin M_1 (AFM_1) in phosphate buffer saline (PBS) and in milk samples. In the assays with PBS, the influence of contact time (15 min. or 24 hours) between the cells of seven LAB strains and AFM_1 was evaluated, as well as the differences between the removal efficiency of viable and non-viable (heat-killed) bacteria, and the stability of AFM_1/LAB complex produced. The three LAB strains with the highest percentage (> 33%) of AFM_1 removal in the tests with PBS were re-evaluated using UHT (ultra-high-temperature) skimmed milk spiked with AFM_1. For these assays, only non-viable bacterial cells were used for checking the effect of temperature (4°C or 37°C) on the toxin removal capacity during 15 min. The mean AFM_1 removal by LAB strains in PBS ranged from 5.60±0.45 and 45.67±1.65% (n=3). Non-viable cells showed AFM_1 removal percentages significantly higher than viable cells in both contact times (15 min. or 24 hours), although there were not significant differences between these contact times. The AFM_1/LAB complex resulted from the tests with PBS was unstable, as 40.57±4.66 to 87.37±1.82% of AFM_1 retained by the bacteria were recovered in solution after washing the complex with PBS. The three LAB strains with the highest percentage of AFM_1 removal in the PBS assays (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Bifidobacterium lactis*) showed no significant differences in the UHT skimmed milk assays at 37°C. Only *B. lactis* had greater ability to remove AFM_1 in UHT milk at 4°C. The results demonstrated that the removal of AFM_1 by using LAB in foods is viable to reduce the toxin concentrations until safe levels. However, additional studies are needed to investigate the mechanisms involved in the toxin removal by LAB aiming its application in food industries.

Keywords: Aflatoxin M_1, Lactic acid bacteria, Decontamination, Milk

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura das principais aflatoxinas existentes.....19

Figura 2 – Metabolismo da AFB_1 no fígado. Adaptado de Inchem (1979).....25

Figura 3 – Fluxograma das análises para contagem de BAL.....36

Figura 4 – Fluxograma dos ensaios de remoção de AFM_1 pelas BAL em TFS.....38

Figura 5 – Colunas de imunoafinidade acopladas a um *manifold* e bomba de vácuo. 41

Figura 6 – Processo de eluição da AFM_1 em coluna de imunoafinidade. 41

Figura 7 – Fluxograma dos ensaios de remoção de AFM_1 pelas BAL em leite UHT.42

Figura 8 – Curvas de concentração bacteriana para as sete cepas de BAL.....45

Figura 9 – Placa de Petri com colônias típicas de *Lactobacillus plantarum*. 45

Figura 10 – Cromatograma do controle positivo.....46

Figura 11 – Cromatograma de uma amostra de células viáveis de *Lactobacillus plantarum* no tempo de contato de 15 minutos. 47

Figura 12 – Cromatograma de uma amostra de células inviáveis de *Enterococcus avium* no tempo de contato de 15 minutos.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de aflatoxina M_1 determinados em leite e derivados no Brasil. 21

Tabela 2 – Ingestão diária de AFM_1 em todos os tipos de leite nas 5 regiões mundiais. 22

Tabela 3 – Cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de remoção da AFM_1. 34

Tabela 4 – Valores de absorbância e concentração bacteriana. 44

Tabela 5 – Percentual de remoção[1] de AFM_1 em solução TFS[2]. 48

Tabela 6 – Percentual[1] de AFM_1 recuperada em solução após lavagem com TFS[2]. 54

Tabela 7 – Percentual de remoção[1] da AFM_1 em leite UHT desnatado[2]. 56

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AFB_1	Aflatoxina B_1
AFB_2	Aflatoxina B_2
AFBO	Aflatoxina B_1-8,9-epóxido
AFG_1	Aflatoxina G_1
AFG_2	Aflatoxina G_2
AFM_1	Aflatoxina M_1
BAL	Bactérias ácido-láticas
^oC	Graus Celsius
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
Kg	Kilograma
L	Litro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MRS	Man, Rogosa & Sharpe
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma
Nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
TFS	Tampão fosfato salina
UHT	*Ultra-high-temperature*
UFC	Unidades formadoras de colônias
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução 13
2. Revisão de Literatura 16
2.1. Aflatoxinas 16
2.2. Propriedades toxicológicas das aflatoxinas 19
2.3. Descontaminação de aflatoxinas por bactérias ácido-láticas 27
3. Metodologia 34
3.1. Bactérias, condições de cultivo e estimativa da concentração bacteriana ... 34
3.2. Ensaio de remoção da aflatoxina M_1 em solução TFS 36
3.3. Quantificação da Aflatoxina M_1 em TFS através de CLAE 39
3.4. Ensaio de remoção da aflatoxina M_1 pelas BAL mais eficientes em leite UHT desnatado 40
3.5. Análise dos resultados 43
4. Resultados e Discussão 44
4.1. Curva de concentração bacteriana 44
4.2. Remoção da AFM_1 em solução TFS 46
4.3. Avaliação da estabilidade do complexo BAL/AFM_1 53
4.4. Remoção da AFM_1 em leite UHT desnatado 55
5. Conclusões 59
6. Referências 61

1. Introdução

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por fungos filamentosos. Dentre todas as micotoxinas existentes, as aflatoxinas, as quais são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em condições de clima quente e úmido, destacam-se devido à sua ampla distribuição em alimentos e por suas propriedades tóxicas acentuadas. Existem, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém a mais prevalente e tóxica é a aflatoxina B_1 (AFB_1), que quando ingerida por animais domésticos, entre eles o gado leiteiro, através do consumo de rações ou alimentos contaminados, sofre biotransformação hepática convertendo-se em aflatoxina M_1 (AFM_1), a qual é excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais.

Historicamente, os níveis de contaminação de leite e derivados com AFM_1 têm estado geralmente abaixo dos limites impostos pela legislação brasileira. No entanto, a alta incidência de AFM_1 nesses produtos gera uma preocupação constante, pois o leite é o principal nutriente para o desenvolvimento de crianças, cuja sensibilidade é notável e potencialmente maior que em adultos. Deste modo, a ocorrência de AFM_1 no leite e nos produtos lácteos é considerada um grave problema de Saúde Pública. Além disso, os limites regulatórios impostos pelos países apresentam uma grande variação, sendo que geralmente os países em desenvolvimento são os que possuem os maiores níveis de tolerância.

As aflatoxinas podem causar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e imunossupressivos em seres humanos e animais, sendo que a exposição crônica a essa toxina leva principalmente ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Além dos riscos à saúde, as aflatoxinas representam um sério problema financeiro, gerando perdas econômicas de milhões de dólares, pois proporcionam menor eficiência na produção agropecuária e industrial, como perda na qualidade, menor rendimento e defeitos nos produtos.

A preocupação relacionada aos impactos negativos das aflatoxinas sobre a saúde levou à investigação de estratégias para prevenir a sua formação em

alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade destas toxinas em produtos contaminados. Considera-se como ideal a prevenção da contaminação já no campo, evitando-se a produção das aflatoxinas pelos fungos através de melhorias das práticas agrícolas e controle das condições de armazenamento dos produtos, além da utilização de outros meios, tais como a utilização de agentes antifúngicos e engenharia genética. Entretanto, as dificuldades de ordem prática para prevenir a contaminação tornam necessário o desenvolvimento de métodos de descontaminação de produtos alimentícios que sejam seguros, eficientes, específicos, apresentem custo-benefício e sejam ambientalmente corretos.

A utilização de microrganismos oferece uma alternativa interessante para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança, sendo que as bactérias ácido-láticas (BAL) vêm sendo amplamente estudadas e tem demonstrado grande capacidade de remoção da AFB_1 em um meio contaminado. Essas bactérias são capazes de fermentar açúcares e tem o ácido lático como principal produto de seu metabolismo, o que faz com que constantemente sejam utilizadas como agentes conservadores em produtos alimentícios fermentados, aumentando sua vida de prateleira e suas propriedades sensoriais. Portanto, além de se utilizar as bactérias para a fermentação e conservação de alimentos, existe a possibilidade de utilizá-las como agentes descontaminantes de aflatoxinas, seja como parte de uma cultura *starter* ou como um componente purificado que pode ser adicionado ao alimento sem comprometer suas características finais.

Com base nos aspectos mencionados, e considerando-se que existem poucos dados na literatura sobre a capacidade de bactérias ácido-láticas em remover a AFM_1 de um meio contaminado, estabeleceram-se os seguintes objetivos para o presente trabalho:

1) Determinar a capacidade de 7 cepas de BAL em remover a AFM_1 presente em solução tampão fosfato (TFS) contaminada, analisando-se a influência do tempo de contato (15 minutos e 24 horas) entre as células bacterianas e a micotoxina;

2) Verificar as diferenças entre a eficiência de remoção das células viáveis e inviabilizadas termicamente (fervura a 100°C por 1 hora) em TFS;

3) Avaliar a estabilidade do complexo formado entre as BAL e a AFM_1 através da lavagem dos *pellets* bacterianos produzidos em TFS;

4) Determinar a capacidade de remoção da AFM_1 pelas 3 cepas de BAL com maior percentual de remoção nos ensaios com TFS, em leite UHT (*ultra-high-temperature*) desnatado artificialmente contaminado, utilizando-se apenas as células inviabilizadas termicamente e analisando-se o efeito da temperatura (4^oC e 37^oC) pelo tempo de 15 minutos sobre essa capacidade de remoção.

2. Revisão de Literatura

2.1. Aflatoxinas

Os fungos são organismos eucarióticos, unicelulares, multinucleados e heterotróficos, caracterizados por uma parede celular quitinosa, a maioria apresentando crescimento filamentoso e em colônias multicelulares (agrupados como micélio). Podem prosperar em quase todas as condições climáticas do mundo e em qualquer suporte sólido ou líquido, desenvolvendo-se em temperaturas entre 10°C e 40°C, em um intervalo de pH de 4 a 8 e em atividade de água acima de 0,70 (podendo também crescer em uma superfície muito seca) (BHAT et al., 2010).

Atualmente, cerca de 100.000 fungos já foram identificados, dos quais mais de 400 podem ser considerados potencialmente toxigênicos e cerca de 5% são conhecidos por produzir compostos tóxicos ou classes de compostos que causam efeitos adversos em animais e humanos ao redor do mundo (BATA & LASZTITY, 1999).

Esses compostos, denominados micotoxinas, são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos pelos micélios ou esporos de fungos filamentosos, que não apresentam significância bioquímica no crescimento e desenvolvimento do fungo (GONÇALEZ et al., 2001; HUSSEIN & BRASEL, 2001). D'Mello & Macdonald (1997) sugerem que a produção das micotoxinas é geralmente limitada a um número relativamente pequeno de espécies de fungos, podendo ser toda a espécie produtora ou apenas uma cepa específica. Quanto mais complexo for o caminho da síntese de uma micotoxina, menor o número de espécies de fungos que a produzem.

O termo micotoxina é derivado da palavra grega "Mykes" que significa fungo e da palavra latina "Toxicum" que significa veneno ou toxina (GONÇALEZ et al., 2001). As micotoxinas são classificadas como o mais importante fator de risco não-infeccioso e crônico alimentar, sendo superior ao dos contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentares ou resíduos de pesticidas. Homem e animais

podem ser levados a quadros de intoxicação aguda ou crônica através da ingestão de micotoxinas, sendo a condição patológica resultante desta ingestão a micotoxicose (NIERMAN et al., 2008). Fatores que afetam a magnitude dessa toxicidade em seres humanos ou animais incluem espécies, modos de ação, metabolismo e mecanismos de defesa (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

Analisando-se a história da humanidade, percebe-se que as micotoxinas afetam a produção agrícola desde seus primórdios, já que inúmeros casos de contaminação foram mencionados ao longo do tempo. Envenenamento por ergotamina é citado na Bíblia e postula-se que as toxinas produzidas por *Fusarium* e a zearalenona foram o motivo para a erradicação dos etruscos e da peste em Atenas no século V a.C. Posteriormente, as toxinas do *Fusarium* causaram doenças em humanos e animais desde o período medieval na Europa até os tempos coloniais na América. Na Idade Média, uma epidemia de ergotismo ou Fogo de Santo Antônio, causado por toxinas produzidas por *Claviceps purpúrea*, levou muitas pessoas à morte em fogueiras acusadas de bruxaria, já que os sintomas dessa intoxicação eram alucinações e inchaço dos membros com sensação de queimação, o que não era compreendido por religiosos da época. Há também especulações de que mortes súbitas misteriosas de arqueólogos ao entrar em tumbas egípcias foram causadas por inalação de micotoxinas, a ocratoxina A em particular (BARTOSZEK, 2006).

Atualmente, cerca de 400 tipos de micotoxinas já foram descobertos, sendo estas geralmente divididas em grupos com base em similaridades estruturais e seus maiores efeitos tóxicos (BHAT et al., 2010). De todas as micotoxinas isoladas, uma das mais conhecidas e amplamente distribuídas em alimentos, e que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas são as aflatoxinas (AN, 2005). Estas são predominantemente produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, mas também podem ser produzidas por outras cepas como *A. nominus*, *A. tamarii* e *A. pseudotamarii* (ALBERTS et al., 2006).

A palavra aflatoxina é derivada da combinação de “a” para o gênero *Aspergillus*, “fla” devido à espécie *flavus* e “toxina” que significa veneno. Sua descoberta foi no ano de 1960 devido à ocorrência de um grave surto causado por uma doença desconhecida (“Doença X”), que resultou na morte de mais de 100 mil perus e outros animais, os quais tinham sido alimentados com amendoim brasileiro contaminado com *A. flavus*. Entretanto, não apenas o amendoim pode sofrer

contaminação por fungos aflatoxigênicos, mas também outros alimentos como cereais (milho, sorgo, milheto, arroz, trigo), especiarias (pimenta, coentro, açafrão, gengibre), oleaginosas (soja, girassol, semente de algodão) e frutas secas (pistache, amêndoas, nozes, castanha do Brasil, coco) (CHU, 1991; BHAT et al., 2010). Destaca-se que a contaminação pode ocorrer, direta ou indiretamente, em qualquer momento durante a produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento (PARK & LIANG, 1993).

As aflatoxinas apresentam ocorrência no mundo inteiro, principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical, sendo que as espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer em uma ampla variedade de substratos e sob diversas condições ambientais. A formação da toxina nos produtos agrícolas ocorre em condições de tempo quente e úmido, e em instalações de armazenagem deficiente ou inadequada, sendo que os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a produção de aflatoxinas são a umidade relativa, que na maioria dos casos a faixa requerida é de 88% a 95% (PARK & LIANG, 1993), e a temperatura, sendo a ótima para o crescimento do fungo de 36°C a 38°C e para a produção máxima de toxina de 25°C a 27℃ (ABBAS, 2005).

Outros fatores que podem ainda influenciar a produção de aflatoxinas são: composição do substrato, pH, atmosfera (teor de oxigênio e de dióxido de carbono), competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante, especificidade e variação da cepa, instabilidade das propriedades toxigênicas, estresse da planta, infestação por insetos e uso de fungicidas ou fertilizantes (GONÇALEZ et al., 2001; HUSSEIN & BRASEL, 2001; MAGAN & OLSEN, 2006). É importante lembrar que o nível de contaminação é cumulativo, portanto a época de colheita e as condições de secagem e armazenamento podem desempenhar um papel igualmente importante na produção de aflatoxina (PRANDINI et al., 2009).

2.2. Propriedades toxicológicas das aflatoxinas

São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados, com base na sua fluorescência sob a luz ultravioleta (B = *Blue* e G = *Green*), como aflatoxina B_1 (AFB_1), B_2 (AFB_2), G_1 (AFG_1) e G_2, (AFG_2), sendo que destes compostos a AFB_1 é a mais prevalente e tóxica (OLIVEIRA & GERMANO, 1997).

Quando a AFB_1 é ingerida por animais domésticos, entre eles o gado leiteiro, através do consumo de rações ou alimentos contaminados, parte dela é degradada no rúmen por seus microrganismos, resultando na formação de aflatoxicol. A parte restante é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva (FINK-GREMMELS, 2008) e sofre biotransformação hepática convertendo-se em aflatoxina M_1 (AFM_1), sendo, portanto, uma forma hidroxilada da AFB_1 que é excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais (OATLEY et al., 2000; PELTONEM et al., 2001; MURPHY et al., 2006). Creppy (2002) relata que da totalidade de AFB_1 ingerida através da ração, aproximadamente 0,3% a 6,2% é transformada em AFM_1 no leite, e Bakirci (2001) afirma que existe ainda uma relação linear entre a quantidade de AFM_1 no leite e a ração contaminada por AFB_1 consumida pelos animais. Observa-se na Figura 1 as estruturas das principais aflatoxinas existentes.

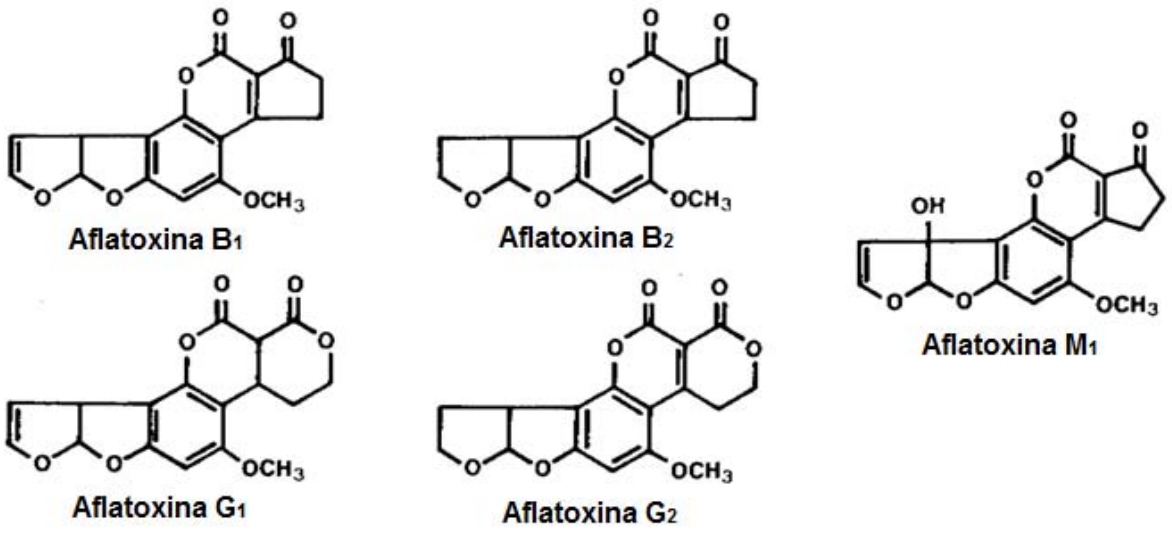

Figura 1 – Estrutura das principais aflatoxinas existentes.

Muitas pesquisas têm sido realizadas para a determinação dos níveis de contaminação por AFM_1 em leite e seus derivados em diversos países do mundo. Na Turquia, Çelik et al. (2005) realizaram análises para detecção de AFM_1 em leite pasteurizado e encontraram que 88,23% das amostras eram positivas com contaminação entre 5,2 e 127,5 ng/L. Galvano et al. (1998) detectaram, na Itália, AFM_1 em mais de 80% das amostras de leite fluido, leite em pó e iogurte, com níveis médios de 10 ng/L, 21 ng/kg e 18 ng/L, respectivamente. Kim et al. (2000) analisaram leite pasteurizado, fórmula infantil, leite em pó e iogurte, na Coréia do Sul, observando incidências de 76, 85, 75 e 83%, respectivamente; os autores obtiveram níveis médios de contaminação de 18, 46, 200 e 29 ng/kg, respectivamente.

No Brasil, os dados referentes à incidência de AFM_1 em leite e derivados indicam que a freqüência da toxina em nossas condições é alta, porém de modo geral em níveis relativamente baixos, conforme pode ser observado em alguns trabalhos recentes apresentados na Tabela 1.

A partir da observação de que o consumo de rações contaminadas por AFB_1 por animais leiteiros pode levar à excreção de AFM_1 no leite, destacam-se alguns fatores nutricionais e fisiológicos que podem influenciar na taxa de conversão da AFB_1 para a AFM_1, tais como o regime de alimentação, a taxa de ingestão, a saúde do animal, a capacidade de biotransformação hepática, a presença de infecções no úbere, o período de lactação (no início da lactação essa taxa é cerca de 3,5 vezes maior em comparação com a fase de lactação avançada) e a produção de leite. Portanto, a taxa de absorção de aflatoxinas e a excreção de AFM_1 no leite variam entre cada animal, de dia para dia, e de ordenha para ordenha (FINK-GREMMELS, 2008).

Prandini et al. (2009) explica que vacas que ingerem uma quantidade de AFB_1 menor que 40 µg/cabeça/dia produzem um leite com teor de AFM_1 menor que 0,05 µg/kg, e que as reações de produção de AFM_1 são muito rápidas, pois a AFM_1 aparece no leite 2 a 3 dias após a ingestão da ração contaminada, assim como o nível de AFM_1 no leite é reduzido a zero também em 2 a 3 dias, quando o animal é alimentado com uma dieta sem aflatoxinas.

Tabela 1 – Níveis de aflatoxina M_1 determinados em leite e derivados no Brasil.

Alimento	Concentração		NC/NA (%)[a]	Referência
	Faixa (ng/L ou kg)	Média ± DP (ng/L ou kg)		
Queijo Minas	20 – 6.920	NE	66/75 (88)	Prado et al. (2000)
Leite pasteurizado e UHT	15 – 500	NE	111/139 (80)	Garrido et al. (2003)
Leite pasteurizado tipo A	11 – 251	60 ± 80	37/48 (77)	Oliveira et al. (2006)
Leite pasteurizado tipo B		56 ± 63		
Leite pasteurizado tipo C		64 ± 41		
Leite UHT		75 ± 48		
Leite cru, pasteurizado e UHT	2 – 26	NE	79/107 (73,8)	Shundo & Sabino (2006)
Leite de cabra	11 – 161	62 ± 40	25/36 (69,4)	Oliveira & Ferraz (2007)
Leite cru	10 – 645	104 ± 138		Oliveira et al. (2008)
Leite em pó, pasteurizado e UHT	10 – 200	31	119/125 (95,2)	Shundo et al.(2009)

[a] NC/NA: Número de amostras contaminadas / número de amostras analisadas.

DP: Desvio padrão.

NE: Não encontrado.

De acordo com Galvano et al. (1996) e Prandini et al. (2009), o leite é o alimento que demonstra o maior potencial para a introdução de resíduos de aflatoxina na alimentação humana. Além disso, como o leite é o principal nutriente para o crescimento de crianças, cuja sensibilidade é notável e potencialmente maior que em adultos, a ocorrência de AFM_1 no leite materno e nos produtos lácteos é um dos mais graves problemas de higiene alimentar. Os mesmos autores ressaltam que os tratamentos térmicos do leite, como pasteurização e secagem, não causam a redução da AFM_1, já que esta apresenta termorresistência; e que a distribuição da AFM_1 no leite não é homogênea, estando 80% dela localizada na parte não gordurosa do leite ligada à caseína. Assim, nos processos que envolvem a separação de gordura, a AFM_1 predominará na fração não gordurosa, o que pode

ser explicado devido ao seu caráter semipolar, e nos processos de fabricação de queijos ocorrerá um fator de enriquecimento da AFM_1, pois sua concentração é aproximadamente 3 vezes maior em queijos macios e 5 vezes maior em queijos de massa dura comparados ao leite.

Kuiper-Goodman (1990) estabeleceu uma ingestão diária tolerável de AFM_1 para os seres humanos em 0,2 ng/kg de peso coporal, sendo assim, uma pessoa de 60 kg ingeriria cerca de 12 ng/dia de AFM_1. Observa-se, na Tabela 2, os valores médios do consumo de leite e da ingestão diária de AFM_1 divulgados no relatório da FAO/OMS (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação / Organização Mundial de Saúde) em 2001 (JEFCA, 2001). Pode-se perceber que a região da África é a que apresenta a menor ingestão diária de AFM_1 por pessoa (0,1 ng/pessoa/dia) e que a região do Oriente Médio é a que apresenta a maior ingestão diária por pessoa (12 ng/pessoa/dia), cujo valor permanece, ainda, dentro do limite tolerável estabelecido acima. Já Revankar (2003) estima que o consumo de aflatoxinas por humanos varie entre 0 e 30.000 ng/kg/dia com uma ingestão média de 10 a 200 ng/kg/dia.

Tabela 2 – Ingestão diária de AFM_1 em todos os tipos de leite nas 5 regiões mundiais.

Dieta regional*	Ingestão de leite (kg/dia)	Aflatoxina no leite (µg/kg)	Ingestão de aflatoxina	
			ng/pessoa/dia**	ng/kg corpóreo/dia
Européia	0,290	0,023	6,8	0,110
América Latina	0,160	0,022	3,5	0,058
Extremo Oriente	0,032	0,360	12,0	0,200
Oriente Médio	0,120	0,005	0,6	0,100
África	0,042	0,022	0,1	0,002

*Países de cada região que forneceram dados para o cálculo das médias: Européia (Canadá, nove membros da União Européia, Noruega, Polônia e Estados Unidos), América Latina (Argentina, Brasil e Uruguai), Extremo Oriente (Índia, Indonésia, Filipinas, República da Coréia e Tailândia), Oriente Médio (Grécia e Emirados Árabes Unidos) e África (Egito).

**Pessoa com peso corporal de 60 kg.

Fonte: JEFCA, 2001.

Sérios riscos à saúde humana e animal podem ser causados pelas aflatoxinas, pois estas apresentam efeitos tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e imunosupressivos (PIERIDES et al., 2000; HERNANDEZ-MENDOZA et al., 2009a), sendo estes influenciados pela variação da espécie, sexo, idade, estado nutricional e os efeitos de outros produtos químicos, além da dose e o período de exposição do organismo à toxina (MISHRA & DAS, 2003).

Em 1993, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993), classificou a AFB_1 como pertencente ao Grupo 1, carcinogênica para humanos, e a AFM_1 como pertencente ao grupo 2B, possivelmente carcinogênica para humanos. Entretanto, em 2002, após a realização de novas pesquisas e uma reconsideração de sua carcinogenicidade, a AFM_1 foi reclassificada passando do grupo 2 para o grupo 1, mesmo sendo aproximadamente 10 vezes menos carcinogênica que AFB_1 (IARC, 2002).

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

Hussein & Brasel (2001) explicam que para os seres humanos, o maior risco das aflatoxinas é a exposição crônica causando o carcinoma hepatocelular, que pode ser agravado pelo vírus da hepatite A. Os mesmos autores também comentam que aflatoxinas foram encontradas em tecidos de crianças que sofrem de síndrome de Reye (encefalopatia com lesões graves nos rins e fígado após gripe ou varicela) e de Kwashiorkor (desnutrição energético-protéica), considerando-se, portanto, ser um fator que contribui para essas doenças.

Entre os animais, os monogástricos, como aves e suínos, são os que apresentam maior risco de contaminação, já que grande parte de sua dieta basal é constituída de cereais, além de estes animais não terem reservatório ruminal com

alguns tipos de microorganismos que podem degradar as toxinas antes que sejam absorvidas pelo intestino. Os principais sintomas da aflatoxicose aguda em mamíferos incluem letargia, ataxia, pêlos arrepiados e inchaço do fígado, enquanto que com a exposição crônica, os sintomas incluem a redução da eficiência alimentar e da produção de leite e diminuição do apetite (PARK et al., 2000; BHAT et al., 2010).

A AFB_1 é metabolizada pelo fígado através do sistema enzimático citocromo P450, podendo seguir 4 diferentes caminhos metabólicos: O-desalquilação a aflatoxina P_1, quetoredução a aflatoxicol, epoxidação a AFB_1-8,9-epóxido (AFBO) (altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico), ou, ainda, hidroxilação a AFM_1 (altamente tóxica), aflatoxina Q_1 ou aflatoxina B_{2a} (ambas relativamente não tóxicas). Assim, as principais reações no metabolismo das aflatoxinas são hidroxilação, oxidação e desmetilação (WU et al., 2009), as quais podem ser observadas mais claramente na Figura 2.

Depois de metabolizada, a AFBO pode se ligar às macromoléculas celulares, incluindo o material genético, como, por exemplo, as proteínas e DNA, formando adutos com os ácidos nucléicos (MURPHY et al., 2006). Os adutos formados convertem-se em um anel aberto estável derivado da formamidopirimidina, sendo que o reparo dessas lesões leva ao aparecimento de mutações genéticas e câncer. Metabólitos hidroxilados e outras aflatoxinas que ocorrem naturalmente são substratos pobres para a reação de epoxidação e, consequentemente, são menos mutagênicos e carcinogênicos (BARTOSZEK, 2006). A excreção de alguns desses compostos na urina de pessoas infectadas, não só serve como prova de que os seres humanos têm os caminhos bioquímicos necessários para a carcinogênese, mas também oferece um biomarcador confiável para a exposição à AFB_1 (MURPHY et al., 2006).

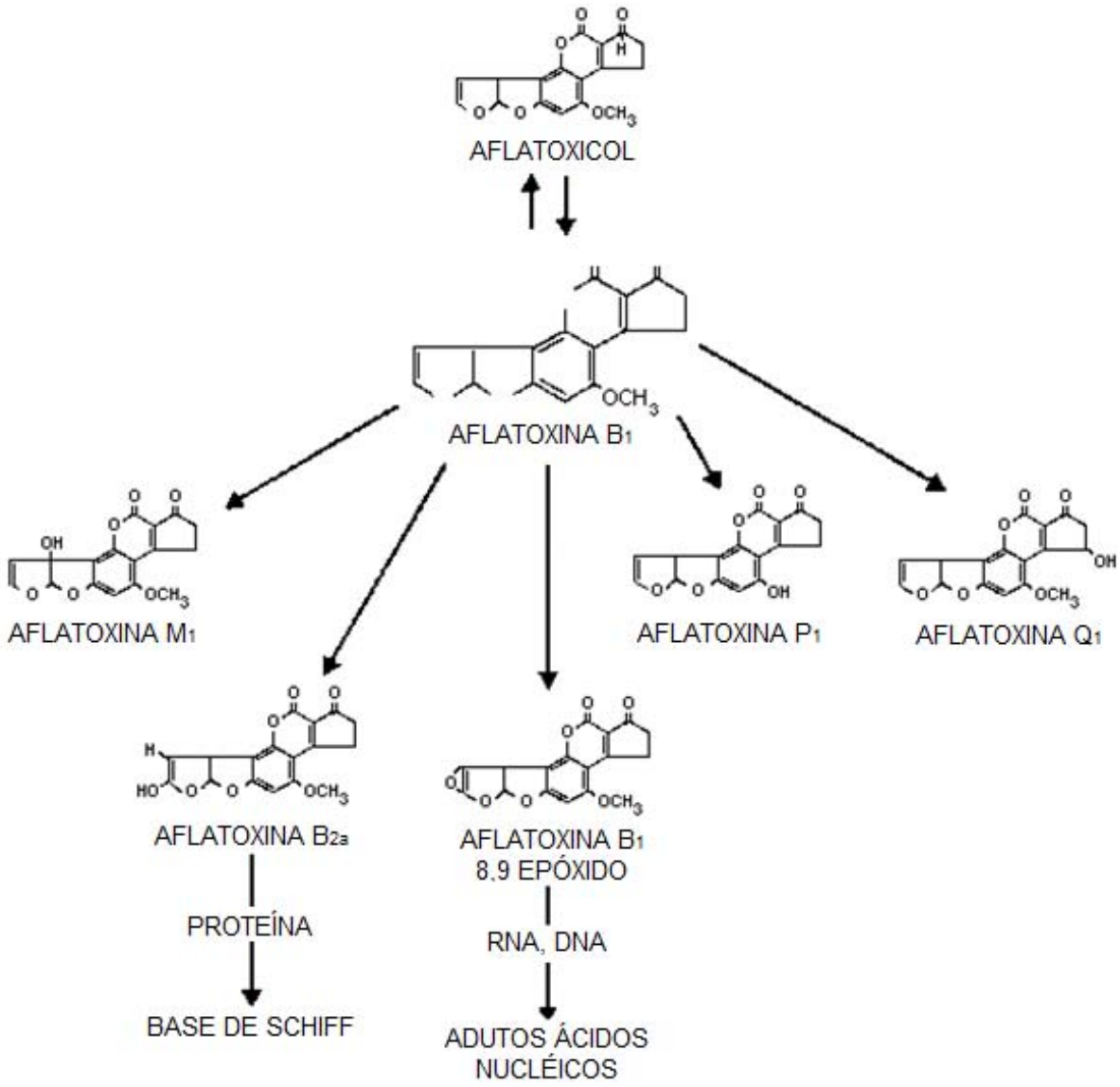

Figura 2 – Metabolismo da AFB_1 no fígado. Adaptado de Inchem (1979).

Além dos riscos à saúde, as aflatoxinas representam um sério problema à economia, pois os danos causados por elas estão relacionados a uma menor eficiência na produção agropecuária e industrial, como perda na qualidade, bem como a um menor rendimento e defeitos nos produtos (BATA & LASZTITY, 1999; HASKARD et al., 2001). Alberts et al. (2009) relatam que, em alguns estados dos Estados Unidos da América (EUA), as perdas econômicas na agropecuária chegam a 100 milhões de dólares. Já Oluwafemi & Da Silva (2009) afirmam que essas perdas devido à contaminação por fungos e micotoxinas são superiores a 1,6 bilhões de dólares nos EUA e que as nações africanas perdem cerca de 670 bilhões

de dólares devido a bloqueios no comércio de alimentos contaminados com aflatoxinas.

O potencial risco que as aflatoxinas causam para a saúde humana tem levado à criação de programas de monitoramento da toxina em diversas matérias-primas, bem como a ações de regulamentação por quase todos os países ao redor do mundo (CHU, 1991). Uma pesquisa realizada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) no ano de 2002 apontou que aproximadamente 100 países possuem legislação específica para a presença de aflatoxinas em alimentos, produtos lácteos e/ou rações, sendo que a população total desses países representava aproximadamente 90% da população mundial. A mesma pesquisa ainda mostrou que as legislações para aflatoxina estão ficando cada vez mais diversas e detalhadas, incluindo métodos de amostragem e metodologia analítica (VAN EGMOND & JONKER, 2004).

Nos países que possuem esse tipo de legislação, os níveis de tolerância para aflatoxina total (soma das aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2) variam entre 1 e 35 µg/kg para alimentos, sendo o valor médio de 10 µg/kg, e variam entre zero e 50 µg/kg para rações, com valor médio de 20 µg/kg. Para AFM_1 em leite, os níveis de tolerância estão entre 0,05 e 0,5 µg/kg, sendo que a maioria dos países adota o limite de 0,05 µg/kg (ABBAS, 2005).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Além da Portaria No.183, de 21 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, que internalizou as normas do MERCOSUL GMC/RES. No.56/94, adotando limites máximos admissíveis de aflatoxinas no leite, amendoim e milho (BRASIL, 1996), o Ministério da Saúde, através da Resolução 274, de 15 de outubro de 2002, estabeleceu limites máximos de AFM_1 admissíveis no leite fluido (0,5 µg/L) e em pó (5,0 µg/kg), assim como os limites máximos para aflatoxina total em amendoim e milho (20,0 µg/kg) (BRASIL, 2002).

2.3. Descontaminação de aflatoxinas por bactérias ácido-láticas

A preocupação relacionada aos impactos negativos das aflatoxinas sobre a saúde levou à investigação de estratégias para prevenir a sua formação em alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade destas toxinas em produtos contaminados (HERNANDEZ-MENDOZA et al., 2009a).

Para prevenir a contaminação utilizam-se métodos de melhoria das práticas agrícolas, agentes antifúngicos, engenharia genética e controle das condições de armazenamento (GONÇALEZ et al., 2001). Para reduzir a biodisponibilidade, utiliza-se a enteroadsorção, que é feita através da adição na dieta de compostos adsorventes nutricionalmente inertes, os quais são agentes sequestrantes de micotoxinas, pois evitam sua absorção no trato gastrointestinal dos animais, impossibilitando a sua distribuição para o órgão-alvo (GRATZ et al., 2005; SEKIYAMA et al., 2007), sendo que esse método tem uma aplicação prática limitada devido à questão de segurança dos adsorventes usados, já que podem alterar o valor nutricional adsorvendo minerais e vitaminas e podem produzir dioxinas (HUSSEIN & BRASEL, 2001), além da dificuldade de aplicação em alimentos para humanos (EL-NEZAMI et al., 1998a).

Por último, para eliminar ou inativar, isto é, para realizar a descontaminação utilizam-se métodos físicos, químicos e biológicos, os quais devem ter como características a completa inativação, destruição ou remoção da toxina; não produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos, preservando seu valor nutritivo e palatabilidade; destruir os esporos e as micelas de fungos para prevenir a produção ou o reaparecimento da toxina; não modificar as propriedades físicas do alimento significativamente, possuir um custo acessível e ser de fácil utilização (BATA & LASZTITY, 1999; MAGAN & OLSEN, 2006).

Os métodos físicos de descontaminação de micotoxinas envolvem procedimentos como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes, e os métodos químicos utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas, como o uso de cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio) ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia). Entretanto, ambos os métodos

possuem desvantagens, seja por não removerem eficientemente, ou então, por apresentarem altos custos ou proporcionarem perdas nutricionais e organolépticas aos produtos (LINE & BRACKETT, 1995; EL-NEZAMI et al., 1998b). Os métodos biológicos decorrem da atuação de microorganismos, como por exemplo, leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas, entre outros, sobre as micotoxinas através de mecanismos como competição por nutrientes e espaço, interações e antibiose (FAZELI et al., 2009).

A biodegradação de aflatoxinas utilizando microorganismos oferece uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança (ALBERTS et al., 2009), além de poder ser utilizada como um apelo de mais “natural”, já que a resistência do consumidor a tratamentos químicos continua a crescer (BATA & LASZTITY, 1999). Os métodos de descontaminação biológicos estão sendo amplamente estudados e podem ser uma escolha muito promissora, desde que apresentem eficiência, especificidade, custo-benefício e que sejam ambientalmente corretos (WU et al., 2009). Dentre todos os tipos de microrganismos existentes e que podem ser utilizados para a remoção de aflatoxinas do meio contaminado, as bactérias ácido-láticas (BAL) são umas das mais estudadas e que apresentam resultados mais promissores.

As BAL são um grande grupo de bactérias geneticamente diversas, que além de produzirem o ácido lático como principal produto do seu metabolismo, possuem características comuns como serem gram-positivas, não-esporogênicas, não se locomoverem espontaneamente, e serem catalase e oxidase negativas. Portanto, elas crescem anaerobicamente, mas são aero-tolerantes. Além disso, elas obrigatoriamente fermentam açúcares e tendem a ser nutricionalmente exigentes, freqüentemente requerendo aminoácidos específicos e vitaminas do complexo B como fatores de crescimento (WALSTRA et al., 2006). Vários gêneros de BAL, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactococcus*, são conhecidos por sua capacidade de atuar como agentes conservadores em produtos alimentícios fermentados, como vegetais, cereais, produtos lácteos e carnes (PELTONEM et al., 2001).

A fermentação proporciona uma maior vida de prateleira e melhora das propriedades sensoriais e nutricionais do produto, pois através do processo fermentativo do açúcar tem-se o abaixamento do pH inibindo o crescimento de

microrganismos deteriorantes e patogênicos, também ocorrendo a hidrólise de proteínas que proporciona melhora na textura e sabor, síntese de componente aromáticos, síntese de agentes texturizantes que influenciam na consistência do produto, e produção de componentes inibitórios (SALMINEN, 2004; SYBESMA & HUGENHOLTZ, 2004). Esta inibição é, em parte, devido aos produtos finais da fermentação, como ácido lático, diacetil, acetaldeído e ácido acético, que podem acumular para níveis inibitórios em certos alimentos e bebidas. Em outros casos, a inibição pode, ainda, ser causada por subprodutos secundários da atividade metabólica, tais como peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas (ONILUDE et al., 2005).

Portanto, dois aspectos podem ser considerados quando se utilizam as BAL: a fermentação e a antibiose. No primeiro caso, a cultura iniciadora adicionada age sobre o substrato, resultando em benefícios ao alimento, e no segundo caso, a cultura iniciadora deve inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que causam danos ao produto ou à saúde humana.

Fuchs et al. (2008) comentam que um dos efeitos identificados das BAL é a proteção contra toxinas contidas nos alimentos, como aminas heterocíclicas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, espécies reativas de oxigênio e micotoxinas. Neste último caso, estudos têm demonstrado que as BAL possuem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, ou ainda, possuem a habilidade de remover a micotoxina do meio minimizando a ação desta.

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

Um dos primeiros estudos nessa área foi o realizado na década de 1960 por Ciegler et al. (1966), quando os autores avaliaram a habilidade de cerca de 1.000 tipos de microrganismos em degradar a aflatoxina, entre eles leveduras, fungos filamentosos, bactérias, actinomicetos, algas e esporos de fungos, sendo que destes apenas a bactéria *Flavobacterium aurantiacum* B-184 (conhecida atualmente como *Nocardia corynebacterioides*) foi capaz de remover irreversivelmente as aflatoxinas da solução.

Depois desse estudo, muitos outros foram realizados, entretanto, os mais significativos na área começaram a aparecer após a década de 1990. El-Nezami et al. (1998b) avaliaram a ação de 7 diferentes tipos de bactérias sobre a AFB_1 e encontraram que algumas cepas de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LC-705) conseguiram remover eficientemente boa parte da micotoxina do meio, alcançando até cerca de 80% de remoção. Haskard et al. (2001) analisaram 9 cepas de *Lactobacillus* spp. e também chegaram ao resultado de que *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LC-705 foram mais eficientes na remoção da AFB_1, chegando a 78,9% e 76,5%, respectivamente. Peltonem et al. (2001) estudaram 15 tipos de BAL, dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e 5 tipos de bifidobactérias, e obtiveram resultados de remoção com a AFB_1 variando de 5,6% a 59,7%, sendo que as cepas de *Lactobacillus amylovorus* (CSCC 5160 e CSCC 5197) e *L. rhamnosus* LC 1/3 foram as que apresentaram melhores resultados, 59,7%, 57,8% e 54,6% respectivamente. Oatley et al. (2000) observaram que diferentes cepas de bifidobactérias removeram de 37% a 46% da AFB_1, e que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* removeram 46% e 37%, respectivamente.

Pode-se observar que dentro de um dado gênero e até mesmo de uma determinada espécie, nem todas as cepas são equivalentes em termos de remoção da toxina, ao contrário, a capacidade de remoção de aflatoxina é uma característica apenas de linhagens específicas, com sua eficácia variando acentuadamente (EL-NEZAMI et al., 2004).

A maioria dos ensaios de remoção de aflatoxinas dos trabalhos citados anteriormente foi realizada em soluções TFS. Shahin (2007) além de testar a habilidade de 27 cepas de *Lactococcus* spp. e 15 cepas de *Streptococcus* spp., isoladas de iogurte, leite cru e queijo *Karish*, em remover AFB_1 em TFS, observando que *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* apresentaram os maiores

níveis de remoção de toxina (54,85% e 81,0%, respectivamente), também testou a habilidade de remoção de AFB_1 das células viáveis e inviáveis em diferentes óleos vegetais, e observou que as células viáveis de *L. lactis* removeram de 71% a 86,7% da AFB_1, enquanto que as células inviáveis removeram 100% da toxina em todos os óleos. Ainda, as células viáveis de *S. thermophilus* removeram de 66,5% a 91,5% da toxina, e as inviáveis de 81,7% a 96,8% da AFB_1.

Rasic et al. (1991) adicionaram AFB_1 ao iogurte e leite acidificado, em concentrações de 1.000 e 1.400 µg/Kg, obtendo a redução da AFB_1 no iogurte (pH 4,0) de 97,8% e 90%, respectivamente, sendo que a diminuição máxima da AFB_1 ocorreu durante a fermentação do leite. Para o leite acidificado com os ácidos cítrico, lático e acético (pH 4,0), a redução da AFB_1 (concentração de 1.000 µg/Kg) foi de 90%, 84% e 73%, respectivamente. Biernasiak et al. (2006) avaliaram a capacidade de bactérias probióticas (*Lactobacillus paracasei, Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em remover a soma das aflatoxinas (B_1, B_2, G_1 e G_2) durante a fermentação de uma massa composta por 50% de farinha de cevada, 45% de farinha de trigo e 5% de farinha de milho, e observaram que após 6 horas de fermentação a quantidade de aflatoxina havia diminuído 18% e 33% para as massas adicionadas em 4 e 40µg de aflatoxina, respectivamente, e após 24 horas a quantidade de aflatoxina diminuiu em 27% e 50%, respectivamente.

A polaridade das toxinas desempenha um papel importante nos mecanismos de ligação. O percentual de aflatoxina removida pelas BAL diminui na seguinte ordem: $AFB_1 > AFB_2 > AFG_1 > AFG_2$, que está correlacionada com a diminuição da polaridade destas toxinas e é consistente com interações hidrofóbicas, as quais provavelmente também desempenham um papel no mecanismo de ligação (KABAK & DOBSON, 2009). A AFM_1 também é removida de maneira menos eficaz que a AFB_1, entretanto, na literatura científica, ainda encontram-se poucos estudos sobre a capacidade das BAL em remover a AFM_1.

Kabak & Var (2008) examinaram a capacidade de 4 cepas de *Lactobacillus* spp. e 2 cepas de *Bifidobacterium* spp. em remover a AFM_1 em TFS e em leite desnatado reconstituído. Em solução TFS, as células viáveis das 6 cepas utilizadas foram capazes de remover de 10,22% a 26,65% da AFM_1 presente na solução, dependendo do nível de contaminação e do período de incubação, enquanto que as

células inviáveis removeram de 14,04% a 28,97% da toxina. Em leite desnatado reconstituído com tempo de incubação de 4 horas, foram removidos 7,85% a 25,94% da AFM_1 pelas células viáveis e 12,85% a 27,31% pelas células inviabilizadas termicamente. Pierides et al. (2000), compararam a atividade de remoção de AFM_1 em TFS (50,7%) com a remoção de AFB_1 na mesma solução (75,3%) por *L. rhamnosus* GG, e concluíram que a remoção da primeira micotoxina foi menos efetiva possivelmente devido à presença de um grupo –OH adicional na molécula de AFM_1 resultando em um aumento de polaridade, o que a torna mais hidrofílica e aumenta sua tendência em ficar retida em soluções aquosas.

Alguns tratamentos físicos, químicos e enzimáticos podem aumentar a habilidade das BAL em unir-se à aflatoxina do meio. A aplicação de ácido clorídrico e tratamento térmico em autoclave ou fervura a 100℃ sobre *L. rhamnosus* GG e LC-705 causaram aumento significativo na remoção da AFB_1, verificando-se que a degradação metabólica por parte das células viáveis das bactérias pode ser descartada como possível mecanismo de atuação (EL-NEZAMI et al., 1998a; EL-NEZAMI et al., 1998b).

Comparando-se a habilidade de células viáveis e tratadas termicamente de bifidobactérias, chegou-se ao resultado de que as células viáveis removeram de 4% a 56% da AFB_1 do meio, enquanto as células inviáveis de 12% a 82% (PELTONEM et al., 2001). Azab et al. (2005) avaliando a influência de tratamentos de inativação sob a capacidade de 4 tipos de *Lactobacillus* spp. em remover a AFB_1, observaram que os tratamentos ácido (58,6% a 87,0%) e térmico (33,5% a 71,9%) aumentaram a capacidade de remoção quando comparados à solução TFS (16,3% a 56,6%), enquanto que os tratamentos alcalino (8,3% a 27,4%) e com etanol (15,9% a 46,5%) diminuíram a quantidade de aflatoxina removida.

Percebe-se que ambas as células, viáveis e inviáveis, conseguem remover a aflatoxina em soluções aquosas. Pelo fato de as células inviáveis conseguirem também realizar essa remoção da toxina, supõe-se que ocorra uma união de natura física com a mesma, ou seja, uma adesão aos componentes da parede celular bacteriana, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, ao invés de ocorrer através de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo da bactéria (BATA & LASZTITY, 1999; LAHTINEN et al., 2004; SHETTY & JESPERSEN, 2006).

Entretanto, não apenas o tipo de cepa bacteriana e a viabilidade das células podem influenciar sobre a formação e a estabilidade do complexo BAL/aflatoxina, mas também muitos outros fatores como a concentração bacteriana, a especificidade da bactéria, o pH, a temperatura de incubação, a adição de nutrientes, os solventes utilizados e outros. Deve-se levar em consideração que a estabilidade do complexo BAL/aflatoxina formado é crítica para uma implementação segura desse método de descontaminação.

Assim, abrem-se perspectivas de utilização das BAL para redução da biodisponibilidade de micotoxinas em alimentos contaminados, seja através da incorporação de uma bactéria específica diretamente no alimento, seja pela inoculação de bactérias em animais desde seu nascimento. O desenvolvimento de um método seguro, barato e que exija baixa tecnologia, desvendando-se todos os efeitos sobre as matrizes alimentícias e sobre os animais, trará inúmeros benefícios, especialmente para os países em desenvolvimento, onde os esforços para combater a contaminação dos alimentos são geralmente limitados pela falta de recursos e tecnologia. O resultado será a melhora da qualidade e segurança dos alimentos e da produção animal, trazendo, consequentemente, benefícios para a saúde humana.

3. Metodologia

3.1. Bactérias, condições de cultivo e estimativa da concentração bacteriana

As bactérias ácido-láticas utilizadas no presente projeto foram originadas de cepas previamente certificadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus, Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Os isolados de BAL, identificados na Tabela 3 com os números 1, 2 e 3, foram provenientes da coleção de culturas lácteas do TECNOLAT – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de Campinas/SP. Os isolados identificados com os números 4, 5 e 6 foram doados gentilmente pela empresa Danisco Brasil Ltda., enquanto que a cepa de número 7 foi obtida na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello localizada em Campinas/SP.

Tabela 3 – Cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de remoção da AFM_1.

Número	Cepa	Bactéria
1	CTC 368	*Lactobacillus plantarum*
2	CTC 469	*Enterococcus avium*
3	TR 570	*Pediococcus pentosaceus*
4	LB 340 LYO 2 DCU	*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*
5	HOWARU® LYO 40 DCU	*Lactobacillus rhamnosus*
6	FLORA-FIT BI 07	*Bifidobacterium lactis*
7	ATCC 33323	*Lactobacillus gasseri*

As cepas bacterianas foram recebidas na forma liofilizada, sendo reativadas em caldo MRS - Man, Rogosa & Sharpe (Acumedia® - Lansing, MI, USA) a 37°C e conservadas sob temperatura de congelamento de –80°C em tubos de 2 mL, onde eram adicionados 800 µL da cultura bacteriana crescida em caldo MRS e 200 µL de

glicerol estéril (Synth® - Diadema, SP, Brasil), tendo este a função de agente crioprotetor.

Para a reativação das cepas, estas foram descongeladas rapidamente, sendo repicadas em caldo MRS e incubadas a temperatura de 37°C por 48 horas. As culturas foram repicadas em caldo MRS repetidas vezes até que as mesmas alcançassem uma concentração elevada de células. Sempre que as cepas bacterianas eram reativadas, sua pureza era examinada através de plaqueamento em profundidade em ágar MRS (Acumedia® - Lansing, Michigan, USA) para verificação das colônias formadas e também por coloração de Gram.

O plaqueamento em profundidade foi realizado em duplicata, seguindo-se o procedimento sugerido pela APHA (2004) (Figura 3). Nesse procedimento, após a diluição seriada da cultura bacteriana, inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis vazias, adicionando-se, em seguida, o meio de cultura (ágar MRS), sendo que para garantir as condições microaerófilas, as placas foram acondicionadas invertidas em uma câmara de anaerobiose contendo um gerador de anaerobiose (Probac do Brasil - São Paulo, SP, Brasil) e, então, incubadas a temperatura de 37 ± 1°C por 48 ± 3 horas. Foram selecionadas para contagem as placas com 25 a 250 colônias, sendo o cálculo do resultado feito de acordo com o número de colônias confirmadas e a diluição inoculada. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de meio.

A estimativa da concentração de cada cepa bacteriana nos caldos preparados foi determinada através da técnica de Turbidimetria, método que analisa o crescimento bacteriano em tempo real através de medidas de densidade óptica. Após o crescimento da cultura de bactérias em caldo MRS por 24 horas a 37°C, foi criada uma curva de concentração correlacionando-se a medida da absorbância (em duplicata) encontrada em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC (Shanghai Lengguang Technology Co. Ltd – Shanghai, China) a 600 nm para cada diluição seriada realizada no próprio caldo MRS (diluído em 10 vezes) com o logaritmo da concentração bacteriana obtida através da contagem de colônias por plaqueamento em profundidade (BEGOT et al., 1996).

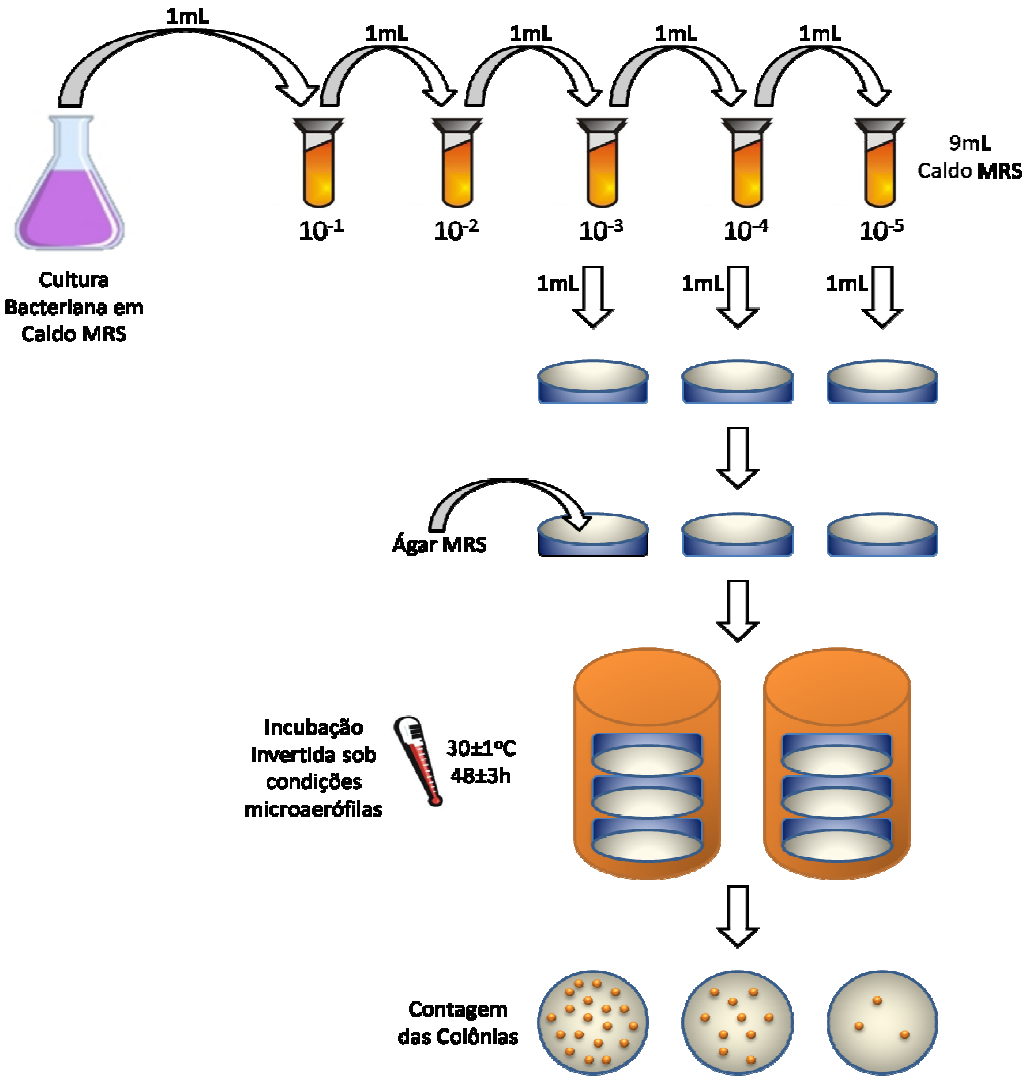

Figura 3 – Fluxograma das análises para contagem de BAL.

3.2. Ensaio de remoção da aflatoxina M_1 em solução TFS

Foi utilizado padrão de AFM_1 (Supelco™ - Bellefonte, PA, USA), dissolvido em acetonitrila, o qual foi calibrado espectrofotometricamente através da técnica preconizada por Scott (1990) e diluído de maneira a obter uma solução estoque contendo aproximadamente 3,0 µg AFM_1/mL. Esta solução foi utilizada no preparo de outra solução de trabalho contendo cerca de 0,15 µg AFM_1/mL em TFS (pH 7,3) (Laborclin Ltda., Pinhais, PR, Brasil), sendo a acetonitrila completamente evaporada por injeção direta de nitrogênio e aquecimento em banho a 45°C antes da adição do TFS.

A realização do experimento foi conduzida adaptando-se o método utilizado por Pierides et al. (2000). Após a incubação de cada cepa bacteriana em caldo MRS a 37°C por 24 horas, fez-se a imersão do tubo em banho contendo água e gelo por 3 minutos a fim de parar o crescimento das bactérias e realizou-se a leitura em espectrofotômetro para determinação da concentração de células bacterianas no meio através da curva de calibração construída previamente. Em seguida, um volume do caldo com a cultura de bactérias correspondendo a cerca de 1 x 10^{10} células foi centrifugado (Microcentrífuga CT-14000, Cientec – Piracicaba, SP, Brasil) a 4.000 rpm por 15 minutos para a formação de *pellets* das bactérias. Os *pellets* formados foram lavados com água Milli-Q (Simplicity 185, Millipore® - Billerica, MA, USA) estéril e, então, ressuspensos em 1,5 mL da solução TFS contendo a aflatoxina. As soluções de bactérias e aflatoxina foram incubadas pelos tempos de 15 minutos e 24 horas a 37°C.

Após o término dos tempos de incubação, as células foram novamente centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante obtido foi analisado através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Seguidamente à retirada do sobrenadante, foi realizada uma lavagem dos *pellets* restantes com solução TFS sem a aflatoxina (adição de 1,5 mL de TFS e agitação em vortex por 20 segundos) e nova centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente, sendo o sobrenadante obtido também analisado por CLAE. Para cada tipo de bactéria, um controle negativo (células bacterianas suspensas em TFS), um controle positivo (AFM_1 em TFS) e também um controle neutro (apenas TFS) foram incubados e analisados.

Também foram feitas análises das células bacterianas inviáveis. Após a etapa de incubação em caldo MRS a 37°C por 24 horas e medição espectrofotométrica da concentração de bactérias, a cultura bacteriana ficou em água fervente (100°C) por 1 hora para inviabilização das células. Em seguida, foram realizadas as mesmas etapas descritas acima a partir do recolhimento de um volume de caldo com a cultura de bactérias correspondendo a cerca de 1 x 10^{10} células. O fluxograma dos ensaios de união de AFM_1 e BAL em solução TFS para as bactérias viáveis e inviáveis encontra-se na Figura 4.

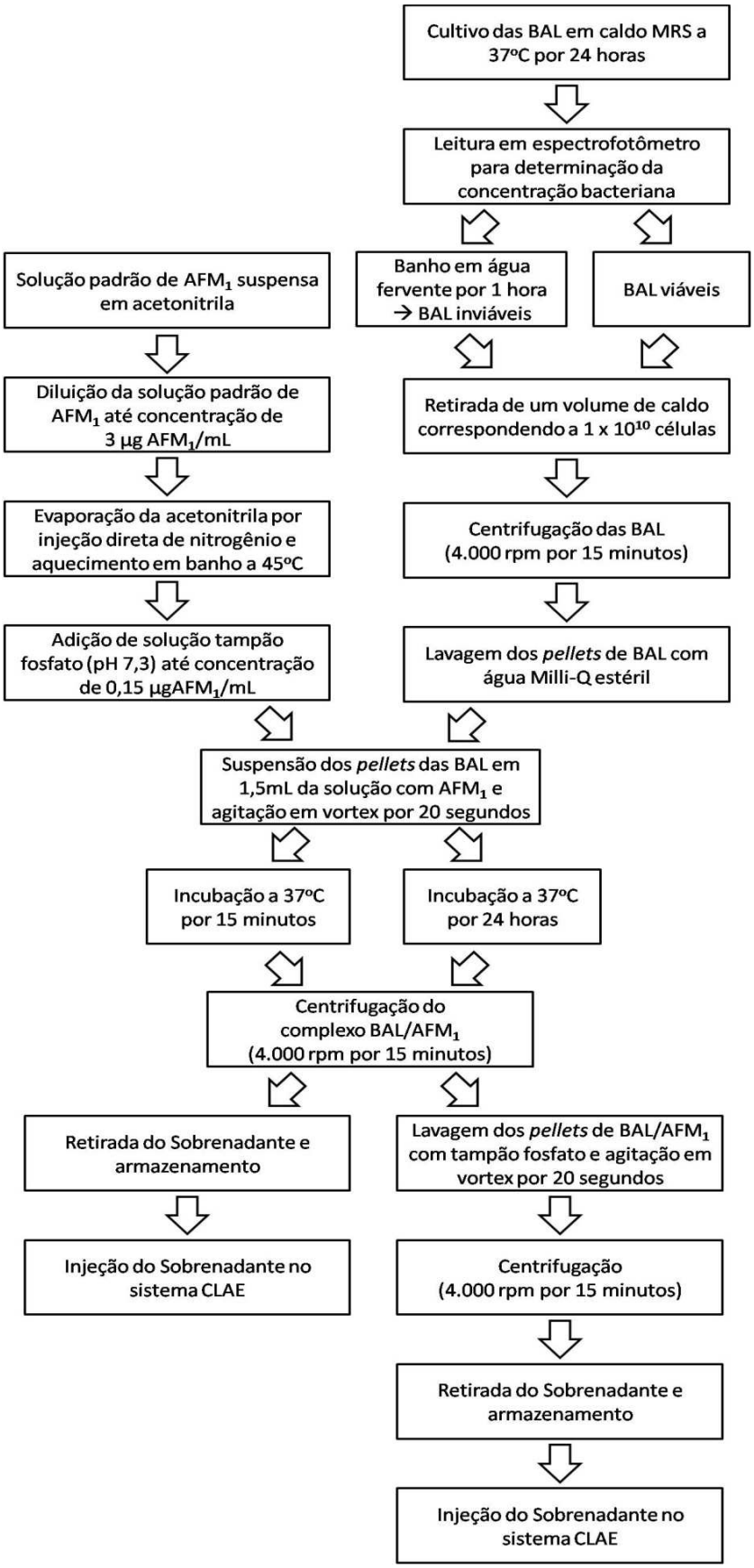

Figura 4 – Fluxograma dos ensaios de remoção de AFM_1 pelas BAL em TFS.

3.3. Quantificação da Aflatoxina M_1 em TFS através de CLAE

Para a quantificação da AFM_1 em solução TFS utilizando o sistema CLAE, não foi necessária a realização de procedimentos de purificação do sobrenadante. Assim, este foi injetado diretamente no sistema CLAE (Shimadzu® - Tóquio, Japão) constituído de detector de fluorescência RF-10A XL (Shimadzu®), equipado com coluna Sinergy Fusion 4µm C_{18} 4,6 X 150 mm (Phenomenex® - Torrance, CA, USA) 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 um fluxo de 1 mL/min. A detecção da excitação foi feita a um comprimento de onda de 366 nm e a emissão a 428 nm.

A quantificação do percentual de AFM_1 adsorvida pela bactéria foi feita através da Equação 1. Após a análise dos resultados, foram selecionadas para os ensaios previstos no item 3.4 três cepas de BAL que apresentaram os melhores resultados de eficiência de redução (> 33%) da concentração de AFM_1 na solução TFS.

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

Onde,

A: percentual de AFM_1 adsorvida pela bactéria

B: área do pico cromatográfico do controle positivo (AFM_1 em solução TFS)

C: área do pico cromatográfico do controle neutro (somente solução TFS)

D: área do pico cromatográfico da amostra (AFM_1 em solução TFS + cepa BAL)

E: área do pico cromatográfico do controle negativo (solução TFS + cepa BAL)

3.4. Ensaio de remoção da aflatoxina M_1 pelas BAL mais eficientes em leite UHT desnatado

As três cepas de BAL selecionadas conforme o critério descrito anteriormente foram submetidas novamente aos mesmos procedimentos descritos no item 3.2, porém utilizando-se como meio para os ensaios, ao invés da solução TFS, o leite UHT desnatado *ultra-fresh* (leite que passou pelo processo de bactofugação, o qual é utilizado para eliminar bactérias contidas no leite mediante o emprego de força centrífuga) da marca Shefa®, lote V2770209 (fabricação em 04/10/2010. Além da mudança do meio, foram utilizadas duas diferentes condições de temperatura (4°C e 37°C) e apenas um tempo de incubação de 15 minutos, sendo que, após a retirada do sobrenadante para análise por CLAE, os *pellets* de BAL restantes não passaram pelo processo de lavagem.

Todas as BAL foram inviabilizadas através de banho em água fervente por 1 hora a fim de evitar uma possível fermentação do leite durante o período de incubação. Para esse ensaio de remoção em leite, a quantidade de AFM_1 adicionada ao leite UHT desnatado *ultra-fresh* foi menor quando comparada ao ensaio em TFS (aproximadamente 0,5 µg AFM_1/litro de leite), sendo esse valor escolhido baseando-se no limite máximo permitido para a AFM_1 em leite fluido (0,5 µg/L) imposto pela legislação brasileira (BRASIL, 2002).

No caso do leite, o sobrenadante retirado após a centrifugação do complexo BAL/AFM_1 passou por um processo de purificação da AFM_1 em uma coluna de imunoafinidade NeoColumn® (Neogen Europe Ltd. – Scotland, UK), para a retirada de impurezas contidas no mesmo. A coluna de imunoafinidade foi acoplada a um *manifold*, que por sua vez estava ligado a uma bomba de vácuo (Modelo 131 Tipo 2V, Prismatec – Itu, SP, Brasil) (Figura 5). Primeiramente, passou-se pela coluna 0,5 mL de TFS e depois 1,0 mL do sobrenadante a ser analisado a um fluxo de 2 a 3 gotas por segundo. Em seguida, lavou-se a coluna através da passagem de 20 mL de uma solução de metanol:água (25:75) e eluiu-se a toxina passando-se 1 mL de uma solução de metanol:ácido acético (98:2) e 1 mL de água Milli-Q a um fluxo, recolhendo-se os 2 mL finais em um *vial* (Figura 6).

A corrida cromatográfica e a quantificação da AFM_1 procederam-se nas mesmas condições descritas anteriormente no item 3.3. Para cada tipo de bactéria, também foram incubados e analisados um controle positivo (AFM_1 em leite), um controle negativo (leite com a presença das células bacterianas) e um controle neutro (leite sem a presença das células bacterianas). A Figura 7 apresenta um resumo das etapas dos ensaios de união de AFM_1 e BAL nos leites experimentais.

Figura 5 – Colunas de imunoafinidade acopladas a um *manifold* e bomba de vácuo.

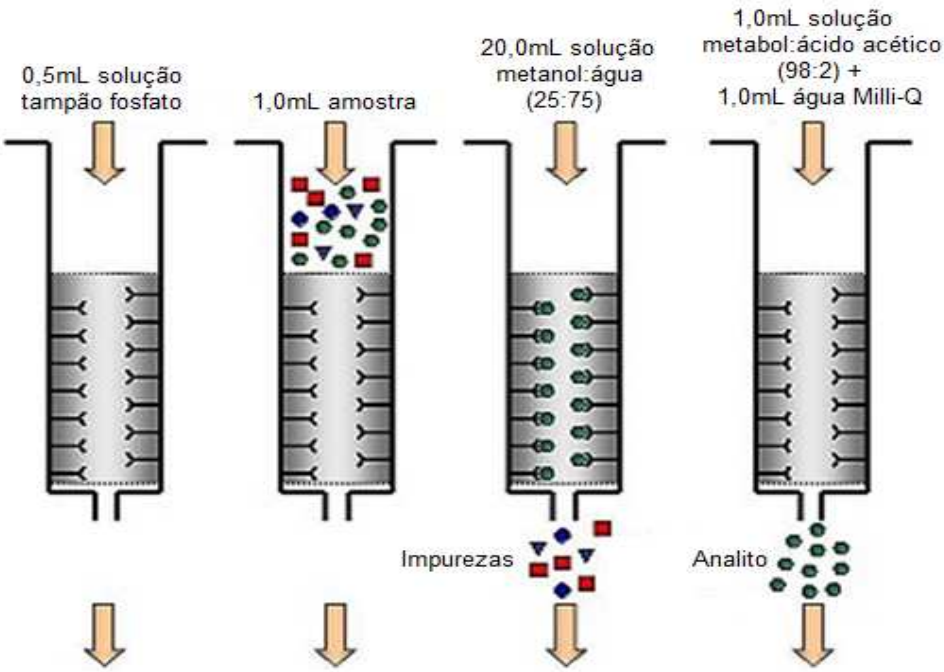

Figura 6 – Processo de eluição da AFM_1 em coluna de imunoafinidade.

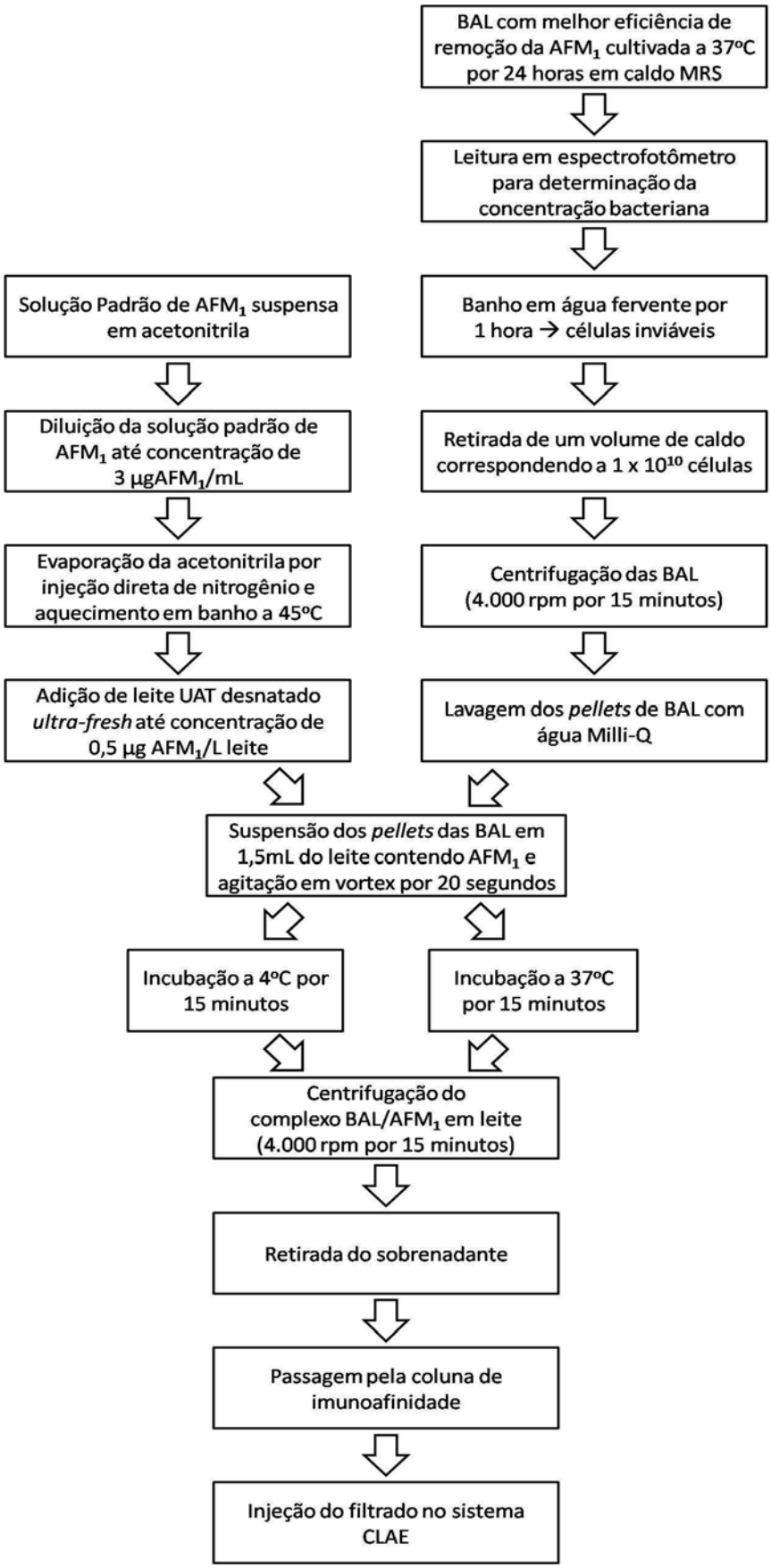

Figura 7 – Fluxograma dos ensaios de remoção de AFM_1 pelas BAL em leite UHT.

3.5. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS® (SAS Institute, 1992), para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre os percentuais de redução de AFM_1 pelas cepas de BAL na solução TFS e no leite. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste de Tukey, adotando-se, como nível de rejeição, $\alpha = 0,05$ (GACULA & SINGH, 1984).

4. Resultados e Discussão

4.1. Curva de concentração bacteriana

As curvas de concentração bacteriana, apresentadas na Figura 8, foram construídas através da correlação entre as medidas de absorbância obtidas e do plaqueamento em profundidade de cada bactéria. Pode-se observar, na Figura 9, um exemplo de uma placa de Petri com colônias típicas de BAL, mais precisamente *Lactobacillus plantarum* resultantes do plaqueamento em profundidade realizado para determinar a concentração bacteriana no caldo MRS cultivado por 24 horas a 37°C.

A partir dos dados obtidos, geraram-se equações potenciais, que foram utilizadas para o cálculo da concentração bacteriana no meio e, em seguida, para o cálculo do volume de meio com o cultivo de bactérias utilizado para alcançar uma concentração de células de cerca de 1,0 x 10^{10} UFC. Observa-se que esse tipo de equação adequou-se perfeitamente aos dados, já que o valor do coeficiente de determinação (R^2) de cada uma das equações variou entre 0,997 e 0,999. A Tabela 4 apresenta as equações e os valores dos coeficientes de determinação obtidos para cada bactéria, assim como a concentração bacteriana no meio.

Tabela 4 – Valores de absorbância e concentração bacteriana.

Bactéria	**Equação**	**Coeficiente de Determinação (R^2)**	**Contagem Média (UFC/mL)**
L. plantarum	$Y = 9{,}055 * X^{0{,}048}$	0,998	4,35 x 10^9
E. avium	$Y = 8{,}888 * X^{0{,}050}$	0,997	2,05 x 10^9
P. pentosaceus	$Y = 9{,}137 * X^{0{,}057}$	0,999	9,20 x 10^9
L. bulgaricus	$Y = 8{,}047 * X^{0{,}072}$	0,997	1,17 x 10^9
L. rhamnosus	$Y = 8{,}353 * X^{0{,}069}$	0,998	1,94 x 10^9
B. lactis	$Y = 8{,}420 * X^{0{,}047}$	0,998	1,21 x 10^9
L. gasseri	$Y = 8{,}080 * X^{0{,}058}$	0,999	6,60 x 10^8

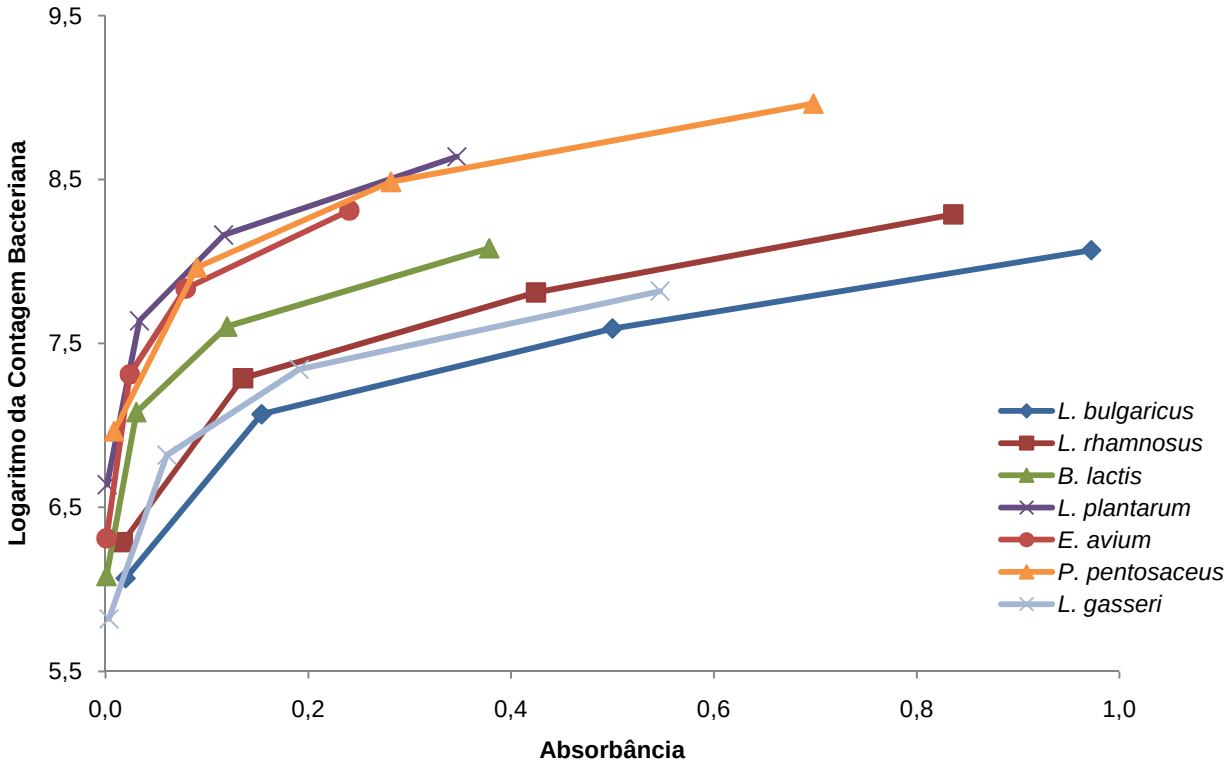

Figura 8 – Curvas de concentração bacteriana para as sete cepas de BAL.

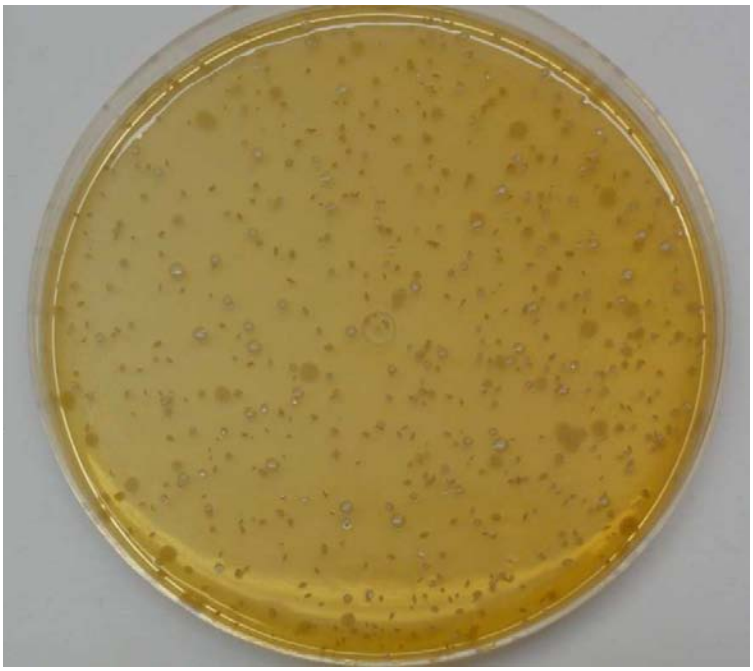

Figura 9 – Placa de Petri com colônias típicas de *Lactobacillus plantarum*.

4.2. Remoção da AFM_1 em solução TFS

Conforme explicado no item 3.2, foram obtidas as porcentagens de remoção de AFM_1 pelas BAL, comparando-se os cromatogramas gerados pelo sistema CLAE, tanto para as células bacterianas viáveis quanto para as inviáveis à temperatura de 37°C nos tempos de contato de 15 minutos e 24 horas. Observa-se nas Figuras 10, 11 e 12 exemplos desses cromatogramas para um controle positivo, para uma amostra de células viáveis de *Lactobacillus plantarum* no tempo de contato de 15 minutos e para uma amostra de células inviáveis de *Enterococcus avium* no tempo de 15 minutos, respectivamente. O tempo de retenção da AFM_1 nas condições de análise especificadas no item 3.3 foi de 6,1 minutos. Os resultados encontrados para os ensaios de remoção estão descritos na Tabela 5.

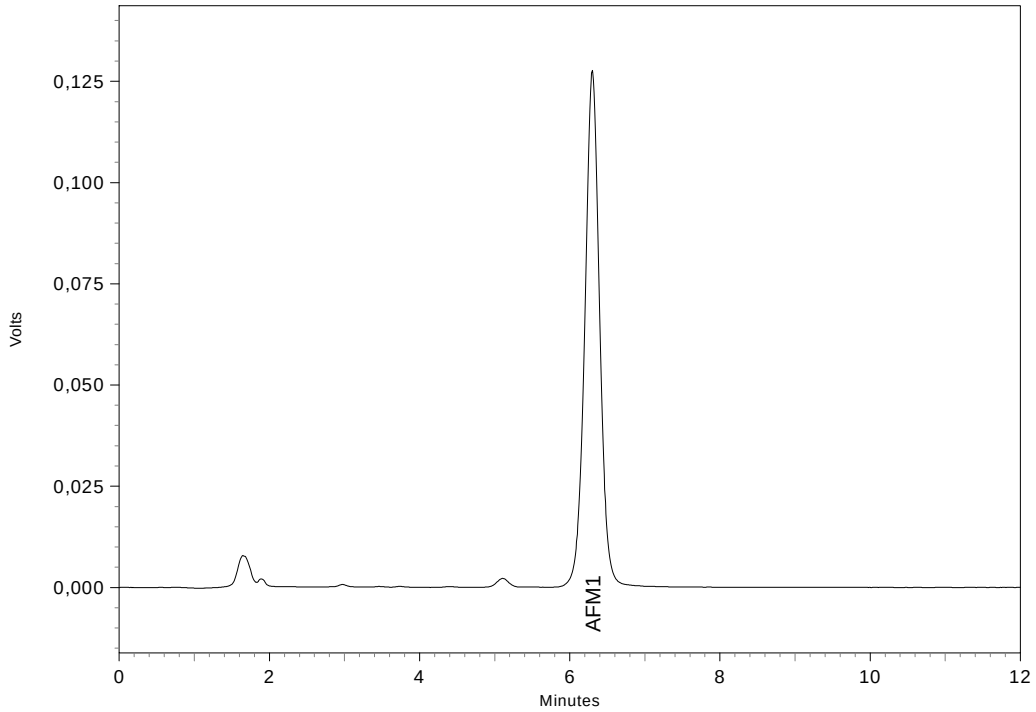

Figura 10 – Cromatograma do controle positivo.

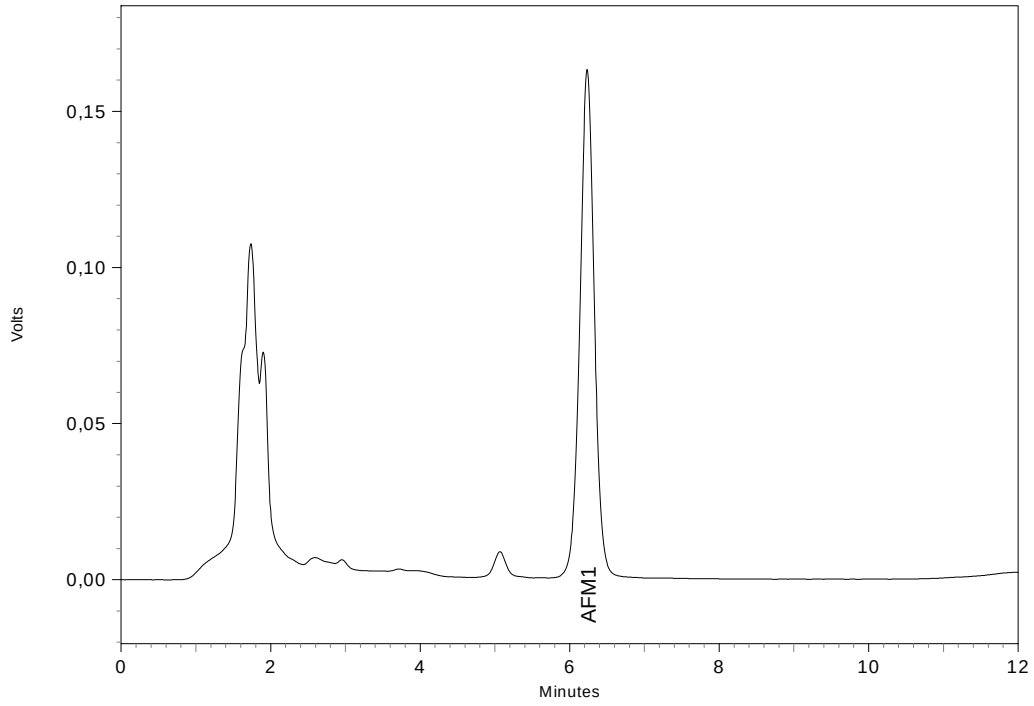

Figura 11 – Cromatograma de uma amostra de células viáveis de *Lactobacillus plantarum* no tempo de contato de 15 minutos.

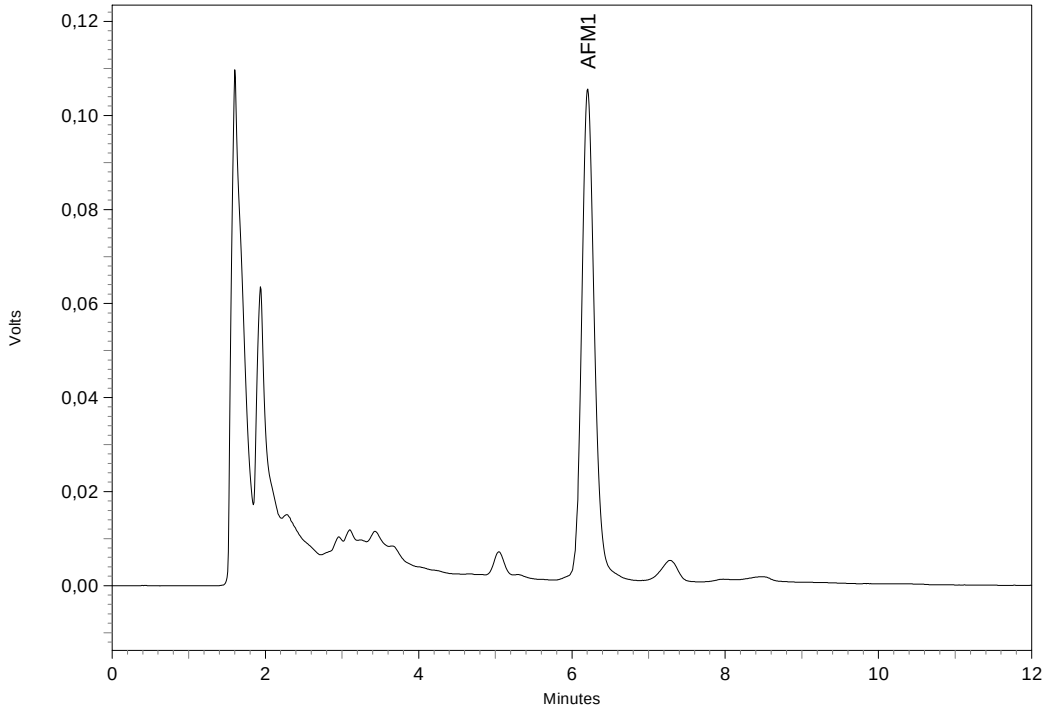

Figura 12 – Cromatograma de uma amostra de células inviáveis de *Enterococcus avium* no tempo de contato de 15 minutos.

Tabela 5 – Percentual de remoção[1] de AFM_1 em solução TFS[2].

Bactérias	% de Remoção de AFM_1			
	Viável 15min[3]	Inviável 15min	Viável 24h	Inviável 24h
L. plantarum	5,60±0,45^{cB}	13,11±0,89^{bA}	8,09±1,33^{cB}	14,14±1,03^{cA}
E. avium	7,36±1,10^{cB}	12,42±2,20^{bA}	6,64±1,40^{cB}	13,13±2,14^{cA}
P. pentosaceus	8,68±1,24^{cB}	15,16±2,40^{bA}	7,76±0,95^{cB}	13,86±1,01^{cA}
L. gasseri	21,37±2,76^{bB}	32,57±1,96^{aA}	22,77±1,81^{bB}	32,30±0,98^{bA}
L. bulgaricus	30,22±1,43^{aB}	36,32±1,09^{aA}	33,54±1,56^{aAB}	33,93±1,91^{bAB}
L. rhamnosus	17,13±3,01^{bD}	35,69±3,13^{aB}	27,79±2,67^{abC}	45,67±1,65^{aA}
B. lactis	16,89±2,01^{bB}	36,56±2,46^{aA}	23,62±4,13^{bB}	35,84±3,85^{bA}

[1] Percentual de toxina removida de uma solução TFS contendo 0,15 µg AFM_1/mL.

[2] Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

[3] Tempo de contato entre a BAL e a AFM_1 em solução TFS (15 min. ou 24 h).

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

[A-D] Em uma mesma linha, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Comparando-se as diferenças encontradas entre os tratamentos aplicados, pode-se observar que, para a maioria das bactérias (*L. plantarum*, *E. avium*, *P. pentosaceus*, *B. lactis* e *L. gasseri*), as células inviáveis apresentaram porcentagens de remoção de AFM_1 significativamente maiores que as células viáveis em ambos os tempos de contato analisados, sendo que não houve diferença significativa entre os tempos de 15 minutos e 24 horas para os valores encontrados. Embora para *L. bulgaricus*, as células inviáveis no tempo de 15 minutos apresentaram o maior valor de remoção da AFM_1, este não diferiu significativamente dos valores para as células viáveis e inviáveis no tempo de 24 horas, enquanto que, para *L. rhamnosus*, as células inviáveis no tempo de 24 horas mostraram-se significativamente mais eficientes em remover a toxina do meio.

Quando analisadas as diferenças de remoção de AFM_1 entre as bactérias estudadas, observou-se que, para as células viáveis no tempo de 15 minutos, *L. bulgaricus* mostrou-se a mais eficiente, entretanto, para as células inviáveis no mesmo tempo de remoção, não houve diferença significativa entre *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *B. lactis* e *L. gasseri*. Já no tempo de contato de 24 horas, as células viáveis de *L. bulgaricus* apresentaram o maior valor de remoção de AFM_1, embora este não tenha sido significativamente diferente do valor apresentado por *L.*

rhamnosus, que foi o mais eficiente em remover a toxina para o tratamento com células inviáveis.

Sarimehmetoglu & Küplülü (2004) encontraram valores bastante semelhantes em seu trabalho, pois células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* CH-2 removeram 29,42% da AFM_1 presente em uma solução TFS no tempo de contato de 4 horas a 37°C. Os autores também avaliaram a capacidade de *Streptococcus thermophilus* ST-36 observando-se 18,70% de remoção da AFM_1 do meio. Até hoje, apenas uma bactéria, *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, conseguiu remover 100% da AFM_1 de um meio líquido contaminado, utilizando-se uma concentração celular de 5 x 10^{10} UFC/mL e tempo de contato de 4 horas (LILLEHOJ et al., 1971).

Kabak & Var (2008) avaliaram a capacidade de 4 cepas de *Lactobacillus* spp. e 2 cepas de *Bifidobacterium* spp. em remover a AFM_1 em TFS e observaram que as células viáveis das 6 cepas removeram de 10,22% a 26,65% da AFM_1 presente na solução, dependendo do nível de contaminação e do período de incubação, enquanto que as células inviáveis removeram de 14,04% a 28,97% da toxina. Os pesquisadores concluíram que o processo de remoção foi rápido, não havendo diferenças significativas entre os tempos de contato de 0, 4 e 24 horas, contrariamente ao observado por Elgerbi et al. (2006) para cepas de *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp., que no tempo de 24 horas apresentaram porcentagens de remoção variando entre 0% e 14,6%, e para o tempo de 96 horas entre 4,5% a 73,1%.

Em relação à concentração de células bacterianas no meio, Kabak & Var (2008) concluíram que houve uma diminuição significativa na quantidade de AFM_1 removida quando a quantidade de células passou de 10^7 UFC/mL (0% a 5,02%) para 10^8 UFC/mL (10,22% a 26,65%), indicando que a população bacteriana é um fator crítico para a remoção de AFM_1 pelas BAL. Bolognani et al. (1997) observaram que uma concentração mínima de 5 x 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium longum* é necessária para remover apenas 13% da AFB_1 em cerca de uma hora.

El-Nezami et al. (1998b) relataram que, para *Lactobacillus rhamnosus* (cepas GG e LC705), foi preciso uma concentração mínima de 2 x 10^9 UFC/mL para remover 50% da AFB_1, sendo que uma remoção maior aconteceu quando a

concentração de BAL foi elevada para 10^{10} UFC/mL. Complementarmente, os autores observaram que bactérias gram-positivas são melhores sequestradoras de aflatoxina do meio que bactérias gram-negativas, com taxas de remoção de 80% e 20%, respectivamente, sugerindo que a habilidade de remoção da toxina é dependente da estrutura da parede celular. Lee et al. (2003) afirmam que a concentração de aflatoxina no meio também influencia a taxa de adsorção da mesma, concluindo que quanto maior a sua concentração no meio maior é a taxa de remoção, tanto para as células viáveis quanto para as inviáveis.

Pierides et al. (2000) analisaram a habilidade de células viáveis e tratadas termicamente de 8 cepas de BAL em remover a AFM_1 em TFS a 37°C após cerca de 16 horas de tempo de contato e obtiveram resultados variando de 18,1% a 53,8% para as células viáveis e de 25,5% a 61,5% para as inviáveis. A bactéria *Lactobacillus Gasseri* (ATCC 33323), a mesma utilizada nesse estudo, apresentou 30,8% de remoção para as células viáveis e 61,5% de remoção para as células inviáveis. Os pesquisadores observaram que *Lactobacillus rhamnosus* (cepas GG e LC705) foram as bactérias que apresentaram os melhores valores de remoção tanto para as células viáveis (50,7% e 46,3%, respectivamente) quanto para as células inviáveis (57,8% e 51,6%, respectivamente), assim, compararam seus resultados com os obtidos por El-Nezami et al. (1998b) para a remoção de AFB_1 na mesma solução pelas mesmas bactérias (77,0% e 65,0%, respectivamente) e concluíram que a remoção da AFM_1 foi menos efetiva possivelmente devido à presença de um grupo –OH adicional em sua molécula, o que resulta em um aumento da polaridade da mesma, tornando-a mais hidrofílica e aumentando sua tendência em ficar retida em soluções aquosas.

Pelos resultados encontrados neste trabalho e nos demais citados, percebe-se que a viabilidade bacteriana não é um pré-requisito para a remoção de AFM_1 por BAL. Embora o mecanismo de ação dessas bactérias sobre as aflatoxinas ainda não tenha sido esclarecido, sugeri-se que, pelo fato de as células inviáveis conseguirem também realizar essa remoção da toxina, ocorra uma união de natureza física com a mesma, ou seja, uma adesão aos componentes da parede celular bacteriana, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, ao invés de ocorrer através de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo da bactéria (BATA & LASZTITY, 1999; LAHTINEN et al., 2004; SHETTY & JESPERSEN, 2006).

Tanto os polissacarídeos quanto os peptidoglicanos da parede celular bacteriana devem ser muito afetados pelos tratamentos térmico e ácido. O calor pode causar a desnaturação de proteínas, aumentando a natureza hidrofóbica de sua superfície, ou a formação de produtos da reação de Maillard. Já o ácido pode romper as ligações glicosídicas em polissacarídeos, liberando monômeros que podem ser ainda mais fragmentados em aldeídos, degradando também as proteínas até componentes menores como peptídeos e aminoácidos. Assim, o tratamento ácido pode quebrar a estrutura do peptidoglicano, comprometendo sua integridade estrutural, isto é, diminuindo a espessura dessa camada, reduzindo as ligações cruzadas e aumentando o tamanho dos poros. Essas perturbações causadas por esses tratamentos permitem que a aflatoxina se vincule à parede celular bacteriana e aos componentes da membrana plasmática, os quais não estavam disponíveis quando a célula bacteriana estava intacta (HASKARD et al., 2001).

Hernandez-Mendoza et al. (2009b) explicam que a integridade da parede celular bacteriana é importante no processo de remoção de aflatoxina para células viáveis e inviáveis. Em seu estudo com AFB_1, puderam verificar que tanto a parede celular bacteriana quanto seus fragmentos purificados foram capazes de remover a aflatoxina do meio, entretanto, quando ocorreu a perda ou destruição da parede celular (total ou parcial) em resposta a tratamentos enzimáticos, uma diminuição significativa da capacidade de remoção foi observada.

Haskard et al. (2000) estudaram a capacidade de *L. rhamnosus* GG em unir-se à AFB_1, observando pouca diferença entre a remoção de aflatoxina pelas células tratadas termicamente e com ácido (85% e 91%, respectivamente), em relação às células viáveis da bactéria (86%). Os autores também observaram que a adição de uréia ao meio, a qual é um agente anti-hidrofóbico, diminuiu significativamente a remoção da toxina para as células inviáveis, de 85% a 91% para 50% a 60%, mostrando que interações hidrofóbicas possuem um papel relevante. Além disso, a adição de diferentes concentrações de NaCl e $CaCl_2$ (de 0,01 a 1M) e uma variação de pH de 2,5 a 8,5 praticamente não apresentaram efeitos sobre a remoção da AFB_1 pela bactéria, sugerindo que ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas não são importantes.

Em tratamentos utilizando pronase E, lipase e periodato, o tratamento com periodato produziu significativas reduções na capacidade de remoção da AFB_1 tanto

para as células viáveis quanto para as inviáveis, já que causa a oxidação dos grupos –OH *cis* em grupos aldeídos e ácido-carboxílicos, sugerindo que a união ocorre predominantemente com os polissacarídeos da bactéria. O tratamento com pronase E causou a mesma redução significativa na remoção da AFB_1, evidenciando que proteínas podem estar também envolvidas no processo. Assim, o fato da pronase E e periodato terem ambos um efeito significativo sobre a remoção de AFB_1, indica que os sítios de ligação são de natureza protéica. Já a lipase não causou nenhuma diminuição significativa na remoção da AFB_1, mostrando que a participação de lipídios, como o ácido lipoteicóico, é pouco provável (HASKARD et al., 2001). Embora os tratamentos utilizados diminuíssem a remoção de AFB_1, em todos os casos esta ainda continuou ocorrendo em quantidades substanciais, mostrando possivelmente um envolvimento de múltiplos componentes na ligação com a micotoxina (HASKARD et al., 2001).

A estabilidade do complexo BAL/AFM_1 em uma ampla faixa de pH é um fator importante para o uso desses microrganismos com o fim de remover a aflatoxina em alimentos, já que a liberação da toxina durante a passagem gástrica teria implicações negativas para a saúde, de modo que o complexo formado deve resistir aos principais estresses ambientais causados pelo trato gastrointestinal, como o baixo pH e a presença de bile. Nenhum estudo avaliando-se essa característica para AFM_1 foi publicado até o momento, apenas estudos utilizando-se AFB_1. Analisando-se a influência da presença de bile sobre o complexo BAL/ AFB_1 formado, observou-se que *Lactobacillus casei* removeu mais AFB_1 quando exposta à bile, sugerindo que essa exposição causa modificações na estrutura e na composição da parede celular da bactéria, induzindo provavelmente à formação de novos sítios de ligação para a aflatoxina, ou, então, aumentando o tamanho dos sítios já existentes (HERNANDEZ-MENDOZA et al., 2009a).

El-Nezami et al. (2000a) investigaram a habilidade de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) e *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS em remover a AFB_1 de um meio líquido intestinal extraído do duodeno de frangos, e observaram que a concentração de AFB_1 reduziu 54% em apenas 1 minuto na presença de *L. rhamnosus* GG, enquanto que apenas 44% na presença de *L. rhamnosus* LC705 e 36% na presença de *P. freudenreichii* spp. *shermanii* JS. Os autores verificaram que o acúmulo de AFB_1 no tecido intestinal apresentou redução de 74%, 63% e 37%,

respectivamente para *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) e *P. freudenreichii* spp. *shermanii* JS, mostrando que essas bactérias podem afetar a biodisponibilidade da aflatoxina e serem utilizadas para redução da sua toxicidade em humanos e animais.

No Egito, um ensaio piloto investigou o efeito da adição de *L. rhamnosus* LC-705 e *P. freudenreichii* spp. *shermanii* JS na dieta de pessoas sobre os níveis de aflatoxinas em amostras fecais. Observou-se que 11 das 20 pessoas voluntárias apresentaram AFB_1 nas fezes em quantidades que variavam de 1,8 a 6 µg AFB_1/kg fezes, sendo que após duas semanas de suplementação com as bactérias probióticas houve uma redução significativa nesse nível de excreção, mostrando que essas cepas possuem a habilidade de influenciar a conteúdo de AFB_1 nas fezes (EL-NEZAMI et al., 2000b).

4.3. Avaliação da estabilidade do complexo BAL/AFM_1

Visando à análise da capacidade de retenção da AFM_1 pelas bactérias, efetuou-se a lavagem com solução TFS dos *pellets* bacterianos contendo a AFM_1 adsorvida. Após a análise do sobrenadante por CLAE, obteve-se os dados visualizados na Tabela 6.

Observa-se que as porcentagens de AFM_1 liberadas de volta para a solução pelas bactérias após a lavagem variaram de 40,57% a 87,37%. As células viáveis de *L. rhamnosus* com tempo de contato de 15 minutos foram as que mais desprenderam a aflatoxina de volta para o meio. Esta bactéria apresentou diferenças significativas entre todos os tratamentos por que passou, entretanto, entre as bactérias não diferiu significativamente de *B. lactis* e *L. gasseri*. A bactéria que menos liberou a AFM_1 para a solução foi *E. avium*, no tratamento com células viáveis e tempo de 24 horas, embora esta não tenha diferido significativamente de suas células inviáveis no tempo de 24 horas e das células viáveis de *L. bulgaricus* no tempo de 24 horas.

Tabela 6 – Percentual[1] de AFM_1 recuperada em solução após lavagem com TFS[2].

Bactérias	% de AFM_1 liberada pela bactéria			
	Viável 15min[3]	Inviável 15min	Viável 24h	Inviável 24h
L. plantarum	66,41±6,22^{bcA}	62,77±3,49^{aAB}	68,87±2,49^{aA}	53,79±3,82^{abB}
E. avium	70,52±7,31^{bcA}	57,00±5,76^{aA}	40,57±4,66^{cB}	56,71±6,94^{abAB}
P. pentosaceus	61,79±5,69^{cA}	57,08±5,93^{aA}	70,25±8,33^{aA}	60,64±7,57^{abA}
L. bulgaricus	63,04±3,87^{cAB}	65,57±5,30^{aAB}	53,90±6,51^{bcB}	69,29±4,45^{aA}
L. rhamnosus	87,37±1,82^{aA}	64,51±4,17^{aB}	59,42±1,97^{abB}	49,16±3,83^{bC}
B. lactis	79,54±7,62^{abA}	62,93±9,21^{aAB}	58,07±7,20^{abB}	59,22±8,22^{abAB}
L. gasseri	79,14±4,26^{abA}	63,40±3,79^{aB}	63,73±0,95^{abB}	64,31±1,32^{abB}

[1] Percentual de toxina liberada pela bactéria após lavagem com solução TFS.

[2] Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

[3] Tempo de contato entre a BAL e a AFM_1 em solução TFS (15 min. ou 24 h).

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

[A-C] Em uma mesma linha, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Elgerbi et al. (2006) observaram que após a primeira lavagem dos *pellets* bacterianos com TFS, a proporção de AFM_1 liberada pelas bactérias foi de 87,3% para as cepas de *Lactobacillus* spp., 85,7% para as cepas de *Lactococcus* spp. e de 85,7% para as cepas de *Bifidobacterium* spp. Também observaram que após a terceira lavagem, praticamente todas as bactérias haviam liberado toda a AFM_1 adsorvida de volta para o meio (92,0% a 100%).

Kabak & Var (2008) concluíram que a remoção de AFM_1 pelas bactérias foi reversível e que pequenas quantidades de toxina voltaram para a solução TFS (5,62% a 8,54%). Isso é consistente com o encontrado por Haskard et al. (2001), que observaram que *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705 e *Lactobacillus casei Shirota* liberaram 3,7%, 3,0% e 2,4%, respectivamente, da AFB_1 de volta para a solução; mas contrasta com o observado por Peltonem et al. (2001), pois a liberação de AFB_1 de volta para a solução na primeira lavagem foi de 48,6%, 30,7% e 26,5% para *Lactobacillus amylovorus* (cepas CSCC 5160 e CSCC 5197) e *L. rhamnosus* Lc 1/3, respectivamente. Após 5 lavagens, a AFB_1 adsorvida por *L. amylovorus* CSCC 5160 foi quase que completamente liberada (94,4%), enquanto que *L. amylovorus* CSCC 5197 e *L. rhamnosus* Lc 1/3 preservaram retida apenas 17,4% e 32,2%, respectivamente, da AFB_1 existente na solução original de incubação.

Assim, percebe-se que o complexo BAL/aflatoxina formado é instável, já que parte da aflatoxina, tanto AFB_1 quanto AFM_1, se libertou do complexo após as lavagens e retornou gradualmente para a solução aquosa. Deste modo, quanto maior foi o número de lavagens, mais aflatoxina foi liberada para a solução, mostrando que a ligação que as unia não era forte e sugerindo que essa ligação era não-covalente fraca, ocorrendo uma associação a sítios hidrofóbicos na superfície bacteriana (PELTONEM et al., 2001; HASKARD et al., 2000).

Contrariamente a esta hipótese, D'Souza & Brackett (2001), realizando as mesmas lavagens sobre o complexo formado entre *Flavobacterium aurantiacum* e AFB_1, observaram que não houve liberação da aflatoxina na solução aquosa e Hernandez-Mendoza et al. (2009a) analisando a estabilidade do complexo formado entre AFB_1 e 8 cepas de *Lactobacillus casei* após as lavagens demonstrou que as quantidades de aflatoxina que foram liberadas variaram entre praticamente zero e 9,2%. Possíveis explicações para essa variação na liberação da aflatoxina incluem as diferenças nos sítios de ligação presentes nas diferentes cepas, ou, então, mais provavelmente, que esses sítios de ligação são similares, mas que apresentam diferenças mínimas dependendo de cada cepa. Hernandez-Mendoza et al. (2009b) explicam que uma menor liberação da toxina para o meio após as lavagens pode ser atribuída às interações entre as moléculas de aflatoxina retidas na parede celular de uma bactéria com as moléculas retidas na parede celular da bactéria adjacente, formando uma espécie de matriz reticulada que impede a liberação da aflatoxina. Lee et al. (2003) sugerem que quanto mais moléculas de aflatoxina forem removidas pela célula bacteriana, mais tempo essas moléculas permanecerão adsorvidas na superfície celular.

4.4. Remoção da AFM_1 em leite UHT desnatado

A fim de testar a capacidade das BAL em remover a AFM_1 em uma matriz alimentícia, foram selecionadas as três cepas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Bifidobacterium lactis*) que apresentaram os maiores resultados de remoção da toxina em solução TFS para

realização de ensaios com leite UHT desnatado. Os resultados obtidos para esses ensaios de remoção estão na Tabela 7.

Tabela 7 – Percentual de remoção[1] da AFM_1 em leite UHT desnatado[2].

Bactérias	**% de Remoção de AFM_1**	
	4°C	**37°C**
L. bulgaricus	13,51 ± 5,26[bB]	33,54 ± 9,74[aA]
L. rhamnosus	19,70 ± 5,14[bA]	24,46 ± 3,82[aA]
B. lactis	37,75 ± 3,31[aA]	32,54 ± 4,01[aA]

[1] Percentual de toxina removida de leite UHT desnatado contendo 0,5 µg AFM_1/L após 15 minutos.

[2] Valores expressos em média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

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

[A-B] Em uma mesma linha, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Comparando-se os tratamentos realizados, isto é, os resultados obtidos para as temperaturas de 4°C e 37°C, observa-se que não houve diferença significativa para as bactérias *L. rhamnosus* e *B. lactis*, apenas para *L. bulgaricus*, a qual apresentou melhor capacidade de remoção da AFM_1 à 37°C. Já na análise comparativa entre as bactérias, percebeu-se que, à temperatura de 37°C, não houve diferença significativa entre as três cepas estudadas. Entretanto, à 4°C, *B. lactis* mostrou-se mais eficiente em remover a micotoxina do leite. El-Nezami et al. (1998b) observaram uma maior eficiência de remoção de AFB_1 a 37°C ao invés de 4°C e 25°C, enquanto que Zinedine et al. (2005) verificaram uma melhor atividade de remoção da AFB_1 a temperatura de 25°C, ao invés de 15°C ou 37°C para todos os 12 tipos de BAL analisados. Em contraste, Haskard et al. (2001) não observaram mudanças significativas na estabilidade do complexo formado entre AFB_1 e *L. rhamnosus* (GG e LC-705) na faixa de temperatura de 4°C a 37°C.

Em relação aos resultados de remoção da AFM_1 por células inviáveis em solução TFS a 37°C no tempo de 15 minutos, demonstrados no item 4.2, os valores encontrados para o leite são relativamente menores. Pierides et al. (2000) encontraram resultados similares em seu trabalho, pois células inviabilizadas termicamente de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) removeram a AFM_1 de leite em pó reconstituído desnatado (18,8% e 27,4%, respectivamente) e integral (26,0% e

30,1%, respectivamente) a 37°C após 16 horas de contato, enquanto que em TFS esses valores foram de 57,8% e 51,6%, respectivamente. Os autores concluíram que essa menor efetividade de remoção, em relação à solução TFS, pode ser explicada pelo fato de a AFM_1 possivelmente não estar acessível no leite, isto é, estar associada à caseína, sendo que a interferência das proteínas no processo de remoção pode ser responsável pela diferença entre os leites desnatado e integral (aproximadamente 10% menor), já que o leite desnatado em pó utilizado continha 37g proteína/100g, enquanto que o conteúdo protéico do leite integral em pó era de 25g proteína/100g.

Contrariamente, Elgerbi et al. (2006) observaram maiores porcentagens de remoção da AFM_1 em leite UHT por cepas de *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. em todos os tempos analisados (24, 48, 72 e 96 horas). Após 96 horas, enquanto no leite UHT as bactérias haviam removido de 46,0% a 80,5% da AFM_1, em TFS essa remoção foi de 4,5% a 73,1%, sendo *Lactobacillus bulgaricus* (NCFB 1489) foi o responsável pela maior remoção no leite (80,5%) e *Lactobacillus plantarum* (DSM 12028) em TFS (73,1%).

Sarimehmetoglu & Küplülü (2004) também obtiveram melhores resultados de remoção da AFM_1 para leite reconstituído (12% de matéria seca não gordurosa). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH-2 e *Streptococcus thermophilus* ST-36 removeram a AFM_1 em 18,70% e 29,42%, respectivamente, em solução TFS, e 27,56% e 39,16%, respectivamente, em leite reconstituído. Possivelmente, essa maior remoção pode ser devido à menor quantidade de matéria seca não gordurosa, já que Brackett & Marth (1982) reportaram que 30,7% mais AFM_1 foi encontrada em leite tratado com enzima proteolítica, sugerindo a ligação da AFM_1 à proteína do leite. Kabak & Var (2008) não observaram diferenças significativas entre a capacidade de remover a AFM_1 em solução TFS ou em leite desnatado após 4 horas de incubação, concluíram que haviam diferenças significativas apenas entre as espécies bacterianas, não entre a capacidade de remoção da AFM_1 pelas células viáveis (7,85% a 25,94%) e inviáveis (12,85% a 27,31%).

Os métodos de remoção de aflatoxinas empregando-se as BAL, principalmente aquelas que já são atualmente utilizadas em produtos alimentícios, podem ser rentáveis, comercialmente viáveis e seguros para a aplicação em alimentos funcionais probióticos e em alimentos líquidos como leite e óleos, além de

rações para animais evitando-se os efeitos negativos das micotoxinas em carnes, ovos e leite.

Os resultados existentes até o momento mostram que as células bacterianas, tanto viáveis quanto inviáveis, podem ser utilizadas como agentes descontaminantes, pois ambas apresentam essa habilidade de remoção de AFM_1 de um meio líquido em um tempo relativamente pequeno. A maioria dos estudos aponta que as células inviáveis de bactérias são menos prováveis de liberar a aflatoxina adsorvida de volta para meio e para trato gastrointestinal, podendo, assim, serem incorporadas a alimentos, prevenindo a adsorção da toxina pelas células do epitélio intestinal, reduzindo sua biodisponibilidade, e, principalmente, não alterando o sabor e a acidez dos alimentos. Entretanto, muitos estudos ainda são necessários a fim de investigar outras possíveis variáveis do processo de remoção, tais como a quantidade máxima de micotoxina removida pela bactéria, os requerimentos estruturais para essa remoção, a variação da remoção sob diferentes condições de processamento dos alimentos e os efeitos das bactérias sobre a biodisponibilidade das aflatoxinas não removidas (LEE et al., 2003; EL-NEZAMI et al., 2004).

Para a indústria de laticínios, uma opção bastante interessante seria a utilização das BAL na forma imobilizada, criando-se uma espécie de filtro que retém a AFM_1, ou seja, o leite passa por esse filtro a uma determinada velocidade por um tempo suficiente para que ocorra o processo de remoção. Assim, obtém-se um leite parcial ou totalmente livre de contaminação por AFM_1, podendo ser utilizado em outros processos subsequentes, sem ter suas características próprias alteradas.

Oluwafemi & Da Silva (2009) explicam que os métodos biológicos de descontaminação podem também apresentar algumas limitações como degradação incompleta da toxina, tempo de degradação longo, inadaptabilidade aos sistemas alimentícios, pigmentação da cultura e produção de odores, os quais podem reduzir seu potencial para o uso na indústria de alimentos. Entretanto, a possibilidade de utilização das células bacterianas inviáveis resolveria praticamente todos esses problemas.

5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, e considerando-se os objetivos propostos, pode-se concluir que:

1) A remoção da AFM_1 pelas cepas de BAL em solução TFS a 37ºC variou entre 5,60 e 45,67%, sendo que as células inviáveis apresentaram percentuais de remoção de AFM_1 significativamente maiores que as células viáveis;
2) Não houve diferenças significativas na remoção da AFM_1 pelas cepas de BAL em solução TFS a 37ºC entre os tempos de 15 minutos e 24 horas;
3) As células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii* spp. b*ulgaricus* foram as que apresentaram o maior percentual de remoção da AFM_1 em solução TFS no tempo de contato de 15 minutos, diferindo significativamente de todas as outras bactérias;
4) As células inviáveis de *Lactobacillus rhamnosus* foram as que apresentaram o maior percentual de remoção da AFM_1 em solução TFS no tempo de contanto de 24 horas, com diferenças significativas em relação às demais bactérias;
5) O complexo formado entre as BAL analisadas e a AFM_1 em solução TFS é altamente instável, sendo que a quantidade de aflatoxina liberada de volta para a solução variou amplamente de cepa para cepa;
6) As células viáveis de *Lactobacillus rhamnosus* com tempo de contato de 15 minutos foram as que mais desprenderam a aflatoxina de volta para o meio, diferindo significativamente entre todos os tratamentos e bactérias, exceto de *B. lactis* e *L. gasseri*;
7) Os percentuais de remoção de AFM_1 nos ensaios realizados em leite UHT desnatado variaram entre 13,51 e 37,75%, sendo que *Lactobacillus bulgaricus* foi a única bactéria que apresentou diferença significativa entre as temperaturas aplicadas, com maior eficiência a 37°C;

8) Ainda no leite, comparando-se as bactérias, observou-se que a 37°C não houve diferença significativa entre elas, entretanto, *Bifidobacterium lactis* mostrou-se mais eficiente na remoção da aflatoxina do leite a 4°C;

9) Os resultados demonstraram que há perspectiva para utilização das cepas de BAL estudadas para remoção de AFM_1 em matrizes alimentícias. Entretanto, estudos adicionais são necessários a fim de investigar os mecanismos envolvidos na remoção da toxina pelas BAL com vistas à aplicação em indústrias de alimentos.

6. Referências

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

ALBERTS, J.F.; ENGELBRECHT, Y.; STEYN, P.S.; HOLZAPFEL, W.H.; van ZYL, W.H. Biological degradation of aflatoxin B_1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v.109, p.121–126, 2006.

ALBERTS, J.F.; GELDERBLOMB, W.C.A.; BOTHA, A.; van ZYL, W.H. Degradation of aflatoxin B_1 by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v.135, p.47–52, 2009.

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

AN, Z. *Handbook of Industrial Mycology*. v.22. New York: Marcel Dekker, 2005.

AZAB, R.M.; TAWAKKOL, W.M.; HAMAD, A.R.M; ABOU-ELMAGD, M.K.; EL-AGRAB, H.M.; REFAI, M.K. Detection and Estimation of Aflatoxin B_1 in Feeds and its Biodegradation by Bacteria and Fungi. *Egyptian Journal of Natural Toxins*, v.2, p.39-56, 2005.

BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxina M_1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, v.12, p.47-51, 2001.

BARTOSZEK, A. Genotoxic Food Components. In: MALEJKA-GIGANTI, D.; BARTOSZEK, A.; BAER-DUBOWSKA, W. *Carcinogenic and Anticarcinogenic Food Components*. CRC Press, 2006. Cap. 4, p.69-96.

BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Science & Technology*, v.10, p.223-228, 1999.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J.D.; LABADIE, J.C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, v.25, p.225-232, 1996.

BHAT, R.; RAI, R.V.; KARIM, A.A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p.57-81, 2010.

BIERNASIAK, J.; PIOTROWSKA, M.; LIBUDZISZ, Z. Detoxification of mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens. *Mycotoxin Research*, v.22, n.4, p.230-235, 2006.

BOLOGNANI, F.; RUMNEY, C.J.; ROWLAND, I.R. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, v.35, p.535-545, 1997.

BRACKETT, R.E.; MARTH, E.H. Association of aflatoxin M_1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung Unters Forschung A*, v.174, n.6, p.439-441, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA n°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 – D.O.U., de 25 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. *Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim e no Milho*. Diário Oficial da União – D.O.U., de 16 de outubro de 2002.

ÇELIK, T.H.; SARIMEHMETOGLU, B.; KÜPLÜLÜ, Ö. Aflatoxin M_1 contamination in pasteurized milk. *Veterinarski Arhiv*, n.75, p.57-65, 2005.

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

CIEGLER, A.; LILLEHOJ, E.B.; PETERSON, R.E.; HALL, H.H. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.14, n.6, p.934-939, 1966.

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

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

D'SOUZA, D.H.; BRACKETT, R.E. Aflatoxin B_1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *Journal of Food Protection*, v.64, n.2, p.268–271, 2001.

ELGERBI, A.M.; AIDOO, K.E.; CANDLISH, A.A.G.; WILLIAMS, A.G. Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin M_1 in milk and phosphate buffer. *Milchwissenschaft*, v.61, n.2, p.197-199, 2006.

EL-NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S. AHOKAS, J. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*, v.61, n.4, p.466-468, 1998a.

EL-NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S. AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B_1. *Food and Chemical Toxicology*, v.36, p.321-326, 1998b.

EL-NEZAMI, H.; MYKKÄNEN, H.; KANKAANPÄÄ, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B_1 from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection*, v.63, n.4, p.549–552, 2000a.

EL-NEZAMI, H.S.; MYKKÄNEN, H.; KANKAANPÄÄ, P.; SUOMALAINEN, T.; AHOKAS, J.T.; SALMINEN, S. The ability of a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* to influence the faecal recovery of aflatoxins in healthy Egyptian volunteers: a pilot clinical study. *Bioscience and Microflora*, v.19, p.41–45, 2000b.

EL-NEZAMI, H.; MYKKÄNEN, H.; HASKARD, C.; SALMINEN, S.; SALMINEN, E. Lactic Acid Bacteria as a Tool for Enhancing Food Safety by Removal of Dietary Toxins. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A,; OUWEHAND, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3.ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2004. Cap. 12, p.397-406.

FAZELI, M.R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M.R.; VAGHARI, E.; POURAGAHI, S. Aflatoxin B_1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, v.72, n.1, p.189–192, 2009.

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

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.1398–1407, 2008.

GACULA, J.R.; SINGH, J. *Statistical methods in food and consumer research*. Orlando: Academic Press, 1984.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M_1 in milk and milk products: A worldwide review. *Journal of Food Protection*, v.59, n.10, p.1079-1090, 1996.

GALVANO, F., GALOFARO, V., ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M., GALVANO, G. Survey of the occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products marketed in Italy. *Journal of Food Protection*, v.61, p.738-741, 1998.

GARRIDO, N.S.; IHA, M.H.; ORTOLANI, M.R.S.; FAVARO, R.M.D. Occurrence of aflatoxins M_1 and M_2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v.20, p.70-73, 2003.

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

GRATZ, S.; MYKKÄNEM, H.; EL-NEZAMI, H. Aflatoxin B_1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. *Journal of Food Protection*, v.68, n.11, p.2470–2474, 2005.

HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, v.128, p.39–49, 2000.

HASKARD, C.A.; EL-NEZAMI, H.S.; KANKAANPÄÄ, P.E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J.T. Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.7, p.3086-3091, 2001.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B_1. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, p.1064–1068, 2009a.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; GARCIA, H.S. Key role of teichoic acids on aflatoxin B_1 binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p.395–403, 2009b.

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

[IARC] International Agency for Research on Cancer – World Health Organization. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, v.56, p.19–23, 1993.

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

[INCHEM] International Program on Chemical Safety – Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations, 1979. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>. Acesso em: 22 dez. 2010.

[JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*. 56th meeting of the JECFA – FAO Food and Nutrition Paper 74/WHO Foods Additives Series 47.

KABAK, B.; VAR, I. Factors affecting the removal of aflatoxin M_1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, v.43, p.617–624, 2008.

KABAK, B.; DOBSON, A.D.W. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, v.72, n.9, p.2006–2016, 2009.

KIM, E.K., SHON, D.H., RYU, D., PARK, J.W., HWANG, H.J., KIM, Y.B. Ocurrence of aflatoxin M_1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, v.17, p.59-64, 2000.

KUIPER-GOODMAN, T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.68, p.1017–1024, 1990.

LACIAKOVÁ, A.; CICOÒOVÁ, P.; MÁTÉ, D.; LACIAK, V. Aflatoxins and possibilities for their biological detoxification. *Medycyna Weterynaryjna*, v.64, n.3, 2008.

LAHTINEN, S.J.; HASKARD, C.A.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; AHOKAS, J.T. Binding of aflatoxin B_1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, v.21, n.2, p.158–164, 2004.

LEE, Y.K.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.A.; GRATZ, S.; PUONG, K.Y.; SALMINEN, S.; MYKKÄNEN, H. Kinetics of Adsorption and Desorption of Aflatoxin B_1 by Viable and Nonviable Bacteria. *Journal of Food Protection*, v.66, n.3, p.426–430, 2003.

LILLEHOJ, E.B.; STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M.; SHOTWELL, O.L. Aflatoxin M_1 removal from aqueous solutions by *Flavobacterium aurantiacum*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, v.45, n.3-4, p.259-266, 1971.

LINE, J.E.; BRACKETT, R.E. Factors affecting aflatoxin B_1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, v.58, n.1, p.91-94, 1995.

MAGAN, N.; OLSEN, M. *Mycotoxins in food* – Detection and Control. Boca Raton: CRC Press, 2006.

MISHRA, H.N.; DAS, C. A Review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.43, n.3, p.245–264, 2003.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 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*. CRC Press, 2008. Cap. 27, p.457-472.

OATLEY, J.T.; RARICK, M.D.; JI, G.E.; LINZ, J.E. Binding of aflatoxin B_1 to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection*, v.63, n.8, p.1133–1136, 2000.

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*, v.31, n.4, Ago. 1997.

OLIVEIRA, C.A.F.; ROSMANINHO J.; ROSIM, R. Aflatoxin M_1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v.23, p.196–201, 2006.

OLIVEIRA, C.A.F.; FERRAZ, J.C.O. Occurrence of aflatoxin M_1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. *Food Control*, 18: 375–8, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v.1, p.147–52, 2008.

OLUWAFEMI, F.; DA-SILVA, F.A. Removal of aflatoxins by viable and heat-killed Lactobacillus species isolated from fermented maize. *Journal of Applied Biosciences*, v.16, p.871–876, 2009.

ONILUDE, A.A.; FAGADE, O.E.; BELLO, M.M.; FADAHUNSI, I.F. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *African Journal of Biotechnology*, v.4, n.12, p.1404-1408, 2005.

PARK, D.L.; LIANG, B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science & Technology*, v.41, p.334-342, 1993.

PARK, D.L.; AYALA, C.E.; GUZMAN-PEREZ, S.E.; LOPEZ-GARCIA, R.; TRUJILLO, S. Microbial Toxins in Foods: Algal, Fungal, and Bacterial. In: HELFERICH, W.; WINTER, C.K. *Food Toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2000. Cap. 5.

PELTONEM, K.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. Aflatoxin B_1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.2152–2156, 2001.

PIERIDES, M.; EL-NEZAMI, H.; PELTONEM, K.; SALMINEM, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M_1 in a food model. *Journal of Food Protection*, v.63, n.5, p.645-650, 2000.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; PEREIRA, M.L.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T. Aflatoxin M_1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, n.3, 2000.

PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. On the occurrence of aflatoxin M_1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, p.984–991, 2009.

RASIC, J.L.; SKRINJAR, M.; MARKOV, S. Decrease of aflatoxins B_1 in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia*, v.113, p.117–119, 1991.

REVANKAR, S.G. Clinical implications of mycotoxins and stachybotrys. *American Journal of the Medical Sciences*, v.325, p.262–274, 2003.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; VON WRIGHT, A.; DALY, C. Future Aspects of Research and Product Development of Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A.C. *Lactic Acid Bacteria*: Microbiological and Functional Aspects. 3.ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. Cap. 22.

SARIMEHMETOGLU, B.; KÜPLÜLÜ, Ö. Binding ability of aflatoxin M_1 to yoghurt bacteria. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, v.51, p.195-198, 2004.

SAS Institute. *SAS® User's Guide*: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC., 1992.

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

SEKIYAMA, B.L.; FERRARI, G.; MACHINSKI JUNIOR, M. Processos de descontaminação de rações contendo micotoxinas. *Revista Analytica*, n.26, p.64-67, 2007.

SHAHIN, A.A.M. Removal of aflatoxin B_1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.9, n.1, p.71-75, 2007.

SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, v.17,p.48–55, 2006.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Determinação de aflatoxina M_1 em leite por coluna de imunoafinidade CCD/CLAE. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, n.2, abr./jun. 2006.

SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M_1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, v.20, p.655–657, 2009.

SYBESMA, W.F.; HUGENHOLTZ, J. Food fermentation by lactic acid bacteria for the prevention of cardiovascular disease. In: ARNOLDI, A. *Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabetes*. CRC Press, 2004. Cap. 21.

VAN EGMOND, H.P.; JONKER, M.A. Worldwide regulations on aflatoxins – The situation in 2002. *Toxin Reviews*, v.23, p.273-293, 2004.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. *Dairy Science and Technology*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, v.41, n.1, p.1-7, 2009.

ZINEDINE, A.; FAID, M.; BENLEMLIH, M. *In Vitro* Reduction of Aflatoxin B_1 by Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Moroccan Sourdough Bread. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.7, n.1, p.67-70, 2005.