

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE

**Leveduras com potencial ação descontaminante
de micotoxinas e como probiótico para
aplicação na produção animal.**

Kelly Moura Keller

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**LEVEDURAS COM POTENCIAL AÇÃO DESCONTAMINANTE DE
MICOTOXINAS E COMO PROBIÓTICO PARA APLICAÇÃO
NA PRODUÇÃO ANIMAL.**

KELLY MOURA KELLER

Sob a Orientação do Professor

Carlos Alberto da Rocha Rosa

E Co-Orientação das Professoras

Lilia Renée Cavaglieri

e

Rosane Nora Castro

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2012

579.563

K291

T

Keller, Kelly Moura, 1981-

Leveduras com potencial ação
descontaminante de micotoxinas e como
probiótico para aplicação na produção
animal / Kelly Moura Keller - 2012.
168 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha
Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

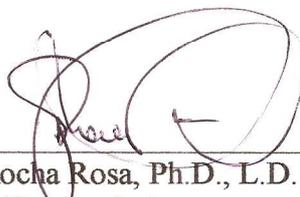
1. Saccharomyces cerevisiae - Teses. 2.
Leveduras (Fungos) - Teses. 3. Aflatoxina -
Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha,
1953-. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

KELLY MOURA KELLER

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

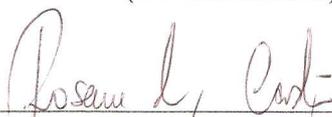
TESE APROVADA EM 15 / 02 / 2012



Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D., L.D. - UFRRJ
(Orientador)



Lilia Renée Cavaglieri, DSc. – UNRC - Argentina
(Co-orientadora)



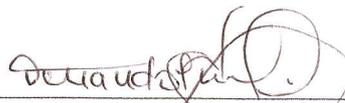
Rosane Nora Castro, DSc. - UFRRJ
(Co-orientadora)



Ana Maria Dalcero, DSc. – UNRC, Argentina



Cecília Ana Dogi, DSc. – UNRC, Argentina



Fernando Augusto Curvello, DSc. - UFRRJ



Miliane Moreira Soares de Souza, DSc. – UFRRJ

*Dedico este trabalho à minha
família e amigos, em especial
minha mãe, por seu amor e
dedicação a todo instante...*

*Sorte é quando a preparação
encontra a oportunidade.
(Elmer G. Letterman)*

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, por sempre ter me apoiado e incentivado, com muito carinho e compreensão.

Ao CNPq, órgão financiador desses anos de pesquisa.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e os vários amigos que fiz nesta instituição e que sempre me apoiaram nessa caminhada.

À todos os que integram (ou já integraram) o Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ. Cada um com suas particularidades, contribuindo para o meu crescimento e aprendizado de vida.

Ao Prof. Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação de longa data, por sempre ter aberto novas portas para o meu crescimento.

À Profa. Rosane Nora Castro, por sempre ter me apoiado e acolhido em momentos de dificuldade. Por todo o carinho com que sempre me atendeu.

À Universidad Nacional de Río Cuarto – Argentina onde tive a oportunidade de conhecer muitas pessoas, colaboradores para este trabalho. Em especial, minha amiga Carina Maricel Pereyra, pela importante ajuda e aprendizado conjunto.

Às Profa. Lilia Renée Cavaglieri, Ana Maria Dalcerro e Carina Elizabeth Magnoli pela orientação e ensinamentos transmitidos. Por sempre terem me acolhido tão carinhosamente, dando o apoio necessário à conclusão deste trabalho.

À todos que me incentivaram, e que direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

À todos vocês, o meu muito obrigada!

RESUMO

KELLER, Kelly Moura **Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal**. 2012. 168p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certas espécies de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e que demonstram propriedades tóxicas em humanos e animais. As aflatoxinas (AFs) são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que se desenvolvem sobre diversos gêneros alimentícios. Em todo o mundo, *Sacharomyces cerevisiae* virou foco de inúmeros estudos, *in vitro* e *in vivo*, devido à capacidade adsorvente exibida pela parede celular desta levedura. Sua parede celular já era usada como prebiótico para melhorar o desempenho animal, e atualmente sabe-se que um dos constituintes principais de sua parede - os glucomanos - também são capazes de adsorver diversas micotoxinas como as AFs. Assim, os objetivos gerais deste trabalho foram: I) demonstrar a eficácia *in vitro* de produtos comerciais, a base de parede celular de levedura (PCL) para adsorver aflatoxina B₁ (AFB₁), sob diferentes condições; II) demonstrar *in vitro* o potencial de leveduras vivas (enfoque em *S. cerevisiae*) para exercer ação probiótica e descontaminante de AFB₁ e III) demonstrar a eficácia *in vivo* de produto a base de PCL como aditivos anti micotoxinas (AAM) em frangos de corte intoxicados com AFB₁. Estes objetivos foram desenvolvidos em três capítulos, por separado. Ambos os AAM testados no capítulo I aderiram eficientemente a AFB₁, sendo recomendada a realização de ensaios *in vivo* confirmatórios. As cepas de *S. cerevisiae* isoladas no capítulo II toleraram a passagem pelas condições *in vitro* gastrointestinais, apresentaram uma ou mais características probióticas, e foram moderadamente capazes de adsorver altas concentrações de AFB₁; e no capítulo III, a inclusão do AAM 0,2% na dieta dos frangos de corte não produziu nenhum efeito deletério significativo sobre os animais, pelo contrário, melhorou significativamente o desempenho animal em relação ao grupo de animais intoxicados e o grupo controle. Existe a clara necessidade de uma metodologia *in vitro* de referência, que possa ser utilizada mundialmente, possibilitando a comparação interlaboratorial de resultados. Os resultados em geral indicam que novos estudos devem ser desenvolvidos acerca do assunto, e que há uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos aditivos com ação probiótica e descontaminante de micotoxinas.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Paredes Celulares de Leveduras; Aflatoxina B₁

ABSTRACT

KELLER, Kelly Moura. **Yeasts with mycotoxin decontaminating and probiotic potential for use in animal production.** 2012. 168p. Thesis (Doctor's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain species of filamentous fungi, mainly among *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genera, which show toxic properties in humans and animals. Aflatoxins (AFs) are mycotoxins produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, which grow on several foodstuffs. Worldwide, *Saccharomyces cerevisiae* has become the focus of numerous *in vitro* and *in vivo* studies due to the adsorbent ability displayed by its yeast cell wall. The cell wall has been already used as prebiotics to improve animal performance, and now it is known that one of the main components of the cell wall - the glucomannans - are also capable of adsorbing several mycotoxins such as AFs. Thus, the general objectives of this study were: i) to demonstrate the *in vitro* efficacy of commercial products, source of yeast cell wall (YCW), to adsorb aflatoxin B₁ (AFB₁) under different conditions; II) to show the potential of live yeast (focus on *S. cerevisiae*) to carry out probiotics and decontamination action of AFB₁ *in vitro* and III) to demonstrate the *in vivo* efficacy of YCW product as anti mycotoxins additives (AAM) in broiler chickens intoxicated with AFB₁. These objectives were developed in three separated chapters. Both AAM tested in Chapter I adhered efficiently to AFB₁, and *in vivo* tests were recommended to confirmatory results. The *S. cerevisiae* strains isolated in Chapter II tolerate passage through the gastrointestinal conditions *in vitro*, had one or more benefic characteristics, and were able to adsorb high AFB₁ concentrations. In Chapter III, the inclusion of AAM 0.2% in the diet of broiler chickens produced no significant deleterious effect on animals, however, significantly improved animal performance in relation to the intoxicated animals group and the control group. There is a clear need for an *in vitro* reference methodology, which can be used worldwide, allowing the intercomparison of results. Generally, the results indicate that further studies should be developed on the subject, and that there is a promising alternative for the development of new additives with probiotic and mycotoxins decontamination potencial.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, yeast cell walls, adsorption

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO *in vitro* DE PRODUTOS COMERCIAIS A BASE DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS NA CAPACIDADE DE ADSORVER AFLATOXINA B₁

Tabela 1:	Composição química* (%) do concentrado de manano-oligossacarídeos.....	26
Tabela 2:	Composição química* estimada (%) da zeólita (clinoptilolita).....	27
Tabela 3:	Protocolo utilizado para os ensaios de adsorção <i>in vitro</i> de concentração única por cada pH.....	28
Tabela 4:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-1, em pH 3 e sistema tampão fosfato-salino.....	31
Tabela 5:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-1, em pH 6 e sistema tampão fosfato-salino.....	32
Tabela 6:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-2, em pH 3 e sistema tampão fosfato-salino.....	32
Tabela 7:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-2, em pH 6 e sistema tampão fosfato-salino.....	33
Tabela 8:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-1, em pH 3 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.....	34
Tabela 9:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-1, em pH 6 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.....	34
Tabela 10:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-2, em pH 3 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.....	35
Tabela 11:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-2, em pH 6 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.....	35
Tabela 12:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-1, em simulador gástrico artificial (pH 3).....	36
Tabela 13:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-1, em simulador intestinal artificial (pH 6).....	36
Tabela 14:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-2, em simulador gástrico artificial (pH 3).....	37

Tabela 15:	Resultados obtidos para os ensaios <i>in vitro</i> do AAM-2, em simulador intestinal artificial (pH 6).....	37
Tabela 16:	Parâmetros de ajuste obtidos a partir do modelo matemático de Hill para as isotermas de adsorção de AFB ₁ e o AAM-1, nos diferentes pH analisados.....	41

CAPÍTULO II: LEVEDURAS PARA USO COMO PROBIÓTICO E DESCONTAMINANTE DE AFLATOXINA B₁ NA PRODUÇÃO ANIMAL

Tabela 1:	Meios de cultivo utilizados para a identificação de leveduras e suas respectivas funções.....	75
Tabela 2:	Princípio e Componentes do produto RapID™ YEAST PLUS System.....	77
Tabela 3:	Interpretação dos resultados nos ensaios para determinação da capacidade de autoagregação de leveduras.....	81
Tabela 4:	Interpretação dos resultados nos ensaios para determinação da capacidade de coagregação de leveduras com patógenos.....	82
Tabela 5:	Número de amostras e leveduras isoladas segundo as diferentes origens.....	85
Tabela 6:	Comparação dos resultados obtidos pela identificação morfológica e nutricional.....	88
Tabela 7:	Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL74.....	91
Tabela 8:	Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL74.....	92
Tabela 9:	Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL83.....	92
Tabela 10:	Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL83.....	93

Tabela 11:	Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL74.....	94
Tabela 12:	Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL74.....	94
Tabela 13:	Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL83.....	95
Tabela 14:	Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL83.....	95
Tabela 15:	Interação entre os fatores presença de soluções simuladoras de TGI e tempos de passagem para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância aos simuladores gastrointestinais para a cepa LL74.....	98
Tabela 16:	Interação entre os fatores presença de soluções simuladoras de TGI e tempos de passagem para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância aos simuladores gastrointestinais para a cepa LL83.....	99
Tabela 17:	Resultados dos ensaios de coagregação entre cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e bactérias patógenas.....	102
Tabela 18:	Resultados dos ensaios de capacidade de produção de substâncias antimicrobianas por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente à bactérias patógenas.....	103
Tabela 19:	Capacidade <i>in vitro</i> de adsorção de aflatoxina B ₁ por células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104

CAPÍTULO III: EFEITO DA ADIÇÃO DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE INTOXICADOS COM AFLATOXINA B₁

Tabela 1:	Composição e perfil nutricional da dieta utilizada durante o experimento.....	128
Tabela 2:	Peso vivo dos animais no 1º, 7º, 14º e 21º dias de idade nos diferentes tratamentos.....	131
Tabela 3:	Ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos.....	132
Tabela 4:	Consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos.....	133
Tabela 5:	Conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos.....	133
Tabela 6:	Efeito dos tratamentos sobre o peso relativo de órgãos ao 21º dia de idade.....	134
Tabela 7:	Efeito dos tratamentos sobre parâmetros sanguíneos das aves ao 21º dia de idade.....	135

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO *in vitro* DE PRODUTOS COMERCIAIS A BASE DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS NA CAPACIDADE DE ADSORVER AFLATOXINA B₁

Figura 1:	Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	9
Figura 2:	Reações de biotransformação da aflatoxina B ₁ em aves e mamíferos. Nem todas as reações ocorrem em uma única espécie.....	12
Figura 3:	Macroscopia de (a) <i>Aspergillus flavus</i> e (b) <i>Aspergillus parasiticus</i> ...	14
Figura 4:	Unidades estruturais básicas das zeólitas. (a) Tetraedro com um átomo de Si no centro e átomos de O nos vértices. (b) Tetraedro com átomo de Al no centro ligado a um cátion monovalente para compensar a diferença de carga entre o Si e o Al. (c) Átomo divalente para balancear as cargas de dois átomos de Al separados por um átomo de Si.....	17
Figura 5:	Representação estrutural da clinoptilolita e sua respectiva fórmula química.....	18
Figura 6:	Representação esquemática do mecanismo envolvido em isotermas do tipo L (formação de monocamada).....	22
Figura 7:	Representação esquemática do mecanismo envolvido em isotermas do tipo S (cooperativismo).....	23
Figura 8:	Isotermas de saturação: efeito da massa dos AAM sobre a adsorção de AFB ₁ . a) AAM-1 e b) AAM-2 em pH 3 a 37°C.....	40
Figura 9:	Isotermas de adsorção de AFB ₁ , para o AAM-1, em pH 3 e 6, segundo modelo de Hill.....	42
Figura 10:	Isotermas de adsorção de AFB ₁ , para o AAM-2, em pH 3 e 6, segundo modelo de Hill.....	42

CAPÍTULO II: LEVEDURAS PARA USO COMO PROBIÓTICO E DESCONTAMINANTE DE AFLATOXINA B₁ NA PRODUÇÃO ANIMAL

Figura 1:	Micrografia colorida de microscopia eletrônica de transmissão da secção de corte de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , incluindo uma célula em brotamento. Legenda: Citoplasma em vermelho, vacúolos em amarelo, paredes celulares em verde e núcleo em azul escuro. Ampliação: x 5000 no tamanho de 35mm.....	66
Figura 2:	Representação esquemática do arranjo estrutural da parede celular de leveduras.....	67
Figura 3:	Representação esquemática do mecanismo de ação dos MOS através do reconhecimento de sítios de ligação de bactérias patogênicas.....	71
Figura 4:	Frequência das espécies de leveduras isoladas a partir de amostras das diferentes origens.....	86
Figura 5:	Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos diferentes meios de cultivo recomendados por Pitt e Hocking (2009).....	87
Figura 6:	Características microscópicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Típicas células vegetativas e reprodução por brotamento. Aumento de 400x..	87
Figura 7:	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resistentes aos oito antibióticos testados (resultados em triplicata).....	89
Figura 8:	Representação dos quadrantes e sub-quadrantes vistos em uma câmara de Neubauer.....	96
Figura 9:	Contagem de células totais de leveduras em câmara de Neubauer. Direita: visão geral do quadrante B (aumento 100x). Esquerda: visão nos sub-quadrantes b (aumento 400x).....	97
Figura 10:	Aspecto macroscópico das suspensões iniciais e finais utilizadas nos ensaios de autoagregação.....	100
Figura 11:	Aspecto microscópico de suspensão final utilizadas nos ensaios de autoagregação. Observar células autoagregadas indicadas pelas setas vermelhas. Aumento 100x.....	101
Figura 12:	Ensaio de capacidade de coagregação. (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LL83 e <i>Salmonella</i> spp. (+++). (b) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LL74 e <i>E. coli</i> (0). Aumento 400x.....	102

Figura 13: Ensaios de produção de substâncias com atividade antimicrobiana. (a) Resultado positivo. Observa-se a formação de zonas claras de inibição no cruzamento entre estrias. (b) Resultado negativo. O patógeno foi capaz de crescer inclusive em cima da levedura..... 104

CAPÍTULO III: EFEITO DA ADIÇÃO DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE INTOXICADOS COM AFLATOXINA B₁

Figura 1: Fígados representativos dos frangos (21 dias de idade) submetidos aos diferentes tratamentos. Macroscopicamente, observam-se em T02 (controle do aditivo) e T04 (AFB₁ + AAM-1), fígados com aparência e tamanhos normais, semelhantes ao T01 (controle negativo). Fígados de T03 (controle positivo) apresentaram-se com esteatose e ligeira hepatomegalia..... 136

Figura 2: Cortes histológicos (400x, HE) de fígados representativos dos frangos (21 dias de idade) submetidos aos diferentes tratamentos. T01 apresenta-se com histologia normal mostrando cordões de hepatócitos periportais preservados; T02 também apresenta histologia normal, apenas com a presença de alguns aglomerados de células basofílicas. T03 apresenta completa desorganização de hepatócitos com áreas de necrose multifocal e vacuolização intracitoplasmática; T04 apresenta cordões de hepatócitos preservados com áreas localizadas de vacuolização intracitoplasmática e picnose nuclear. Barra equivalente a 10 µm..... 137

LISTA DE ABREVIATURAS

CPA	Ácido Ciclopiazônico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
AAM	Aditivo(s) Anti-Micotoxina(s)
AF	Aflatoxina(s)
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
Cz	Agar Czapek
DRBC	Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
MY10-12	Agar Extrato de Levedura, NaCl 10% e Glicose 12%
YPD	Agar/Caldo Extrato de Levedura Peptona Dextrose
MEA	Agar Extrato de Malte
MY-50G	Agar Extrato de Malte, Extrato de Levedura, Glicose 50%
MAA	Agar Malte Acético
SDA	Agar Sabouraud Dextrose
ALT	Alanina-Amino-Transferase
HSCAS	Aluminossilicato(s) de Sódio e Cálcio Hidratado(s)
ANOVA	Análise de Variância
APC	Antibióticos Promotores de Crescimento
AST	Aspartato-Amino-Transferase
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CR	Consumo de Ração
CA	Conversão Alimentar
SD	Desvio Padrão
LD₅₀	Dose Letal 50%
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Fruto-Oligossacarídeos
GP	Ganho de Peso
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>
IgA	Imunoglobulina A
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer
LAMIC	Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal de Santa Maria
LSD	<i>Least Square Difference</i> Teste Estatístico da Menor Diferença Significativa
MOS	Manano-Oligossacarídeos
\bar{X}	Média Aritmética
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NPMM	Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas
OTA	Ocratoxina A
PCL	Parede(s) Celular(es) de Levedura(s)
ppb	Partes por Bilhão
ppm	Partes por Milhão
PV	Peso Vivo
PSA	Projeto Sanidade Animal
PT	Proteínas Totais
rpm	Rotações por Minuto
TIM	Simuladores <i>in vitro</i> Gastrointestinais Dinâmicos
TGI	Trato Gastrointestinal
UV	Ultravioleta
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UE	União Européia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
WHO	<i>World Health Organization</i> Organização Mundial de Saúde
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Hipótese Geral	2
Objetivos Gerais	3
Estrutura da Tese	3
CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DE PRODUTOS COMERCIAIS A BASE DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS NA CAPACIDADE DE ADSORVER AFLATOXINA B₁	4
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Aflatoxinas: Generalidades	8
1.2 Toxicidade das Aflatoxinas	10
1.3 Biotransformação das Aflatoxinas	10
1.4 Fungos Produtores de Aflatoxinas	12
1.5 Estratégias de Prevenção e Controle	14
1.6 Métodos Físicos: com o Uso de Adsorventes Inorgânicos	16
1.6.1 Zeólitas: clinoptilolita	16
1.7 Métodos Biológicos: através do Uso de Paredes Celulares de Leveduras	19
1.8 Mecanismo de Ação <i>in vitro</i> dos Agentes Descontaminantes de Micotoxinas	20
1.8.1 Estudos de concentração única	21
1.8.2 Isotermas de adsorção	21
1.8.3 Simuladores gastrointestinais estáticos e dinâmicos	23
1.9 Legislação Brasileira sobre Aditivos	24
1.10 Hipótese	25
1.11 Objetivos Específicos	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Aflatoxina B ₁	26
2.2 Produtos Comerciais Utilizados	26
2.3 Ensaio <i>in vitro</i> de Adsorção	27
2.3.1 Ensaio <i>in vitro</i> de concentração única	27

2.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> através de isothermas de adsorção	29
2.4 Condições Cromatográficas dos Ensaio	29
2.5 Análises Estatísticas	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Ensaio <i>in vitro</i> de Concentração Única sob Diferentes Soluções de Reação	31
3.1.1 Sistema tampão 1: fosfato-salino	31
3.1.2 Sistema tampão 2: fosfato-ácido cítrico	33
3.1.3 Simuladores artificiais: gástrico e intestinal	35
3.2 Ensaio <i>in vitro</i> através de Isothermas de Adsorção	40
4. CONCLUSÕES	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO A: Transcrição da Proposta para Registro de Aditivos Anti-Micotoxinas Elaborada pelo Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas (BRASIL, 2006).	58
CAPÍTULO II: LEVEDURAS PARA USO COMO PROBIÓTICO E DESCONTAMINANTE DE AFLATOXINA B₁ NA PRODUÇÃO ANIMAL	62
1. INTRODUÇÃO	65
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
1.2 Probióticos	68
1.3 Prebióticos	70
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na Alimentação Animal	72
1.5 Hipótese	73
1.6 Objetivos Específicos	73
2. MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1 Amostragem	74
2.2 Isolamento de Leveduras a partir das Amostras de Diferentes Origens	74
2.2.1 A partir de alimentos e fezes	74

2.2.2 A partir de intestinos de animais	74
2.3 Identificação de Leveduras	75
2.3.1 Identificação morfológica	75
2.3.2 Identificação nutricional	76
2.4 Estudo das Propriedades Probióticas das Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Isoladas	78
2.4.1 Resistência a antibióticos de uso frequente em animais de produção	78
2.4.2 Ensaio de tolerância às condições gastrointestinais	78
2.4.3 Capacidade de autoagregação	81
2.4.4 Capacidade de coagregação com microrganismos patógenos	82
2.4.5 Capacidade de produção de substâncias antimicrobianas frente à patógenos	83
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> do Potencial das Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Isoladas para Adsorver Aflatoxina B ₁	83
2.6 Análises Estatísticas	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1 Isolamento e Identificação Morfológica das Leveduras Isoladas	85
3.2 Identificação Nutricional das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Isoladas	88
3.3 Estudo das Propriedades Probióticas das Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Isoladas	89
3.3.1 Resistência a antibióticos	89
3.3.2 Ensaio de tolerância às condições gastrointestinais	90
3.3.3 Capacidade de autoagregação	99
3.3.4 Capacidade de coagregação com microrganismos patógenos	101
3.3.5 Capacidade de produção de substâncias antimicrobianas frente à patógenos	103
3.4 Avaliação <i>in vitro</i> do Potencial Descontaminante de Aflatoxina B ₁ das Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Isoladas	104
4. CONCLUSÕES	106
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

CAPÍTULO III: EFEITO DA ADIÇÃO DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE INTOXICADOS COM AFLATOXINA B₁	116
1. INTRODUÇÃO	119
1.1 Avicultura no Brasil	120
1.2 Ocorrência de Aflatoxinas e seus Fungos Produtores em Rações de Aves	121
1.3 Aflatoxicose em Aves	122
1.4 Eficácia dos Aditivos Anti-Micotoxinas em Ensaio <i>in vivo</i>	125
1.5 Hipótese	126
1.6 Objetivos Específicos	126
2. MATERIAIS E MÉTODOS	127
2.1 Local	127
2.2 Aves Experimentais	127
2.3 Delineamento Experimental	127
2.4 Dieta e Manejo	128
2.5 Parâmetros Analisados	129
2.6 Produção de Aflatoxina B ₁	130
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
4. CONCLUSÕES	139
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
CONSIDERAÇÕES FINAIS	146

INTRODUÇÃO GERAL

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certas espécies de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e que demonstram propriedades tóxicas em humanos e animais. Constituem um grupo diverso de substâncias químicas, de baixo peso molecular, que podem afetar muitos órgãos e sistemas, principalmente o fígado, rins e sistemas nervoso, endócrino e imune. Mais de 400 metabólitos secundários fúngicos foram identificados, no entanto, o número de micotoxinas que têm sido detectadas com frequência em alimentos é reduzido para cerca de 30. A principal via de exposição dos animais é através da ingestão de alimentos contaminados. As culturas agrícolas, especialmente os cereais, são susceptíveis ao ataque de fungos, no campo ou durante o armazenamento e os níveis de micotoxinas nos alimentos podem flutuar de acordo com as condições para o crescimento dos fungos produtores. Quando presentes em níveis elevados na dieta alimentar, estas toxinas podem levar a problemas agudos de saúde e até a morte; já a exposição prolongada a níveis baixos pode levar a manifestações ocultas (imunidade debilitada, atrasos no crescimento, susceptibilidade a doenças), e a problemas crônicos de saúde, o que gera preocupação por parte dos governos em todo o mundo.

As estratégias de prevenção precisam ter como alvo primário minimizar a formação de micotoxinas no campo e durante armazenamento, no entanto, quando as ações empregadas não forem possíveis ou eficientes devem ser então aplicadas medidas pós-colheita para a detoxificação. Cria-se então um novo grupo funcional de aditivos alimentares, os Aditivos Anti-Micotoxinas (AAM), que inclui os produtos que, quando adicionados em alimentos para animais, são capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas. Dependendo do seu modo de ação, esses aditivos podem agir através da redução da biodisponibilidade das micotoxinas ou através da sua degradação ou transformação em metabólitos menos tóxicos.

Os agentes de adsorção ou adsorventes são compostos de alto peso molecular, que devem ser capazes de se ligar às micotoxinas presentes nos alimentos contaminados, sem se dissociar no trato gastrointestinal (TGI) do animal. Desta forma, o complexo micotoxina-adsorvente atravessa o trato digestivo do animal e é eliminado através das fezes. Isso evita ou minimiza a exposição dos animais às micotoxinas. Existem dois tipos de adsorventes, os agentes inorgânicos e os agentes orgânicos.

Os adsorventes inorgânicos são polímeros à base de sílica, tais como: zeólitas, bentonitas, argilas diversas, aluminossilicatos de sódio e cálcio hidratados (HSCAS), terra

diatomácea, etc. Tais materiais são geralmente de baixo custo e de fácil manuseio, mas exigem altas taxas de inclusão, além de serem capazes de se ligar a um número pequeno de micotoxinas e realizarem ligações não-específicas, adsorvendo minerais e vitaminas presentes na dieta, causando outras complicações de saúde.

Estes argumentos estimulam os pesquisadores a desenvolverem novas estratégias de descontaminação que evitem o uso de agentes químicos ou físicos e que reduzam as perdas de valor nutritivo e de palatabilidade de alimentos descontaminados, entretanto, sem diminuir os níveis produtivos. Assim, uma das alternativas promissoras é a detoxificação biológica.

Os extratos da parede celular de leveduras constituem uma das ferramentas mais importantes desta biotecnologia. A eficácia dos produtos de leveduras contendo glucomananos para uso como adsorventes de micotoxinas em rações tem sido investigada globalmente e os benefícios do seu uso são as baixas taxas de inclusão na dieta, grande área superficial para adsorção de um grande número de micotoxinas e, certamente, não envolve risco de contaminação por materiais tóxicos; e neste contexto, as paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas.

Ainda que os resultados obtidos mundialmente nesta temática sejam promissores, no Brasil é necessário um maior desenvolvimento destas estratégias biológicas de descontaminação de micotoxinas aplicadas para alimentação animal.

Hipótese Geral

“Leveduras são capazes de descontaminar micotoxinas podendo ser aplicadas em alimentos destinados à produção animal.”

Objetivos Gerais

- a) Demonstrar a eficácia *in vitro* de produtos comerciais, a base de parede celular de leveduras, para adsorver aflatoxina B₁ (AFB₁) sob diferentes condições.
- b) Demonstrar *in vitro* o potencial de leveduras vivas para exercer ação probiótica e descontaminante de AFB₁.
- c) Demonstrar a eficácia *in vivo* de produto a base de parede celular de leveduras como AAM em frangos de corte intoxicados com AFB₁.

Estrutura da Tese

Para demonstrar cada um dos objetivos gerais propostos, a tese foi dividida em três capítulos com abordagem mais aprofundada sobre cada uma das temáticas especificadas.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO *in vitro* DE PRODUTOS COMERCIAIS A BASE DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS NA CAPACIDADE DE ADSORVER AFLATOXINA B₁

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certas espécies de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e que demonstram propriedades tóxicas em humanos e animais. As aflatoxinas (AFs) são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que sob condições favoráveis de temperatura e de umidade se desenvolvem sobre diversos gêneros alimentícios. Particularmente a aflatoxina B₁ (AFB₁) têm despertado um grande interesse devido à existência de suficientes dados experimentais que indicam sua atividade tóxica, carcinogênica, teratogênica e mutagênica. Podemos contornar o problema das micotoxinas em alimentos por métodos de prevenção, físicos, como o uso de adsorventes inorgânicos, ou biológicos, através de paredes celulares de leveduras (PCL), que além de efeito pró e prebiótico, apresentam poder de adsorção sobre as micotoxinas. Porém, há diferenças na capacidade adsorptiva das PCL oriundas de cepas diversas, e a análise *in vitro* do processo de adsorção é uma ferramenta poderosa para a triagem/seleção de potenciais agentes descontaminantes de micotoxinas. Tendo isto em conta, os objetivos do presente estudo foram: 1) verificar *in vitro* a capacidade de produtos comerciais à base de parede celular de leveduras para adsorver AFB₁; 2) estudar o efeito da composição dos produtos comerciais, do pH e da solução de reação sobre o processo de adsorção de AFB₁ e, 3) realizar isotermas de adsorção em solução tampão para os diferentes produtos comerciais, em condições de pH e temperatura que simulem as condições fisiológicas dos animais monogástricos. Os dois aditivos anti micotoxinas (AAM) testados aderem eficientemente a AFB₁, sendo recomendada a realização de ensaios *in vivo* confirmatórios. A composição química dos produtos, o pH relativamente ácido, maior concentração de íons fosfato, e ausência dos simuladores gastrointestinais influenciam na capacidade máxima de adsorção nas condições *in vitro*. Existe a clara necessidade de uma metodologia de referência, que possa ser utilizada mundialmente, possibilitando a comparação interlaboratorial de resultados de diferentes produtos; além disso, o estudo através de isotermas de adsorção pode ser considerado bem completo, visto que oferece informações a respeito da afinidade e eficiência do processo, tanto em altas como baixas concentrações de micotoxina, e através do formato da isoterma é possível sugerir o tipo de mecanismo de adsorção envolvido.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain species of filamentous fungi, mainly of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, which show toxic properties in humans and animals. Aflatoxins (AFs) are mycotoxins produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, which under favorable conditions of temperature and humidity are developed on several foodstuffs. Especially the aflatoxin B₁ (AFB₁) has attracted great interest due to the existence of sufficient experimental data indicating their toxic activity, carcinogenic, teratogenic and mutagenic. We can handle with the mycotoxins problem in foods by prevention methods, physicals, such as the use of inorganic adsorbents, or biological with yeast cell wall (YCW), which in addition to the prebiotic effect, have the power to adsorb mycotoxins. However, there are differences in the adsorptive capacity of the YCW from different strains and *in vitro* analysis of the adsorption process is a powerful tool for screening / selection of potential mycotoxin decontaminating agents. With this in mind, the objectives of this study were: 1) assess the *in vitro* ability of commercial products based on yeast cell wall to adsorb AFB₁, 2) study the effect of commercial products composition, pH and reaction solution on the adsorption of AFB₁ and 3) carry out adsorption isotherms in a buffer solution for different commercial products, under conditions of pH and temperature that simulate physiological conditions of monogastric animals. The two anti mycotoxins additives (AAM) tested adhere efficiently AFB₁, and *in vivo* test are recommended to confirmatory results. The chemical composition of the products, the slightly acidic pH, higher concentration of phosphate ions, and the absence of gastrointestinal simulators influence the maximum adsorption capacity under *in vitro* conditions. There is a clear need for a reference methodology that can be used worldwide, allowing the intercomparison of results of different products, in addition, the study of adsorption isotherms can be considered fairly complete, since it provides information about affinity and efficiency of the process, both at high and low concentrations of mycotoxins, and by the shape of the isotherm is possible to suggest the type of adsorption mechanism involved.

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas (do grego, *mykes* = fungo) são compostos policetônicos resultantes das reações de condensação que ocorrem quando se interrompe a redução dos grupos cetônicos na biossíntese dos ácidos graxos realizada por algumas espécies fúngicas (SMITH; MOSS, 1985). Estes metabólitos secundários induzem reações tóxicas em vertebrados mesmo quando ingeridos em baixa concentração. São substâncias que preocupam os governos de todo o mundo devido ao fato de serem estáveis e resistentes. Sua atividade tóxica persiste por um longo tempo nos alimentos, mesmo após o desaparecimento dos fungos que as originaram. São compostos com estruturas químicas complexas e variadas, de baixo peso molecular e que não são detectados como antígenos pelo sistema imune do hospedeiro.

Micotoxicoses é o nome dado às doenças e afecções originadas no homem e animais, ocasionadas por estas substâncias. As mais freqüentes que podem ser encontradas como contaminantes naturais em alimentos para animais e humanos são as aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), fumonisinas B₁ e B₂, zearalenona (ZEA) e os tricotecenos, com ênfase às AFs. É importante ressaltar que uma única espécie de fungo é capaz de produzir uma ou várias micotoxinas, e uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A ingestão de micotoxinas pode causar quadros de intoxicação aguda, subaguda ou crônica, com efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, entre outros (CAST, 2003). O impacto das toxinas fúngicas na saúde humana e animal é muito importante e estima-se que possam causar perdas econômicas de milhões de dólares em todo o mundo (VAN EGMOND, 1995). A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) estima que 25% da produção anual de grãos é afetada por micotoxinas. A redução no valor nutricional e no rendimento dos grãos aumenta em muito os custos da produção. As criações comerciais de animais também são afetadas devido à redução da produção de carne, leite e ovos, problemas reprodutivos no plantel, aumento da incidência de doenças e de despesas com assistência veterinária, além dos custos com processos de descontaminação e desvalorização no mercado. Estes custos são ainda mais elevados quando as micotoxicoses envolvem mortes.

1.1 Aflatoxinas: Generalidades

De acordo com Blount (1961), a aflatoxicose foi primeiramente detectada em 1960, sendo denominada de “Doença X dos perus”. O uso do farelo de amendoim de origem brasileira contaminado com esta micotoxina em rações para perus determinou a morte de aproximadamente 100.000 dessas aves na Inglaterra. Mais tarde foi descoberto que a causa dessa misteriosa doença ocorreu devido à presença de compostos que apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta (UV) e cuja produção foi atribuída à espécie fúngica contaminante denominada *Aspergillus flavus*, dando lugar ao nome aflatoxinas (ASPLIN; CARNAGHAN, 1961).

As AFs são substâncias químicas altamente tóxicas, produzidas principalmente por fungos das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, que sob condições favoráveis de temperatura e de umidade se desenvolvem sobre os alimentos e podem produzir as toxinas, sendo sua incidência relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical (MOSS, 1998). A facilidade e frequência com que isso acontece, torna a sua presença comum em muitos alimentos.

Há mais de 20 tipos de moléculas de AFs e seus derivados isolados, porém os principais tipos estudados continuam sendo a B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 1), que possuem uma estrutura química muito semelhante, bi-furanóide. As AFs da série B apresentam um anel ciclopentanona na molécula, enquanto que as da série G apresentam um anel lactona. Assim como outros compostos heterocíclicos, são substâncias fluorescentes com características próprias. Tanto a AFB₁ como a aflatoxina B₂ (AFB₂) apresentam uma fluorescência azul, enquanto que a G₁ (AFG₁) e a aflatoxina G₂ (AFG₂) apresentam uma fluorescência verde amarelada sob luz UV (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Apesar das semelhanças estruturais, as AFs apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB₁, além de ser a mais frequentemente encontrada em cereais, é a que apresenta maior poder toxígeno, seguida da AFG₁, AFB₂ e AFG₂ (COULOMBE, 1991). Terao e Ueno (1978) demonstraram que a magnitude da toxidez da AFG₂, AFB₂ e AFG₁ correspondem a 10%, 20% e 50% da AFB₁, respectivamente.

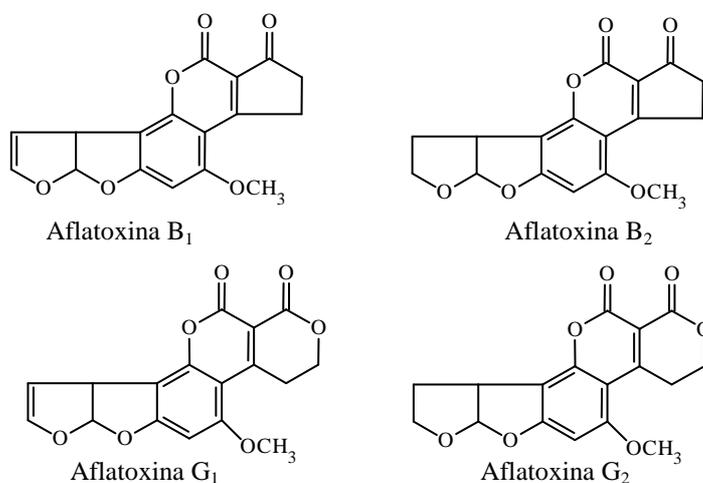


Figura 1: Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

Fonte: Hussein e Brasel (2001).

Pode-se classificar as AFs como compostos de natureza cristalina, termoestáveis até temperaturas muito elevadas e solúveis em solventes polares, como o clorofórmio e metanol. São reativas a valores de pH menores que 3 e maiores que 10, e quando expostas à luz UV em presença de oxigênio. São destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (OPS, 1983).

Apesar das maiores concentrações serem encontradas em grãos mal armazenados, em ambientes quentes e úmidos, também é possível detectar concentrações significantes de AFs no campo, antes da colheita (PITTET, 1998). O milho e o amendoim continuam sendo as maiores fontes de contaminação, principalmente na Índia e América do Sul, porém outros cereais produzidos em clima tropical bem como seus subprodutos também são susceptíveis à contaminação por estas micotoxinas (MOSS, 1998). No Brasil, a ocorrência de AFs tem sido observada com frequência, e em altos níveis, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, como milho, amendoim e derivados. Resultados obtidos no Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC) demonstraram que entre os anos de 1986 e 2010, cerca de 30-35% dos alimentos analisados estavam contaminados por AFs (LAMIC, 2010).

1.2 Toxicidade das Aflatoxinas

A presença de AFs nos alimentos e rações tem sido objeto de grande preocupação no mundo científico, desde a sua descoberta. Particularmente a AFB₁, têm despertado um grande interesse devido a existência de suficientes dados experimentais que indicam sua atividade tóxica, carcinogênica, teratogênica e mutagênica em animais de experimentação, além de diversos estudos epidemiológicos que indicam que a AFB₁ está envolvida na ocorrência de neoplasias gastrointestinais e hepáticas em países da África e China, entre outros (KEEHN; FRANK-STROMBORG, 1991). O carcinoma hepatocelular (CHC) é, mundialmente, um dos tipos mais comuns de câncer e diversos autores têm reportado a presença de AFs no soro e em biópsias de fígado de pacientes com câncer hepático (RUSTOM, 1997).

Com base nos estudos disponíveis, a Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer - *International Agency for Research on Cancer* (IARC) concluiu que existem evidências suficientes para considerar a AFB₁ como fator etiológico do câncer hepático em populações humanas, sendo então classificada no grupo 1 (IARC, 1993), além de ser considerada o mais potente carcinógeno de origem biológica conhecido (BENNETT; KLICH, 2003).

A absorção das AFs ocorre no trato gastrointestinal e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de função mista oxidase, associadas ao citocromo P-450 (BIEHL; BUCK, 1987). A AFB₁ é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990).

Embora o fígado seja o alvo primário, em muitos casos, lesões cancerígenas foram observadas nos rins, cólon, pulmão e glândulas lacrimais de vários animais alimentados com rações contaminadas por AFs (STOLOFF, 1977). Os efeitos metabólicos das AFs incluem inibição da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, redução na atividade enzimática, depressão no metabolismo das glicoses, inibição da síntese de lipídios (incluindo fosfolipídios, ácidos graxos livres, triglicerídios e colesterol) e depressão da síntese de fatores de coagulação (BUSBY; WOGAN, 1984).

1.3 Biotransformação das Aflatoxinas

Existe atualmente um consenso entre grande número de especialistas de que a AFB₁ é, na realidade, um pró carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos. A forma ativada da AFB₁ é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB₁,

ou AFB₁-epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como o DNA, RNA e proteínas. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas AFs. A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIEHL; BUCK, 1987; HSIEH; ATKINSON, 1991; WOGAN, 1992).

Os mecanismos de toxidez aguda das AFs estão ligados aos adutos formados pela ligação entre RNA e proteínas à AFB₁-epóxido, o que acaba provocando a morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células (HSIEH; ATKINSON, 1991). A inibição da síntese protéica no fígado e a diminuição das proteínas plasmáticas durante a aflatoxicose são amplamente descritas na literatura (KUBENA et al., 1991; QUEZADA et al., 2000; TUNG et al., 1975).

A biotransformação da AFB₁ inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação e de o-demetilação (Figura 2). Na reação de hidroxilação são formadas as aflatoxinas M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁) e a aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}), enquanto que a aflatoxina P₁ (AFP₁) é formada na reação de o-demetilação. Esses quatro novos compostos possuem o grupo hidroxila em sua molécula, permitindo a sua conjugação com o ácido glicurônico ou sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água. Essas substâncias podem então ser excretadas através da urina, bile e fezes (BIEHL; BUCK, 1987). A capacidade mutagênica desses produtos de biotransformação é menor do que a da AFB₁ (COULOMBE, 1991). As vias de biotransformação da AFB₁ variam entre as espécies animais, tal fato poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à AFB₁ entre os indivíduos (WOGAN, 1992).

Um outro tipo de AF é o aflatoxicol, também um importante metabólito da AFB₁, porque espécies animais sintetizam-na pela redução da AFB₁ pela enzima citoplasmática NADPH dependente, localizada na fração solúvel de preparações hepáticas. O aflatoxicol é considerado tão carcinogênico quanto a AFB₁, mas menos mutagênico, e pode também formar adutos de DNA da mesma forma que a AFB₁ (EATON; RAMSDELL; NEAL, 1994).

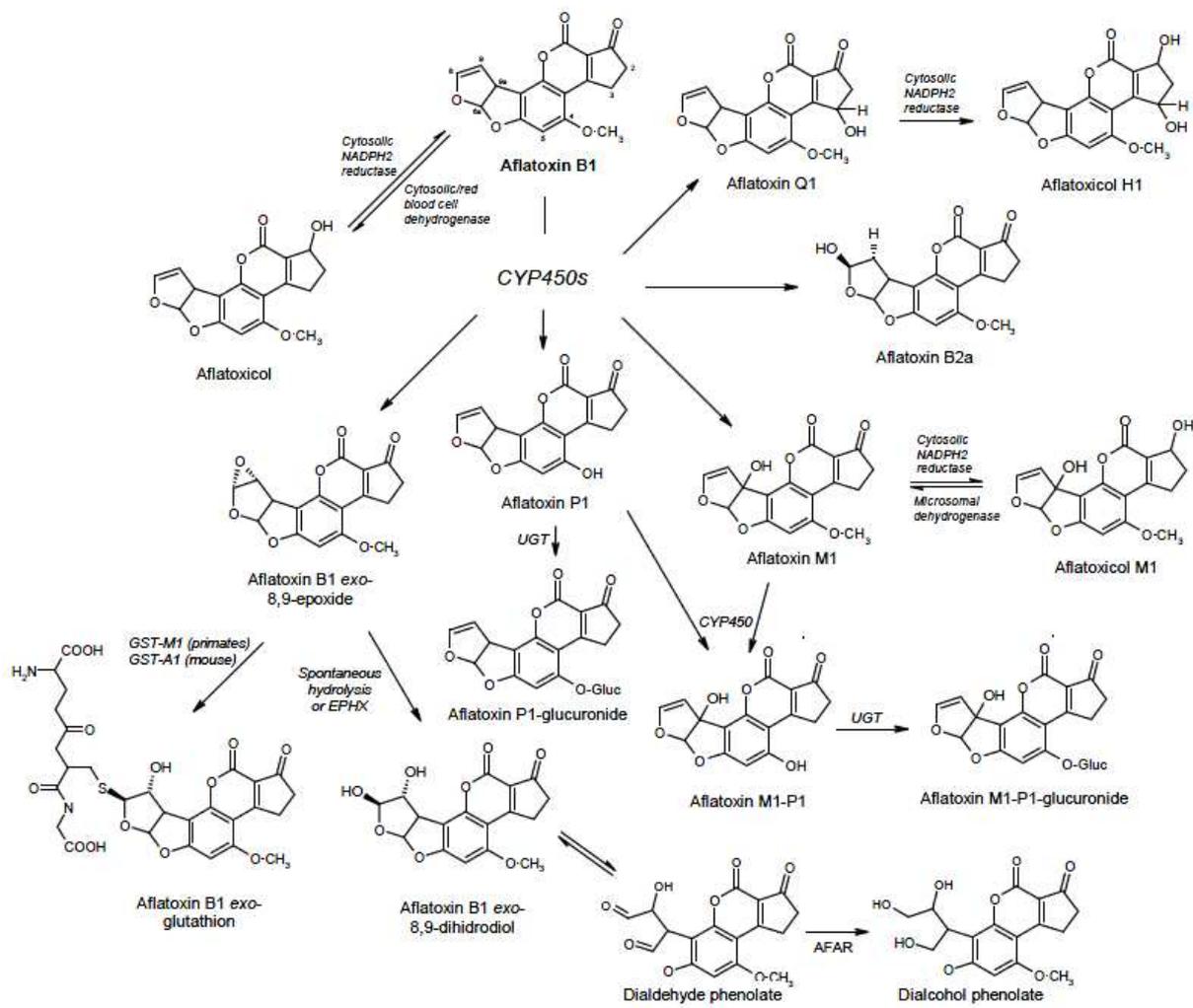


Figura 2: Reações de biotransformação da aflatoxina B₁ em aves e mamíferos. Nem todas as reações ocorrem em uma única espécie.

Fonte: Diaz e Murcia (2011).

1.4 Fungos Produtores de Aflatoxinas

Conforme já foi dito, as AFs são produzidas principalmente pelos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*. Estas espécies são bem definidas: *A. flavus* produz apenas aflatoxinas B e, por vezes a micotoxina ácido ciclopiazônico (CPA), enquanto *A. parasiticus* produz aflatoxinas B e G, mas nunca produz CPA (DORNER; COLE; DIENER, 1984; KLICH; PITT, 1988; PITT, 1993; SCHROEDER; BOLLER, 1973).

Esta situação simples, de apenas duas espécies produtoras de AFs, foi complicada por descobertas taxonômicas. Kurtzman et al. (1987) descreveu *A. nomius*, uma espécie

intimamente relacionada com *A. flavus*, mas que produz esclerócios em forma de pequenas balas de revólver, distintos dos esclerócios grandes e esféricos produzidos pela maioria dos isolados de *A. flavus*. Esta espécie é também distinta de *A. flavus* pela produção de ambas as AFs B e AFs G (PITT, 1993; SAITO et al., 1989).

A segunda nova espécie, intimamente relacionada com *A. nomius*, foi descrita por Peterson et al. (2001) e nomeado *A. bombycis*. Diferenças no DNA e também na velocidade de crescimento a 37°C são o que distinguem estas duas espécies. Assim como *A. nomius*, *A. bombycis* produz AFs B e AFs G.

A espécie *A. ochraceoroseus*, descrita por Bartoli e Maggi (1978), foi demonstrada ser um outro produtor de AFs. Ela também produz a micotoxina esterigmatocistina (FRISVAD, 1997; KLICH et al., 2000). Saito e Tsuruta (1993) descreveram *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, que produz esclerócios esféricos pequenos, porém um isolado (NRRL 3251) reportado como sendo um representante da nova variedade foi considerado tanto por Christensen (1981) e Pitt (1993) como sendo um típico *A. flavus*. Este mesmo isolado foi relatado por Stubblefield; Shannon; Shotwell (1970) como produtor de AFs B, mas não G, em concordância com a idéia de que se tratava de um típico *A. flavus*. Além disso, Geiser et al. (2000) mostraram que a produção de pequenos ou de grandes esclerócios não tem importância taxonômica em *A. flavus*.

Dois produtores de AFs isolados no Japão, que inicialmente foram classificados como *A. tamaritii* atípicos (GOTO et al., 1996), foram descritos como *A. pseudotamaritii*. Assim como *A. flavus*, esta espécie produz AFs B e CPA, mas difere de *A. flavus* pela produção de conídios marrom alaranjados (ITO et al., 2001).

Em estudos genéticos de populações de *A. flavus*, Geiser et al. (1998) mostraram que *A. flavus* isolados de campos de amendoim na Austrália eram constituídos por dois subgrupos distintos, que foram denominados Grupo I e Grupo II, e sugeriram que o Grupo II diferiu suficientemente do Grupo I (*A. flavus stricto sensu*), para ser elevado ao nível de uma nova espécie. Outros estudos por Geiser et al. (2000) e observações independentes confirmaram que *A. flavus* Grupo II compreende uma espécie distinta, que foi descrita como *A. australis*. Diferentemente de quaisquer das outras espécies conhecidas, *A. australis* produz AFs B e G e também CPA. Parece que ocorre quase que exclusivamente no hemisfério sul, onde tem sido encontrada na Argentina, Austrália, Indonésia e África do Sul.

Estas novas informações, embora sejam complexas, não devem obscurecer a importância das espécies mais antigas. As evidências indicam que *A. flavus* e *A. parasiticus* (Figura 3) são responsáveis pela esmagadora maioria de AFs encontradas nos alimentos em

todo o mundo. Das outras espécies, apenas *A. australis*, que parece ser generalizado no hemisfério sul e é comum em solos australianos de amendoim, também pode ser uma importante fonte de AFs em alguns países.

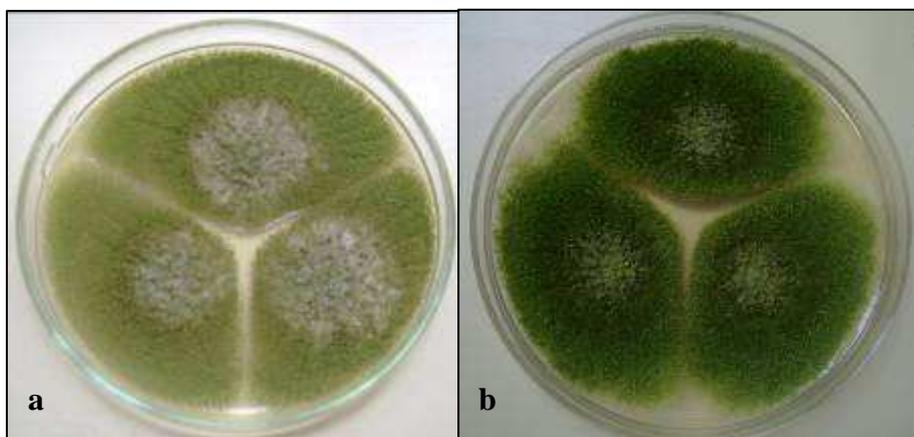


Figura 3: Macroscopia de (a) *Aspergillus flavus* e (b) *Aspergillus parasiticus*.

Fonte: Arquivo pessoal

1.5 Estratégias de Prevenção e Controle

O crescimento fúngico e a formação de micotoxinas dependem de uma série de fatores como umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento do fungo, estabelecimento no substrato, perda da integridade dos grãos causada por insetos, danos mecânicos, tamanho do inóculo e as características de interação / competição genética.

Desta forma, a estratégia mais efetiva para controlar a contaminação por micotoxinas é a prevenção tanto da infecção fúngica, como da produção de suas toxinas no campo e armazenamento, tarefa que pode se tornar muito difícil em condições tropicais.

Uma redução significativa na formação de micotoxinas pode ser alcançada com boas práticas agrônômicas. Particularmente AFs, ZEA, tricotecenos e alcalóides do ergot podem ser formados durante o crescimento das plantas no campo. Para evitar essa contaminação, é necessário melhorar as práticas agrícolas, entre outros, utilizando sementes de qualidade e livre de fungos; selecionando variedades de culturas que sejam mais resistentes às doenças fúngicas foliares (engenharia genética); impedindo o ataque de insetos, porque o dano mecânico está, invariavelmente, associado a uma rápida invasão de fungos, realizando a aragem de resíduos de colheita.

Além disso, para evitar a contaminação por fungos é importante a implantação de boas práticas de armazenagem e boas condições ambientais que impeçam o ataque de fungos. Para evitar a formação de micotoxinas é preciso estar atento aos seguintes pontos: teor de umidade abaixo de 12%; umidade relativa abaixo de 60%; temperatura de armazenamento abaixo de 20°C; limpeza dos grãos evitando os quebrados; controle de insetos e roedores; evitar condições de estresse (geada, calor, alterações de pH). Além disso, o uso de fungicidas químicos (ácido propiônico, acético, fórmico, benzóico e sórbico), atmosfera modificada, irradiação gamma e controle biológico podem aumentar ainda mais a estabilidade da ração e dos ingredientes durante o armazenamento.

Quando a contaminação não puder ser evitada, e/ou as demais ações não forem possíveis, existe então a possibilidade de reduzir os níveis de micotoxinas com a implementação de estratégias de descontaminação.

Devido ao impacto das micotoxinas sobre toda a cadeia alimentar e os sérios riscos à saúde humana e animal, qualquer abordagem para reduzir a atuação tóxica destas moléculas, bem como as perdas econômicas ocasionadas, deveriam responder tanto quanto possível aos seguintes requisitos (DIAZ et al., 2004; HUWIG et al., 2001; PIVA et al., 1995):

- ser aceito pelas agências reguladoras;
- prevenir, destruir, remover ou inativar as micotoxinas de alimentos ou rações;
- não produzir ou deixar resíduos tóxicos no produto final;
- não alterar significativamente as propriedades tecnológicas e nutricionais do alimento ou ração;
- ser técnica e economicamente viável;
- demonstrar afinidade pelas micotoxinas, com baixa ou nenhuma afinidade para os pigmentos, promotores de crescimento, vitaminas, macro e micronutrientes e aminoácidos sintéticos;
- não produzir alterações no ambiente.

Embora existam vários métodos de descontaminação (físicos, químicos, biológicos e físico-químicos), até a presente data não se conhece nenhum método que atenda à todas essas características. Estes argumentos estimulam os pesquisadores a desenvolver novas estratégias para a descontaminação, que evitem o uso de agentes químicos e que reduzam as perdas no valor nutritivo e palatabilidade dos alimentos descontaminado, sem reduzir os níveis de produção.

1.6 Métodos Físicos: com o Uso de Adsorventes Inorgânicos

Um dos métodos físicos mais utilizados na descontaminação de AFB₁ se dá mediante o uso de substâncias adsorventes. Este método consiste na aplicação de aditivos não nutrientes na alimentação animal para a prevenção da intoxicação por AFs. Estes aditivos adsorvem firmemente estas substâncias tóxicas no trato digestivo dos animais, reduzindo de modo significativo sua biodisponibilidade e toxicidade associada.

Os adsorventes sequestram as toxinas no TGI formando complexos insolúveis que são eliminados nas fezes. Assim, ao reduzir a biodisponibilidade das micotoxinas, diminuem seus efeitos tóxicos. Dentro dos adsorventes mais utilizados com esta finalidade encontram-se os aluminossilicatos, maior classe de agentes sequestrantes de micotoxinas e a que apresenta mais estudos (EFSA, 2009). Dentro deste grupo, há duas subclasses importantes: a subclasse dos filossilicatos e a subclasse dos tectosilicatos. Filossilicatos incluem bentonitas, montmorillonitas, esmectitas, caulinitas, etc.; e os tectosilicatos incluem as zeólitas.

1.6.1 Zeólitas: clinoptilolita

As zeólitas foram reconhecidas pela primeira vez em 1756 pelo mineralogista sueco Baron Axel Frederick Consted. O termo zeólita (zéo e líthos) vem do grego e significa pedra que ferve. Em 1845, Way descobriu que determinados tipos de solos tinham a propriedade de reter sais de amônia, e Breck constatou que os silicatos hidratados de alumínio no solo eram os responsáveis pela troca iônica. Em 1925, Weigel e Steinholf foram os primeiros a constatar que a zeólita chabazita absorvia seletivamente moléculas orgânicas menores e rejeitava as maiores. Em 1932, McBain denominou esse fenômeno de peneiramento molecular, e já nas décadas de 40 e 50, as pesquisas sobre as propriedades das zeólitas tomaram um impulso muito grande. A partir de então, ficou claro o potencial de utilização das zeólitas em processos industriais (CLIFTON, 1987).

As zeólitas englobam um grande número de minerais naturais e sintéticos que apresentam características comuns. São aluminossilicatos hidratados de metais alcalinos ou alcalinos terrosos (principalmente sódio, potássio, magnésio e cálcio), estruturados em redes cristalinas tri-dimensionais, compostas de tetraedros do tipo TO₄ (T = Si, Al, B, Ge, Fe, P, Co...) unidos nos vértices através de átomo de oxigênio. A Figura 4 ilustra a estrutura básica das zeólitas (LUZ, 1995). Nos casos (a) e (b) tanto o átomo de Si quanto o de Al, se encontram no centro do tetraedro formado pelos átomos de oxigênio. Devido à valência do Si,

O e Al, o tetraedro SiO_4 é neutro enquanto o AlO_4 possui uma carga negativa. Por essa razão, encontra-se fora da rede cristalina do sólido um cátion compensador de carga quando a rede possui um átomo de Al (Figura 4 (b) e 4 (c)). Estes cátions podem ser Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , H^+ , NH_4^+ , entre outros. Estando situados fora da rede cristalina, esses cátions podem ser trocados por outros cátions em solução (AGUIAR; NOVAES; GUARINO, 2002). Esta característica confere à zeólita a propriedade de trocadora iônica (MONTE; RESENDE, 2005). São conhecidos 48 tipos de zeólitas naturais e mais de 150 artificiais.

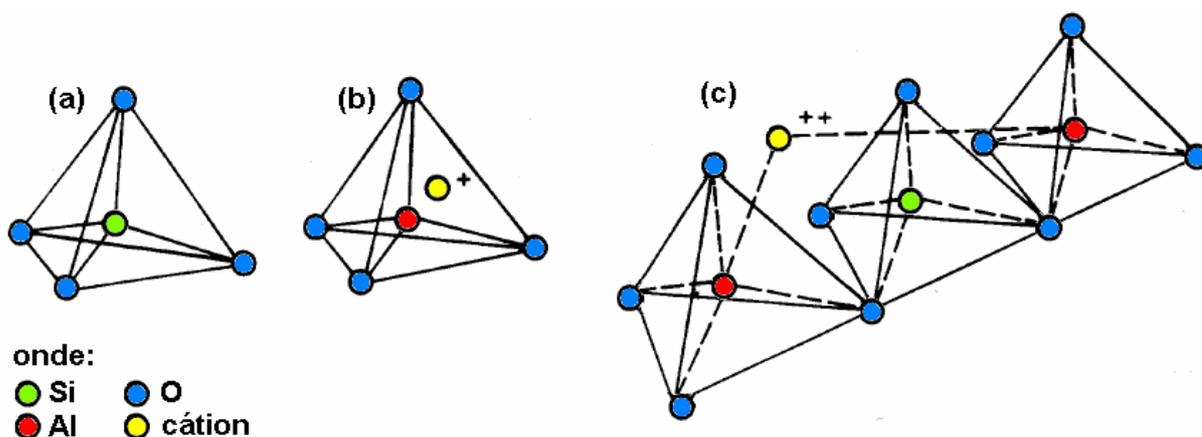


Figura 4: Unidades estruturais básicas das zeólitas. (a) Tetraedro com um átomo de Si no centro e átomos de O nos vértices. (b) Tetraedro com átomo de Al no centro ligado a um cátion monovalente para compensar a diferença de carga entre o Si e o Al. (c) Átomo divalente para balancear as cargas de dois átomos de Al separados por um átomo de Si.

Fonte: Luz (1995)

A estrutura das zeólitas apresenta canais e cavidades interconectadas de dimensões moleculares, nas quais se encontram os íons de compensação, moléculas de água ou outros adsorbatos e sais. Esse tipo de estrutura microporosa confere às zeólitas uma superfície interna muito grande, quando comparada à sua superfície externa. A estrutura da zeólita permite a transferência de matéria entre os espaços intracristalinos, no entanto, essa transferência é limitada pelo diâmetro dos poros das zeólitas. Dessa forma, só podem ingressar ou sair do espaço intracristalino aquelas moléculas cujas dimensões são inferiores a um certo valor crítico, que varia de uma zeólita a outra (GIANNETO, 1989). É devido a esta característica que as zeólitas recebem o nome de peneira molecular, ou seja, a capacidade de reter ou não moléculas por adsorção.

Basicamente, são minerais que possuem uma estrutura aberta que pode acomodar uma grande variedade de íons positivos, como o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , entre outros. Estes íons positivos estão fracamente ligados à estrutura podendo ser prontamente substituídos por outros da solução em contato. Desse modo as zeólitas têm capacidade de adsorver certos íons presentes em soluções aquosas, liberando os que estavam presentes em sua estrutura. Segundo Correia et al. (2000), as zeólitas apresentam boa capacidade de adsorção e dessorção de nutrientes devido à sua alta capacidade de troca catiônica (CTC). É devido a sua alta CTC que as zeólitas podem ser usadas na nutrição animal como agentes carreadores de micotoxinas e de íons que poderiam causar problemas de intoxicação por excesso nos animais.

Dentre as zeólitas naturais, a mais abundante é a clinoptilolita (Figura 5) (ARMBRUSTER, 2001; SANTÚRIO et al., 1999). Sua estrutura é formada por sólidos cristalinos, através da combinação tridimensional de tetraedros à base de óxido de silício (SiO_3) e óxido de alumínio (Al_2O_3) e possui uma rede de cavidades e canais interconectados que lhe garante uma ampla superfície interna, de $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Clinoptilolita (CLI)
 $(\text{Na}, \text{K}, \text{Ca})_{2-3} \text{Al}_3 (\text{Al}, \text{Si})_2 \text{Si}_{13} \text{O}_{36} \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

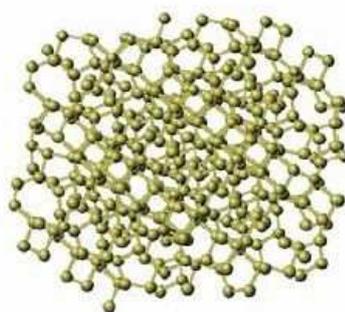


Figura 5: Representação estrutural da clinoptilolita e sua respectiva fórmula química.

Fonte: Oliveira (2006)

A estrutura apresentada pela clinoptilolita lhe permite apresentar alta capacidade de troca catiônica (LUZ, 1995), alta superfície específica, alta porosidade, resistência a temperaturas extremas, neutralidade química e incapacidade de aumentar de volume na presença de água (ARMBRUSTER, 2001; SANTÚRIO et al., 1999). Apresenta também, ainda em decorrência de sua estrutura, a função de adsorver gases e vapores, micotoxinas, amônia, água, metais pesados e elementos radioativos tais como o chumbo, estrôncio, céσιο, lítio, mercúrio e bário (LUZ, 1995; SANTÚRIO et al., 1999). A adsorção de enterotoxinas e fitotoxinas também pode ocorrer (NISTIAR et al., 2000).

A clinoptilolita é uma das zeólitas com maior número de referências bibliográficas (HARVEY et al., 1993; OĞUZ; KURTOGLU, 2000; OĞUZ; KURTOGLU; COSKUN, 2000; OĞUZ et al., 2000; OLVER, 1997; ORTATATLIA; OĞUZ, 2001; PARLAT; YILDIZ; OGUZ, 1999). Hipoteticamente, devido à sua elevada atividade química, a captação de AFs por esta zeólita poderia ser sua aplicação mais importante. Estudos *in vitro* sobre a capacidade das zeólitas em adsorver AFs apresentam resultados contraditórios. Ensaio *in vivo* indicam melhoria nos parâmetros produtivos especialmente de frangos, e redução dos efeitos tóxicos (PAPAIANOUA et al., 2005). No entanto, trabalhos relatam que o emprego das zeólitas por si só não é suficiente para proteger o fígado dos efeitos das AFs (HARVEY et al., 1993). Além disso, os adsorventes físicos, em geral, são capazes de se ligar a um grupo muito pequeno de micotoxinas, e quando adicionados na dieta, alguns deles podem seqüestrar importantes micronutrientes, constituindo uma desvantagem potencial deste método (DÍAZ et al., 2004; HUWIG et al., 2001).

Estes argumentos estimulam os pesquisadores a desenvolverem novos métodos e uma das alternativas promissoras mais recentes é a descontaminação através da utilização de bio-produtos, que são adicionados aos alimentos durante o processamento.

1.7 Métodos Biológicos: através do Uso de Paredes Celular de Leveduras

Entre os agentes biológicos que podem ser utilizados para a redução dos danos ocasionados pela ingestão de dietas contaminadas, as leveduras têm sido alvo de diversas investigações (ARMANDO et al., 2011; BAPTISTA et al., 2001; 2004; CELIK et al., 2001; 2003; DEVEGOWDA et al., 1996; DOGI et al., 2011; KRAUSE et al., 1989; PARLAT et al., 2001; STANLEY et al., 1993).

As leveduras têm sido utilizadas há mais de uma década como aditivos naturais na alimentação de animais de produção. Este tipo de suplementação tem gerado incremento nos parâmetros produtivos e na saúde dos animais (HOOGE, 2004; PETTIGREW, 2000; SHETY; JEPERSEN, 2006). Recentemente, os estudos têm focado as frações de polissacarídeos das paredes celulares de leveduras (PCL) como os β -glucanos e os manano-oligosacarídeos (MOS), as quais demonstram efeitos benéficos tanto sobre a saúde de animais de produção como do homem.

As vantagens destes produtos, a base de PCL, devem-se por sua grande capacidade de suportar as altas temperaturas que ocorrem nos processos de peletização e extrusão de rações, capacidade de resistir às condições químicas e físicas do TGI (PERRY, 1995), baixas taxas de

inclusão na dieta, grande área superficial e, certamente, não envolve risco de contaminação por materiais tóxicos. Estudos *in vitro* chegaram a demonstrar até 85% de adsorção de AFs por PCL de forma dose-dependente (DEVEGOWDA et al., 1994 apud DAWSON; EVANS; KUDUPOJE, 2006).

O mecanismo envolvido na capacidade de leveduras em prevenir os danos promovidos por AFs ainda é incerto e há várias hipóteses que tentam explicar tal habilidade. Um modelo proposto por Yiannikouris et al. (2003), através de ensaios *in vitro* concluíram que a habilidade das leveduras em reduzir os efeitos de micotoxinas está relacionada com a capacidade de adsorver essas moléculas nas paredes celulares e com isso limitar a biodisponibilidade ao organismo. A estrutura tridimensional dos polisacarídeos que constituem a PCL permite a adsorção de diferentes micotoxinas ou seus derivados metabólicos (JOUANY; YIANNIKOURIS; BERTIN, 2005; RINGOT et al., 2005). Os β -D-glucanos da parede das leveduras são capazes de adsorver diversas micotoxinas (ŠROBÁROVÁ; KOGAN, EGED, 2005; YIANNIKOURIS et al., 2003, 2004a,b) enquanto que os α -D-mananos inibem a atividade tóxica das micotoxinas, provavelmente por interagir com os radicais destes compostos (MADRIGAL-BUJAJIDAR et al., 2002).

1.8 Mecanismo de Ação *in vitro* dos Agentes Descontaminantes de Micotoxinas

Os agentes adsorventes podem ser classificados, entre outros, com base em:

- Origem: mineral, biológicos, sintéticos, etc.
- Mecanismo e tipo de interações envolvidas: hidrofóbico, eletrostático, reconhecimento molecular, etc.

Além dessas diferenças qualitativas, aspectos quantitativos, tais como a capacidade de afinidade e seletividade são muito importantes. Na medida do possível, estes parâmetros devem ser medidos e expressos de uma forma que permita a comparação de diferentes agentes de adsorção e previsão do seu comportamento sob diferentes circunstâncias.

Infelizmente, ao analisarmos a literatura mundial sobre esta temática chegamos à conclusão de que nem sempre isso é possível. Existe uma enorme variedade de metodologias (desde mensurações com uma concentração única até elaborados modelos de simuladores gastrointestinais dinâmicos) que têm sido aplicadas nestes estudos *in vitro*, o que tem dificultado bastante a reprodutibilidade e comparação interlaboratorial de resultados.

A análise *in vitro* do processo de adsorção das micotoxinas é uma ferramenta poderosa para a triagem/seleção de potenciais agentes descontaminantes de micotoxinas. Se um agente

seqüestrante não consegue adsorver uma micotoxina *in vitro*, ele tem pouca ou nenhuma chance de fazê-lo *in vivo*; representando uma economia real de tempo e dinheiro. Os ensaios *in vitro* são muito úteis para a identificação e classificação de potenciais produtos AAM, ajudando a determinar os mecanismos e condições favoráveis para a ocorrência da adsorção (DIAZ; SMITH, 2005).

1.8.1 Estudos de concentração única

Um grande número de técnicas têm sido utilizadas para medir *in vitro* a adsorção de micotoxinas. O método de concentração única é o mais simples de executar, com menor desperdício de toxina e o método *in vitro* mais utilizado, sendo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para registro de AAM no Brasil (BRASIL, 2006). Ele mede a adsorção em soluções, onde uma quantidade conhecida de micotoxina purificada reage com uma quantidade conhecida do produto teste. Os resultados são geralmente relatados como “% adsorção”, isto é, a fração de toxina que foi ligada ao agente adsorvente. Este parâmetro é fortemente dependente da concentração do agente de adsorção (g L^{-1}). A capacidade do sistema de análise para medir com precisão a adsorção é restrita pelos limites de detecção da técnica, com aumento da sensibilidade através do uso cromatografia líquida de alta performance.

1.8.2 Isotermas de adsorção

Uma das formas de analisar os aspectos teóricos dos sistemas de adsorção é mediante o estudo das isotermas de adsorção, que são equações matemáticas usadas para descrever, em termos quantitativos, a adsorção de solutos por sólidos, a temperaturas constantes. Esta metodologia têm sido utilizada de forma eficiente em vários estudos (GRANT; PHILLIPS, 1998; RAMOS; HERNANDEZ, 1996).

A quantidade de micotoxina adsorvida por unidade de peso é plotada contra a concentração da micotoxina em solução em uma temperatura constante e em condições estáveis. Admite-se que a diferença entre a quantidade adicionada e a remanescente na solução encontra-se adsorvida na superfície do adsorvente. Esse sistema leva em conta que o seqüestro de micotoxinas é um processo reversível, e que pode ser caracterizado como um equilíbrio químico. Os resultados dos estudos de isotermas são geralmente interpretados por ajuste de curvas usando um ou mais modelos matemáticos como Langmuir, Hill, Freundlich,

etc. e fornecem informações importantes sobre o tipo/mecanismo do processo de adsorção. Grant e Phillips (1998) usaram diferentes equações de isothermas para determinar não apenas a capacidade de adsorção máxima e afinidade, como também foram capazes de mensurar a afinidade média, entalpia da ligação, coeficiente de heterogenicidade, múltiplos coeficientes de distribuição, entre outros para HSCAS e AFB₁.

A seleção do modelo matemático, de acordo com os critérios propostos por Giles (1974), implica na classificação da isoterma em função da sua forma, a qual está determinada pelo mecanismo de adsorção.

A equação de Langmuir (isothermas do tipo L) baseia-se em três suposições: (a) a superfície de adsorção é homogênea, isto é, a adsorção é constante e independente da extensão da cobertura da superfície; (b) a adsorção ocorre em sítios específicos, sem interação com as moléculas do soluto; (c) a adsorção torna-se máxima quando uma camada monomolecular cobre totalmente a superfície do adsorvente (Figura 6).

A equação matemática de Langmuir é:

$$\Gamma = \Gamma_{\max} \cdot \beta \cdot x / (1 + \beta \cdot x)$$

em que Γ é a massa de soluto por unidade de massa do adsorvente, β é a constante relacionada à energia de ligação soluto-superfície adsorvente, x é a concentração de equilíbrio do soluto e Γ_{\max} é a quantidade máxima de soluto que pode ser adsorvida, o que ocorre após a formação de uma camada monomolecular completa.

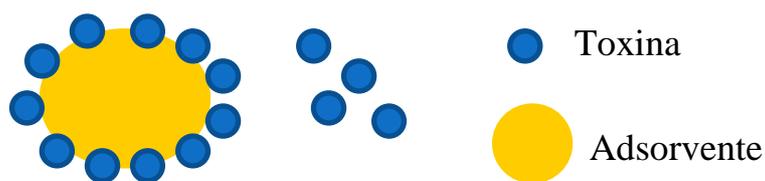


Figura 6: Representação esquemática do mecanismo envolvido em isothermas do tipo L (formação de monocamada).

A equação de Hill (isothermas do tipo S) foi originalmente formulada por Archibald Hill em 1910 para descrever a curva sigmoideal de adsorção entre O₂ e a hemoglobina. Em bioquímica, a ligação de um ligante a uma macromolécula é frequentemente reforçada quando já existem outros ligantes presentes na mesma macromolécula (isto é conhecido como ligação cooperativa) (Figura 7). O coeficiente de Hill fornece uma maneira de quantificar esse efeito. Ele descreve a fração da macromolécula saturada pelo ligante em função da concentração do

ligante, que é utilizado na determinação do grau de cooperativismo da ligação do ligante ao receptor. Um coeficiente igual a 1 indica adsorção completamente independente, independentemente do número de ligantes adicionais já ligados. Números maiores que 1 indicam cooperativismo positivo, enquanto números menores que 1 indicam cooperativismo negativo.

A equação matemática de Hill é:

$$\Gamma = (\Gamma_{\max} \cdot x^n) / k_d + x^n$$

onde k_d é a constante de dissociação, x é a concentração de equilíbrio do soluto, e n é o coeficiente de Hill ou índice de cooperatividade, no qual podemos ter as seguintes situações:

$n > 1$ - reação cooperativa positiva: uma vez que um ligante está ligado ao receptor, a sua afinidade por outras moléculas ligantes aumenta.

$n < 1$ - reação cooperativa negativa: uma vez que um ligante está ligado ao receptor, a sua afinidade por outras moléculas ligantes diminui.

$n = 1$ - reação não cooperativa: a afinidade do receptor por uma molécula ligante não é dependente de outras moléculas ligantes já estarem ou não ligadas.



Figura 7: Representação esquemática do mecanismo envolvido em isotermas do tipo S (cooperativismo).

1.8.3 Simuladores gastrointestinais estáticos e dinâmicos

Ensaio *in vitro* para a avaliação da eficiência dos AAM podem ser realizados com modelos simuladores gastrointestinais, úteis na identificação das condições fisiológicas que são importantes para o processo de adsorção. Vários estudos chamados simuladores gastrointestinais “estáticos” e “dinâmicos” têm sido realizados. Vekiru et al. (2007) demonstraram que as bentonitas se tornam menos eficientes quando as condições gastrointestinais são simuladas. Isto significa que a eficácia dos agentes de adsorção pode depender das condições reais durante a passagem através do TGI. No entanto, tais modelos gastrointestinais estáticos estão muito longe das condições *in vivo* reais, pois não são capazes

de mimetizar as condições fisiológicas cinéticas do TGI dos animais, incluindo a secreção de saliva, sucos gástrico, biliar e pancreático, em associação com o trânsito intestinal, contrações peristálticas e absorção do alimento ingerido.

Uma outra opção são os simuladores *in vitro* gastrointestinais dinâmicos (TIM), multi-compartimentais, controlados por computador, relatados por Avantaggiato et al. (2003, 2004, 2007). O sistema TIM, que compreende quatro compartimentos ligados por válvulas peristálticas, simula os processos de cinética digestiva respectivamente, do estômago, duodeno, jejuno e íleo de seres humanos e animais monogástricos. Os parâmetros incluem a secreção de saliva, suco gástrico, suco pancreático e bile para a simulação dos valores de pH realistas, as concentrações de eletrólitos e atividade das enzimas digestivas, bem como, a temperatura do corpo e os movimentos peristálticos para o trânsito gastrointestinal. Membranas semipermeáveis são conectados aos compartimentos de jejuno e íleo para diálise contínua dos compostos digeridos e liberados (fração bioacessível) e absorção de água. Como as micotoxinas são provavelmente absorvidas por difusão passiva, o sistema de diálise é uma forma adequada de se estudar a biodisponibilidade das micotoxinas e a eficácia dos agentes de adsorção (AVANTAGGIATO et al., 2007). Em contraste com os modelos *in vitro* estáticos, os estudos com a TIM sobre a biodisponibilidade de micotoxinas, com simulação das condições gastrointestinais, têm uma elevada qualidade preditiva: resultados semelhantes aos obtidos em estudos *in vivo* (AVANTAGGIATO et al., 2004; AVANTAGGIATO et al., 2007; BLANQUET et al., 2004). A grande desvantagem do método dinâmico está no alto custo para aquisição de todo o sistema que é patenteado por empresa estrangeira.

1.9 Legislação Brasileira sobre Aditivos

O MAPA define pela Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004 o Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2004). O texto da Instrução Normativa define: “Aditivo para produtos destinados à alimentação animal: substância, microorganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais saudáveis e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano”.

O MAPA através da Portaria nº 13, de 24 de maio de 2006 (BRASIL, 2006) instituiu o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal, com as atribuições de:

I. Avaliar a situação brasileira quanto aos níveis de micotoxinas nos produtos destinados à alimentação animal com foco na segurança de alimentos;

II. Definir critérios para o controle de micotoxinas de interesse em produtos destinados à alimentação animal;

III. Reavaliar o uso de adsorventes de micotoxinas como aditivo autorizado na alimentação animal.

O Grupo de Trabalho elaborou então uma proposta, encaminhada ao MAPA, para o registro de aditivos anti-micotoxinas, a qual tem sido utilizada como referência para a condução dos ensaios *in vitro* e *in vivo* no País (ANEXO A).

1.10 Hipótese

“As paredes celulares de leveduras, isoladas ou em combinação com aluminossilicatos, são capazes de descontaminar aflatoxina B₁.”

1.11 Objetivos Específicos

- a) Verificar *in vitro* a capacidade de produtos comerciais a base de parede celular de leveduras para adsorver AFB₁.
- b) Estudar o efeito da composição dos produtos comerciais, do pH e da solução de reação sobre o processo de adsorção de AFB₁.
- c) Realizar isotermas de adsorção em solução tampão para os diferentes produtos comerciais, em condições de pH e temperatura que simulem as condições fisiológicas dos animais monogástricos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aflatoxina B₁

Foi utilizado padrão Biopure[®] com pureza $99,5 \pm 0,5\%$, comercializado por Romer Labs do Brasil Imp. e Exp. Ltda. A toxina foi diluída em metanol e sua concentração foi padronizada em espectrofotômetro Shimadzu[®] modelo 2001 ($\lambda=350\text{nm}$, $\epsilon=21500$, $\text{PM}=312,3$). A concentração dos extratos durante os ensaios *in vitro* foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando padronização externa.

2.2 Produtos Comerciais Utilizados

O enfoque maior de nosso trabalho é a utilização de produtos biológicos, mais especificamente leveduras e seus derivados, como estratégia de descontaminação de AFB₁. No entanto, como visto na literatura, os adsorventes inorgânicos têm alta capacidade de adsorção desta micotoxina. Por isso, foram utilizados dois produtos de origem comercial, potenciais AAM (AFB₁), sendo aqui genericamente denominados de AAM-1 e AAM-2.

O AAM-1 é um concentrado de MOS, obtido da purificação da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, de origem cervejeira. O AAM-2 é uma mistura homogênea (1:1) do AAM-1 e de uma zeólita (clinoptilolita). A composição do concentrado MOS e da zeólita está apresentada nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Composição química* (%) do concentrado de manano-oligossacarídeos.

Composição	AAM-1 (100%) e AAM-2 (50%)
β glucanos	23 % Min.
Mananos	21 % Min.
Proteínas	28 % Max.
Fósforo	1 % Min.
Gordura	20 % Min.
Cinzas	4 % Max.
Matéria Seca	95 % Min.

* Dados do fabricante AAM = Aditivo Anti-Micotoxinas

Tabela 2: Composição química* estimada (%) da zeólita (clinoptilolita).

Composição	AAM-2 (50%)
SiO ₂	63,00
TiO ₂	0,45
Al ₂ O ₃	11,57
Fe ₂ O ₃	1,87
FeO	0,81
MgO	0,92
CaO	5,78
Na ₂ O	2,39
K ₂ O	1,49
P ₂ O ₅	0,09
H ₂ O	3,44

* Dados do fabricante AAM = Aditivo Anti-Micotoxinas

2.3 Ensaios *in vitro* de Adsorção

2.3.1 Ensaios *in vitro* de concentração única

A metodologia utilizada nestes ensaios procurou estar em concordância com a proposta para registro de AAM do Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2006), incluindo estudos adicionais que fornecessem informações extras sobre o processo de adsorção.

Assim, foram realizados ensaios de concentração única (concentração fixa de micotoxina) sob diferentes condições, sendo avaliada a capacidade dos AAM-1 e AAM-2 de adsorver a micotoxina AFB₁ conforme o protocolo apresentado na Tabela 3. As concentrações dos AAM utilizadas correspondem a 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da dose máxima recomendada pelo fabricante, que é de 2 kg ton⁻¹.

Tabela 3: Protocolo utilizado para os ensaios de adsorção *in vitro* de concentração única por cada pH.

Tubo	AAM (mg mL⁻¹)	Concentração de AFB₁ (µg mL⁻¹)
1	0	≅1,0
2	0,5	≅1,0
3	1,0	≅1,0
4	1,5	≅1,0
5	2,0	≅1,0

Os ensaios foram testados nos valores de pH 3 e 6, por triplicata, avaliando-se diferentes tipos de soluções de reação, conforme os dados a seguir. Todas as soluções de reação foram preparadas no momento de uso, e seu pH final foi aferido em aparelho pHmetro digital de bancada microprocessado Gehaka[®] modelo PG 1800; quando necessário, era feita a correção com soluções de HCl 0,2 M ou NaOH 0,1 M.

Sistema Tampão 1: Fosfato-salino

pH	KCl 0,2 M	HCl 0,2 M	KH₂PO₄ 0,1 M	NaOH 0,1 M
3	50 mL	13 mL	---	---
6	---	---	100 mL	11,2 mL

Fonte: Robinson e Stokes (1968)

Sistema Tampão 2: Fosfato-ácido cítrico

pH	Na₂HPO₄ 0,2 M	C₆H₈O₇ 0,1 M
3	4,11 mL	15,89 mL
6	12,63 mL	7,37 mL

Fonte: Morita e Assumpção (1995)

Simulador Gástrico Artificial: NaCl 125 mM; KCl 7 mM; NaHCO₃ 45 mM, pepsina 3 g L⁻¹ (de mucosa gástrica de suínos, 800-2500 U mg⁻¹), pH 3.

Simulador Intestinal Artificial: bile 0,5 % (w/v); tripsina tipo IX-S 1 mg mL⁻¹ (13000-20000 BAEE U mg⁻¹), α-quimiotripsina tipo II 1 mg mL⁻¹ (de pâncreas, ≥ 40 U mg⁻¹), pH 6.

O percentual de adsorção foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Adsorção \%} = [1 - (\text{área do sobrenadante} / \text{área da toxina no controle positivo})] \times 100.$$

2.3.2 Ensaios *in vitro* através de isothermas de adsorção

Além dos ensaios de concentração única nas diferentes soluções de reação, também foram realizados estudos através de isothermas de adsorção. Para determinar a capacidade de adsorção dos produtos foram realizadas previamente isothermas de saturação da micotoxina com distintas massas dos AAM (250, 200, 100, 50, 10, 5, 2, 1 e 0,1 mg mL⁻¹). A partir daí, foram realizadas isothermas de adsorção dos AAM (2 mg mL⁻¹) com distintas concentrações de AFB₁ (15,346; 10,33; 7,34; 4,83 e 2,08 µg mL⁻¹). Os ensaios foram testados nos valores de pH igual a 3 e 6, por triplicata, em solução tampão.

Os dados obtidos foram ajustados com as equações matemáticas propostas nos modelos teóricos de Langmuir ou de Hill, selecionados segundo a forma da isoterma (tipo L ou tipo S, respectivamente). O ajuste foi feito com o programa Origin¹ versão 8.0.

Em cada um dos ensaios (concentração única e isothermas de adsorção) foram incluídos controles de adsorbato (micotoxina em solução de reação) e de adsorvente (produtos testados). Os AAM em solução foram incubados com a micotoxina durante 1 hora a 37°C sob agitação de 150 rpm em centrífuga refrigerada Sigma[®] modelo 3K-30. Imediatamente após este tempo, os extratos foram precipitados sob agitação de 13000rpm durante 10 min a 37°C. O sobrenadante contendo a micotoxina não ligada foi coletado e quantificado por CLAE.

2.4 Condições Cromatográficas dos Ensaios

Para quantificação da toxina não ligada foi utilizado um cromatógrafo líquido (HPLC Shimadzu[®] modelo LC-20AT) com detector UV-Vis (modelo UV SPD 10A) em comprimento de onda de 360 nm e coluna de fase reversa C18 (Betasil, Thermo Scientific[®]; 250 mm x 10 mm x 5µm). Como fase móvel utilizou-se sistema isocrático 65% metanol:acetonitrila (90:10) e 35% água com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL.

¹ OriginLab Corporation, MA, USA

2.5 Análises Estatísticas

Os dados de cada um dos ensaios *in vitro* de concentração única sob as diferentes soluções de reação foram submetidos, por separado, à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o delineamento experimental blocos ao acaso composto de dois tratamentos (pH 3 e pH 6) quatro blocos (concentrações 25%, 50%, 75% e 100%) e três repetições. O teste de Tukey (1%) foi utilizado para comparação das médias.

Os resultados dos percentuais de adsorção dos AAM, em cada uma das soluções de reação, também foram submetidos à ANOVA sendo utilizado o teste de Tukey (5%) para a comparação das médias. Todas as análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS².

² SAS Institute, NC, USA

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaios *in vitro* de Concentração Única sob Diferentes Soluções de Reação

3.1.1 Sistema tampão 1: fosfato-salino

Os resultados obtidos para os ensaios analíticos *in vitro* do AAM-1, em pH 3 e 6, utilizando-se tampão fosfato-salino como solução de reação estão apresentados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Para o AAM-1 utilizando-se o tampão fosfato salino, a quantidade de AFB₁ adsorvida foi significativamente maior em pH 6 ($\bar{X} = 0,366 \mu\text{g}$) do que em pH 3 ($\bar{X} = 0,290 \mu\text{g}$) ($p < 0,001$). Desta forma, o percentual de adsorção foi também maior em pH 6 ($\bar{X} = 28,9 \%$) do que em pH 3 ($\bar{X} = 23,0 \%$). As diferentes concentrações do aditivo não produziram nenhuma diferença significativa ($p = 0,4617$), o que significa dizer que o incremento de AAM não foi acompanhado por significativo aumento da capacidade de adsorção; pelo contrário, se observarmos a relação $\mu\text{g AFB}_1$ adsorvida / $\mu\text{g AAM}$ utilizado, verificamos que esta mostrou-se economicamente mais eficiente na dose de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. O aumento para a dose de 2 mg mL^{-1} não produziu um aumento linear da capacidade de adsorção. O nível efetivo de inclusão do AAM à dieta depende do espectro de capacidade de adsorção de diferentes micotoxinas e do grau de contaminação da ração em questão. Um amplo espectro de adsorção minimiza o nível necessário de inclusão do aditivo e atenua a redução da densidade nutricional decorrente de sua adição. Altos níveis de inclusão de aditivos podem alterar as propriedades físicas da ração, além de alterar as especificações da dieta.

Tabela 4: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-1, em pH 3 e sistema tampão fosfato-salino.

Ensaio ^a (nº)	AFB ₁ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AAM-1 (mg mL^{-1})	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	$\mu\text{g AFB}_1$ / mg AAM-1
1*	1,261	0,00	---	---	---	---
2	1,261	0,50	0,280	0,981	22,2	0,56
3	1,261	1,00	0,297	0,964	23,5	0,30
4	1,261	1,50	0,296	0,965	23,4	0,20
5	1,261	2,00	0,288	0,973	22,9	0,14

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Tabela 5: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-1, em pH 6 e sistema tampão fosfato-salino.

Ensaio ^a (n°)	AFB ₁ (µg mL ⁻¹)	AAM-1 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (µg)	AFB ₁ livre (µg)	Adsorção AFB ₁ (%)	µg AFB ₁ / mg AAM-1
1*	1,266	0,00	---	---	---	---
2	1,266	0,50	0,362	0,904	28,7	0,72
3	1,266	1,00	0,367	0,899	29,0	0,37
4	1,266	1,50	0,355	0,911	28,1	0,24
5	1,266	2,00	0,379	0,887	29,9	0,19

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Os resultados obtidos para os ensaios analíticos *in vitro* do AAM-2, em pH 3 e 6, utilizando-se tampão fosfato-salino como solução de reação estão apresentados nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Para o AAM-2 utilizando-se o tampão fosfato salino, não houve efeito significativo do pH ($p=0,1472$), ou seja, a quantidade de AFB₁ adsorvida em pH 3 ($\bar{X} = 0,429 \mu\text{g}$) foi similar ao pH 6 ($\bar{X} = 0,472 \mu\text{g}$), assim como houve semelhança nos percentuais de adsorção em pH 3 ($\bar{X} = 34,0 \%$) e pH 6 ($\bar{X} = 37,3 \%$). Também não houve efeito significativo das concentrações de aditivo ($p=0,1938$), e da mesma forma que o AAM-1 a relação toxina / aditivo mais eficiente demonstrou ser na dose de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, chegando bem próximo a $1,0 \text{ (um)}$ em pH 3.

Tabela 6: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-2, em pH 3 e sistema tampão fosfato-salino.

Ensaio ^a (n°)	AFB ₁ (µg mL ⁻¹)	AAM-2 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (µg)	AFB ₁ livre (µg)	Adsorção AFB ₁ (%)	µg AFB ₁ / mg AAM-2
1*	1,261	0,00	---	---	---	---
2	1,261	0,50	0,475	0,786	37,7	0,95
3	1,261	1,00	0,440	0,821	34,9	0,44
4	1,261	1,50	0,507	0,754	40,2	0,34
5	1,261	2,00	0,293	0,968	23,3	0,15

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Tabela 7: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-2, em pH 6 e sistema tampão fosfato-salino.

Ensaio ^a (n°)	AFB ₁ (μg mL ⁻¹)	AAM-2 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	μg AFB ₁ / mg AAM-2
1*	1,266	0,00	---	---	---	---
2	1,266	0,50	0,270	0,996	21,3	0,54
3	1,266	1,00	0,396	0,870	31,3	0,40
4	1,266	1,50	0,547	0,719	43,2	0,37
5	1,266	2,00	0,674	0,592	53,2	0,34

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

3.1.2 Sistema tampão 2: fosfato-ácido cítrico

Os resultados obtidos para os ensaios analíticos *in vitro* do AAM-1, em pH 3 e 6, utilizando-se tampão fosfato-ácido cítrico como solução de reação estão apresentados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Para o AAM-1 utilizando-se o tampão fosfato-ácido cítrico, a quantidade de AFB₁ adsorvida foi significativamente maior em pH 3 ($\bar{X} = 0,332 \mu\text{g}$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 0,128 \mu\text{g}$) ($p < 0,001$), o que resultou em melhores percentuais de adsorção em pH 3 ($\bar{X} = 26,3 \%$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 10,1 \%$). Também houve diferença estatística ($p = 0,0061$) nas diferentes doses de aditivo, onde a concentração de 100% foi significativamente mais eficiente do que a de 25%, 50% e 75%, em pH 3. Em pH 6, as diferentes concentrações do aditivo não produziram efeito significativo. Apesar de 100% da dose máxima ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) ter sido a concentração mais eficiente em pH 3, mais uma vez observamos que em ambos os pH, a melhor relação custo-benefício demonstrou ser na dose de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, especialmente marcada em pH 6.

Tabela 8: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-1, em pH 3 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.

Ensaio ^a (n ^o)	AFB ₁ (μg mL ⁻¹)	AAM-1 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	μg AFB ₁ / mg AAM-1
1 [*]	1,261	0,00	---	---	---	---
2	1,261	0,50	0,252	1,009	20,0	0,50
3	1,261	1,00	0,270	0,991	21,4	0,27
4	1,261	1,50	0,293	0,968	23,2	0,20
5	1,261	2,00	0,514	0,747	40,7	0,26

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Tabela 9: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-1, em pH 6 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.

Ensaio ^a (n ^o)	AFB ₁ (μg mL ⁻¹)	AAM-1 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	μg AFB ₁ / mg AAM-1
1 [*]	1,266	0,00	---	---	---	---
2	1,266	0,50	0,217	1,049	17,2	0,43
3	1,266	1,00	0,096	1,170	7,5	0,07
4	1,266	1,50	0,078	1,188	6,2	0,05
5	1,266	2,00	0,119	1,147	9,4	0,06

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Os resultados obtidos para os ensaios analíticos *in vitro* do AAM-2, em pH 3 e 6, utilizando-se tampão fosfato-ácido cítrico como solução de reação estão apresentados nas tabelas 10 e 11, respectivamente.

Para o AAM-2 utilizando-se o tampão fosfato-ácido cítrico, a quantidade de AFB₁ adsorvida foi significativamente maior em pH 3 ($\bar{X} = 0,345 \mu\text{g}$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 0,225 \mu\text{g}$) ($p=0,005$). Desta forma, o percentual de adsorção foi também maior em pH 3 ($\bar{X} = 27,3 \%$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 17,8 \%$). Houve diferença estatística ($p=0,0026$) nas diferentes concentrações de aditivo, onde a concentração de 100% foi significativamente mais eficiente do que a de 50% e a de 25%, em pH 3 e pH 6, respectivamente. A melhor relação custo-

benefício em pH 3 demonstrou ser na dose de 0,5 mg mL⁻¹, e em pH 6, a dose de 0,5 mg mL⁻¹ e a de 1,0 mg mL⁻¹ demonstraram resultados similares, não havendo diferença significativa.

Tabela 10: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-2, em pH 3 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.

Ensaio ^a (nº)	AFB ₁ (µg mL ⁻¹)	AAM-2 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (µg)	AFB ₁ livre (µg)	Adsorção AFB ₁ (%)	µg AFB ₁ / mg AAM-2
1 [*]	1,261	0,00	---	---	---	---
2	1,261	0,50	0,322	0,939	25,5	0,64
3	1,261	1,00	0,307	0,954	24,3	0,31
4	1,261	1,50	0,327	0,934	26,0	0,22
5	1,261	2,00	0,422	0,839	33,5	0,21

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Tabela 11: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-2, em pH 6 e sistema tampão fosfato-ácido cítrico.

Ensaio ^a (nº)	AFB ₁ (µg mL ⁻¹)	AAM-2 (mg mL ⁻¹)	AFB ₁ adsorvida (µg)	AFB ₁ livre (µg)	Adsorção AFB ₁ (%)	µg AFB ₁ / mg AAM-2
1 [*]	1,266	0,00	---	---	---	---
2	1,266	0,50	0,110	1,156	8,7	0,22
3	1,266	1,00	0,278	0,988	21,9	0,28
4	1,266	1,50	0,187	1,079	14,8	0,12
5	1,266	2,00	0,325	0,941	25,7	0,16

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

3.1.3 Simuladores artificiais: gástrico e intestinal

Os resultados obtidos para os ensaios analíticos *in vitro* do AAM-1, utilizando-se os simuladores artificiais gástrico (pH 3) e intestinal (pH 6) como solução de reação estão apresentados nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Para o AAM-1 utilizando-se os simuladores gastrointestinais, a quantidade de AFB₁ adsorvida foi significativamente maior em pH 3 ($\bar{X} = 0,355 \mu\text{g}$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 0,055 \mu\text{g}$) ($p=0,003$), o que resultou em melhores percentuais de adsorção em pH 3 ($\bar{X} = 28,2 \%$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 4,4 \%$). Também houve diferença estatística ($p=0,0031$) nas diferentes doses de aditivo, onde a concentração de 100% foi significativamente mais eficiente do que a de 25%, 50% e 75%, em pH 6. Em pH 3, as diferentes concentrações do aditivo não produziram nenhuma diferença significativa ($p=0,7382$). Se observarmos a relação $\mu\text{g AFB}_1 / \mu\text{g AAM}$, verificamos que esta se mostrou economicamente mais eficiente na dose de 0,5 mg mL⁻¹ em pH 3. Em pH 6, independente da dose, a relação μg de toxina adsorvida / mg de aditivo foi muito baixa.

Tabela 12: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-1, em simulador gástrico artificial (pH 3).

Ensaio ^a (nº)	AFB ₁ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AAM-1 (mg mL^{-1})	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	$\mu\text{g AFB}_1 /$ mg AAM-1
1*	1,261	0,00	---	---	---	---
2	1,261	0,50	0,256	1,005	20,3	0,51
3	1,261	1,00	0,326	0,935	25,9	0,33
4	1,261	1,50	0,390	0,871	30,9	0,26
5	1,261	2,00	0,448	0,813	35,5	0,22

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Tabela 13: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-1, em simulador intestinal artificial (pH 6).

Ensaio ^a (nº)	AFB ₁ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AAM-1 (mg mL^{-1})	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	$\mu\text{g AFB}_1 /$ mg AAM-1
1*	1,266	0,00	---	---	---	---
2	1,266	0,50	0,023	1,243	1,8	0,05
3	1,266	1,00	0,040	1,226	3,2	0,04
4	1,266	1,50	0,036	1,230	2,8	0,02
5	1,266	2,00	0,122	1,144	9,7	0,06

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Os resultados obtidos para os ensaios analíticos *in vitro* do AAM-2, utilizando-se os simuladores artificiais gástrico (pH 3) e intestinal (pH 6) como solução de reação estão apresentados nas tabelas 14 e 15, respectivamente.

Para o AAM-2 utilizando-se os simuladores gastrointestinais, igualmente a quantidade de AFB₁ adsorvida foi significativamente maior em pH 3 ($\bar{X} = 0,491 \mu\text{g}$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 0,211 \mu\text{g}$) ($p=0,0046$). Da mesma forma, o percentual de adsorção foi também maior em pH 3 ($\bar{X} = 38,9 \%$) do que em pH 6 ($\bar{X} = 16,7 \%$). Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de aditivo ($p=0,1958$) e a relação toxina / aditivo mais eficiente demonstrou ser na dose de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, chegando próximo a 1 (um) em pH 3.

Tabela 14: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-2, em simulador gástrico artificial (pH 3).

Ensaio ^a (n°)	AFB ₁ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AAM-2 (mg mL^{-1})	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	$\mu\text{g AFB}_1 /$ mg AAM-2
1*	1,261	0,00	---	---	---	---
2	1,261	0,50	0,427	0,834	33,8	0,85
3	1,261	1,00	0,450	0,811	35,7	0,45
4	1,261	1,50	0,505	0,756	40,0	0,34
5	1,261	2,00	0,582	0,679	46,2	0,29

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Tabela 15: Resultados obtidos para os ensaios *in vitro* do AAM-2, em simulador intestinal artificial (pH 6).

Ensaio ^a (n°)	AFB ₁ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AAM-2 (mg mL^{-1})	AFB ₁ adsorvida (μg)	AFB ₁ livre (μg)	Adsorção AFB ₁ (%)	$\mu\text{g AFB}_1 /$ mg AAM-2
1*	1,266	0,00	---	---	---	---
2	1,266	0,50	0,206	1,060	16,3	0,41
3	1,266	1,00	0,165	1,101	13,0	0,17
4	1,266	1,50	0,173	1,093	13,7	0,12
5	1,266	2,00	0,300	0,966	23,7	0,15

^a resultados da média de três repetições

* Tubos do controle positivo

Na comparação entre produtos, através dos percentuais de adsorção em cada uma das soluções de reação, temos que:

O AAM-2 conseguiu adsorver mais AFB₁ do que o AAM-1, tanto em pH 3 (p<0,001) quanto em pH 6 (p=0,0035), quando em tampão fosfato salino.

Quando em tampão fosfato-ácido cítrico, o AAM-2 foi estatisticamente mais eficiente que o AAM-1 apenas em pH 6 (p=0,004).

Já na avaliação utilizando-se os simuladores gastrointestinais, o AAM-2 foi novamente o mais eficaz tanto em suco gástrico artificial (p=0,0324), quanto em simulador intestinal artificial (p=0,004).

Assim, evidenciamos que na maioria das situações simuladas o AAM-2 mostrou ser mais eficiente em relação ao AAM-1 na adsorção de AFB₁, provavelmente por efeito da composição dos produtos, já que o AAM-2 é uma mistura homogênea (1:1) de uma PCL e uma zeólita (clinoptilolita). As aflatoxinas são moléculas pequenas e polares sendo fortemente atraídas pela clinoptilolita devido a sua alta capacidade de troca catiônica, alta superfície específica, alta porosidade, entre outros. Grant e Phillips (1998) estudaram a adsorção de AFB₁ pela montmorilonita, que também é um aluminossilicato, e concluíram que parte significativa da adsorção ocorre dentro das áreas interlaminares da argila. Reportaram que a interação da AFB₁ com os íons Ca²⁺ presentes nesta região são os maiores responsáveis pelo processo adsorptivo. Como o principal cátion em posição de troca na clinoptilolita também é o cálcio sugere-se o mesmo tipo de interação sendo responsável pela adsorção de AFB₁ por esta zeólita.

Não existe um adsorvente 100% eficaz contra as mais de 400 micotoxinas existentes. A tendência mundial reflete a busca por produtos que são mesclas de vários constituintes, são os chamados aditivos multifuncionais, onde micotoxinas polares podem ser rapidamente adsorvidas por produtos com alta CTC; já as micotoxinas apolares podem ser biotransformadas, de modo a torná-las menos tóxicas ou mais polares; os radicais livres resultantes do processo de estresse oxidativo podem ser anulados (uso de antioxidantes) e os órgãos que sofreram danos, como o fígado, por exemplo, podem ser reparados (uso de hepatoprotetores naturais). No caso da PCL, ocorre ação adsorvente através dos β-glucanos, em especial, com ligação 1,3 e 1,6, além de ação estimulante do sistema imunológico, através dos MOS, justamente porque as micotoxinas atuam deprimindo este sistema.

Os estudos *in vitro* ajudam a caracterizar as interações entre os AAM e as micotoxinas específicas. Nossos resultados então de acordo com a literatura que relata que a adsorção da

aflatoxina é influenciada pelo pH (acidez relativa) e pela concentração de fosfato no ambiente aquoso (DAWSON; EVANS; KUDUPOJE, 2006). Os autores informaram uma ligação máxima ocorrendo em um pH de aproximadamente 4, e em nosso estudo os melhores resultados se deram em pH 3 (ácido). Além disso, eles observaram uma ligação máxima ocorrendo em tampão fosfato contendo 0,5 M de fosfato. Em nosso estudo, o único caso em que a adsorção mostrou-se mais eficiente em pH 6 foi quando em tampão fosfato salino, indicando que neste caso, a composição do tampão para este pH, com a inclusão de 100mL de KH_2PO_4 0,1M foi o elemento crucial para esta modificação do padrão de resultados.

As primeiras metodologias descritas para estudos *in vitro* de avaliação de eficiência de AAM começaram a ser desenvolvidas há mais de 20 anos e utilizavam como veículo para a aflatoxina, uma solução hidroalcoólica. Apesar desta condição ser ainda amplamente utilizada, quando no organismo animal, o adsorvente é submetido a situações que, obviamente, não são reproduzidas apenas com ensaios em solução hidroalcoólica (MALLMANN et al., 2009). E foi exatamente isso que conseguimos comprovar em nosso trabalho. Houve uma grande variação nos percentuais de adsorção em função dos sistemas de reação ensaiados; e é por isso que não conseguimos uma correta comparação de resultados à luz da literatura, já que as mais diversas metodologias vêm sendo testadas. Lemke et al. (2001) testaram quatro diferentes AAM sob diferentes condições *in vitro* e concluíram que tanto a participação dos simuladores gastrointestinais, como a presença da matriz contaminada (alimento) podem causar grandes modificações dos resultados em relação aos ensaios em meios aquosos.

Em nosso estudo, a maior capacidade de adsorção foi apresentada pelo AAM-2, em pH 3 utilizando o simulador gástrico artificial como solução de reação. Mallmann et al. (2009) relataram terem ensaiado mais de 500 produtos com capacidade de adsorção superior a 90% em ensaios *in vitro* de concentração única, no período de 1998 a 2009. Porém, esse índice não correspondeu ao desempenho apresentado pelos produtos nos ensaios *in vivo*.

Desta forma, fica evidente que mesmo produtos que se mostraram pouco eficazes em situações menos realísticas como as encontradas em ensaios *in vitro*, podem muitas vezes apresentar desempenho satisfatório em ensaios de campo. E o contrário também pode ocorrer, onde testes que demonstram ser eficazes *in vitro* não terão necessariamente a mesma efetividade *in vivo* (HUFF et al., 1992; PLANK et al., 1990). Mallmann et al. (2009), submetendo seus resultados a uma análise de regressão linear, verificou não haver correlação significativa entre os teste *in vivo* e *in vitro*, independente das condições empregadas nestes últimos ($P \leq 0,05$ e $R \leq 0,45$). Portanto, é extremamente necessário que estudos *in vivo* sejam

realizados na tentativa de verificar a efetividade real dos produtos, utilizando-se a espécie para o qual o produto será designado, e também para determinar a estabilidade dos complexos formados no TGI e estabelecer a natureza inócua desses compostos. Em nosso estudo, os resultados dos ensaios *in vivo* em frangos de corte serão detalhados no capítulo III.

3.2 Ensaios *in vitro* através de Isotermas de Adsorção

Para determinar a capacidade de adsorção dos produtos foram realizadas previamente isotermas de saturação da micotoxina com distintas massas dos AAM. As Figuras 8 (a) e (b) mostram a adsorção de uma certa quantidade de AFB₁ ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) para diferentes massas dos AAM (250, 200, 100, 50, 10, 5, 2, 1 e $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$).

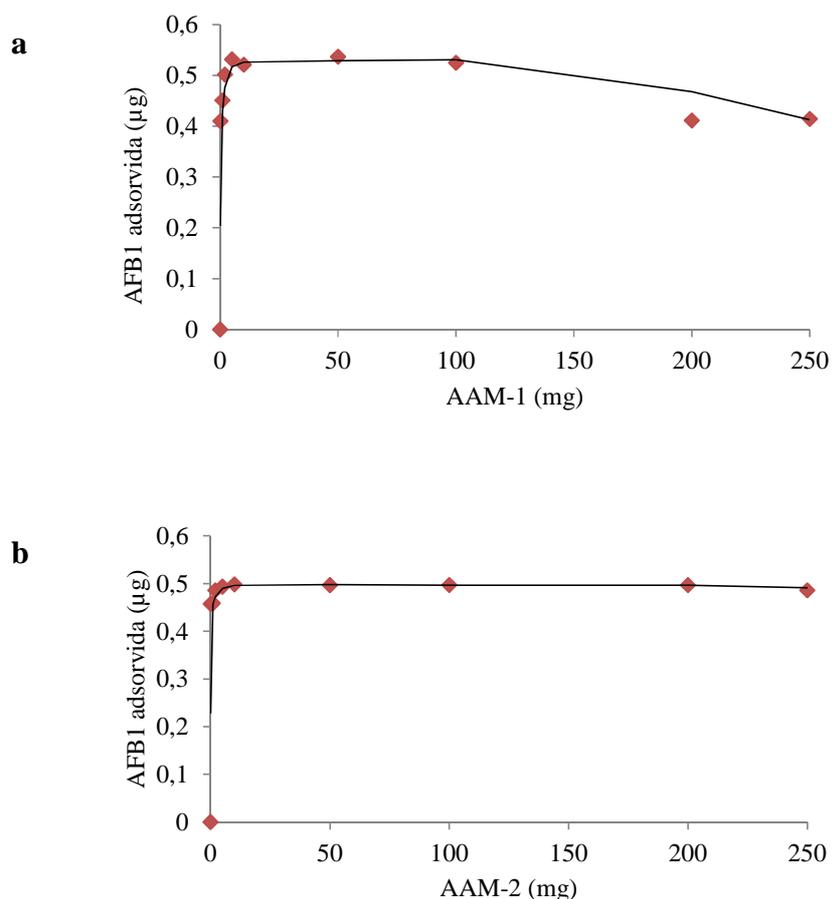


Figura 8: Isotermas de saturação: efeito da massa dos AAM sobre a adsorção de AFB₁. a) AAM-1 e b) AAM-2 em pH 3 a 37°C.

Em ambos os gráficos observa-se que a partir da concentração de 2 mg mL⁻¹ de AAM, a adsorção permanece constante, indicando que esta seria a melhor dose a ser utilizada para as isotermas de adsorção (condição de equilíbrio onde coexistem sítios livres com sítios ocupados no adsorvente e a toxina no sobrenadante). Para o AAM-1, percebe-se claramente pelo gráfico que o excesso de aditivo inclusive piora o processo adsortivo.

A partir daí, foram realizadas isotermas de adsorção dos AAM (2 mg mL⁻¹) com distintas concentrações de AFB₁ (15,346; 10,33; 7,34; 4,83 e 2,08 µg mL⁻¹). As isotermas de adsorção geradas para os AAM 1 e 2 foram do tipo S e podem, portanto, ser ajustadas pelo modelo matemático de Hill. Os parâmetros de ajuste obtidos com base no modelo matemático estão apresentados na Tabela 16. Nas Figuras 9 e 10, podem ser observados os gráficos relativos às isotermas de adsorção de AFB₁, sob diferentes pH, para os AAM testados.

Tabela 16: Parâmetros de ajuste obtidos a partir do modelo matemático de Hill para as isotermas de adsorção de AFB₁ e os AAM-1 e AAM-2, nos diferentes pH analisados.

Adsorvente	pH	k_d (µM)	$10^{-6}\beta$ (M ⁻¹)	Γ_{\max} (µg/mg)	n	N	R ²
AAM-1	3	4,291±0,189	0,233±0,044	0,918±0,056	3,829±0,453	5	0,996
	6	4,806±0,303	0,208±0,063	1,002±0,089	3,619±0,459	5	0,996
AAM-2	3	30,596±0,230	0,033±0,008	1,558±0,023	5,517±0,137	3	1,000
	6	6,253±2,633	0,160±0,421	1,950±1,104	2,582±0,680	5	0,988

k_d = Constante de dissociação, β = Constante de associação, Γ_{\max} = Capacidade máxima de adsorção, n = número de sítios para o cooperativismo, N = número de pontos na curva. Cada ponto é a média das triplicatas.

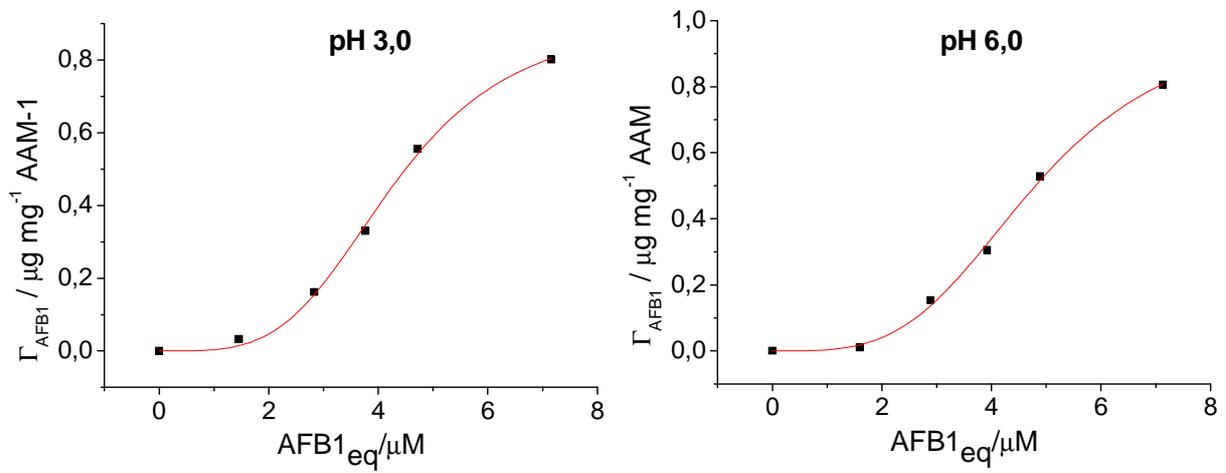


Figura 9: Isotermas de adsorção de AFB₁, para o AAM-1, em pH 3 e 6, segundo modelo de Hill.

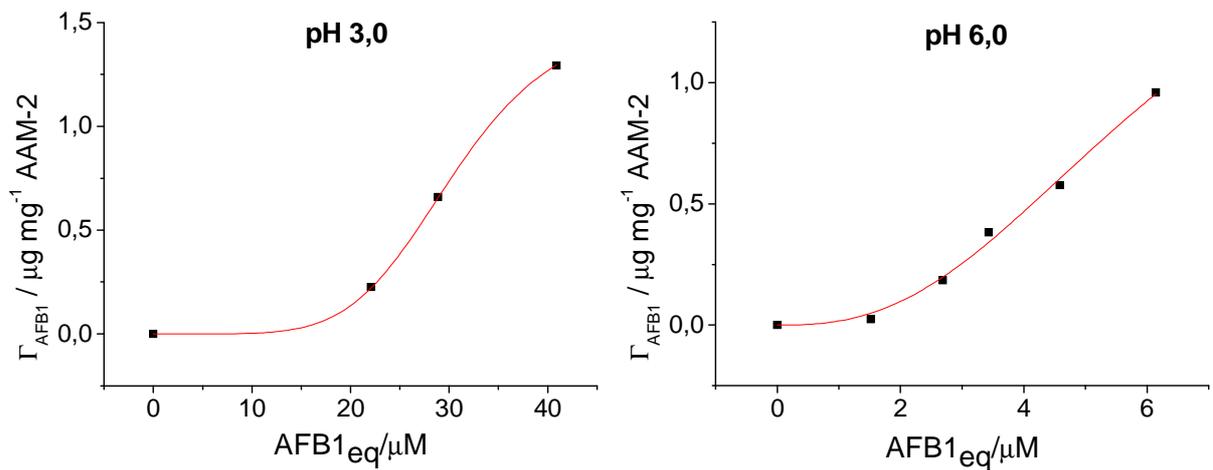


Figura 10: Isotermas de adsorção de AFB₁, para o AAM-2, em pH 3 e 6, segundo modelo de Hill.

Todas as isotermas de adsorção foram sigmoidais, indicando que a adsorção se dá por mecanismo cooperativo; e os ajustes matemáticos foram feitos pelo modelo de Hill, o qual tem sido recomendado pela literatura para explicar isotermas de adsorção de PCL e PCL modificadas (YIANNIKOURIS et al., 2003, 2004).

Para o AAM-1 não observam-se grandes variações no formato da isoterma entre os diferentes pH; tanto os valores para a capacidade máxima de adsorção, como para as constantes de associação e dissociação permanecem com pequenas variações, indicando alta eficiência (adsorção menos desorção) no processo.

Para o AAM-2 já se nota ligeira alteração no formato da isoterma em função do pH; apesar do valor para a capacidade máxima de adsorção sofrer pequena variação, observa-se que o produto em pH 3 apresentou menor eficiência no processo (baixa constante de associação e alta constante de dissociação). No entanto, observa-se que o produto restabelece o padrão esperado em pH 6, o que é um fato importante, já que é no intestino delgado que predomina a absorção, sendo recomendado que neste sítio o complexo micotoxina-adsorvente apresente baixa desorção.

Em relação a capacidade máxima de adsorção, assim como nos ensaios de concentração única, nota-se ligeira vantagem para o AAM-2. Além disso, os maiores valores foram demonstrados em pH 6 indicando mais uma vez, conforme dito anteriormente, que o efeito da concentração de fosfato pode ser sobreposto ao efeito do pH.

Os ensaios de concentração única apesar de serem mais simples e cursarem com menor gasto de micotoxina-padrão, podem fornecer muitos resultados falso-positivos, especialmente se o resultado informado for em relação ao percentual de adsorção. Já o método por isotermas de adsorção tem a vantagem de fornecer informações sobre o tipo de mecanismo envolvido e permitir a comparação ao menos do formato das isotermas com dados da literatura (LEMKE et al., 2001)

4 CONCLUSÕES

- ✓ A AFB₁ aderiu eficientemente aos AAM-1 e AAM-2, demonstrando a potencialidade dos produtos em prevenir os efeitos tóxicos provocados pela ingestão desta micotoxina, sendo recomendada a realização de ensaios *in vivo* confirmatórios.
- ✓ A composição química dos produtos influenciou na capacidade máxima de adsorção de AFB₁. A adição da zeólita (AAM-2) demonstrou ser eficiente para aumentar a captação de AFB₁ quando em comparação com a PCL isolada (AAM-1).
- ✓ Existiu efeito do pH da solução de reação sobre o processo de adsorção da AFB₁, sendo favorecido em valores de pH relativamente ácidos.
- ✓ A composição da solução de reação influenciou no processo de adsorção da AFB₁. A adsorção foi negativamente afetada quando na presença dos simuladores gastrointestinais em relação às demais soluções tamponadas, apesar de estes serem as soluções que mais se assemelham às condições naturais de TGI dos monogástricos.
- ✓ Existiu efeito da concentração de íons fosfato sobre a adsorção de AFB₁, sendo favorecido em condições de maior concentração, inclusive superando o efeito de pH.
- ✓ Várias condições experimentais podem ser utilizadas para testar *in vitro* potenciais AAM e micotoxinas. Existe a clara necessidade de uma metodologia de referência, que possa ser utilizada mundialmente, possibilitando a comparação interlaboratorial de resultados de diferentes produtos, visando classificá-los para futuros testes *in vivo*.
- ✓ O estudo através de isotermas de adsorção pode ser considerado bem completo, visto que oferece informações a respeito da afinidade e eficiência do processo, tanto em altas como baixas concentrações de micotoxina, e através do formato da isoterma é possível sugerir o tipo de mecanismo de adsorção envolvido.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M.R.M.P.; NOVAES, A.C.; GUARINO, A.W.S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1145-1154, 2002.

ARMANDO, M.R.; DOGI, C.A.; PIZZOLITTO, R.P.; ESCOBAR, F. PEIRANO, M.S.; SALVANO, M.A. SABINI, L.I.; COMBINA, M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L. R. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.

ARMBRUSTER, T. Clinoptilolite-heulandite: applications and basic research. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 135, p. 13-27, 2001.

ASPLIN, F.D.; CARNAGHAN, R.B.A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1215-1219, 1961.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1283-1290, 2003.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 817-824, 2004.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4810-4819, 2007.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; GLORIA, E.M.; DOMINGUES-CALORI, M.A.; VIZIOLI, M.R. *Saccharomyces cerevisiae* in the reduction of the aflatoxins effects. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, Sup. 1, S.48, 2001.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; GLÓRIA, E.M.; SALGADO, J.M.; VIZIOLI, M.R. The capacity of mannanoligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 475-481, 2004.

BARTOLI, A.; MAGGI, O. Four new species of *Aspergillus* from Ivory Coast soil. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 71, n. 3, p. 393–394, 1978.

BENNETT, J; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BLANQUET, S.; ZEIJDNER, E.; BEYSSAC, E.; MEUNIER, J.; DENIS, S.; HAVENAAR, R.; ALRIC, M. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 4, 585-591, 2004.

BLOUNT, W.P. Turkey “x” Disease. **Turkey**, v.9, p.55-58, 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº13, de 30 de novembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 01 de dezembro de 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº130, de 24 de maio de 2006. Institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 de maio de 2006.

BUSBY, W.F.; WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SEARLE, C.E. (Ed.). **Chemical Carcinogens**. Washington: American Chemical Society, 1984. chap. 16, p. 945-1136.

CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. USA, Iowa: Task Force Report n° 139, 2003.

CELIK, K.; DENLI, M.; ERTURK, M.; OZTURKCAN, O.; DORAN, F. Evaluation of dry yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) compounds in the feed to reduce aflatoxin B₁ (AFB₁) residues and toxicity to Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Applied Animal Research**, v. 20, n. 2, p. 245-250, 2001.

CELIK, K.; DENLY, M.; SAVAS, T. Reduction of toxic effects of aflatoxin B₁ by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicks diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 615-619, 2003.

CHRISTENSEN, M.A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, v. 73, n. 6, p. 1056–1084, 1981.

CLIFTON, R.A. **Natural and synthetic zeolites**. Washington: Bureau of Mines. 1987.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and Phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143

DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. **Engormix**, 2006. Disponível em: <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/understanding-adsorption-characteristics-yeast_218.htm> Acesso em: 04 jan. 2012

DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B.I.R.; MORTON, M.G. *Saccharomyces cerevisiae* and manannan oligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. **Proceedings Australian Poultry Sciences Symposium**, v. 8, p. 103-106, 1996.

DIAZ, D.E.; HAGLER, W.M.; BLACKWELDER, J.T.; HOPKINS, B.A.; ANDERSEN, K.L. Aflatoxin blinders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, n. 2, p. 233-241, 2004.

DIAZ, G.J.; MURCIA, H.W. Biotransformation of Aflatoxin B₁ and Its Relationship with the Differential Toxicological Response to Aflatoxin in Commercial Poultry Species. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G (Ed.). **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. Croatia: InTech. 2011. p. 3-20.

DIAZ, D.E., SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: DIAZ, D.E. (Ed.) **The Mycotoxin Blue Book**. United Kingdom: Nottingham University Press, 2005. p. 323-340.

DOGI, C.A.; ARMANDO, R.; LUDUEÑA, R.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A.; CAVAGLIERI, L. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 12, p. 1705-1711, 2011.

DORNER, J.W.; COLE, R.J.; DIENER, U.L. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. **Mycopathologia**, v. 87, n. 1-2, p. 13-15, 1984

EATON, D.L.; RAMSDELL, H.S.; NEAL, G.E. Biotransformation of aflatoxinas. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (Ed). **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance**. London: Academic Press, 1994, p. 45-72.

FRISVAD, J.C. **New producers of aflatoxin**. In: International Workshop on *Penicillium* and *Aspergillus*, 3, 1997, Baarn, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultures, International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA), Paris, International Union of Microbiological Sciences (IUMS), 1997.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 1, p. 120-131, 2001.

GEISER, D.M.; DORNER, J.W.; HORN, B.W.; TAYLOR, J.W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 3, p. 169-179, 2000.

GEISER, D.M.; PITT, J.I.; TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 388–393, 1998.

GIANNETO, P. **Zeolitas: características, propiedades y aplicaciones industriales**. Caracas: Editorial Innovación Tecnológica, 1989. cap. 2 e 4.

GILES, C.H; SMITH, D; HUITSON, A. A general treatment and classification of solute adsorption isotherm. I: Theoretical. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 47, n. 3, p. 755-765, 1974.

GOTO, T.; WICKLOW, D.T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4036–4038, 1996.

GRANT, P.G.; PHILLIPS, T.D. Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 599-605, 1998.

HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; PHILLIPS, T.D. Efficacy of Zeolitic Ore Compounds on the Toxicity of Aflatoxin to Growing Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 67-73, 1993.

HOOGE, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharides 1993-2003. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 3, p. 163-174, 2004.

HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; PHILLIPS, T.D. Efficacy of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Reduce the Individual and Combined Toxicity of Aflatoxin and Ochratoxin A. **Poultry Science**, v. 71, n. 1, p. 64-69, 1992.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 2, p. 179- 188, 2001.

HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advance Experimental Medical Biology**, v. 283, p. 525-532, 1991.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, 1993. p. 489-521. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56).

ITO, Y.; PETERSON, S.W.; WICKLOW, D.T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 233–239, 2001.

JOUANY, J.P.; YIANNINKOURIS, A.; BERTIN, G. How yeast cell wall components can alleviate micotoxicosis in animal production and improve the safety of edible animal products. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, suppl 1., p. 171- 191, 2005.

KEEHN, D.M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nurs**, v. 14, n. 4, p. 163-174, 1991.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, n. 1, p. 99-108, 1988.

KLICH, M.A.; MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; CARY, J.W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 605–609, 2000.

KRAUSE, O.G.; RICHARDSON, C.R.; CASTLEBERRY, R.E.; COBB, C.W. Biological response of chicks fed sorghum grain based diets with added grain specific enzymes mixture and yeast. **Texas Technology of Agriculture Science**, v. 5, p. 727-735, 1989.

KUBENA, L.F.; HUFF, W.E.; HARVEY, R.B.; YERSIN, A.G.; ELISSALDE, M. H.; WITXEL, D.A.; GIROIR, L.E.; PHILLIPS, T.D.; PETERSON, H.D. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poult during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v. 70, n. 8, p. 1823-1830, 1991.

KURTZMAN, C.P.; HORN, B.W.; HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147–158, 1987.

LAMIC - Laboratório de Micotoxinas. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. **Tabelas de resultados - Média de Aflatoxinas por Ano**. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/resultado_afla_media_ano.html#> Acesso em: jan. 2011.

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LEMKE, S.L.; OTTINGER, S.E.; MAYURA, K.; AKE, C.L.; PIMPUKDEE, K.; WANG, N.; PHILLIPS, T.D. Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, n. 12, p. 17-29, 2001.

LUZ, A.B. **Zeólitas: propriedades e usos industriais**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, 1995.

MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; PAGES, N.; KOGAN, G.; CHAMORRO, G. Antigenotoxic studies in mouse to reduce the aflatoxin B₁ damage. In: GOUDEY-PERRIERE, F.; BON, C.; PUISSEUX-DAO, S.; SAUVIAT, M-P. (Eds.). **Toxines et recherches biomédicales**. Paris (French): Elsevier, 2002. p. 123–132.

MALLMANN, C.A.; VASCONCELOS, T.G.; TYSKA, D.; MARTINS, A.C. Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas. In: Congreso Bienal de La Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal, 14, 2009, Puerto Vallarta, Jal.

México. **Memorias del XIV Congreso Bienal AMENA**. México: AMENA, 2009. Online. Disponível em: <<http://amena.mx/wp-content/uploads/2010/11/11CMallmann.pdf>> Acesso em: 05 jan. 2012.

MONTE, M.B.M.; RESENDE, N.G.A.M. **Zeólitas naturais**. Rio de Janeiro: CETEM, 2005.

MORITA, T.; ASSUMPTÃO, R.M.V. **Manual de soluções reagentes e solventes – Padronização, preparação, purificação**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1995, p. 275.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.

NIŠTIAR, F.; MOJŽIŠ, J.; KOVÁČ, G.; SEIDEL, H.; RÁCZ, O. Influence of intoxication with organophosphates on rumen bacteria and rumen protozoa and protective effect of clinoptilolite – rich zeolite on bacterial and protozoan concentration in rumen. **Folia Microbiologica**, v. 45, n. 6, p. 567-571, 2000.

OGUZ, H.; KURTOGLU, V. Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v. 41, n. 4, p. 512-517, 2000.

OGUZ, H.; KURTOGLU, V.; COSKUN, B. Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) exposure. **Research in Veterinary Science**, v. 69, n. 2, p. 197-201, 2000.

OGUZ, H.; KECECI, T.; BIRDANE, Y.O.; ONDER, F.; KURTOGLU, V. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 69, n. 1, p. 89-93, 2000.

OLIVEIRA, C.R. **Adsorção-remoção de íons sulfato e isopropilxantato em zeólita natural funcionalizada**. Porto Alegre: UFRGS. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais).

OLVER, M.D. Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens. **British Poultry Science**, v. 38, n. 2, p. 220-222, 1997.

OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Criterios de Salud Ambiental, 11: Micotoxinas**. Whashington: OPS. 1983. (OPS. Publicación Científica, 453).

ORTATATLIA, M.; OĞUZ, H. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 1, p. 59-66, 2001.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

PAPAIOANNOUA, D.; KATSOULOSA, P.D.; PANOUSIS, N.; KARATZIASA, H. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, n. 1-3, p. 161-170, 2005.

PARLAT, S.S.; OZCAN, M.; OGUZ, H. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 3, p. 207-211, 2001.

PERRY, F.G. Biotechnology in animal feeds and feeding, an overview. In: WALLACE, R.J.; CHESSON, A. (eds.) **Biotechnology in Animal Feeds and Feeding**. New York (USA): VCH Publishers Inc., 1995. p. 1-15

PETERSON, S.W.; ITO, Y.; HORN, B.W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v. 93, n. 4, p. 689-703, 2001.

PETTIGREW, J.E. Mannanligosaccharides effects on performance reviewed. **Feedstuffs**, v. 25, p. 12- 14, 2000.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins en foods and feeds - an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.

PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 3, p. 265–269, 1993.

PIVA, G.; GALVANO, F.P.F.; PIETRI, A.; PIVA, A. Detoxification methods of aflatoxins – a review. **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 767-776, 1995.

PLANK, G.; BAUER, J.; GRUNKEMEIER, A.; FISCHER, S.; GEDEK, B.; BERNER, H. The protective effect of adsorbents against ochratoxin A in swine. **Tierarztl Praxis**, v. 18, n. 5, p. 483-489, 1990.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A.G.; REYES, J.L. Effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 125, n. 3, p. 265-272, 2000.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of absorption isotherms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 62, n. 2-4, p. 263-269, 1996.

RINGOT, D.; LERZY, B.; BONHOURE, J.P.; AUCLAIR, E.; ORIOL, E.; LANONDELLE, Y. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3008- 3016, 2005.

ROBINSON, R.A.; STOKES, R.H. **Electrolyte solutions**. 2nd. Ed. Rev. London: Butterworths, 1968.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SAITO, M.; TSURUTA, O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. **Proc. of the Japanese Association of Mycotoxicology**, v. 37, p. 31–36, 1993.

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; MANABE, M. Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 23, p. 151–154, 1989.

SANTURIO, J.M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxin. **British Poultry Science**, v. 40, n. 1, p. 115-119, 1999.

SCHROEDER, H.W.; BOLLER, R.A. Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 885-889, 1973

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

SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. United States: John Wiley and Sons. 1985. chapter 3.

ŠROBÁROVÁ, A.; KOGAN, G.; EGED, Š. Yeast polysaccharide affects fusaric acid content in maize root rot. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 12, p. 1685–1690, 2005.

STANLEY, V.G.; OJO, R.; WOLDESENBET, S.; HUTCHINSON, D.H.; KUBENA, L.F. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1867-1872, 1993.

STOLOFF, L. Aflatoxin: a overview. In: RODRICKS, J.V.C.; HESSELTINE, W.; MEHLMAN, M.A. (Ed.) **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Patholox Publishers. 1977. cap. 1, p. 7-28.

STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M.; SHOTWELL, O.L. Aflatoxins M₁ and M₂: Preparation and purification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 47, n. 10, p. 389–390, 1970.

TERAO, K.; UENO, Y. Morphological and functional damage to cells and tissues. In: URAGUCHI, K.; YAMAZAKI, M. **Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins**. New York: Wiley, 1978, p. 189-210.

TUNG, H.T.; WYATT, R.D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P.B. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 320-326, 1975.

VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 3, p. 321-330, 1995.

VEKIRU, E.; FRUHAUF, S.; SAHIN, M.; OTTNER, F.; SCHATZMAYR, G.; KRŠKA, R. Investigation of various adsorbents for their ability to bind aflatoxin B₁. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 1, p. 27-33, 2007.

YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C.G.; FRANCOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J.P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 10, p. 783- 789, 2003.

YIANNIKOURIS, A.; FRANCOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1195-1200, 2004a.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Alkali extraction of β-D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties towards Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3666-3673, 2004b.

WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 374, p. 123-137, 1992.

ANEXO A: Transcrição da Proposta para Registro de Aditivos Anti-Micotoxinas Elaborada pelo Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas (BRASIL, 2006).

“...

4. PROPOSTA PARA REGISTRO DE ADITIVOS ANTI-MICOTOXINAS

4.1 Linhas gerais :

O GT faz as seguintes proposições referentes aos produtos incluídos neste item:

- Alteração da denominação “**Aditivo Adsorvente**” para “**Aditivo Anti-Micotoxinas (AAM)**” definindo-se como tal os produtos que, adicionados em alimentos para animais, sejam capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas;
- A empresa deve garantir a inocuidade dos produtos AAM que fabrica e/ou embala e distribui para comercialização, seguindo os critérios definidos no item 4.2.5;
- A empresa deve demonstrar a eficiência do produto mediante teste “*in vitro*”, que é o controle de qualidade na elaboração dos AAM, pela medição da capacidade de adsorção das micotoxinas, sempre especificando a técnica que se utilizou para a quantificação;
- A empresa deve demonstrar a eficiência do produto mediante teste “*in vivo*”, que é a única opção que demonstra a eficiência do adsorvente.
- Portanto, para conceder o registro de um produto, deverá ser apresentada toda a documentação técnica que garante que o produto é inócuo para o animal e tenha sido avaliado para cada micotoxina em cada espécie animal que se quer obter registro. O estudo “*in vivo*” deverá ser integralmente conduzido no Brasil seguindo os protocolos definidos no parágrafo 4.2.4.

4.2 Documentação exigida no primeiro registro ou na renovação de registro:

4.2.1 Descrição detalhada do produto, incluindo, nome, origem, composição qualitativa e outras informações que o MAPA considerar pertinentes.

4.2.2 Relatório de ensaio “*in vitro*”, demonstrando a capacidade anti micotoxina, com critério de controle de qualidade do produto, para cada micotoxina, em pH 3 e 6,,segundo o protocolo a seguir (Tabela 7)

Tabela 7. Avaliação de aditivos anti-Micotoxinas: Exigências mínimas para os ensaios analíticos “*in vitro*”, por cada pH:

Tubo*	AAM ¹	Concentração de micotoxinas	
		AFLA, ZEA, OTA	FB, DON
1	0	1,0 ppm	2,5 ppm
2	25	1,0 ppm	2,5 ppm
3	50	1,0 ppm	2,5 ppm
4	75	1,0 ppm	2,5 ppm
5	100	1,0 ppm	2,5 ppm

¹ % da dose máxima recomendada pelo fabricante/importador

* Mínimo de 3 repetições/tubo

4.2.3 Relatório de ensaio *in vivo*, demonstrando eficiência para cada micotoxina em cada espécie animal pleiteada para o uso do produto, seguindo o protocolo mínimo anexo (Tabelas 8, 9 e 10);

Tabela 8. Avaliação de aditivos anti-Micotoxinas: Exigências mínimas para os ensaios *in vivo*: Modelo de dietas experimentais para avaliar a eficácia de um adsorvente *in vivo*.

Dietas	AAM	Micotoxina
1*	0	0
2	100% ¹	0
3	0	(X) mg/kg
4	100%	(X) mg/kg

¹ % da dose máxima recomendada pelo fabricante

* Mínimo de X repetições/dieta por espécie, toxina e tempo

Tabela 9. Avaliação de aditivos anti-Micotoxinas: Efeitos tóxicos de micotoxinas selecionados para avaliação *in vivo*:

Micotoxina	Nível na dieta (mg/kg)	Efeitos
Aflatoxinas	1-3	Alterações do desempenho (ganho de peso, consumo de alimento e conversão alimentar). Alterações de proteínas séricas e/ ou alterações em enzimas hepáticas Alterações peso relativo do fígado e/ou rins
Aflatoxina B ₁	5*	Alterações de AFM ₁ no leite
Zearalenona	0,25 – 2	Alterações na vulvometria. Alterações do comprimento e peso do trato reprodutivo de fêmeas.
Ocratoxina A	2 – 4	Alterações do desempenho Alterações de proteínas séricas e/ou alterações do ácido úrico Alterações do peso do fígado e rins
Desoxinivalenol	5-15	Alterações do desempenho Alterações de proteínas séricas
Fumonisina B ₁	50-200	Alterações do desempenho. Alterações de proteínas séricas. Alterações da esfingalina/ esfingosina. Alterações no peso relativo do fígado e dos pulmões (suínos)

* Nível empregado no concentrado

Tabela 10. Avaliação de aditivos anti-Micotoxinas: Modelo para apresentação dos resultados de eficácia de um aditivo anti-Micotoxinas *in vivo*;

Dietas	Parâmetro avaliado
1	X,x ± dp *
2	Y,y ± dp *
3	Z,z ± dp *
4	W,w ± dp *

¹ Número de unidades experimentais:

- Aves: 6 unidades/tratamento, com 10 aves em cada unidade.

- Demais espécies: 6 animais/tratamento

* Indicar a inferência e o método estatístico utilizado no estudo

Dp: Desvio padrão

4.2.4 Laudo analítico evidenciando a inocuidade do produto quanto à presença de contaminantes químicos e microbiológicos estabelecidos seguindo os limites a seguir:

Para aditivos contendo aluminossilicatos

Contaminantes	Limite
Dioxinas e furanos	0,75 ng OMS-PCDD/F-TEQ/kg ¹
Pb	15 mg/kg ²
Cd	5 mg/kg ³
Hg	0,1 mg/kg ³
As	12 mg/kg ²
<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25 g

¹ Diretiva 100/2003/CE de 31/10/2003

² Diretiva 57/2003/CE de 17/06/2003

³ Diretiva 32/2002/CE de 07/05/2002

Para aditivos sem componentes a base de aluminossilicatos

Salmonella sp Ausência em 25 g

4.3 Critérios para controle de qualidade do fabricante de AAM:

- Análise *in vitro* por lote de produto, realizada de acordo com os critérios do item 4.2.2
- Análise do produto para verificação da presença de contaminantes químicos e microbiológicos, de acordo com o seu sistema de garantia da qualidade.

4.4 Critérios para fiscalização:

- Avaliar o controle de qualidade do fabricante
- Inspeção e monitoramento nas fábricas nacionais e internacionais
- Coleta de amostra para análise fiscal, quando pertinente.

...”

CAPÍTULO II

LEVEDURAS PARA USO COMO PROBIÓTICO E

DESCONTAMINANTE DE AFLATOXINA B₁

NA PRODUÇÃO ANIMAL

RESUMO

Uma boa digestão e absorção dos nutrientes são fatores determinantes para a manutenção da saúde, e para isso é necessário uma mucosa intestinal íntegra e uma microbiota intestinal saudável e em equilíbrio (eubiose). Nesse cenário, os suplementos funcionais, utilizados tanto em saúde humana como animal, são alternativas para melhorar o desempenho nas criações. *Saccharomyces cerevisiae* é uma das espécies de levedura de maior valor econômico, e que atua favoravelmente sobre a microbiota intestinal. Sua parede celular, constituída principalmente por β -glucanos e mananoproteínas, tem se destacado como suplemento, reconhecidos pela ação probiótica e por sua eficiência na adsorção de micotoxinas. Com base nisto, os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar leveduras (ênfase em *S. cerevisiae*) a partir de alimentos, intestino ou matéria fecal; 2) identificá-las através de métodos morfológicos e nutricionais; 3) estudar suas propriedades probióticas (resistência a antibióticos; tolerância às condições gastrointestinais; capacidade de autoagregação; capacidade de coagregação com microorganismos patógenos e capacidade de produção de substâncias antimicrobianas frente à patógenos) e 4) avaliar o potencial para adsorver aflatoxina B₁ (AFB₁) através de ensaios *in vitro*. No presente estudo, 70 amostras foram analisadas. *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada apenas de alimentos para humanos. Métodos enzimáticos foram úteis para garantir a confiabilidade da identificação das leveduras, já que apenas o método morfológico esteve associado com maior probabilidade de erros. As cepas de *S. cerevisiae*, LL74 e LL83, toleraram a passagem pelas condições *in vitro* gastrointestinais; apresentaram uma ou mais características probióticas; e foram moderadamente capazes de adsorver AFB₁. Estes resultados indicam uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos aditivos com ação probiótica e descontaminante de micotoxina.

ABSTRACT

A good digestion and absorption of nutrients are crucial for health maintenance, and this requires an intact intestinal mucosa and a healthy intestinal microbiota, in balance (eubiosis). In this scenario, the functional additives, used in both human and animal health, are an alternative to improve the performance in animal production. *Saccharomyces cerevisiae* is the yeast of great economic value that benefits the intestinal microbiota. Its cell wall, mainly of β -glucans and mannan-proteins, has emerged as an additive, due to the probiotic action and efficiency in the adsorption of mycotoxins. On this basis, the objectives of this study were: 1) to isolate yeasts (focused on *S. cerevisiae*) from food, gut or feces, 2) to identify them using morphological and enzymatic methods, 3) to study their probiotic properties (resistance to antibiotics, tolerance to gastrointestinal conditions; autoaggregation capacity, ability for coaggregation with pathogenic microorganisms and the ability to produce antimicrobial substances against pathogens) and 4) to evaluate the potential to adsorb aflatoxin B₁ (AFB₁) on *in vitro* assays. In this study, 70 samples were analyzed. *Saccharomyces cerevisiae* was only isolated from human food. Enzymatic methods were useful to ensure reliable identification of yeasts, since only the morphological one was associated to greater errors. The *S. cerevisiae* strains, LL74 and LL83, tolerate passage through the gastrointestinal conditions *in vitro*, had one or more probiotic characteristics, and were moderately able to adsorb AFB₁. These results indicate a promising alternative for the development of new additives with probiotic and mycotoxin decontamination capacity.

1 INTRODUÇÃO

Os conceitos “alimentação saudável”, “conforto animal”, “saúde intestinal”, “suplementos funcionais” estão cada vez mais presentes no dia-a-dia dos animais, com base no fato de que uma boa digestão e absorção dos nutrientes são fatores determinantes para a manutenção da saúde.

Uma boa digestão e a absorção adequada de nutrientes dependem de uma mucosa intestinal íntegra e de uma microbiota intestinal saudável e em equilíbrio (eubiose). Nesse cenário surgem os suplementos funcionais, definidos como sendo compostos à base de nutrientes em certa combinação, que auxiliam na manutenção de uma microbiota ativa e saudável. Um dos elementos de destaque, por atuar favoravelmente sobre a microbiota intestinal, é a levedura *S. cerevisiae*, que por ser rica em vitaminas e aminoácidos vem tendo grande relevância na manutenção da microbiota intestinal benéfica.

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Existem pelo menos 80 gêneros de leveduras com aproximadamente 600 espécies conhecidas. Dentre todas essas espécies, a *S. cerevisiae* tornou-se o organismo escolhido para estudos de metabolismo, genética molecular, desenvolvimento de eucariontes e dos cromossomos, sendo, portanto, o primeiro eucarioto com o genoma completamente sequenciado (RAVEN et al., 2007).

As leveduras são fungos unicelulares, apresentam-se na forma de células alongadas ou ovaladas, abundantemente encontradas na natureza em frutas cítricas, cereais e vegetais. As células da *S. cerevisiae* são elípticas, medem cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura, reproduzem-se assexuadamente por brotamento (PELCZAR JR. et al., 1997) e apresentam membrana celular bem definida. Bastante espessa, com cerca de 70 nm de espessura, a PCL desempenha um papel importante na regulação do transporte de materiais para o interior da célula, estando situada na superfície externa da célula (OSUMI, 1998).

A PCL desempenha quatro funções principais:

- i) estabilização das condições osmóticas internas – para limitar a entrada de água do meio externo os fungos desenvolveram uma parede celular robusta e elástica;
- ii) proteção contra estresse físico, funcionando como uma película protetora – a combinação de uma resistência mecânica considerável e uma elevada elasticidade permitem à parede transmitir e redistribuir o estresse físico oferecendo proteção contra danos mecânicos;

iii) manutenção da forma da célula; e

iv) servir de estrutura de sustentação de proteínas – os polissacarídeos da parede celular funcionam como estrutura de suporte a uma camada externa de glicoproteínas, que limitam a permeabilidade celular à macromoléculas, protegendo a célula de ataques de proteínas externas e limitando o escape de componentes solúveis da estrutura da parede para o meio.

A composição em polissacarídeos, a estrutura e espessura da PCL variam consideravelmente com as condições ambientais (KLIS et al., 2006). A parede celular da *S. cerevisiae*, assim como os fungos da classe Ascomycetes, tem uma dupla camada (Figura 1) (DE GROOT et al., 2005) e mede aproximadamente 70 ± 10 nm de espessura, correspondendo a cerca de 25 % do peso seco da célula, consistindo numa estrutura multilaminar microfibrilar constituída por polissacarídeos (90 %), sendo os mananos e os glucanos os principais polímeros estruturais. A sua composição química geral, expressa em percentagem de peso seco consiste em glucanos (28,8 %), mananos (31 %), proteínas (13 %), lipídios (8,5 %), quitina (1 %), quitosano (2 %), compostos nitrogenados (2,1 %), fosfato (0,31 %), e íons inorgânicos como Ca^{2+} e Mg^{2+} (cerca de 3 %) (BRADY et al., 1994; PATZAK et al., 1997; VOLESKY, 1987). Esta diversidade reflete-se com a presença de uma grande variedade de potenciais sítios para a complexação de moléculas (ZOUBOULIS et al., 2001).

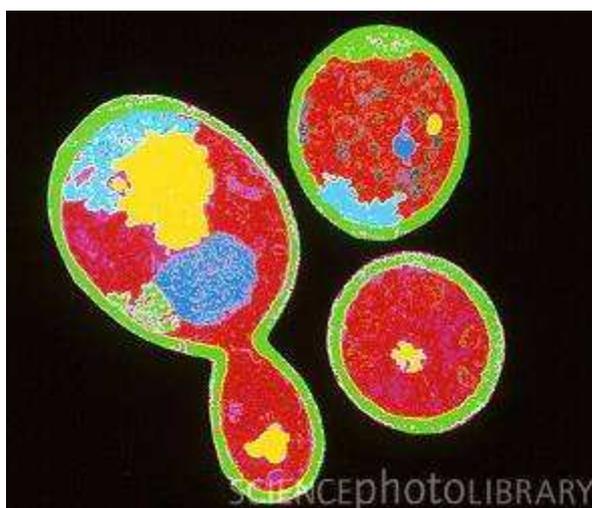


Figura 1: Micrografia colorida de microscopia eletrônica de transmissão da secção de corte de *Saccharomyces cerevisiae*, incluindo uma célula em brotamento. Legenda: Citoplasma em vermelho, vacúolos em amarelo, paredes celulares em verde e núcleo em azul escuro. Ampliação: x 5000 no tamanho de 35 mm.

Fonte: Dr Gopal Murti / Science Photo Library (online)

forma de microfibrilas na camada interna da parede celular na matriz de glucano. O quitosano é produzido por deacetilação da quitina (BRADY et al., 1994).

Saccharomyces cerevisiae é uma das espécies de maior valor econômico, pois algumas cepas são utilizadas em muitos processos industriais para elaboração de produtos fermentados. No Brasil, vem sendo utilizada para a elaboração de diversos produtos; em muitos destes, a sua participação é, apenas, como um agente biológico de transformação, uma vez que ao término do processo produtivo é descartada. Este fato é notório na fabricação de etanol, onde a massa celular deste microrganismo, gerada ao final da produção, é considerada um subproduto e o volume de células é tão significativo que a produção nacional de etanol pode gerar, anualmente, mais de 300 mil toneladas de biomassa de levedura. Conseqüentemente, vislumbra-se uma necessidade de se buscar novas aplicações deste agente biológico após sua utilização em processos primários. Entre as inúmeras possibilidades, seu aproveitamento na alimentação tem ganhado importância pelos resultados que tem demonstrado não somente como fonte proteica, mas também na forma de probiótico, que se fundamenta na utilização de células vivas, e na forma de prebiótico, através do aproveitamento de componentes de sua parede celular.

1.2 Probióticos

Desde a década de 90 foram intensificadas as ações contra o uso de antibióticos como promotores de crescimento. Baseando-se nesses novos conceitos de segurança alimentar, produtos alternativos foram pesquisados e desenvolvidos, o que estimulou o avanço biotecnológico dos aditivos para produtos destinados à alimentação animal.

Nos últimos anos tem-se observado um crescente interesse da comunidade científica sobre a utilização de microrganismos como probióticos. O termo probiótico deriva do grego **pro** “a favor de” e **biotika** “vida”, significando “para a vida ou em favor da vida”, sendo aplicado a todos os microrganismos que trabalham positivamente para favorecer a microbiota benéfica intestinal e melhorar a qualidade de vida dos organismos superiores. A FAO/WHO (2001) define o termo probiótico como “Microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. Os probióticos atuam basicamente inibindo a proliferação de bactérias patogênicas por exclusão competitiva, ou seja, na competição por sítios de adesão às células do epitélio do intestino delgado, competição por nutrientes e/ou produção de compostos antimicrobianos.

Os microrganismos de maior aplicação como probióticos são as bactérias produtoras de ácido láctico, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ainda que espécies como *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* também tenham sido utilizadas.

Dentre as leveduras, a espécie *S. cerevisiae* tem sido a mais utilizada para animais de produção (SIMON; JADAMUS; VAHJEN, 2001). Em relação ao conceito de probiótico, o termo não se trata necessariamente de microrganismos que tenham a capacidade de colonizar o intestino; o fato mais importante é que possuam efeito benéfico no hospedeiro como resultado da ingestão de formas viáveis. Desta forma, a capacidade de *S. cerevisiae* de atuar como probiótico dependerá do uso contínuo e do fornecimento de quantidade suficiente de células vivas (CUARÓN, 2000).

Os benefícios para saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, aumento da concentração dos ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos, estimulação do sistema imune e aumento da absorção de minerais e vitaminas, entre outros (SAAD, 2006). A estimulação imunológica parece estar relacionada com a capacidade de interagir com as placas de Peyer e as células epiteliais do intestino, estimulando a secreção de IgA e a migração de células T no intestino.

Na seleção de microrganismos como potenciais probióticos se espera que possuam certas propriedades para que exerçam efeitos benéficos. Entre estes requerimentos básicos incluem-se:

- 1) que o microrganismo seja considerado seguro (*Generally Recognised As Safe* - GRAS), não patógeno, não cancerígeno e não invasivo (LEE; SALMINEN, 1995; REID, 1999);
- 2) devem ser tolerantes a acidez, sais biliares e outras secreções digestivas particulares de cada espécie animal;
- 3) devem ser capazes de aderir-se às células epiteliais intestinais do hospedeiro (LIN et al., 2007);
- 4) devem ser capazes de reduzir ou excluir microrganismos patógenos;
- 5) devem persistir e multiplicar-se no hospedeiro; após passagem pelo TGI devem manter níveis de células viáveis com uma concentração entre 10^6 a 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹), seja em cultivo puro ou formando parte de uma mescla de espécies e/ou cepas;
- 6) devem ser capazes de coagregar-se (PERELMUTER; FRAGA; ZUNINO, 2008);

7) devem apresentar estabilidade genética.

Além disso, podemos citar: capacidade de produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, etc.); autoagregação, coagregação com patógenos intestinais e produção de compostos bioativos (enzimas, peptídeos, etc.).

Do ponto de vista tecnológico, os probióticos não podem alterar as propriedades organolépticas dos alimentos, e devem permanecer viáveis durante o processamento, armazenamento e distribuição do produto.

Hoje em dia, células de leveduras vivas pertencentes à espécie *S. cerevisiae* são adicionadas em dietas para animais com a finalidade de melhorar a saúde e produtividade (CUARON, 2000; LESSON; SUMMER, 2001; VAN VUUREN, 2003). Graças às suas significativas propriedades nutricionais e farmacêuticas *S. cerevisiae* foi aprovado como um microorganismo seguro para seu emprego na alimentação animal na União Européia (EEC 70/524). *Saccharomyces cerevisiae* forma parte da farmacopéia japonesa (NITTA; KOBAYASHI, 1999) e dos Estados Unidos, onde o FDA (*Food and Drug Administration - USA*) lhe outorgou o grau de microorganismo seguro ou grau GRAS.

1.3 Prebióticos

Existe uma estreita relação entre probióticos e prebióticos. Segundo Gibson e Roberfroid (1995), prebióticos são ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de uma ou mais espécies de microrganismos benéficos intestinais, melhorando a saúde do seu hospedeiro; reduzindo a atividade de organismos potencialmente patogênicos (ROBERFROID, 2002). Esta seletividade foi demonstrada principalmente para cepas do gênero *Bifidobacterium*, que podem ser estimuladas pelos fruto-oligossacarídeos (FOS) e a inulina.

Para que uma substância (ou grupo de substâncias) possa ser definida como prebiótico, deve cumprir os seguintes requisitos: ser de origem vegetal; formar parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas; não ser digerida por enzimas digestivas; ser parcialmente fermentada por uma colônia de bactérias e ser osmoticamente ativa (RODRÍGUEZ, MEGÍAS, BAENA, 2003).

Alguns efeitos atribuídos aos prebióticos são: a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da

microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia intestinal (ROBERFROID, 2002).

Conforme dito anteriormente, a parede celular de *S. cerevisiae* apresenta em sua composição polímeros de D-manose, os MOS, um dos principais prebióticos de uso na alimentação animal. Microorganismos Gram negativos como *Salmonella* e *Escherichia coli* são incapazes de fermentar os FOS e MOS, tendo o seu crescimento diminuído quando em presença destes produtos (ORGANNACT, 2012). Estudos conduzidos por Finucane; Spring e Newman (1999) avaliaram o mecanismo de adesão de *Escherichia coli* no trato intestinal. Das cepas testadas, foi verificado que 66% manifestaram expressão de fímbrias específicas para manose, indicando que estas podem reconhecer este açúcar e se aderir ao mesmo, sendo utilizados como depressores do crescimento de bactérias patogênicas (Figura 3) como *Salmonella*, clostrídios e *Campylobacter* (DAWSON; PIRVULESCU, 1999; FINUCANE; SPRING; NEWMAN, 1999).

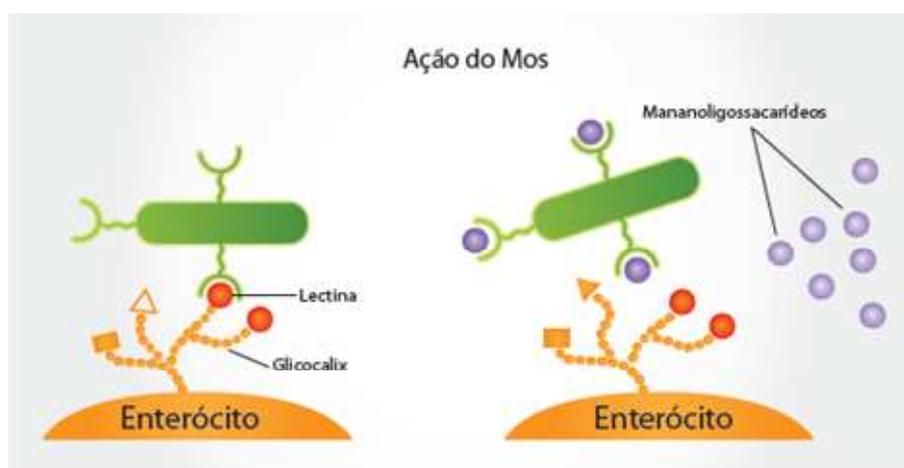


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de ação dos MOS através do reconhecimento de sítios de ligação de bactérias patogênicas. Fonte: Organnact (2012)

A combinação de probiótico e prebiótico é denominada de simbiótico e constitui um novo conceito na utilização de aditivos em dietas. A ação simbiótica estabiliza o meio intestinal e aumenta o número de bactérias benéficas, favorecendo a situação de eubiose (FULLER, 1989). Segundo Menten (2002), o conceito de simbiótico alia o fornecimento de microorganismos probióticos juntamente com substâncias prebióticas específicas que estimulem seu desenvolvimento e atividade, potencializando o efeito de ambos os produtos.

1.4 *Saccharomyces cerevisiae* na Alimentação Animal

Há mais de uma década a levedura *S. cerevisiae* tem sido utilizada como aditivo natural na alimentação de animais de produção. Esta suplementação resulta em melhoria dos parâmetros produtivos e de saúde dos animais (HOOGE, 2004; SHETY; JEPERSEN, 2006).

Como vimos, sua parede celular é rica em duas frações de grande interesse biotecnológico, os β -glucanos e os MOS. Os β -glucanos ligam-se a uma ampla variedade de micotoxinas (SHETY; JEPERSEN, 2006), através de ligações de hidrogênio e de Van der Waals, principalmente. Em ensaios *in vitro*, foi demonstrada a capacidade de *S. cerevisiae* em adsorver AFs, OTA e ZEA (ARMANDO et al., 2011; BEJAOUI et al., 2004; DOGI et al., 2011; RAJU; DEVEGOWDA, 2000; SHETTY; HALD; JESPERSEN, 2007; YIANNIKOURIS et al., 2004a). Baptista et al. (2001), igualmente relataram a utilização de *S. cerevisiae* na forma de probiótico como promissor agente para a redução dos danos promovidos por AFs.

Já os MOS possuem sítios receptores de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* ou *Vibrio cholerae*. Agem estimulando as células B precursoras de IgA e células T colaboradoras das placas de Peyer para o desenvolvimento da imunidade geral e inespecífica. Através do estímulo imunológico da mucosa ocorre a produção de anticorpos tipo IgA que reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal. O estímulo imune produz ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon α , entre outros, determinando um aumento da imunidade das mucosas (ROBERFROID, 2002). Também tem demonstrado atividade antioxidante e antimutagênica (KRIZKOVA et al., 2001). E assim, ambas as moléculas podem mostrar efeitos benéficos sobre a saúde de animais e humanos.

A composição química da parede celular de *S. cerevisiae* pode apresentar variações, desta forma dizemos que suas propriedades benéficas são cepa-dependentes e não podem ser extrapoladas ao gênero nem à espécie, tornando necessária a avaliação de cada nova cepa (ou produto derivado). Yiannikouris et al. (2004b) comprovaram *in vitro* este fato, demonstrando que a adsorção de ZEA foi correlacionada com a quantidade de β -D-glucanos contidos na parede celular da levedura ($R^2 = 0,889$). Quatro cepas foram testadas, onde as que apresentaram níveis mais elevados de β -D-glucanos, foram capazes de adsorver maiores quantidades de ZEA, com maiores constantes de associação e taxas de afinidade. Enquanto que cepas com conteúdos mais elevados de quitina apresentaram menor flexibilidade de suas

paredes celulares, o que restringiu o acesso da ZEA aos sítios de ligação com os β -D-glucanos envolvidos na formação do complexo micotoxina-adsorvente.

1.5 Hipótese

“Cepas de Saccharomyces cerevisiae possuem propriedades probióticas e são capazes de descontaminar aflatoxina B₁ sendo uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos aditivos para uso na produção animal.”

1.6 Objetivos Específicos

- a) Isolar leveduras a partir de alimentos, intestino ou matéria fecal de animais.
- b) Identificar as leveduras isoladas através de métodos morfológicos e nutricionais.
- c) Estudar as propriedades probióticas das cepas de *S. cerevisiae* isoladas através de:
 1. Ensaio de resistência a antibióticos.
 2. Ensaio de tolerância às condições gastrointestinais.
 3. Capacidade de autoagregação.
 4. Capacidade de coagregação com microorganismos patógenos.
 5. Capacidade de produção de substâncias antimicrobianas frente à patógenos.
- d) Avaliar, através de ensaios *in vitro*, o potencial das cepas de *S. cerevisiae* isoladas para adsorver AFB₁.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram analisadas 70 amostras de diferentes origens, entre elas encontram-se alimentos destinados ao consumo humano e animal, além de cera de abelhas, fezes e intestinos de bovinos, suínos, eqüinos e ovinos. O período total de coletas foi compreendido entre Março de 2009 a Março de 2010.

2.2 Isolamento de Leveduras a partir das Amostras de Diferentes Origens

2.2.1 A partir de alimentos e fezes

O isolamento foi realizado segundo metodologia de diluição decimal seriada com semeadura por espalhamento em superfície, onde 10 gramas da amostra foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% estéril (diluição 10^{-1}). Diluições decimais seriadas foram realizadas colocando 1 mL em 9 mL do mesmo diluente (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) (GUSILS; BUJAZHA; GONZÁLEZ, 2002; PITT; HOCKING, 2009). Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas nos meios de cultivo dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) para o isolamento da micoflora total e em agar extrato de levedura peptona dextrose (YPD) para o isolamento seletivo de leveduras. Todas as placas foram incubadas a 25°C por até sete dias em estufas microbiológicas com controle eletrônico de temperatura. Com o objetivo de armazenar isolados puros, cada uma das colônias de leveduras isoladas foram repicadas em placas de YPD pelo método de esgotamento em placas por estrias. Assim, os isolados obtidos a partir de uma única UFC foram subcultivados em tubos inclinados de agar extrato de malte (MEA) para sua posterior identificação em espécies (KURTZMAN; FELL, 1998; PITT; HOCKING, 2009).

2.2.2 A partir de intestinos de animais

Foram seccionados fragmentos de 10 cm do duodeno, jejuno e íleo (intestino delgado) de diferentes animais de produção. Um corte longitudinal foi realizado em cada fragmento, expondo a mucosa da luz intestinal, e posterior inoculação em 150 mL de caldo YPD para

enriquecimento da amostra por 48h em estufa a 37°C. Posteriormente, o isolamento seguiu a metodologia descrita no item anterior a partir de 10 mL deste cultivo enriquecido.

2.3 Identificação de Leveduras

2.3.1 Identificação morfológica

Subcultivos de 3-7 dias em tubos de MEA foram realizados para cada isolado puro antes da marcha para identificação morfológica. A partir daí, recolhiam-se células de cada cultivo até preenchimento do *loop* ($\cong 10\mu\text{L}$) da alça de platina; realizava-se a dispersão destas células em tubos contendo 5 mL de água peptonada 0,1% estéril; recolhia-se uma alçada desta suspensão para inoculação pelo método de esgotamento em placas por estrias. Os diferentes meios de cultivo utilizados para a identificação das leveduras estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Meios de cultivo utilizados para a identificação de leveduras e suas respectivas funções.

IDENTIFICAÇÃO	FUNÇÃO
Agar extrato de malte (MEA) a 25°C	Estudar a morfologia da colônia
Agar extrato de malte (MEA) a 37°C	Determinar o possível crescimento em temperatura corporal e/ou elevadas
Agar Czapek (Cz) a 25°C	Determinar a capacidade de utilização do nitrato como única fonte de nitrogênio
Agar malte acético (MAA) a 25°C	Estabelecer a resistência a conservantes
Agar extrato de malte, extrato de levedura, glicose 50% (MY-50G)	Determinar o crescimento em reduzida atividade de água, na presença de alta concentração de carboidratos
Agar extrato de levedura, NaCl 10%, e glicose 12% (MY10-12)	Determinar o crescimento em baixa atividade de água, na presença de alta concentração de cloreto de sódio

Fonte: Pitt e Hocking (2009)

Todas as placas contendo os meios de cultivo foram mantidas em estufa controlada, de acordo com a temperatura descrita, por até sete dias. Analisaram-se os resultados ao terceiro e sétimo dias. Observou-se a presença ou ausência de crescimento nos diferentes meios e as características morfológicas coloniais, como: cor, tamanho, aspecto. Para cada colônia efetuou-se um preparado de lâminas a partir da placa de MEA a 25°C observando-se as características microscópicas como: tamanho e forma da célula, modo de reprodução, disposição das células, seja aos pares, seja em cadeias; além da presença de pseudomicélio e produção de ascósporos.

2.3.2 Identificação nutricional

A partir dos resultados obtidos com a identificação morfológica, todas as cepas suspeitas de serem *S. cerevisiae* foram submetidas aos testes de perfil nutricional para confirmação da identidade.

Para isso foi utilizado o RapID™ Yeast Plus System³. O RapID™ Yeast Plus é um sistema que utiliza um micrométodo qualitativo com 18 substratos convencionais e cromogênicos (Tabela 2). Como recomendado pelo fabricante, antes de serem utilizados no sistema, cada microrganismo era subcultivado e examinado para assegurar sua viabilidade e pureza. Para realização dos testes, as cepas de *S. cerevisiae* foram cultivadas em placas de agar Sabouraud dextrose (SDA) a 30°C por 48 h. A partir daí, células da levedura foram suspensas em 2 mL do Fluido de Inoculação RapID™ até atingir uma turbidez visual que completamente ocultava as linhas negras do Cartão de Inoculação RapID™ fornecido com o kit. Cada suspensão era então inoculada no Painel RapID™ Yeast Plus, que eram incubados em estufa por 4 h a 30°C. Imediatamente após este período fazia-se a leitura do painel com o auxílio dos RapID™ Yeast Plus Reagentes A e B, e a coloração das reações era observada e avaliada seguindo as instruções do fabricante. Em seguida os resultados foram carregados no Software ERIC® (Electronic RapID™ Compendium) que fazia a interpretação das informações e informava os resultados como uma probabilidade daquela identificação.

³ Innovative Diagnostic Systems, Georgia, USA

Tabela 2: Princípio e Componentes do produto RapID™ YEAST PLUS System.

Cavidade	Código	Reagentes	Quantidade	Princípio	
1	GLU	Glicose	1,0%	A utilização do açúcar como substrato libera produtos ácidos que abaixam o pH e mudam a cor do indicador	
2	MAL	Maltose	1,0%		
3	SUC	Sacarose	1,0%		
4	TRE	Trealose	1,0%		
5	RAF	Rafinose	1,0%		
6	LIP	Éster de ácido graxo	1,0%	Hidrólise de ácido graxo libera produtos ácidos que reduzem o pH e mudam a cor do indicador	
7	NAGA	p-nitrofenil-N-acetil- β ,D-galactosaminida	0,05%	Hidrólise enzimática do glucosídeo ou fosfoéster libera orto ou p-nitrofenil amarelo que é detectado com o reagente A	
8	α GLU	p-nitrofenil- α ,D-glucosídeo	0,05%		
9	β GLU	p-nitrofenil- β ,D-glucosídeo	0,05%		
10	ONPG	o-nitrofenil- β ,D-glucosídeo	0,05%		
11	α GAL	p-nitrofenil- α ,D-galactosídeo	0,05%		
12	β FUC	p-nitrofenil- β ,D-fucosídeo	0,05%		
13	PHS	p-nitrofenil-fosfato	0,05%		
14	PCHO	p-nitrofenil-fosforilcolina	0,05%		
15	URE	Uréia	0,3%		Hidrólise da uréia libera produtos alcalinos que aumentam o pH e mudam a cor do indicador
16	PRO	Prolina- β -naftilamida	0,01%		Hidrólise enzimática do substrato arilamida libera β -naftilamina que é detectado com a o reagente B
17	HIST	Histidina- β -naftilamida	0,01%		
18	LGY	Leucil-glicina- β -naftilamida	0,01%		

Fonte: Instruções de Uso do Sistema RapID™ Yeast Plus

2.4 Estudo das Propriedades Probióticas das Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas

Todas as cepas identificadas pelos testes morfológicos e nutricionais como sendo *S. cerevisiae* foram submetidas aos estudos das propriedades probióticas.

2.4.1 Resistência a antibióticos de uso frequente em animais de produção

Para o estudo da resistência aos antibióticos foi utilizado o teste da disco-difusão em agar descrito por Bauer e Kirby, em 1966, e que até os dias de hoje é a metodologia mais empregada pelos laboratórios de microbiologia.

A metodologia baseou-se na descrição de Mourad e Nour-Eddine (2006) com modificações. Discos especiais de papel-filtro impregnados com concentração padronizada dos antimicrobianos foram colocados sobre uma placa de agar YPD, previamente semeada com uma suspensão de 10^7 células mL^{-1} de cada cepa de *S. cerevisiae* em teste. Para se determinar o número de células mL^{-1} da suspensão preparada foi feita uma estimativa através do uso da câmara de Neubauer. Após incubação de 24 h a 37°C , o halo de inibição foi medido em milímetros.

Os antibióticos utilizados neste ensaio foram selecionados por seu uso frequente em medicina veterinária para animais de produção, a saber: ampicilina $10\mu\text{g}$, estreptomicina $10\mu\text{g}$, gentamicina $10\mu\text{g}$, neomicina $30\mu\text{g}$, norfloxacin $10\mu\text{g}$, penicilina G 10UI, sulfonamida $300\mu\text{g}$ e trimetoprim $5\mu\text{g}$ (Laborclin[®]). Os ensaios foram realizados, por triplicata, com quatro antibióticos por placa, equidistantes entre si e em relação à borda da placa.

2.4.2 Ensaio de tolerâncias às condições gastrointestinais

Os ensaios foram realizados em duplicatas e basearam-se na técnica descrita por Olejnik et al. (2005) com modificações.

a) Tolerância ao pH ácido

A partir de placas de agar YPD previamente semeadas com cada um dos isolados de *S. cerevisiae* foram realizadas suspensões para cada cepa em teste de 10^8 células mL^{-1} , sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Um mililitro da suspensão foi

adicionado a nove mililitros de caldo YPD ajustado para pH 2 através da adição de solução de ácido clorídrico 1M, atingindo assim uma concentração final de 10^7 células mL^{-1} . Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação constante de 150 rpm. Nos tempos 4, 8, 12 e 24h foram recolhidas alíquotas de 1 mL para contagem de células totais (por câmara de Neubauer) e contagem de células viáveis (através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD), além disso eram feitas montagens a fresco para observação de alterações nas características microscópicas das células. Controles negativos foram realizados submetendo-se cada cepa ao mesmo procedimento descrito, porém com inoculação em caldo YPD sem ajuste de pH.

Interpretação dos resultados: variações na concentração celular total e no número de células viáveis após o estresse, em relação aos controles negativos e aos tempos.

b) Tolerância a bile 0,5%

A partir de placas de agar YPD previamente semeadas com cada um dos isolados de *S. cerevisiae* foram realizadas suspensões para cada cepa em teste de 10^8 células mL^{-1} , sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Um mililitro da suspensão foi adicionado a nove mililitros de caldo YPD suplementado com bile de boi a 0,5% ajustado para pH 6 (através da adição de solução de hidróxido de sódio 1M), atingindo assim uma concentração final de 10^7 células mL^{-1} . Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação constante de 150 rpm. Nos tempos 4, 8, 12 e 24 h foram recolhidas alíquotas de 1mL para contagem de células totais (por câmara de Neubauer) e contagem de células viáveis (através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD), além disso eram feitas montagens a fresco para observação de alterações nas características microscópicas das células. Controles negativos foram realizados submetendo-se cada cepa ao mesmo procedimento descrito, porém com inoculação em caldo YPD sem ajuste de pH e sem o acréscimo da bile de boi.

Interpretação dos resultados: variações na concentração celular total e no número de células viáveis após o estresse, em relação aos controles negativos e aos tempos.

c) Tolerância aos simuladores gastrointestinais

A partir de placas de agar YPD previamente semeadas com cada um dos isolados de *S. cerevisiae* foram realizadas suspensões para cada cepa em teste de 10^7 células mL^{-1} , sendo a

padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, foram realizadas etapas em sequência conforme descrito:

Tempo 0 (T0): transferiu-se 1 mL de cada suspensão para microtubo estéril; depois foi recolhida alíquota de 100 µL para contagem de células viáveis (através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD); o microtubo foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado.

Tempo 1 (T1): o sedimento no microtubo foi ressuspensionado em 1 mL de secreção salivar artificial e a suspensão foi incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm por 10 min, simulando a passagem pela boca; ao final deste tempo, foi recolhida alíquota de 100 µL para contagem de células viáveis (através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD); o microtubo foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado.

Tempo 2 (T2): o sedimento no fundo do microtubo foi ressuspensionado em 1 mL de suco gástrico artificial e a suspensão foi incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm por 1 h, simulando a passagem pelo estômago; ao final deste tempo, foi recolhida alíquota de 100 µL para contagem de células viáveis (através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD); o microtubo foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado.

Tempo 3 (T3): o sedimento no fundo do microtubo foi ressuspensionado em 1 mL de fluido intestinal artificial e a suspensão foi incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm por 1 h, simulando a passagem pelo intestino; ao final deste tempo, foi recolhida alíquota de 100 µL para contagem de células viáveis (através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD); o microtubo foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado.

Controles negativos foram realizados submetendo-se cada cepa ao mesmo procedimento descrito, porém a ressuspensão em todos os casos foi feita em tampão fosfato salino pH 6,5, considerado uma solução isotônica e não tóxica em relação às células de humanos e animais. A composição química dos simuladores de secreção salivar, suco gástrico e fluido intestinal foram:

Secreção Salivar Artificial: lisozima 2 mg mL⁻¹ (grau I, de ovo de galinha, ≥ 40000 U mg⁻¹) em tampão fosfato salino pH 6,5.

Suco Gástrico Artificial: NaCl 125 mM; KCl 7 mM; NaHCO₃ 45 mM, pepsina 3 g L⁻¹ (de mucosa gástrica de suínos, 800-2500 U mg⁻¹), pH 3.

Fluido Intestinal Artificial: bile 0,5 % (w/v); tripsina tipo IX-S 1 mg mL⁻¹ (13000-20000 BAEU U mg⁻¹), α -quimiotripsina tipo II 1 mg mL⁻¹ (de pâncreas, \geq 40 U mg⁻¹), pH 6.

Interpretação dos resultados: variações no número de células viáveis após o estresse, em relação aos controles negativos.

2.4.3 Capacidade de autoagregação

Os ensaios para determinação da capacidade de autoagregação das leveduras seguiram metodologia descrita por Kos et al. (2003) com modificações. A partir de placas de agar YPD previamente semeadas com cada um dos isolados, células de *S. cerevisiae* foram sendo transferidas para tubos com água peptonada 0,1%, com homogeneização através de vórtex, até a suspensão inicial obter um valor constante de absorvância, medida em espectrofotômetro UV-Vis a 600nm (FEMTO[®] modelo 600S). Leituras foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 min de incubação a temperatura ambiente.

Interpretação dos resultados: As cepas que se autoagreguem formarão aglomerados celulares para dar lugar a um sobrenadante claro. Ao contrário, aquelas que não se autoagreguem manterão a turbidez constante durante pelo menos uma hora (GÓMEZ ZAVAGLIA et al., 2002). O percentual de autoagregação foi determinado através da seguinte fórmula: $1 - (A_t/A_0) \times 100$, onde A_t representa a absorvância medida em cada um dos tempos e A_0 representa a absorvância inicial medida no tempo 0 de incubação. A Tabela 3 descreve os critérios estabelecidos para a interpretação dos possíveis resultados.

Tabela 3: Interpretação dos resultados nos ensaios para determinação da capacidade de autoagregação de leveduras.

Resultado	Observação
(-)	% Agregação \leq 60
(+)	% Agregação $< 80 > 60$
(++)	% Agregação \geq 80

2.4.4 Capacidade de coagregação com microrganismos patógenos

Os ensaios para determinação da capacidade de coagregação entre cepas de *S. cerevisiae* e cepas patógenas foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Boris et al. (1998) com modificações. Foram utilizadas sete diferentes cepas de bactérias associadas com infecções intestinais, a citar: *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

A partir de placas de agar YPD previamente semeadas com cada um dos isolados de *S. cerevisiae* foram realizadas suspensões para cada cepa em teste de 10^7 células mL^{-1} , sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Igualmente, a partir de placas de agar Casoy previamente semeadas com cada uma das cepas patógenas foram realizadas suspensões de 10^7 células mL^{-1} . Em tubos tipo Falcon estéreis foram homogeneizados (mistura) 3 mL da suspensão da levedura com 3 mL da suspensão de cada cepa patógena (1:1), seguindo-se incubação a 37°C sob agitação de 150 rpm durante 4 h. Transcorrido este tempo, foram recolhidas alíquotas a partir de cada tubo de reação para o preparo de esfregaços que foram submetidos à coloração de Gram e observação ao microscópio óptico em objetiva de imersão.

Nestes ensaios foram incluídos controles das cepas de leveduras e das cepas patógenas, ou seja, incubação de cada um por separado, sem a mistura; sendo verificada a viabilidade das suspensões e manutenção de suas características.

Interpretação dos resultados: foi considerada a existência de coagregados quando as células da levedura estiveram rodeadas por cepas de patógenos (contato muito próximo) e ausência de coagregação quando tanto leveduras quanto patógenos foram observadas livres. A Tabela 4 descreve os critérios estabelecidos para a interpretação dos possíveis resultados.

Tabela 4: Interpretação dos resultados nos ensaios para determinação da capacidade de coagregação de leveduras com patógenos.

Resultado	Observação
0 (-)	Ausência de coagregação em 5 campos observados ao azar
1 (+)	Presença de coagregação em 1 campo de 5 observados ao azar
2 (++)	Presença de coagregação em 2 ou 3 campos de 5 observados ao azar
3 (+++)	Presença de coagregação em 4 ou 5 campos de 5 observados ao azar

2.4.5 Capacidade de produção de substâncias antimicrobianas frente à patógenos

Os ensaios para determinar a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas através da inibição do crescimento de patógenos seguiram a metodologia proposta por Teo e Tan (2005) com modificações, baseada no método de estrias cruzadas. Todos os tratamentos foram realizados por duplicata.

As cepas de *S. cerevisiae*, previamente incubadas em caldo YPD a 37°C por 24 h (cultivos de 10^7 células mL⁻¹), foram inoculadas com estria central em placas de agar YPD a 37°C durante 48 h. Posteriormente, cada cultivo foi inativado através de exposição à vapores de clorofórmio por 20 min. Dez mililitros de agar Casoy foram adicionados a cada placa cobrindo o crescimento da levedura. Em seguida, logo após a solidificação do meio, as cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* previamente incubadas em caldo Casoy a 37°C durante 48 h (cultivos de 10^7 células mL⁻¹) foram semeadas com estrias perpendiculares.

Interpretação dos resultados: Depois de 24 h de incubação a 37°C, foi avaliada a atividade antimicrobiana pelo surgimento de zonas claras ao redor do cruzamento das linhas de estrias, que indica o efeito inibitório de um microorganismo sobre outro.

2.5 Avaliação *in vitro* do Potencial das Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas para Adsorver Aflatoxina B₁

A partir de placas de agar YPD previamente semeadas com cada um dos isolados de *S. cerevisiae* foram realizadas suspensões para cada cepa em teste de 10^8 células mL⁻¹, sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi confirmada através de diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de agar YPD.

Em seguida, transferiu-se 1 mL de cada suspensão para microtubo estéril que foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento no microtubo foi lavado duas vezes com água peptonada 0,1% e finalmente ressuspendido em simuladores artificiais gástrico - pH 3 e intestinal - pH 6 (ver capítulo I, item 2.3.1). A partir daí, as soluções foram incubadas durante 1 h a 37°C na presença de 1 µg mL⁻¹ de AFB₁ (ver capítulo I, item 2.1). Após este tempo, os extratos foram precipitados por centrifugação e o sobrenadante, contendo a micotoxina não ligada, foi coletado e quantificado por CLAE (ver

capítulo I, item 2.4). Os ensaios foram testados por triplicata. Em cada ensaio foram incluídos controles de adsorbato (micotoxina) e de adsorvente (levedura em teste).

2.6 Análises Estatísticas

Foi realizado estudo estatístico adequado para cada ensaio em particular (QUINN; KEOUGH, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e Identificação Morfológica das Leveduras Isoladas

Segundo a origem, as 70 amostras avaliadas foram classificadas em quatro categorias para expressão dos resultados:

- Alimentos para humanos (n = 15), onde foram incluídas amostras de mel, farelo de pão, levedo de cerveja, pão de forma e queijo minas.
- Alimentos para animais (n = 47), onde foram incluídas amostras de silagem de cana e trigo, silagem de capim, silagem de cevada, silagem de milho, silagem de capim + polpa cítrica, silagem de sorgo, bagaço de malte, resíduo de cervejaria, ração para bovinos, ração para pássaros, ração para peixes, cana de açúcar picada e capim picado.
- Intestinos de animais (n = 5): provenientes de bovinos, equino, ovino e suíno.
- Fezes de animais (n = 3): provenientes de bovinos.

Todas as 70 amostras apresentaram algum tipo de contaminação fúngica, seja por fungos filamentosos, seja por leveduras. A Tabela 5 refere-se ao número de leveduras isoladas segundo as diferentes origens.

Tabela 5: Número de amostras e leveduras isoladas segundo as diferentes origens.

Origem das amostras	Amostras (n)	Leveduras isoladas (n)
Alimentos para humanos	15	16
Alimentos para animais	47	59
Intestinos de animais	5	6
Fezes de animais	3	3
TOTAL	70	84

Observamos que o maior número de amostras analisadas, assim como o de leveduras isoladas, foi proveniente de alimentos para animais, especialmente dos diferentes tipos de silagens utilizadas na alimentação animal (sorgo, milho, cana de açúcar e capim). De acordo com a chave taxonômica de referência foi realizada a identificação morfológica de todas as

colônias de leveduras. A Figura 4 apresenta a identificação e frequência das leveduras isoladas a partir das amostras de diferentes origens.

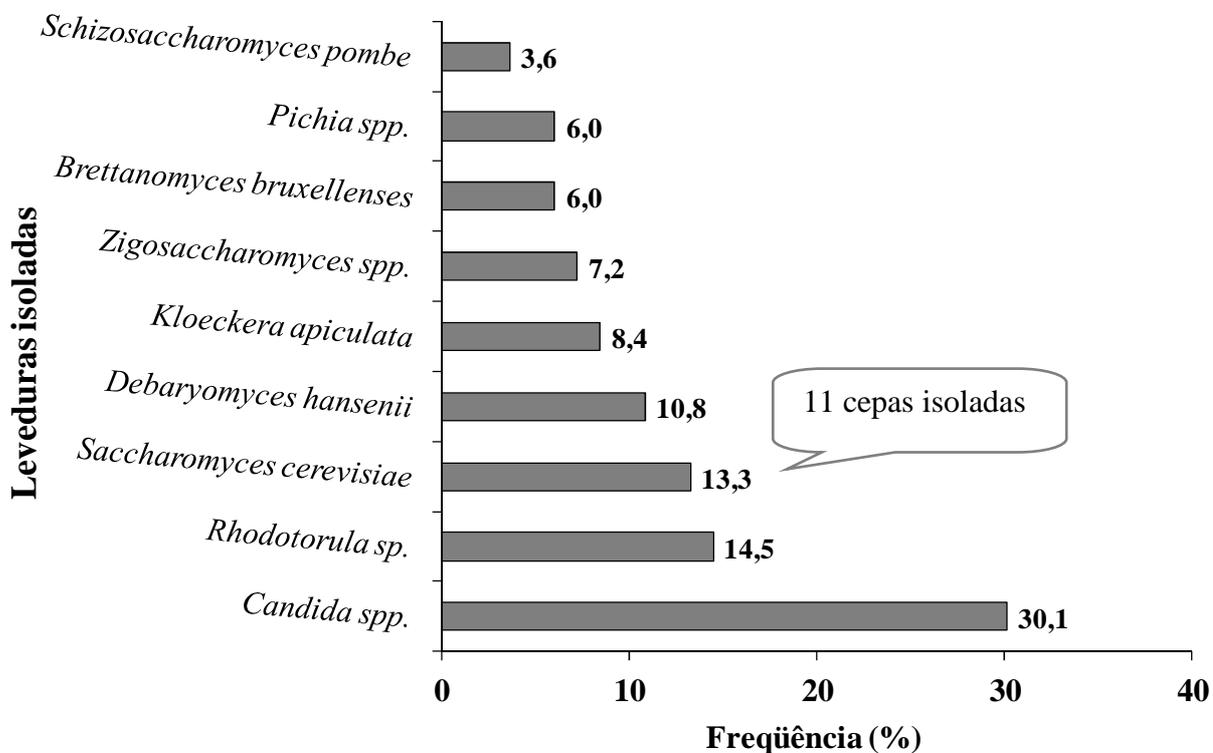


Figura 4: Frequência das espécies de leveduras isoladas a partir de amostras das diferentes origens.

Espécies de *Candida sp.* foram as mais isoladas, seguidas por espécies de *Rhodotorula sp.* e por *S. cerevisiae* (13,3 %). Desta última, foram isoladas ao todo 11 cepas, que estiveram presentes em amostras de bagaço de malte, farelo de pão, levedo de cerveja, pão de forma e, principalmente, nas silagens de milho e de sorgo. A Figura 5 demonstra os aspectos macroscópicos da marcha de identificação para *S. cerevisiae*, com crescimento vigoroso em MEA a 25 e 37°C, crescimento variável (fraco a moderado) em MAA e Cz e sem crescimento em MY50G e MY10-12. A Figura 6 apresenta a morfologia microscópica característica da espécie, com células esféricas a subesferoidais, ocasionalmente elipsoidais a cilíndricas, reproduzindo por brotamentos irregulares (PITT; HOCKING, 2009).

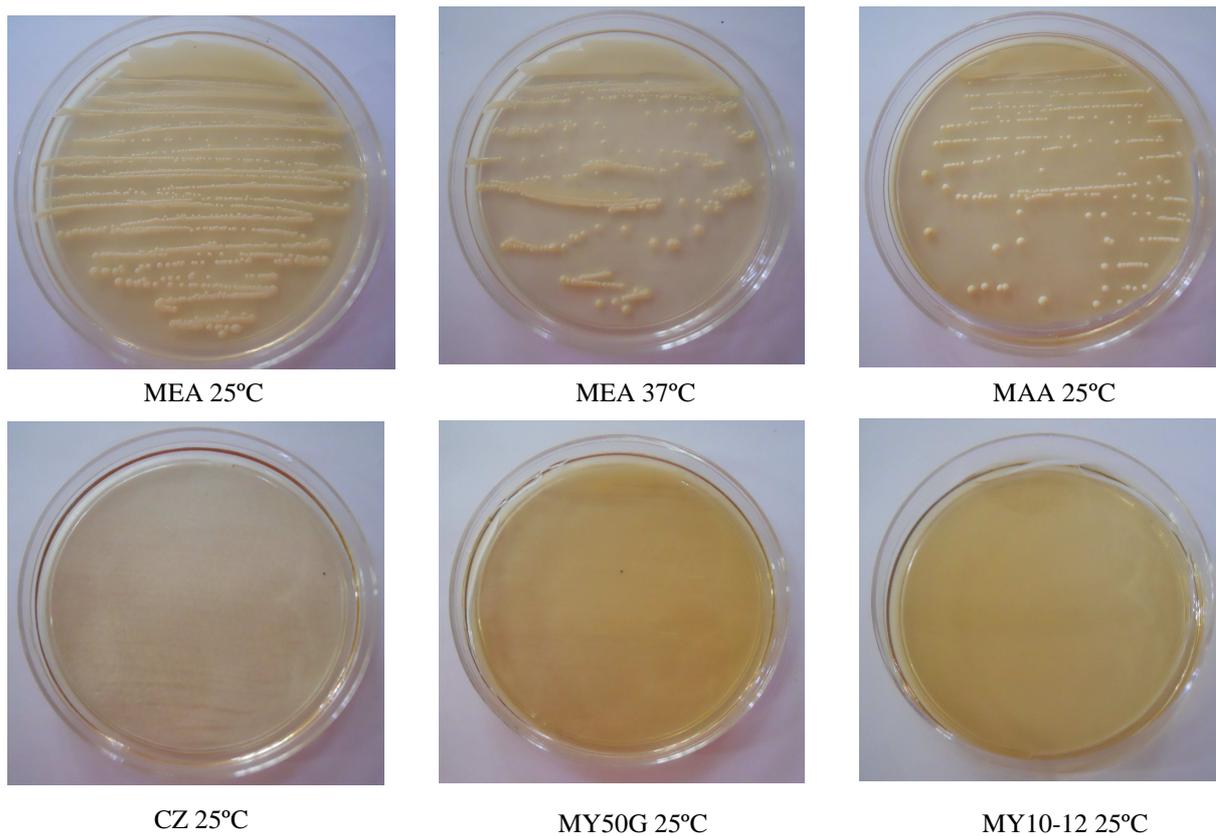


Figura 5: Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* nos diferentes meios de cultivo recomendados por Pitt e Hocking (2009).



Figura 6: Características microscópicas de *Saccharomyces cerevisiae*. Típicas células vegetativas e reprodução por brotamento. Aumento de 400x.

Vale a pena destacar, que a chave taxonômica de Pitt e Hocking (2009) tem por objetivo ser um sistema simples e rápido, que permita a identificação das principais espécies de leveduras relacionadas à deterioração de alimentos, especialmente útil para laboratórios de

microbiologia de alimentos. O sistema não foi projetado para lidar com espécies que possam aparecer como contaminantes ocasionais, e desta forma, alguns isolados podem ser erroneamente classificados.

3.3 Identificação Nutricional das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas

Por esta razão, todas as cepas isoladas, suspeitas de serem *S. cerevisiae*, foram submetidas à um segundo método de identificação, através de uma série de reações bioquímicas (testes de perfil enzimático-nutricional), elevando consideravelmente a confiabilidade do resultado informado. O sistema comercial utilizado é relatado na literatura como sendo de alta precisão (ESPINEL-INGROFF et al., 1998).

Dentre as 11 cepas suspeitas de serem *S. cerevisiae*, apenas duas tiveram sua identidade confirmada pelos testes nutricionais, as outras nove cepas foram caracterizadas ou como espécies de *Candida*, ou como espécies de *Cryptococcus* (Tabela 6), que não eram contempladas pela chave taxonômica da identificação morfológica, reforçando a idéia de que são necessários métodos complementares para um correto diagnóstico.

Tabela 6: Comparação dos resultados obtidos pela identificação morfológica e nutricional.

Origem	Identificação Morfológica	Cepa	Identificação Nutricional	Probabilidade
Alimentos para humanos	<i>S. cerevisiae</i>	LL57	<i>Cryptococcus albidus</i>	84,52%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL74	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,99%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL83	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,99%
Alimentos para animais	<i>S. cerevisiae</i>	LL01	<i>Candida zeylanoides</i>	99,99%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL02	<i>Candida zeylanoides</i>	99,99%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL09	<i>Candida lusitaniae</i>	99,92%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL12	<i>Cryptococcus albidus</i>	99,99%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL19	<i>Candida lusitaniae</i>	86,37%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL47	<i>Cryptococcus albidus</i>	99,99%
	<i>S. cerevisiae</i>	LL61	<i>Candida famata</i>	84,01%
<i>S. cerevisiae</i>	LL77	<i>Candida kefir</i>	99,99%	

Desta forma, apenas as cepas LL74 e LL83 prosseguiram para os ensaios de propriedades probióticas e potencial descontaminante de AFB₁.

3.3 Estudo das Propriedades Probióticas das Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas

3.3.1 Resistência a antibióticos

A primeira propriedade a ser estudada nas cepas isoladas foi a resistência frente à antibióticos de uso freqüente em animais de produção, considerada uma das principais características a ser avaliada no momento da seleção de potenciais probióticos (KLAENHAMMER; KULLEN, 1999).

Em nosso estudo, ambas as cepas de *S. cerevisiae* estudadas (LL74 e LL83) foram resistentes a todos os antibióticos testados pela técnica de disco difusão em agar (ampicilina 10µg, estreptomicina 10µg, gentamicina 10µg, neomicina 30µg, norfloxacin 10µg, penicilina G 10UI, sulfonamida 300µg e trimetoprim 5µg). A Figura 7 ilustra os resultados obtidos, similares para ambas as cepas.

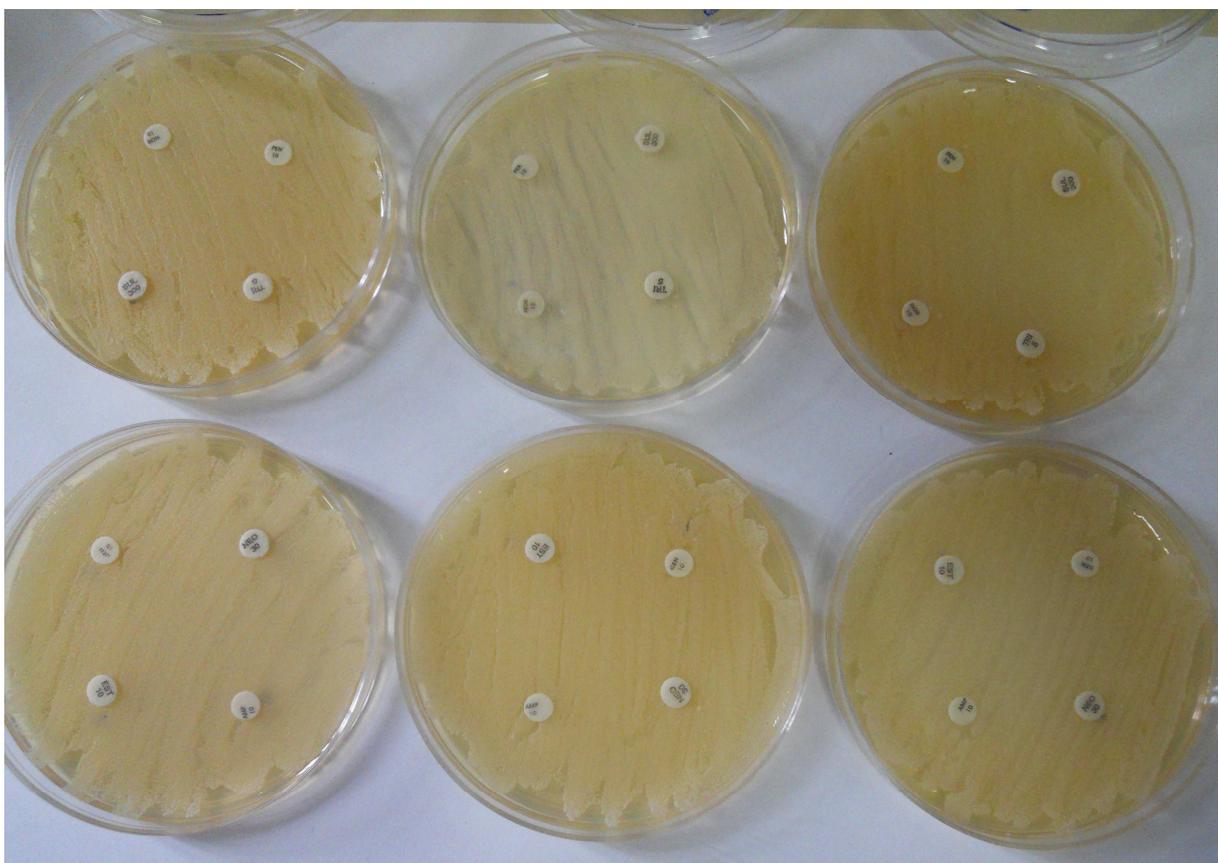


Figura 7: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes aos oito antibióticos testados (resultados em triplicata).

Os animais de produção podem ser acometidos por diversas doenças bacterianas durante as fases de criação, e precisarão fazer uso de antibióticos para combatê-las. Só que estas drogas podem atuar tanto sobre os organismos patogênicos como também sobre as cepas probióticas residentes. Então, a resistência aos antibióticos de uso mais freqüente é uma característica desejável, sendo a resistência natural das leveduras um importante argumento para a sua utilização como probiótico (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007).

Além disso, argumenta-se que a resistência bacteriana pode ocorrer de forma vertical (inerente ou natural da espécie ou gênero), e/ou horizontal, através da transferência de genes entre bactérias. O TGI dos mamíferos oferece condições favoráveis para a transferência de material genético entre muitas espécies de bactérias. Recentemente, muitos investigadores têm especulado que bactérias comensais, incluindo bactérias lácticas, podem atuar como reservatórios de genes de resistência. Genes que conferem resistência à tetraciclina, eritromicina e vancomicina foram detectados e caracterizados em *Lactobacillus lactis*, *Enterococcus* e, recentemente, em espécies de *Lactobacillus* isoladas de produtos cárneos e lácteos fermentados, e em cepas que estavam sendo utilizadas como probióticos (MATHUR; SINGH, 2005; TEMMERMAN et al., 2003). A principal ameaça associada com estas bactérias é que elas podem transferir genes de resistência às bactérias patogênicas. Como não há transferência de material genético entre bactérias e leveduras, o uso destas como probióticos torna-se seguro e vantajoso.

3.3.2 Ensaios de tolerância às condições gastrointestinais

a) Tolerância ao pH ácido

Um probiótico deve ter a capacidade de sobreviver e proliferar no local de destino, resistindo à presença das enzimas digestivas, do suco gástrico, pancreático e biliar (KLAENHAMMER; KULLEN, 1999). A sobrevivência das cepas probióticas ingeridas nas diferentes porções do TGI difere de um organismo para o outro. Algumas são rapidamente inibidas no estômago, enquanto outras podem atingir o intestino com elevadas concentrações. Muitos modelos *in vitro* consistem em provas simples, que testam a sensibilidade do microrganismo à presença de ácido, bile e secreções do trato digestivo (MARTEAU et al., 1997).

Em nosso estudo, primeiramente foram realizados o ensaio de resistência à condições ácidas (pH 2) e à presença de sais biliares (0,5 %) em pH 6. Logo em seguida, as cepas foram submetidas aos ensaios que simularam a passagem pelo TGI, mediante condições de secreções salivar, gástrica e intestinal.

Para a cepa LL74, os resultados indicam que tanto em meio ácido como no meio controle, o tempo de exposição resultou em variações significativas no número de células totais (Tabela 7), entretanto, ao final das 24 h de incubação a cepa conseguiu manter níveis de 10^7 células mL⁻¹ (log = 7). Em relação ao efeito do pH, ao final de 24 h, não observamos qualquer efeito significativo no número de células totais (Tabela 7).

O mesmo não ocorreu para as contagens de células viáveis, que também apresentou variações significativas no número de UFC (Tabela 8), porém sua viabilidade foi afetada ao final de 24 h. Os resultados indicam que a cepa apresentou-se em fase de crescimento exponencial atingindo um pico de concentração com 12 h. Entre 12 e 24 h ocorreu declínio deste crescimento. Pelos resultados, podemos afirmar que tanto o tempo como o pH influenciaram significativamente no número de células viáveis da cepa LL74 (Tabela 8).

Além disso, podemos perceber que existiu correlação entre os métodos de contagens empregados, o de células totais através de câmara de Neubauer, e o de células viáveis através de diluições seriadas e crescimento em placas. Não houve diferença estatística significativa dos resultados dos dois métodos. Este é um dado importante, pois de acordo com Charteris et al. (1998), para serem considerados de importância fisiológica, os probióticos devem alcançar populações viáveis acima de 10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹ (log = 6 a 8).

Tabela 7: Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL74.

Cepa	Contagens de Células Totais (células mL ⁻¹)			
	Tempo de exposição (em horas)			
LL74	4	8	12	24
Meio ácido YPD pH 2	7,81 ^{aA}	7,23 ^{cB}	7,45 ^{bA}	7,26 ^{cA}
Controle (-) YPD ≅ pH 6,2	7,14 ^{dB}	7,65 ^{aA}	7,21 ^{cdB}	7,33 ^{bcA}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Tabela 8: Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL74.

Cepa LL74	Contagens de Células Viáveis (UFC mL ⁻¹)			
	Tempo de exposição (em horas)			
	4	8	12	24
Meio ácido YPD pH 2	6,90 ^{b A}	8,28 ^{a A}	8,44 ^{a A}	6,78 ^{b B}
Controle (-) YPD ≅ pH 6,2	7,10 ^{b A}	7,57 ^{a B}	7,56 ^{a B}	7,61 ^{a A}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Para a cepa LL83, os resultados indicam que tanto em meio ácido como no meio controle, o tempo de exposição resultou em variações significativas no número de células totais (Tabela 9), entretanto, ao final das 24 h de incubação a cepa conseguiu manter níveis de 10⁶ - 10⁷ células mL⁻¹ (log = 6 a 7). Em relação ao efeito do pH, observamos que a cepa LL83 foi bastante tolerante, sendo igual ou significativamente melhor que o controle na maioria dos tempos analisados (Tabela 9). O mesmo ocorreu para as contagens de células viáveis, que também apresentou variações ao longo do tempo, mas manteve sua viabilidade em níveis probióticos ao final de 24 h (Tabela 10). Em relação ao pH, os resultados indicam que a cepa LL83, em meio ácido, foi comparável ao controle, em meio sem correção de pH (Tabela 10). Neste caso, também houve correlação significativa entre os métodos de contagens de células totais e de células viáveis.

Tabela 9: Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL83.

Cepa LL83	Contagens de Células Totais (células mL ⁻¹)			
	Tempo de exposição (em horas)			
	4	8	12	24
Meio ácido YPD pH 2	7,35 ^{ab B}	7,26 ^{b A}	7,43 ^{a A}	7,33 ^{b A}
Controle (-) YPD ≅ pH 6,2	7,76 ^{a A}	7,04 ^{c B}	7,47 ^{b A}	6,93 ^{d B}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Tabela 10: Interação entre os fatores pH e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a pH ácido para a cepa LL83.

Cepa	Contagens de Células Viáveis (UFC mL ⁻¹)			
	Tempo de exposição (em horas)			
LL83	4	8	12	24
Meio ácido YPD pH 2	6,88 ^{b A}	7,65 ^{a A}	7,43 ^{ab A}	7,28 ^{ab A}
Controle (-) YPD ≅ pH 6,2	7,28 ^{b A}	7,52 ^{a B}	7,69 ^{a A}	7,69 ^{a A}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Nossas cepas de *S. cerevisiae* podem ser consideradas promissoras quanto a capacidade de sobreviver em pH ácido. Kühle; Skovgaard e Jespersen (2005), relataram que 100% das cepas de *S. cerevisiae* testadas sobreviveram em pH 2,5 por 4 h, enquanto que nossas cepas toleraram até 12 h em concentrações ideais. Outros resultados também são relatados, como no trabalho de Charteris et al. (1997) em ensaios com pH 2, onde apenas 0,6% das cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sobreviveram a um tempo de exposição de 3 h. Draksler; Gonzáles e Oliver (2004) observaram que apenas 4,4% das bactérias ácido lácticas isoladas de fezes de cabras foram tolerantes à acidez; e Gusils; Bujazha e González (2002) relataram que apenas 16% das bactérias ácido lácticas que estavam sendo testadas como potenciais probióticos para alimentos de suínos, foram capazes de resistir a pH 3 por 3h.

b) Tolerância a bile 0,5%

A tolerância aos sais biliares é considerada um pré-requisito para a colonização e atividade probiótica no intestino delgado do hospedeiro (HAVENAAR; TEN BRINK; HUIS IN'T VELD, 1992). Por este motivo, ao avaliar o uso potencial de leveduras como um efetivo probiótico é necessário avaliar sua habilidade em resistir aos efeitos desta condição (LEE; SALMINEN, 1995).

Nestes ensaios, como o pH de ambos os meios (tratamento e controle) foi praticamente o mesmo, assim, a interação que queremos observar é da presença ou ausência de bile e os diferentes tempos de incubação.

Para a cepa LL74, os resultados indicam que tanto em meio com bile 0,5% como no meio controle, o tempo de exposição resultou em oscilações no número de células totais e

viáveis (Tabelas 11 e 12), entretanto, ao final das 24 h de incubação a cepa conseguiu manter níveis entre 10^6 - 10^7 células mL^{-1} ($\log = 6$ a 7). Em relação ao efeito da presença de bile 0,5%, observamos que na maioria dos casos, o grupo tratado foi significativamente superior ao controle, indicando que a presença da bile estimula o crescimento da levedura (aumento do número de células totais e viáveis) (Tabelas 11 e 12). Além disso, podemos perceber que novamente existiu correlação entre os métodos de contagens empregados.

Tabela 11: Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL74.

Cepa LL74	Contagens de Células Totais (células mL^{-1})			
	Tempo de exposição (em horas)			
	4	8	12	24
YPD + bile 0,5% - pH 6	7,58 ^{a A}	7,27 ^{b B}	7,56 ^{a A}	7,55 ^{a A}
Controle (-) YPD \cong pH 6,2	7,14 ^{c B}	7,65 ^{a A}	7,21 ^{bc B}	7,33 ^{b B}

Dados transformados para Log_{10}

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD ($P > 0,05$)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD ($P > 0,05$)

Tabela 12: Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL74.

Cepa LL74	Contagens de Células Viáveis (UFC mL^{-1})			
	Tempo de exposição (em horas)			
	4	8	12	24
YPD + bile 0,5% - pH 6	7,26 ^{c A}	7,64 ^{b A}	7,74 ^{ab A}	7,84 ^{a A}
Controle (-) YPD \cong pH 6,2	7,10 ^{b A}	7,57 ^{a A}	7,56 ^{a B}	7,61 ^{a B}

Dados transformados para Log_{10}

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD ($P > 0,05$)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD ($P > 0,05$)

Para a cepa LL83, os resultados indicam que tanto em meio com bile 0,5 % como no meio controle, o tempo de exposição resultou em oscilações significativas no número de células totais e viáveis (Tabela 13 e 14), entretanto, ao final das 24 h a cepa conseguiu manter

níveis probióticos. Em relação ao efeito da presença de bile 0,5%, observamos que a cepa LL83 manteve o mesmo comportamento que a cepa anterior, isto é, foi bastante tolerante a esta condição, mantendo-se em níveis comparáveis ao controle (Tabela 13 e 14).

Tabela 13: Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células totais obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL83.

Cepa LL83	Contagens de Células Totais (células mL ⁻¹)			
	Tempo de exposição (em horas)			
	4	8	12	24
YPD + bile 0,5% - pH 6	7,06 ^{c B}	7,52 ^{a A}	7,49 ^{ab A}	7,38 ^{b A}
Controle (-) YPD ≅ pH 6,2	7,76 ^{a A}	7,04 ^{c B}	7,47 ^{b A}	6,93 ^{d B}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Tabela 14: Interação entre os fatores presença de bile e tempo de incubação para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância a bile 0,5% para a cepa LL83.

Cepa LL83	Contagens de Células Viáveis (UFC mL ⁻¹)			
	Tempo de exposição (em horas)			
	4	8	12	24
YPD + bile 0,5% - pH 6	7,11 ^{b A}	7,52 ^{a A}	7,80 ^{a A}	7,78 ^{a A}
Controle (-) YPD ≅ pH 6,2	7,28 ^{b A}	7,52 ^{a A}	7,69 ^{a A}	7,69 ^{a A}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Estes resultados concordam com Kühle; Skovgaard e Jespersen (2005), que demonstraram que 65% das cepas de *S. cerevisiae* testadas foram capazes de crescer na presença de bile 0,3%. Em comparação com bactérias probióticas, Liu et al. (2007), afirmaram que apenas 10% do total de cepas de bifidobactérias testadas foram inibidas na presença de bile 0,3%, entretanto, quando o teor foi aumentado para bile 0,5 %, a inibição subiu para 84% das cepas. Demonstrando que as bactérias parecem ser muito mais sensíveis

que as leveduras quanto à presença de bile. Resultados similares foram encontrados por Gusils; Bujazha e González (2002), que observaram que 85% das cepas de *L. acidophilus* e *Enterococcus faecium* isoladas das fezes de suínos não conseguiram sobreviver a bile 0,1 % durante 24 h. E Draksler; Gonzáles e Oliver (2004) informaram que apenas 4,5% das bactérias ácido lácticas empregadas como probiótico para cabras apresentaram crescimento na presença de bile 0,3 %.

Podemos perceber que em todos os casos existiu correlação entre os métodos de contagens de células totais e de células viáveis. Ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens. O método de contagem em placas é bem mais trabalhoso, demanda maior gasto de tempo e material, visto que suspensões muito densas precisam ser diluídas para uma adequada leitura das placas e contagem das colônias. Sua grande vantagem é a alta sensibilidade, onde até mesmo uma única célula viável por amostra inoculada pode ser detectada. Já o método de contagem de células totais é uma tarefa bem rápida e simples, entretanto apresenta limitações como não distinguir células vivas de células mortas e a pouca precisão. O tamanho da célula e a densidade da suspensão podem exercer grande efeito sobre isso já que a visualização ao microscópio pode ficar inevitavelmente afetada, diminuindo a precisão (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010). As leveduras são consideravelmente maiores que as bactérias, e para o preparo das nossas soluções em concentrações probióticas ($\cong 10^7$ células mL⁻¹), a visualização dos campos na câmara de Neubauer tornava-se muito “poluída”. Observando-se ao microscópio, percebe-se que na câmara de Neubauer existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C (Figura 8).

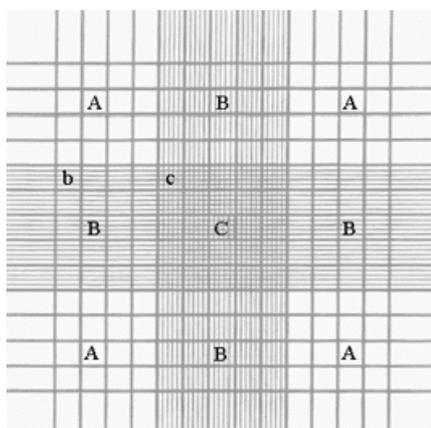


Figura 8: Representação dos quadrantes e sub-quadrantes vistos em uma câmara de Neubauer.

Em nosso estudo selecionamos o quadrante B para a realização das contagens e utilizamos a seguinte fórmula:

$$\begin{array}{l} \text{N}^\circ \text{ médio de células em (b) x } 20 \text{ ----- } 0,0001 \text{ cm}^3 \\ \text{X células ----- } 1 \text{ cm}^3 (= 1 \text{ mL}) \end{array}$$

Logo, o número de células mL^{-1} é igual ao n° médio de células contadas em (b) x $(2,0 \times 10^5)$. As contagens eram feitas em 4 sub-quadrantes (b) de B, de onde tirávamos a média. Se retornarmos ao que foi dito anteriormente, na seção material e métodos, veremos que para estes ensaios, as suspensões iniciais foram de 10^8 células mL^{-1} que posteriormente eram diluídas (1:10) no meio em teste (p. ex. caldo YPD pH 2). Fazendo-se esta conta, para conseguir atingir 1×10^8 células mL^{-1} é preciso que as médias de contagens dos sub-quadrantes (b) seja igual a 500, o que tornava particularmente difícil a tarefa e aumentava a possibilidade de erros, especialmente a superestimação (contar mais de uma vez a mesma célula). A Figura 9 pode ilustrar bem esta situação.

Exatamente por isso, nos ensaios de tolerância aos simuladores gastrointestinais, resolvemos trabalhar apenas com a contagem de células viáveis, mesmo sendo um método mais trabalhoso, e mesmo nossa correlação entre métodos ter sido positiva, consideramos que para o caso de leveduras, o método de contagem de células viáveis é mais confiável.

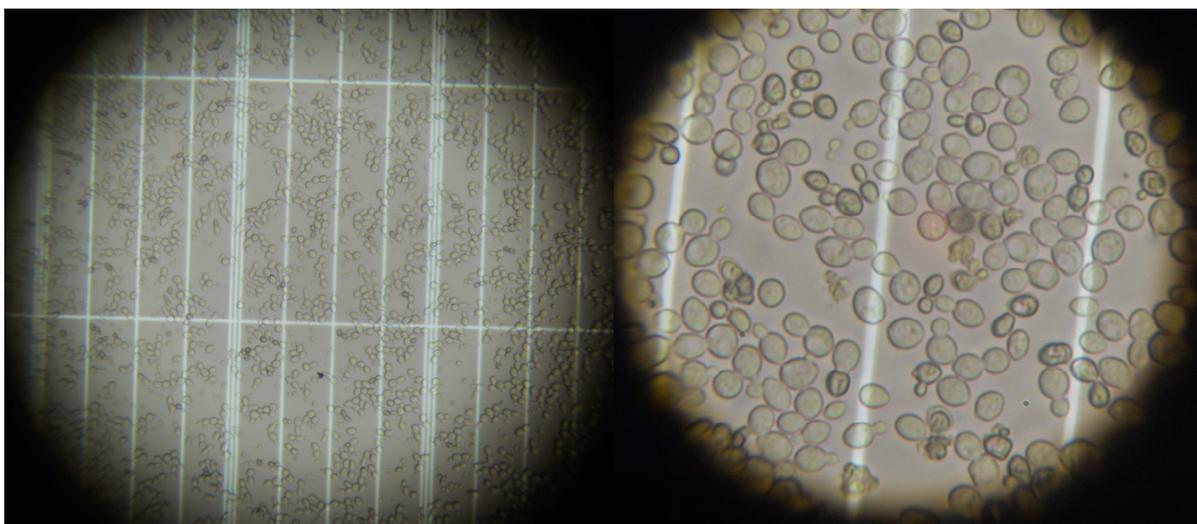


Figura 9: Contagem de células totais de leveduras em câmara de Neubauer. Direita: visão geral do quadrante B (aumento 100x). Esquerda: visão nos sub-quadrantes b (aumento 400x).

c) Tolerância aos simuladores gastrointestinais

Nestes ensaios, observamos o efeito da presença ou ausência das soluções simuladoras de TGI em comparação ao controle negativo, que utilizava apenas solução isotônica; e também, o efeito de cada compartimento específico ao longo do processo digestivo, isto é, em T0 testava-se inóculo inicial simulando o momento antes de sua ingestão; em T2 havia secreção salivar artificial simulando a passagem pela boca; em T3 havia suco gástrico artificial, simulando a passagem pelo estômago; e por último, em T4, havia fluido intestinal artificial, simulando a passagem pelo intestino. Os resultados destes ensaios para a cepa LL74 encontram-se na Tabela 15. Podemos observar que na passagem de T0 para T1 e de T1 para T2 a levedura está em crescimento, caracterizado pelo aumento nas contagens de UFC; e de T2 para T3 este crescimento foi reduzido significativamente. Se fizermos uma avaliação global, levando-se em conta tanto as passagens como a composição das soluções de reação, podemos sugerir que tanto a solução salivar quanto o suco gástrico artificial estimularam o desenvolvimento da LL74; efeito que não ocorreu na presença do fluido intestinal artificial, sendo os resultados da cepa comparáveis ao controle negativo em T3.

Tabela 15: Interação entre os fatores presença de soluções simuladoras de TGI e tempos de passagem por cada um para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância aos simuladores gastrointestinais para a cepa LL74.

Cepa LL74	Contagens de Células Viáveis (UFC mL ⁻¹)			
	T0	T1	T2	T3
Simuladores de TGI	8,06 ^{b A}	8,55 ^{a A}	8,64 ^{a A}	7,89 ^{c A}
Controle (-) tampão	8,06 ^{a A}	7,84 ^{c B}	7,90 ^{c B}	7,99 ^{b A}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Na Tabela 16, podemos observar que a cepa LL83 apresentou crescimento durante a passagem pelas condições T1, T2 e T3, com aumento significativo das contagens em relação ao inóculo inicial.

Tabela 16: Interação entre os fatores presença de soluções simuladoras de TGI e tempos de passagem por cada um para as médias de contagens de células viáveis obtidas nos ensaios de tolerância aos simuladores gastrointestinais para a cepa LL83.

Cepa LL83	Contagens de Células Viáveis (UFC mL ⁻¹)			
	T0	T1	T2	T3
Simuladores de TGI	7,30 ^{b A}	8,48 ^{a A}	8,60 ^{a A}	8,48 ^{a B}
Controle (-) tampão	7,30 ^{c A}	7,76 ^{b B}	7,84 ^{b B}	8,60 ^{a A}

Dados transformados para Log₁₀

Médias com mesma letra minúscula, na linha, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste LSD (P>0,05)

Ambas as cepas foram tolerantes à passagem pelo TGI. Diferentes autores informaram resultados similares com cepas de *S. cerevisiae* isoladas de fezes de lactantes e de queijo feta (PSOMAS et al., 2005) e com cepas de *S. cerevisiae* var *boulardii* isoladas de alimentos destinados à humanos (KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 2005). Em contraposição, outros estudos demonstraram um nível muito baixo de recuperação de bactérias quando submetidas às condições gastrointestinais nos ensaios *in vitro* para seleção de potenciais probióticos (GUSILS; BUJAZHA; GONZÁLEZ, 2002). Lin et al. (2007) informaram uma diminuição de 2-3 log nas contagens de cepas de *L. fermentum* isoladas de suínos e frangos.

3.3.3 Capacidade de autoagregação

A capacidade de agregação é uma característica desejável para o estabelecimento de um microrganismo como probiótico (ALANDER et al., 1997; KLAENHAMMER; KULLEN, 1999). Em muitos casos está associada com a capacidade de adesão da cepa (DEL RE et al., 2000). Esta adesão à mucosa intestinal demonstrou ser importante para a modulação da resposta imune do hospedeiro e para a exclusão competitiva contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Clostridium* spp. (ALANDER et al., 1999).

A capacidade de agregação pode ser observada de duas formas distintas, como autoagregação, onde ocorre aglomeração de células da mesma espécie; e como co-agregação, onde ocorre a união de microrganismos diferentes (JANKOVIC et al., 2003).

A capacidade de autoagregação das cepas de *S. cerevisiae* foi testada nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 min. A absorvância inicial (A₀) registrada por espectrofotômetro a 600nm foi

igual a 3,000. E as absorvâncias medidas ao final dos tempos de incubação (A_t), para ambas as cepas e todos os casos também foi igual a 3,000. Desta forma, podemos considerar o resultado de ambas as cepas ao final de 60 min. como sendo negativo, isto é, autoagregação ≤ 60 %. Talvez fosse necessário um tempo de incubação maior para que resultados diferentes fossem percebidos através do espectrofotômetro. Visualmente, nitidamente observamos que com o passar do tempo, o sobrenadante ia se tornando mais límpido (indicativo da agregação), e microscopicamente este processo também podia ser observado (Figuras 10 e 11).

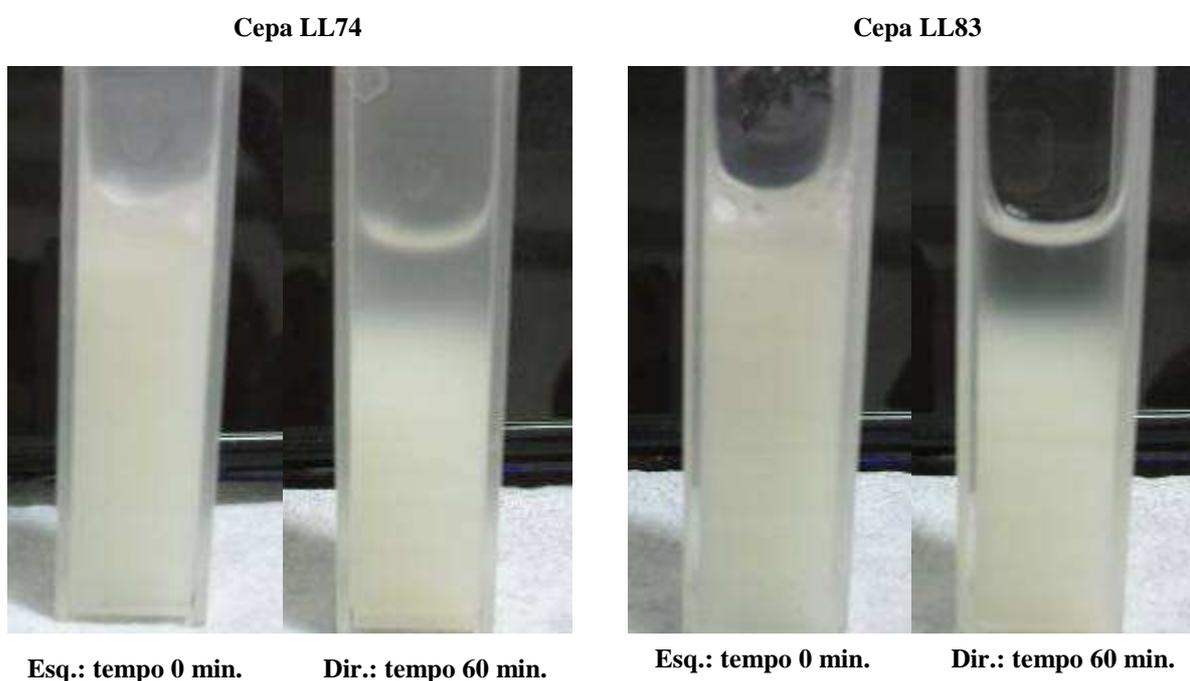


Figura 10: Aspecto macroscópico das suspensões iniciais e finais utilizadas nos ensaios de autoagregação.

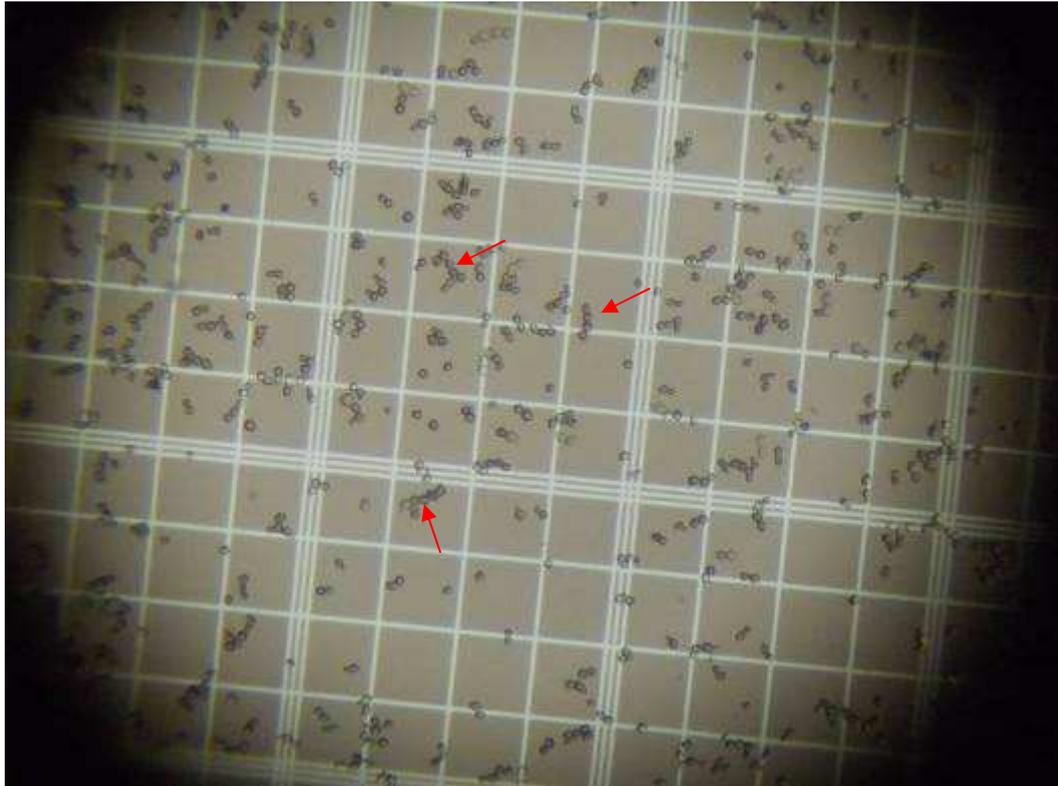


Figura 11: Aspecto microscópico de suspensão final utilizadas nos ensaios de autoagregação. Observar células autoagregadas indicadas pelas setas vermelhas. Aumento 100x.

Nossos resultados discordam dos encontrados por Armando et al. (2011), que isolaram cepas de *S. cerevisiae* com capacidade de autoagregação variando entre 85,3 a 97,9%. Em contraste, Draksler; Gonzáles e Oliver (2004) relataram que apenas 6,6% das cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* ensaiadas foram capazes de autoagregarem-se.

3.3.4 Capacidade de coagregação com microrganismos patógenos

De acordo com diversos trabalhos, a habilidade das cepas probióticas de coagregação, lhe permite formar uma barreira que impede a colonização dos microrganismos enteropatógenos (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; PERELMUTER; FRAGA; ZUNINO, 2008).

Os resultados de coagregação entre as cepas de *S. cerevisiae* e os agentes patógenos estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados dos ensaios de coagregação entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias patógenas.

Cepas	Coagregação*						
	<i>S. aureus</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>
LL74	++	++	++	+++	+++	++	0
LL83	+	++	++	+++	+	+++	+

*Os resultados informados então de acordo com o escore estabelecido na tabela da seção Material e Métodos .

Ambas as cepas apresentaram bons resultados na maioria dos casos ensaiados, exceto quando em presença da *E. coli* patogênica, onde a cepa LL74 apresentou resultado negativo e a LL83 apresentou o escore mais baixo de coagregação. A Figura 12 demonstra alguns dos resultados obtidos. Armando et al. (2011) relataram que a capacidade de *S. cerevisiae* coagregar-se com patógenos varia muito de cepa para cepa, tanto da levedura quanto do patógeno. Em seus estudos apenas uma das quatro cepas testadas foi capaz de aderir-se com *E. coli*, *Salmonella sp.* e *Enterobacter sp.* Alguns estudos têm tentado estabelecer o modo pelo qual as leveduras conseguem se ligar à estas bactérias. Gedek (1999) informou que cepas de *E. coli* enteropatogênica, de *S. typhimurium* e de *S. enteritidis* se ligariam à *S. cerevisiae* por receptores tipo lecitina dependentes de manose, presentes na parede celular da levedura, resultados comparáveis aos achados por Pérez-Sotelo et al. (2005), que observaram a aderência de cepas de *Salmonella spp.* com leveduras pelo mesmo mecanismo.

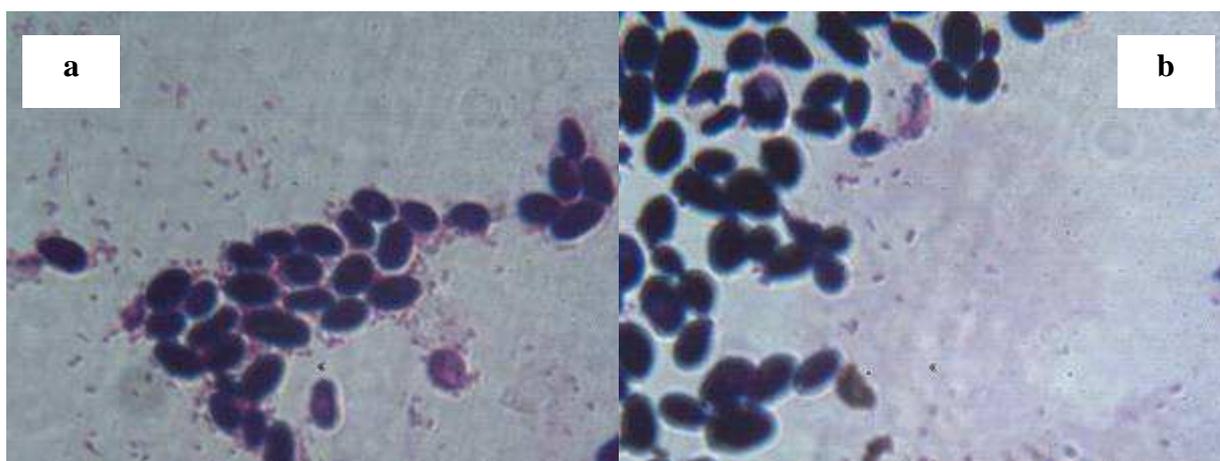


Figura 12: Ensaios de capacidade de coagregação. (a) *Saccharomyces cerevisiae* LL83 e *Salmonella spp.* (+++). (b) *Saccharomyces cerevisiae* LL74 e *E. coli* (0). Aumento 400x.

3.3.5 Capacidade de produção de substâncias antimicrobianas frente à patógenos

As leveduras sintetizam, como produto do seu metabolismo, diferentes substâncias que são antagônicas para a microbiota circundante, tais como ácidos graxos de cadeia curta, amilases, celulases, lipases, proteases, inulinas e “toxinas *killer*” (KLAENAMMER, 1988; KLAENAMMER et al., 1993). A síntese destes compostos lhes confere algumas vantagens no momento da competição, permitindo sua prevalência nos diferentes nichos ecológicos (tanto de humanos como de animais), com benefícios para o hospedeiro, já que conseguem inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. A Tabela 18 apresenta os resultados destes ensaios.

Tabela 18: Resultados dos ensaios de capacidade de produção de substâncias antimicrobianas por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* frente à bactérias patógenas.

Cepas	Produção de Substância Antimicrobiana*						
	<i>S. aureus</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>S. marcescens</i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>Shigella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i>
LL74	-	-	+	+	-	-	-
LL83	-	-	-	-	-	-	-

*Os resultados informados então de acordo com os critérios estabelecidos na seção Material e Métodos.

Das leveduras testadas, somente a LL74 apresentou alguma atividade antimicrobiana, e mesmo assim, apenas contra dois patógenos. Estes resultados diferem dos relatados por Armando et al. (2011) que conseguiram isolar cepas de *S. cerevisiae* com forte capacidade de inibição, produzindo zonas claras de 10 a 15 mm. Em contraposição, Draksler; Gonzáles e Oliver (2004) reportaram que apenas 0,7% das cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, ensaiadas como probiótico para cabras, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. typhimurium* e *E. coli*. Os 99,3% restantes, não apresentaram qualquer zona de inibição. A Figura 13 mostra alguns dos resultados obtidos.

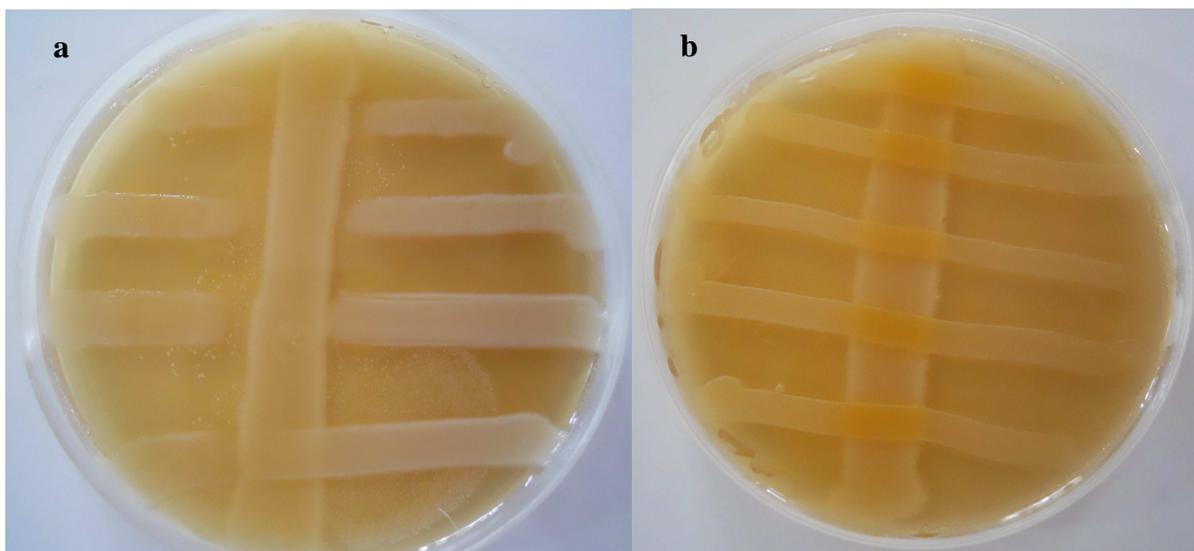


Figura 13: Ensaios de produção de substâncias com atividade antimicrobiana. (a) Resultado positivo. Observa-se a formação de zonas claras de inibição no cruzamento entre estrias. (b) Resultado negativo. O patógeno foi capaz de crescer inclusive em cima da levedura.

3.4 Avaliação *in vitro* do Potencial Descontaminante de Aflatoxina B₁ das Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas

Devido aos bons resultados demonstrados nos ensaios de características probióticas, ambas as cepas foram testadas quanto a sua capacidade para adsorver AFB₁. Os resultados das médias das triplicatas dos ensaios encontram-se na Tabela 19. O percentual de adsorção foi calculado através da fórmula: $[1 - (\text{área do sobrenadante} / \text{área da toxina no controle positivo})] \times 100$. Podemos observar que ambas as cepas apresentaram menor capacidade de adsorção na presença do fluido intestinal artificial, e que a média geral de adsorção foi de 27% de captação da AFB₁ contra uma concentração em torno de $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 19: Capacidade *in vitro* de adsorção de aflatoxina B₁ por células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ensaio (nº)	$\mu\text{g mL}^{-1}$ AFB ₁	μg adsorvidos	Adsorção AFB ₁ (%)
LL74 em SG	1,261	0,386	30,61
LL74 em SI	1,266	0,145	11,46
LL83 em SG	1,261	0,454	36,00
LL83 em SI	1,266	0,360	28,44

SG = solução simuladora de suco gástrico SI = solução simuladora de fluido intestinal

Armando et al. (2011) testaram a capacidade de quatro cepas de *S. cerevisiae* em adsorver AFB₁ utilizando diferentes concentrações de toxina. O percentual de adsorção variou desde 16,4 até 82% contra 50 ng mL⁻¹ AFB₁; entre 21,3 e 48,7% para 100 ng mL⁻¹; e de 20,2 a 65,5% contra 500 ng mL⁻¹ de toxina. Estes dados comprovam o que temos dito, que a capacidade de adsorção é cepa dependente, existindo grande variabilidade de resultados conforme a cepa; além do que, percebemos que não existe uma correlação entre a capacidade de adsorção e a concentração de toxina.

Segundo Bolognani et al. (1997), um mínimo de 2 a 5 x 10⁹ UFC mL⁻¹ são necessários para exercer uma significativa remoção de AFB₁ (13-50%), resultados comparáveis com El-Nezami et al. (1998), onde uma concentração de 2 x 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi capaz de reduzir os níveis de AFB₁ para menos de 13%. Embora não tenhamos estudado a influência da concentração do inóculo sobre a capacidade de descontaminação, podemos verificar que a concentração utilizada em nosso trabalho foi efetiva na remoção de AFB₁ em níveis comparáveis aos da literatura.

4 CONCLUSÕES

- ✓ Diversas leveduras podem ser isoladas a partir de diferentes nichos ecológicos, tanto de humanos, como de animais, sendo que, em nosso estudo, apenas alimentos para humanos foram fonte da espécie *S. cerevisiae*.
- ✓ Métodos enzimáticos são ferramentas úteis para aumentar a confiabilidade do diagnóstico. A correta identificação de leveduras de diferentes origens deve ser baseada em diferentes métodos uma vez que a metodologia tradicional, baseada em aspectos morfológicos, pode resultar em erros.
- ✓ As cepas de *S. cerevisiae* LL74 e LL83, isoladas neste estudo, toleraram a passagem pelas condições gastrointestinais *in vitro*, apresentaram duas ou mais características desejáveis em um probiótico e foram moderadamente capazes de adsorver AFB₁, constituindo em alternativa promissora para o desenvolvimento de novos aditivos com ação probiótica e descontaminante de micotoxina.
- ✓ Novos estudos devem ser conduzidos para uma caracterização mais completa das cepas, e de suas propriedades tecnológicas e funcionais, possibilitando o seu uso na produção animal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANDER, M.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VON WRIGHT, A. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 361-364, 1997.

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN SALMELA, T.; MATTILA SANDHOLM, T.; VON WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 351-354, 1999.

ARMANDO, M.R.; DOGI, C.A.; PIZZOLITTO, R.P.; ESCOBAR, F. PEIRANO, M.S.; SALVANO, M.A. SABINI, L.I.; COMBINA, M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L. R. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; GLORIA, E.M.; DOMINGUES-CALORI, M.A.; VIZIOLI, M. R. *Saccharomyces cerevisiae* in the reduction of the aflatoxins effects. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, suppl. 1, S.48, 2001.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1038-1044, 2004.

BRADY, D.; STOLL, A.D.; STARKE, L.E; DUNCAN, J.R. Chemical and enzymatic extraction of heavy-metal binding polymers from isolated cell-walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 3, p. 297-302, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº13, de 30 de novembro de 2004. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 01 de dezembro de 2004.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1997.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 71-74, 2007.

CUARON, I.J.A. La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiologica antagonista. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas - SP. **Anais...** Campinas: CBNA. 2000, p. 71-79.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 767–778, 2007.

DAWSON, K.A.; PIRVULESCU, M. Mananoligossacarídeos derivados de leveduras como moduladores da resposta imunológica e alternativas aos promotores de crescimento antimicrobianos. In: RONDA LATINO-AMERICANA DA ALLTECH. 9., Campinas, 1999. **Anais...** Campinas:Altech, 1999. p.33-41.

DE GROOT, P.W.J.; RAM, A.F.; KLIS, F.M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 657-675, 2005.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 438-442, 2000.

DOGI, C.A.; ARMANDO, R.; LUDUEÑA, R.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A.; CAVAGLIERI, L. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 12, p. 1705-1711, 2011.

DRAKSLER, D.; GONZÁLES, S.; OLIVER, G. Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, n. 5, p. 397-405, 2004.

ESPINEL-INGROFF, A.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.; PINCUS, D.; POLLACK, J.; MARLER, J. Comparison of RapID Yeast Plus System with API 20C System for Identification of Common, New, and Emerging Yeast Pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 883-886, 1998.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf> Acesso em: 08 jan. 2012

FINUCANE, M.P.; SPRING, P.; NEWMAN, K.E. Incidence of mannose-sensitive adhesions in enteric bacteria. **Poultry Science**, v. 78, suppl. 1, p. 139, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GEDEK, B.R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. **Mycoses**, v. 42, n. 4, p. 261-264, 1999.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. **Journal Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GÓMEZ ZAVAGLIA, A.; KOCIUBINSKI, G.; PÉREZ, P.; DISALVO, E.; DE ANTONI, G. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 5, p. 794-799, 2002.

GUSILS, C.; BUJAZHA, M.; GONZÁLEZ, S. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. **Interciencia**, v. 27, n. 8, p. 409-413, 2002.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. **Selection of strains for probiotic use. The Scientific Basis**. London: Chapman & Hall, 1992. p. 209-221.

HOOGE, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharides 1993-2003. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 3, p. 163-174, 2004.

JANKOVIC, I.; VENTURA, M.; MEYLAN, V.; ROUVET, M.; ELLI, M.; ZINK, R. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3288-3296, 2003.

KAPTEYN, J.C.; RAM, A.F.; GROOS, E.M.; KOLLAR, R.; MONTIJN, R.C.; VAN DEN ENDE, H.; LLOBELL, A.; CABIB, E.; KLIS, F.M. Altered extent of cross-linking of beta 1,6-glycosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta 1,3-glucan content. **The Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 20, p. 6279-6284, 1997.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, n. 3, p. 337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T.R.; FREMAUX, C.; AHN, C.; MILTON, K. Molecular Biology of bacteriocins produced by *Lactobacillus*. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. (Eds). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. New York: Academic Press, 1993. p. 151-180.

KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 45-47, 1999.

KLIS, F.M.; BOORSMA, A.; GROOT, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.Y.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981-987, 2003.

KRIŽKOVÁ, L.; ĎURAČKOVÁ, Z.; ŠANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJČOVIČ, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, n. 1-2, p. 213–222, 2001.

KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.Y.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 29-39, 2004.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.

LESSON, S.; SUMMERS, J.D. Non-Nutritive Feed Additive. In: _____. **Scott`s Nutrition of the Chicken**. 4ed. Guelph: University Books; 2001. p. 452-453.

LIN, W.H.; YU, B.; JANG, S.H.; TSEN, H.Y. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. **Anaerobe**, v. 13, n. 3-4, p. 107–113, 2007.

LIU, Z.; JIANG, Z.; ZHOU, K.; LI, P.; LIU, G.; ZHANG, B. Screening of Bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 13, n. 5-6, p. 215-219, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENNAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effects of bile. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1031-1037, 1997.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281–295, 2005.

MENTEN, J. F. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2, 2002, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: CBNA, 2002. p. 251-276.

MOURAD, K.; NOUR-EDDINE, K. In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 1, n. 1, p. 27-32, 2006.

NITTA, K.; KOBAYASHI, F. Brewer's yeast as health foodstuff. **New Food Industry**, v. 41, n. 2, p. 17-23, 1999.

OLEJNIK, A.; LEWANDOWAKA, M.; OBARSKA, M.Y.; WLODZIMIERZ, G. Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains to low pH, bile salt and digestive enzymes. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 8, n. 1, online, 2005. Disponível em: <<http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue1/art-05.html>> Acesso em: 09 jan. 2012

ORGANNACT. **Manutenção Nutricional dos Cães**. Informativo Técnico - Pet & Pet Palitos. Disponível em: <http://www.organnact.com.br/adm/upload_arquivos/produto_3_file1_pet_&_pet_palitos.pdf> Acesso em: 11 jan. 2012

OSUMI, M. The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation. **Micron**, v. 29, n. 2/3, p. 207-233, 1998.

PATZAK, M.; DOSTALEK, P.; FOGARTY, R.V.; SAFARIK, I.; TOBIN, J.M. Development of magnetic biosorbents for metal uptake. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 7, 483-487, 1997.

PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. v.1, 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1718-1725, 2008.

PÉREZ-SOTELO, L.S.; TALAVERA-ROJAS, M.; MONROY-SALAZAR, H.G.; LAGUNAS-BERNABÉ, S.; CUARÓN-IBARGÜENGOITIA, J.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J.C. Evaluación in vitro de la capacidad de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 para adherir a su pared *Salmonella* spp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n. 3-4, p. 70-75, 2005.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009.

PSOMAS, E.; ANDRIGHETTO, C.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; LOMBARDI, A.; TZANETAKIS, N. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 125-133, 2001.

RAJU, M.V.; DEVEGOWDA, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). **British Poultry Science**, v. 41, n. 5, p. 640-650, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3763-3766, 1999.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, suppl. 2, p. 105-110, 2002.

RODRÍGUEZ, M.B.S.; MEGÍAS, S.M.; BAENA, B.M. Alimentos Funcionales y Nutrición óptima. **Revista da Espanha de Salud Pública**, v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, p.1-16, 2006.

SHETY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* a lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 48–55, 2006.

SHETTY, P.H.; HALD, B.Y; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 41-46, 2007.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, W. Probiotic feed additives effectiveness and expected modes of action. **Journal of Animal Feed Science**, v. 10, suppl. 1, p. 51-67, 2001.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 1–10, 2003.

VAN VUUREN, A.M. Effect of live yeast of the performance of dairy cows. In: VAN VUUREN, A.M. (Ed.) **Role of probiotics and their link to the demands of European consumers**. The Netherlands: TNO Publications, 2003. p. 41-48.

VOLESKY, B. Biosorbents for Metal Recovery. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 96-101, 1987.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties towards Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3666-3673, 2004a.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1195-1200, 2004b.

ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A.; LAZARIDIS, N.K. Removal of metal ions from simulated wastewater by *Saccharomyces* yeast biomass: Combining biosorption and flotation processes. **Separation Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 349-365, 2001.

CAPÍTULO III

EFEITO DA ADIÇÃO DE PAREDE CELULAR DE

LEVEDURA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE

INTOXICADOS COM AFLATOXINA B₁

RESUMO

Nas últimas décadas, o número crescente de casos de resistência microbiana em humanos trouxe à tona a questão do uso maciço de antibióticos como promotores de crescimento nas criações animais. Restrições vêm sendo impostas, e desde então o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos tem sido estimulado, principalmente na avicultura mundial. Graças às suas propriedades nutricionais e benéficas, *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura de uso mais frequente tanto na alimentação animal como de humanos, além disso, estudos também têm relatado sua capacidade de sequestrar micotoxinas presentes na dieta. No capítulo I, foi demonstrada a eficiência de um produto comercial, constituído 100% por parede celular de *S. cerevisiae*, em sua capacidade de adsorver aflatoxina B₁ (AFB₁) através de ensaios *in vitro*. Neste capítulo III, a eficiência *in vivo* do mesmo produto (AAM-1) frente a um quadro de intoxicação experimental em frangos de corte foi avaliada. Foram utilizados 288 frangos de corte, machos, da linhagem Cobb, recebidos com um dia de idade, os quais foram alojados em gaiolas de baterias metálicas em quatro tratamentos (controle negativo, controle do aditivo 0,2%, controle positivo com 1 ppm de AFB₁, e grupo intoxicado que recebeu o aditivo) até os 21 dias de idade. Foram avaliados o peso vivo, ganho de peso, consumo de alimento, a conversão alimentar, pesos relativos de fígados e rins, análises histopatológicas e análises sanguíneas das aves. A inclusão da AFB₁ na dieta diminuiu o desempenho das aves como o esperado, e apesar de não ter alterado os pesos relativos dos órgãos, foram notadas alterações histopatológicas no tecido hepático. O dano hepático também foi percebido pelo aumento da concentração sérica da ALT e elevação sérica do ácido úrico. A inclusão apenas do AAM-1, na concentração de 0,2 % na dieta, não produziu nenhum efeito deletério significativo sobre os parâmetros avaliados, sendo inclusive, capaz de melhorar significativamente vários dos parâmetros analisados, em relação ao grupo de animais intoxicados e mesmo quando comparados ao tratamento controle. Desta forma, o AAM-1 demonstrou ser eficaz como aditivo melhorador de desempenho zootécnico e na prevenção dos efeitos tóxicos da AFB₁ sobre a função e o tecido hepático.

ABSTRACT

In recent decades, the growing number of cases of microbial resistance in humans raised the issue of massive use of antibiotics as growth promoters in animals. Restrictions have been imposed, and the use of probiotics, prebiotics and synbiotics has been encouraged, especially in poultry industry. Due to its healthy and nutritional properties, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is frequently used in both animal and human nutrition, in addition, studies have also reported their ability to bind mycotoxins present in the diet. In Chapter I, was demonstrated the efficiency of a commercial product, consisting of *S. cerevisiae* cell wall (100%), in its ability to adsorb aflatoxin B₁ (AFB₁) by *in vitro* tests. In Chapter III, the efficiency of the same product *in vivo* (AAM-1) against an experimental condition of intoxication in broiler chickens was assayed. Broiler males (288) from Cobb lineage, of one day years old were used. They were housed in metal cages in four treatments (negative control, additive control 0.2%, positive control with 1 ppm AFB₁, and the intoxicated group that received the additive) until 21 days old. Body weight, weight gain, feed intake, feed conversion, relative weights of livers and kidneys, blood tests and pathological examinations of the chicks were evaluated. The inclusion of AFB₁ in the diet decreased the chick's performance, as expected, and despite not having changed the organ's relative weights, histopathological changes were noted in liver tissue. The liver damage was also noted by increased serum ALT and elevated serum uric acid. The inclusion of AAM-1 at a concentration of 0.2% in the diet did not produced significant deleterious effects on the evaluated parameters, including being able to significantly improve several of the analyzed parameters in relation to the intoxicated group and even when compared to control. Thus, the AAM-1 was shown to be effective as a booster of performance and in preventing the toxic effects of AFB₁ on the function and liver tissue.

1 INTRODUÇÃO

O aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos em seres humanos vem sendo relacionado com o uso de antibióticos na alimentação animal. A utilização de antibióticos, em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento em espécies domésticas, com a finalidade de melhorar o crescimento, a eficiência alimentar e a saúde do animal, pode levar rapidamente ao desenvolvimento de linhagens resistentes à antibióticos na flora intestinal, que contém bactérias patogênicas como a *Salmonella*; situação que pode representar um risco potencial para saúde pública, onde por meio das fezes ou pelo consumo de produtos de origem animal (carne, leite, ovos), parte destas bactérias resistentes pode se disseminar e colonizar o TGI de seres humanos.

As estruturas de alguns antibióticos promotores de crescimento (APC), como a avoparcina, virginamicina e avilamicina, são semelhantes às estruturas de antibióticos de última geração desenvolvidos para uso humano como a vancomicina, pristamicina e ziracina, respectivamente. Bactérias resistentes a esses antibióticos foram encontradas no TGI de aves e suínos. Um levantamento da resistência de bactérias a agentes antimicrobianos feito na Dinamarca (AARESTRUP et al., 1998) mostrou resistência adquirida por bactérias a todos os agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento, com maior frequência de resistência à avilamicina, avoparcina, bacitracina, flavomicina, espiramicina, tilosina e virginamicina.

Diante desta situação e de outras (Encefalopatia Espongiforme Bovina - “Mal da Vaca Louca”, doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos, dioxinas, etc.), a percepção dos consumidores por produtos de origem animal vêm sofrendo alterações, com a preferência por produtos, teoricamente de melhor qualidade, e produzidos de forma mais natural (orgânicos, bem estar animal, etc.). Além disso, desde 2006, a União Européia (UE) instituiu a proibição completa de APC nas rações para animais. No Brasil, está proibido o uso de anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

E assim, nos últimos 20-30 anos, intensificaram-se os estudos por aditivos melhoradores de desempenho em substituição aos APC. A nutrição moderna passou a buscar estratégias não apenas baseadas no aumento da qualidade dos alimentos, como também em práticas de manejo, biossegurança, e na incorporação de novos aditivos, como: enzimas, microrganismos vivos, extratos de plantas, ácidos orgânicos, prebióticos, etc...

Conforme temos visto ao longo dos capítulos desta tese, graças às suas propriedades nutricionais e benéficas, *S. cerevisiae* é a levedura de uso mais frequente tanto na alimentação animal como de humanos. Estudos têm relatado seus efeitos como aditivo melhorador de desempenho e também sua capacidade de sequestrar micotoxinas presentes na dieta; porém como estas propriedades são cepa-dependentes, torna-se necessária a avaliação de cada nova cepa ou produto derivado. No capítulo I, foi demonstrada através de ensaios *in vitro* a eficiência de um produto comercial, constituído 100% por parede celular de *S. cerevisiae*, em sua capacidade de adsorver AFB₁. Neste capítulo III, pretendemos demonstrar a eficiência *in vivo* do mesmo produto (AAM-1) frente a um quadro de intoxicação experimental em frangos de corte.

1.1 Avicultura no Brasil

Dados da União Brasileira de Avicultura - UBABEF (2011a,b) indicam que no Brasil, a avicultura emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto nacional. O setor é representado por dezenas de milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras.

A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica. Em 2010, a produção brasileira atingiu a marca recorde de 12,230 milhões de toneladas, aproximando o Brasil do segundo posto mundial entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, com Estados Unidos (1º) e China (2º). Desse total, cerca de 69% permaneceram no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país. O consumo per capita de carne de aves no Brasil está em aproximadamente 40 quilos por ano (UBABEF, 2011a,b).

Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2010 com a marca de 3,8 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países. Com esse desempenho, a carne de frango brasileira aumentou ainda mais sua presença na mesa dos consumidores no Brasil e no mundo. O panorama econômico mundial tem colocado o segmento de avicultura em um cenário bastante positivo no Brasil. O País tem potencial para ser o pólo produtor do mundo em razão das condições favoráveis de clima, área, mão de obra, condições de biossegurança e capacidade empreendedora para projetos avícolas (UBABEF, 2011a,b).

1.2 Ocorrência de Aflatoxinas e seus Fungos Produtores em Rações de Aves

Na avicultura moderna, o segmento de produção de rações está diretamente atrelado à avicultura e suinocultura. Esses dois setores, juntos, consomem quase 90% das rações produzidas no Brasil, sendo responsáveis pelo consumo de mais de 60% da produção de milho, 35% da produção de soja e quantidades expressivas de outros grãos. Conforme dito anteriormente, as culturas agrícolas, especialmente os cereais, são susceptíveis ao ataque de fungos, no campo ou durante o armazenamento com a produção de micotoxinas.

A ração contaminada com estes metabólitos tóxicos resulta em grandes perdas econômicas devido à redução no ganho de peso, piora na conversão alimentar, desuniformidade nos lotes, imunossupressão, incidência de hemorragia petequiais e hematomas, problemas de qualidade na casca dos ovos, queda de postura e eclodibilidade. Mesmo com a disponibilidade de modernos sistemas de controle de qualidade em grãos e rações, não há garantia total para os produtores avícolas de que suas rações estejam completamente livres de contaminação por micotoxinas.

Diversas micotoxinas são importantes causas de perdas, nem sempre perceptíveis em avicultura, mas sem dúvida alguma, as mais importantes são as aflatoxinas. Considerando este fato, em 1988, o Brasil estabeleceu o nível máximo de tolerância de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de AFs $B_1+B_2+G_1+G_2$, válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente de rações destinadas ao consumo animal (BRASIL, 1988). No entanto, esta lei encontra-se revogada pela Instrução Normativa nº 30 de 05 de agosto de 2009 (BRASIL, 2009) que não faz referência à estas substâncias. Se compararmos esse dado com outros países, como o bloco da UE, por exemplo, onde o limite é de $10-20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EU, 2003), vemos que precisamos urgentemente retomar esta discussão e estabelecer novos limites para estes contaminantes na alimentação animal.

Diversos trabalhos sobre a contaminação de rações e de alimentos por fungos toxígenos foram publicados no Brasil e no mundo nos últimos anos. Dalcerro et al. (1997) pesquisaram a microbiota em cinco fábricas de rações para frangos de corte na Argentina. As espécies de maior prevalência detectadas foram pertencentes aos gêneros *Penicillium* (98% das amostras), *Fusarium* (87%) e *Aspergillus* (52%). Dentre as espécies de *Aspergillus*, as mais frequentes foram *A. parasiticus* (33%) e *A. flavus* (8%), e entre as amostras analisadas, 14% estavam contaminadas com AFB₁ com níveis de 17 a $197 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dalcerro et al. (1998) continuaram o monitoramento destas fábricas e reportaram, desta vez, maior prevalência do

gênero *Aspergillus* (85%) e da espécie *A. flavus* (36%), e a ocorrência natural de AFB₁ se manteve em níveis que variaram de 10 to 123 µg kg⁻¹.

No Brasil, Rosa et al. (2006) ao estudarem a micobiota toxígena de 96 amostras de rações destinados à alimentação de frangos de corte provenientes de quatro fábricas do Estado do Rio de Janeiro, observaram que o gênero *Aspergillus* foi o de maior frequência, seguido por *Penicillium* sp.; e *A. flavus* foi a espécie mais prevalente (50%). Oliveira et al. (2006) reportaram a ocorrência de AFB₁ em níveis entre 1,2 e 17,5 µg kg⁻¹ em amostras de rações destinados à alimentação de frangos de corte em duas fábricas de rações também do Estado do Rio de Janeiro.

Fraga et al. (2007) analisaram amostras de milho e de rações para os diferentes estágios da criação de frangos de corte no Estado do Rio de Janeiro. *Aspergillus flavus* foi a espécie mais isolada tanto nas amostras de milho como de ração inicial e de terminação. Dentre todas as cepas isoladas, 29% de *A. flavus* e 100% de *A. parasiticus* foram capazes de produzir AFs em ensaios *in vitro*. Dentre os fungos produtores testados, 63% produziram as quatro AFs: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. *Aspergillus parasiticus* foi a espécie que produziu as maiores quantidades de AFB₁ e AFG₁ em relação às demais cepas testadas. Os autores também avaliaram a presença de AFs nas rações de terminação e encontraram 100% das amostras contaminadas com AFs e OTA. Os níveis de AFs variaram entre 1,3 e 80 µg kg⁻¹ (65,3±18,7 µg kg⁻¹, $\bar{X} \pm SD$).

Por fim, Almeida et al. (2009) estudaram a ocorrência de AFs em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. Oitenta amostras de milho foram coletadas de duas fábricas produtoras de ração e os resultados revelaram que oito (10%) amostras estavam contaminadas, com níveis variáveis de 1 a 5 µg kg⁻¹.

Estes estudos demonstram que a qualidade do produto quanto à contaminação por AFs pode variar de uma região para outra, sendo necessário o monitoramento constante da sua produção para a implementação de medidas de controle sempre que necessário.

1.3 Aflatoxicose em Aves

Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis às criações animais (PIER, 1992).

Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para o diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é a alteração no tamanho dos órgãos

internos. Ocorre aumento de tamanho no fígado, baço e rins, enquanto a bursa e timo estão diminuídos. Somando-se a alterações de tamanho, ocorrem alterações na coloração e textura dos órgãos. Por exemplo, o fígado de aves com aflatoxicose tem como característica a coloração amarelada e textura friável, com acentuada infiltração de gordura. O grau de infiltração gordurosa depende da dose e do tempo de intoxicação por AFs, chegando a 68% de aumento em frangos de corte (MERKLEY et al., 1987).

Em surtos de aflatoxicose no campo, uma das características mais marcantes é a má absorção que se manifesta como partículas de ração mal digeridas na excreta das aves. Está associada com esteatorréia ou excreção aumentada de lipídeos (OSBORNE; HAMILTON, 1981). Essa má absorção prejudica a eficiência da conversão alimentar e, conseqüentemente, aumenta o custo da produção. A esteatorréia da aflatoxicose pode ser severa, com o aumento de até dez vezes o teor de gordura no material fecal (SCHAEFFER; HAMILTON, 1991). Em frangos de corte, a esteatorréia é acompanhada por uma diminuição nas atividades específica e total da lipase pancreática, a principal enzima digestiva das gorduras, e pela diminuição nos sais biliares, os quais são necessários tanto para a digestão como para a absorção de gorduras.

De forma geral, podemos dizer que em aves, as AFs causam diminuição na velocidade do crescimento e na eficiência alimentar, redução do metabolismo protéico e absorção de gorduras, redução da produção de ovos, ação sobre enzimas (amilase, tripsina e lipase pancreática), redução na produção de sais biliares, redução na absorção de vitaminas lipossolúveis e pigmentos, redução na detoxificação de toxinas pelo fígado, redução de proteínas plasmáticas (menor produção de imunoglobina, interferência na coagulação sanguínea com hemorragias generalizadas), aumento na mortalidade (nem sempre acentuada), redução das atividades fagocitárias e linfocitárias com aumento na susceptibilidade à doenças, como a fibrose e o câncer hepático, aumento do peso relativo dos rins e pâncreas, maior incidência de ovos com cascas defeituosas e má formação de embriões, maior incidência de lesões pancreáticas, renais e intestinais (SANTURIO et al., 2000).

Gimeno e Martins (2008) relatam que contaminações com 75 a 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou ppb (partes por bilhão) de AFB₁ em rações para pintos a partir de 1 dia de vida durante 3 a 10 semanas, causaram desde retardo no crescimento chegando a danos graves ao fígado e mortes nas maiores concentrações. Com 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em três semanas, foram observados também problemas de fígado esteatótico; e com 308 e 610 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a mortalidade foi de 8 e 11%, respectivamente, entre 0 e 9 semanas.

No entanto, quando dietas contaminadas com 2500 e 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ foram fornecidas para frangos de 23 dias de idade por 32 dias, não houve maiores problemas além

de um fígado ligeiramente friável e uma redução na concentração sérica de cálcio. No aspecto microscópico, as lesões histológicas observadas foram vacuolização dos hepatócitos e infiltração gordurosa. Percebe-se que existe uma susceptibilidade dos frangos de corte às aflatoxinas conforme a idade destas aves, indicando que aves mais jovens apresentam maiores danos no seu desenvolvimento em comparação às aves mais velhas, fato também relatado por Mariani (1998).

Pintinhos de 1 dia alimentados com dieta contendo 20% de proteína bruta e 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, sofreram uma redução de peso de cerca de 20% em relação ao controle. No entanto, quando a proteína bruta foi aumentada para 30% com o mesmo nível de contaminação, a redução de peso foi apenas de 5,4%. A aflatoxicose altera a digestão de proteínas e absorção de aminoácidos; aumenta a retenção hepática destas substâncias e diminui a síntese de DNA, RNA e proteínas no ribossomo. Tudo isso provoca um aumento das necessidades de proteína de aves e conduz a um atraso no crescimento. Aparentemente, o aumento dos níveis protéicos para 30%, ajudou a reduzir esses efeitos (GIMENO; MARTINS, 2008).

Da mesma forma, Santurio (2000) afirma que o baixo nível protéico da ração fornecida aos animais potencializa os sinais da intoxicação, sendo assim, rações contaminadas exigem maior quantidade de proteína, elevando assim os custos na ração.

Contaminações com 250 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ em rações fornecidas para pintos de 1 dia de vida durante 3 semanas, resultou em queda da imunidade contra *Pasteurella multocida* e contaminações de 200 ppb durante 29 dias resultaram em aumento da susceptibilidade à coccidiose por *Eimeria tenella* (GIMENO; MARTINS, 2008). Os autores também ressaltam o aumento da susceptibilidade à salmonelose e candidíase. A interferência da AFB₁ na função hepática normal, possivelmente, reduzir a síntese de imunoglobulinas séricas, que tem uma grande influência sobre a patogênese e morbidade.

Segundo Salle et al. (2002), as aflatoxinas prejudicam os parâmetros de produção, causam imunodepressão humoral e celular e afetam o mecanismo de coagulação. Todas estas alterações contribuem para a ocorrência de infecções concomitantes, sobretudo por agentes virais e bacterianos.

Observa-se ainda em frangos e poedeiras que receberam aflatoxinas, extrema palidez das mucosas e pernas. Essa pigmentação deficiente parece ser resultado da menor absorção, diminuição no transporte e diminuição tecidual dos carotenóides da dieta (LESSON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

No que concerne às poedeiras, as principais manifestações da aflatoxicose, em condições experimentais, incluem redução da produção e do peso dos ovos, aumento da gordura hepática e alteração de enzimas séricas, e atresia de ovários em experimentos com poedeiras recebendo rações contendo $8000 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, durante 7 dias (ROSMANINHO et al., 2001).

1.4 Eficácia dos Aditivos Anti-Micotoxinas em Ensaios *in vivo*

Conforme vimos, os efeitos tóxicos das aflatoxinas em frangos dependem, principalmente, da dose e do tempo de exposição. Patterson (1973) relata que as aves são relativamente resistentes às aflatoxinas, arbitrando um valor de LD₅₀ (dose letal 50%) entre 6,5 e 16,5 mg kg⁻¹ ou ppm (partes por milhão) de peso vivo.

Dados na literatura indicam que a maioria dos AAM a base de aluminossilicatos são efetivos contra as aflatoxinas. Especialmente os HSCAS, demonstram alta afinidade por esta toxina, indicando sua eficácia na prevenção da aflatoxicose em animais (RAMOS; HERNANDEZ, 1997). Phillips et al. (1988) relataram que a adição de HSCAS 0,5% na dieta de frangos da linhagem Leghorn reverteu significativamente o efeito sobre o crescimento dos animais quando alimentados com dietas contendo $7,5 \text{ mg kg}^{-1}$ AFB₁.

Oguz et al. (2000), observaram que a incorporação de clinoptilolita a 1,5% e 2,5% na ração de frangos contaminada com $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de aflatoxina foi suficiente para prevenir a intoxicação. Resultados similares foram encontrados por Parlat et al. (1999), descrevendo que a adição da clinoptilolita reduziu significativamente os efeitos negativos das aflatoxinas sobre o consumo de ração e o ganho de peso vivo em cordornas japonesas.

Com relação às leveduras, diversos produtos a base de PCL têm sido avaliados como agentes descontaminantes das aflatoxinas em frangos de corte (KARAMAN et al., 2005; SANTIN et al., 2003; STANLEY et al., 2004). Glucomananos incorporados na dieta em doses, em torno de 1 g kg^{-1} , reduziram os efeitos negativos de dietas contaminadas com 2 mg kg^{-1} de aflatoxinas em frangos de corte de 1 a 21 dias de idade e diminuíram a gravidade das alterações. Em matrizes de 35 semanas de idade, 1 mg kg^{-1} de aflatoxina não afetou a fertilidade. No entanto, a produção de ovos (57,6%), porcentagem de eclodibilidade (67,6%), mortalidade embrionária (24%), proteína sérica total, globulina e albumina foram significativamente afetadas pela aflatoxina. A inclusão da PCL 0,1% na dieta contaminada elevou o nível de eclodibilidade (74,9 vs 67,6%), produção de ovos (65,83 vs 57,26%), e reduziu a mortalidade embrionária (16,8 vs 24%). Os níveis séricos de globulina e albumina

foram reduzidos em galinhas alimentadas com aflatoxina, mas foram parcialmente restaurados com a adição da PCL. Estes dados demonstraram que as PCL podem melhorar o desempenho de frangos de corte e matrizes alimentados com rações contaminadas com aflatoxinas (KARAMAN et al., 2005).

1.5 Hipótese

“Paredes celulares de leveduras incorporados na dieta são capazes de reduzir os efeitos da aflatoxicose em frangos de corte sem causar efeitos deletérios.”

1.6 Objetivos Específicos

- a) Produzir AFB₁ para realização dos ensaios *in vivo*.
- b) Estudar o efeito da adição de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte (peso vivo, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar).
- c) Avaliar o efeito da adição de parede celular de levedura sobre o peso relativo e histopatologia de órgãos, e enzimas séricas de frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O local dos ensaios *in vivo* foi o Galpão Experimental do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM) nas dependências do Projeto Sanidade Animal (PSA), convênio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado na cidade de Seropédica/RJ.

2.2 Aves Experimentais

Foram utilizados 288 frangos de corte, machos, da linhagem Cobb, recebidos com um dia de idade, vacinados contra a Doença de Marek⁴, NewCastle⁵ e Gumboro⁶, com peso inicial médio de 42 g, os quais foram alojados em gaiolas de baterias metálicas.

2.3 Delineamento Experimental

O período experimental foi de 21 dias tendo início em 12 de Janeiro de 2010 e término no dia 02 de Fevereiro de 2010. As aves foram distribuídas em delineamento de blocos ao acaso, com quatro tratamentos e oito repetições. Ao todo, foram utilizados 72 animais por tratamento (9 aves por gaiola, 36 aves por bloco, 2 blocos por tratamento), e os tratamentos consistiram de:

T01 = Dieta com 0 ppm de AFB₁ e 0,0 % do AAM-1 (controle negativo)

T02 = Dieta com 0 ppm de AFB₁ e 0,2% do AAM-1 (controle do aditivo)

T03 = Dieta com 1 ppm de AFB₁ e 0,0% do AAM-1 (controle positivo)

T04 = Dieta com 1 ppm de AFB₁ e 0,2% do AAM-1

⁴ Nobilis[®] Marexine CA 126 (Intervet do Brasil)

⁵ Avinev[®] (Merial Brasil)

⁶ Cevac[®] Transmune IBD (Ceva Sante Animale)

2.4 Dieta e Manejo

Utilizou-se uma dieta comercial⁷ a base de milho e soja, formulada para atender as exigências nutricionais na fase inicial (1 a 21 dias). A composição e níveis nutricionais informados pelo fabricante encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Composição e perfil nutricional da dieta utilizada durante o experimento.

Composição Básica do Produto
Milho Integral Moído (60,57%), Farelo de Soja, Farinha de Carne e Ossos, Calcário Calcítico, Cloreto de Sódio (Sal Comum), Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina B12, Ácido Nicotínico, Ácido Fólico, Vitamina K3, Biotina, Pantetonato de Cálcio, Cloreto de Colina, Óxido de Zinco, Sulfato de Manganês, Sulfato de Cobre, Sulfato de Ferro, Iodato de Cálcio, Selenito de Sódio, DL-Metionina, Promotor de Crescimento e Eficiência Alimentar e Coccidiostático.
Eventuais Substitutivos
Farelo de Glúten de Milho 21, Farelo de Glúten De Milho 60, Fosfato Bicálcico, Farinha de Peixe, Farelo de Algodão.
Níveis de Garantia / Kg
Umidade (máx.) 12,00 %, Proteína Bruta (mín.) 22,00 %, Extrato Etéreo (mín.) 2,00 %, Matéria Fibrosa (máx.) 4,00 %, Matéria Mineral (máx.) 6,00 %, Cálcio (máx.) 1,20 %, Cálcio (mín.) 0,80 %, Fósforo (mín.) 0,30 %, Ácido Fólico (mín.) 0,40 mg, Biotina (mín.) 0,06 mg, Colina (mín.) 0,26 g, Metionina (mín.) 1,68 g, Cobre (mín.) 9,00 mg, Ferro (mín.) 30,00 mg, Iodo (mín.) 1,00 mg, Manganês (mín.) 60,00 mg, Niacina (mín.) 35,00 mg, Selênio (mín.) 0,25 mg, Vitamina A (mín.) 11.000 UI, Vitamina B1 (mín.) 1,20 mg, Vitamina B12 (mín.) 16,00 µg, Vitamina B2 (mín.) 4,50 mg, Vitamina B6 (mín.) 2,00 mg, Vitamina D3 (mín.) 2.000 UI, Vitamina K3 (mín.) 1,50 mg, Zinco (mín.) 60,00 mg, Pantotenato de Cálcio (mín.) 10,00 mg, Halquinol (mín.) 30,00 mg, Narasin (mín.) 50,00 mg, Nicarbazina (mín.) 50,00 mg, Vitamina E (mín.) 16,00 UI.

⁷ No Ramo Corte Inicial - Ração para Alimentação de Aves de Corte Inicial (No Ramo Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, São José do Vale do Rio Preto/RJ)

Cada compartimento era provido de bebedouro e comedouro onde as aves receberam água e ração *ad libitum*. Os pintos foram pesados após o recebimento e distribuídos nas unidades experimentais de forma que o peso vivo de cada tratamento tivesse uma média semelhante. As aves foram monitoradas diariamente, três vezes ao dia, por alterações de morbidade e mortalidade, bem como registro das temperaturas máxima, mínima e atual dentro das baterias. O galpão experimental dispunha de aparatos para o aquecimento artificial ou ventilação/climatização do ambiente, bem como janelas com cortinas, sendo o manejo destes realizado levando-se em consideração o conforto térmico das aves segundo a faixa etária (GRANJA PLANALTO, 2006). O programa de iluminação utilizado foi o contínuo, com 24 horas de luminosidade, natural e/ou artificial.

2.5 Parâmetros Analisados

a) Peso vivo (PV)

Determinado pela pesagem de todas as aves ao 1º, 7º, 14º e 21º dia de idade.

b) Ganho de peso (GP)

Calculado ao 7º, 14º e 21º dia de idade através da diferença entre o peso inicial e final. O ganho de peso corrigido foi determinado através da correção pelo número médio de aves.

c) Consumo de ração (CR)

Calculado ao 7º, 14º e 21º dia de idade considerando-se a ração fornecida e as sobras de rações nos comedouros.

d) Conversão alimentar (CA)

Calculada ao 7º, 14º e 21º dia de idade através da divisão do consumo de ração pelo peso vivo das aves. Foi realizada correção para as aves mortas ou descartadas.

e) Pesos relativos

Aos 21 dias de idade, 24 aves de cada tratamento foram abatidas para a avaliação dos pesos relativos de fígado e rins em relação ao peso vivo pós-jejum da respectiva ave.

f) Análises sanguíneas

Foram coletadas amostras de sangue, na fase de sangria durante o abate, em tubos com e sem anticoagulante para determinação de proteínas totais (PT) e das enzimas alanina-amino-transferase (ALT) e aspartato-amino-transferase (AST) para avaliação hepática, e ácido úrico para avaliação renal.

g) Análises histopatológicas

Amostras de fígado (órgão alvo da AFB₁) foram coletadas para avaliação histopatológica. Para isso, os órgãos foram coletados e acondicionados em formol 10% tamponado nas primeiras 24 h, e após em álcool 70%. Os fragmentos de tecidos foram processados de acordo com as técnicas histopatológicas usuais e os tecidos corados com hematoxilina-eosina (GIACOMINI et al., 2006).

h) Análise estatística

Os dados de desempenho e sanguíneos foram submetidos à ANOVA. Onde ocorreram diferenças significativas, ao nível de 5% de significância, foi aplicado o teste de comparação de médias LSD (*Least Square Difference*). As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS[®].

2.6 Produção de Aflatoxina B₁

A AFB₁ foi produzida nos laboratórios do NPMM/UFRRJ, a partir da fermentação controlada de arroz branco polido por *A. parasiticus* NRRL 2999, de acordo com Shotwell et al. (1966) com modificações. Todo o núcleo de AFB₁ foi autoclavado, seco a 50°C e triturado (granulometria de 20 mesh). A micotoxina foi extraída e purificada através de coluna MycoSep[®] 226 AflaZon de acordo com as informações do fabricante⁸, sendo em seguida quantificada por CLAE. Após a quantificação, o núcleo foi incorporado à ração das aves em proporção conveniente utilizando um misturador mecânico tipo “Y”. Após esta etapa, uma nova extração e quantificação por CLAE foi realizada a fim de se obter a concentração final de 1 ppm de AFB₁ na ração experimental.

⁸ Romer Labs Diagnostic GmbH, Áustria

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos relatos na literatura envolve quadros experimentais de aflatoxicose aguda, com contaminações variando de 2 a 5 mg kg⁻¹ AFB₁ na dieta. Estas altas concentrações da toxina podem ajudar a intensificar os sinais da doença, fazendo com que os efeitos dos aditivos sejam mais facilmente observados no período experimental (BATINA et al., 2005; GIACOMINI et al., 2006; MIAZZO et al., 2000; ROSA et al., 2001).

O PV dos quatro tratamentos no 1º, 7º, 14º e 21º dias de idade estão apresentados na Tabela 2. Aos 7 dias, a média de PV dos animais pertencentes ao T03 foi inferior às demais médias. Esta diminuição de PV é um efeito negativo da dieta com AFB₁ (1 ppm) resultado de acordo com o estudo de Aravind et al. (2003), que utilizaram para frango de corte uma concentração bem menor de toxina - 0,168 ppm de AFB₁ - sem a adição de AAM, e já observaram redução significativa no PV das aves intoxicadas.

Aos 21 dias, a maior média de PV correspondeu aos animais do T04, e a menor foi observada nos animais do T03. O AAM foi capaz de elevar o PV aos 21 dias, resultado semelhante ao encontrado por Lopes et al. (2006), que testaram o efeito da adição de bentonita sódica (AAM inorgânico), na ração de frangos de corte.

Tabela 2: Peso vivo dos animais no 1º, 7º, 14º e 21º dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Peso Vivo (g) ¹			
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	42,26 ± 0,27 ^a	157,44 ± 9,35 ^a	453,41 ± 4,56 ^a	746,11 ± 5,34 ^{ab}
T02: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	42,35 ± 0,28 ^a	158,63 ± 3,75 ^a	458,85 ± 17,30 ^a	777,15 ± 3,67 ^{ab}
T03: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	42,35 ± 0,13 ^a	142,04 ± 7,91 ^b	383,33 ± 5,56 ^b	709,73 ± 2,27 ^b
T04: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	42,44 ± 0,28 ^a	160,85 ± 2,33 ^a	456,26 ± 3,89 ^a	809,29 ± 59,18 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

a, b - Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD (p<0,05)

O melhor desempenho zootécnico pode ser atribuído aos polissacarídeos presentes na parede celular das leveduras, que promovem um ambiente intestinal saudável, estimulam respostas imunológicas, e podem seqüestrar toxinas. Entretanto, Benites et al. (2008) avaliando o desempenho de aves intoxicadas aos 21 dias alimentadas com 0,5 g kg⁻¹ (0,05%) de parede celular de *S. cerevisiae* não observaram aumento no PV e no GP das aves que receberam o aditivo, indicando que os efeitos benéficos devem ser dose dependentes.

O GP dos quatro tratamentos aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Tabela 3. O menor GP aos 7 dias (T03) está relacionado ao efeito negativo da AFB₁. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Miazzo et al. (2005), que testaram uma concentração de 2,5 ppm aos 33 dias de tratamento e obtiveram uma redução do GP das aves intoxicadas.

As aves do T04 alcançaram maior média de GP quando comparadas às demais aos 21 dias de idade. Contrariando estes resultados, Santín et al. (2003) relatam que o AAM testado em seu experimento não foi capaz de alterar o GP nem o PV das aves.

Tabela 3: Ganho de peso dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Ganho de Peso (g) ¹		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	115,30 ± 9,49 ^a	291,06 ± 23,23 ^a	329,44 ± 2,51 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	118,96 ± 1,22 ^a	293,26 ± 16,07 ^a	331,14 ± 11,78 ^a
T03: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	99,63 ± 7,99 ^b	243,44 ± 4,61 ^b	323,56 ± 1,57 ^b
T04: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	115,63 ± 3,20 ^a	293,50 ± 8,05 ^a	331,95 ± 65,43 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

a, b - Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD (p<0,05)

O CR dos animais dos quatro tratamentos nos dias 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Tabela 4. E os resultados se assemelham aos de PV e GP, com menores médias para as aves intoxicadas a partir de 7 dias. Estes dados confirmam as observações de Aravind et al. (2003), Giacomini et al. (2006), Lopes et al. (2006) e Santín et al. (2003), que em seus experimentos também observaram efeito da AFB₁ na redução do CR. No geral, o CR foi inferior ao esperado em todos os tratamentos, em função da elevada temperatura interna do aviário, cerca de 30°C na região, apesar da utilização de nebulizadores e ventiladores.

Tabela 4: Consumo de ração dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Consumo de Ração (g) ¹		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	150,46 ± 1,68 ^a	406,55 ± 10,33 ^a	556,58 ± 43,73 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	156,27 ± 4,61 ^b	411,81 ± 17,50 ^a	560,75 ± 36,42 ^a
T03: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	148,22 ± 3,30 ^a	384,47 ± 15,65 ^b	518,61 ± 13,81 ^b
T04: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	155,11 ± 4,13 ^b	405,30 ± 11,31 ^a	558,95 ± 65,90 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

a, b - Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD (p<0,05)

O valor da CA dos animais dos quatro tratamentos aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na Tabela 5. Os resultados sobre a eficácia de AAM à base de parede de leveduras dependem do manejo, composição do produto, idade e estado sanitário das aves, mas em geral, estes produtos são reportados como capazes de reverter efeitos negativos das aflatoxicoses em frangos e podem melhorar a conversão alimentar na presença ou não de micotoxinas na dieta (ROLL et al., 2010).

Tabela 5: Conversão alimentar dos animais aos 7, 14 e 21 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Conversão Alimentar (g/g) ¹		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	0,89 ± 0,04 ^{ab}	1,30 ± 0,08 ^a	1,53 ± 0,09 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	0,89 ± 0,04 ^{ab}	1,31 ± 0,04 ^a	1,48 ± 0,06 ^a
T03: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	0,85 ± 0,08 ^b	1,34 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,07 ^a
T04: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	0,92 ± 0,01 ^a	1,28 ± 0,04 ^a	1,52 ± 0,12 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

a, b - Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD (p<0,05)

Neste trabalho, o AAM-1 (PCL 0,2%) não melhorou significativamente a CA, discordando dos trabalhos de Čelýk; Denlý e Savas (2003) e de Santín et al. (2003). Nesse tipo de estudo, a avaliação da conversão alimentar deve ser feita com cuidado e critério, pois a adição de aflatoxina na dieta provoca um marcante efeito na redução do ganho de peso e do

consumo alimentar, resultando, muitas vezes, em conversões alimentares similares. Desta forma, as principais variáveis a serem consideradas devem ser o peso vivo, o ganho de peso e o consumo de ração, sendo a conversão alimentar analisada como um critério posterior ou de desempate na avaliação de múltiplos produtos.

Os resultados dos pesos relativos de fígados e rins dos animais dos quatro tratamentos ao final do experimento estão apresentados na Tabela 6. A AFB₁ e/ou o AAM na dieta não afetaram o peso relativo dos órgãos avaliados, entretanto, os maiores valores foram apresentados em T03. Apesar da literatura relatar um aumento significativo dos pesos relativos destes órgãos (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995), assim como em nosso estudo, Santín et al. (2003), também não encontraram variações expressivas.

Tabela 6: Efeito dos tratamentos sobre o peso relativo de órgãos ao 21º dia de idade.

Tratamentos	Peso Relativo de Órgãos (%) ¹	
	Fígado	Rins
T01: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	2,48 ± 0,21 ^a	0,63 ± 0,08 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	2,44 ± 0,18 ^a	0,62 ± 0,07 ^a
T03: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	2,50 ± 0,17 ^a	0,71 ± 0,10 ^a
T04: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	2,29 ± 0,18 ^a	0,61 ± 0,22 ^a

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

a - Médias com mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente segundo teste de LSD

Os resultados obtidos nas análises sanguíneas estão apresentados na Tabela 7. No que se refere à concentração das proteínas plasmáticas totais, apesar de não haver diferença estatística significativa, os dados indicam que ao final do experimento, houve uma redução na concentração de proteínas totais nas aves intoxicadas (2,98 g dL⁻¹) em relação ao grupo controle negativo (3,25 g dL⁻¹), o que concorda com os resultados obtidos por Batina et al. (2005), Franciscato et al. (2006) e Quezada et al. (2000), que também obtiveram diminuição de proteínas totais e albumina, em intoxicações experimentais por AFs. A diminuição das concentrações séricas de proteínas e albumina são indicadores confiáveis de hepatotoxicidade em frangos e perus, em consequência da aflatoxicose, sendo esta redução atribuída ao bloqueio da síntese de RNA e inibição da síntese protéica no fígado.

No grupo das aves intoxicadas, a AST manteve-se em níveis normais comparando-se com o grupo controle negativo e ocorreu aumento significativo da ALT. A ALT é uma enzima encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma do fígado, fazendo com que

se eleve rapidamente após a lesão hepática aguda. Já a AST, é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado, músculos esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos, e, portanto, sua elevação só ocorre quando há um comprometimento mais profundo dos hepatócitos. Nossos resultados concordam com Batina et al. (2005) que também não encontraram alterações significativas nos níveis séricos de AST.

Houve um aumento significativo nos níveis séricos de ácido úrico nos animais de T03. Nas aves, o produto final do metabolismo de compostos nitrogenados que se apresenta em maior quantidade no sangue é o ácido úrico. Esse é excretado primariamente pela secreção tubular e é independente à reabsorção de água. Os valores plasmáticos normais do ácido úrico variam conforme a espécie, idade, dieta alimentar, entre outros fatores, no entanto, sabe-se que estados de necrose elevam os valores plasmáticos desse metabólito (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007). Nos casos de aflatoxicose aguda, as alterações histopatológicas mais frequentes revelam uma desorganização da estrutura hepática (distrofia) e uma grave necrose hepática (degeneração gordurosa) (ROSA et al., 2001), o que explica os valores encontrados em nosso estudo.

Tabela 7: Efeito dos tratamentos sobre parâmetros sanguíneos das aves ao 21º dia de idade.

Tratamentos	Análises sanguíneas ¹			
	PT (g dL ⁻¹)	AST (UI I ⁻¹)	ALT (UI I ⁻¹)	Ácido Úrico (mg dL ⁻¹)
T01: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	3,25 ±	307,75 ±	27,50 ±	16,7 ±
	0,44 ^a	73,08 ^b	23,56 ^b	1,2 ^b
T02: 0 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	3,04 ±	370,83±	29,00±	18,11 ±
	0,15 ^a	83,99 ^a	27,25 ^b	1,9 ^b
T03: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,0%	2,98 ±	318,52 ±	37,00 ±	38,38 ±
	0,24 ^a	69,50 ^b	8,9 ^a	3,7 ^a
T04: 1 ppm AFB ₁ + AAM-1 0,2%	3,24 ±	274,25 ±	23,25 ±	17,0 ±
	0,33 ^a	12,18 ^b	19,47 ^b	0,6 ^b

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições

a, b - Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD (p<0,05)

Em relação aos achados anatomopatológicos (Figura 1), os animais de T01 e T02 não mostraram lesões macroscópicas dignas de nota. Os frangos de T03 apresentaram fígados geralmente aumentados, pálidos, amarelados, friáveis e com focos hemorrágicos difusos pelo

parênquima. Já o grupo T04 apresentou alguns poucos animais com alterações macroscópicas no parênquima hepático, que se caracterizaram por áreas focais de congestão e hemorragias.

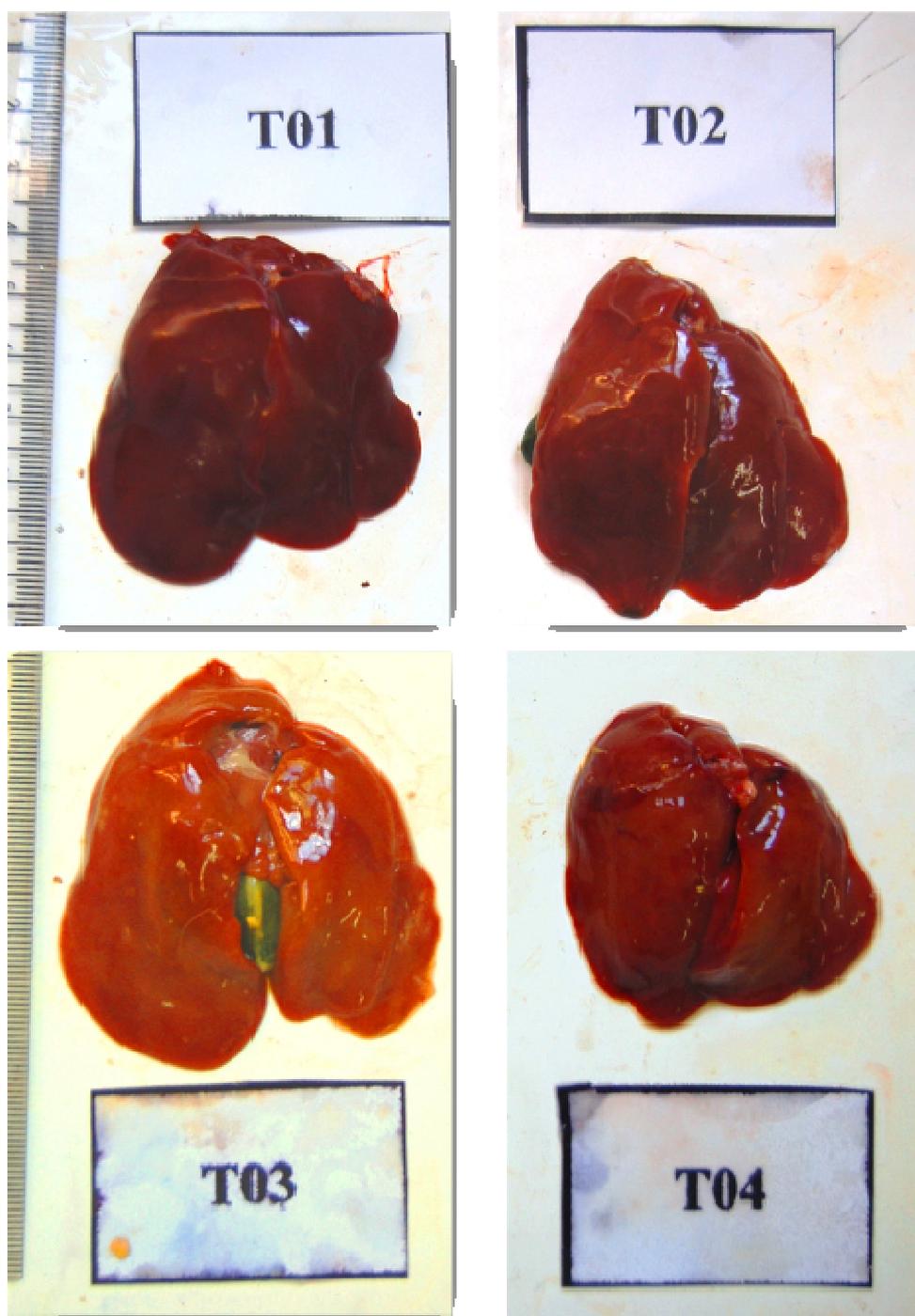


Figura 1: Fígados representativos dos frangos (21 dias de idade) submetidos aos diferentes tratamentos. Macroscopicamente, observam-se em T02 (controle do aditivo) e T04 (AFB₁ + AAM-1), fígados com aparência e tamanhos normais, semelhantes ao T01 (controle negativo). Fígados de T03 (controle positivo) apresentaram-se com esteatose e ligeira hepatomegalia.

Microscopicamente (Figura 2), as análises histopatológicas indicaram em T01 morfologia dos hepatócitos e ductos biliares normais, mostrando cordões de hepatócitos periportais preservados. Em T02 ocorreu disposição hepatocitária normal com presença de aglomerados de células basofílicas (células de Kupfer); morfologia dos hepatócitos e ductos biliares foi normal. O grupo das aves intoxicadas (T03) apresentou áreas de necrose hepatocitária, alguns hepatócitos com núcleo picnótico, vacuolização intracitoplasmática, áreas de hemorragia periportal, além de congestão de veia centrolobular e sinusoidal. Por fim, as aves intoxicadas e tratadas com o aditivo (T04) apresentaram necrose e picnose nuclear individual de alguns hepatócitos, além de áreas localizadas de vacuolização intracitoplasmática; a morfologia dos ductos biliares apresentou-se normal e houve presença de alguns aglomerados de células basofílicas.

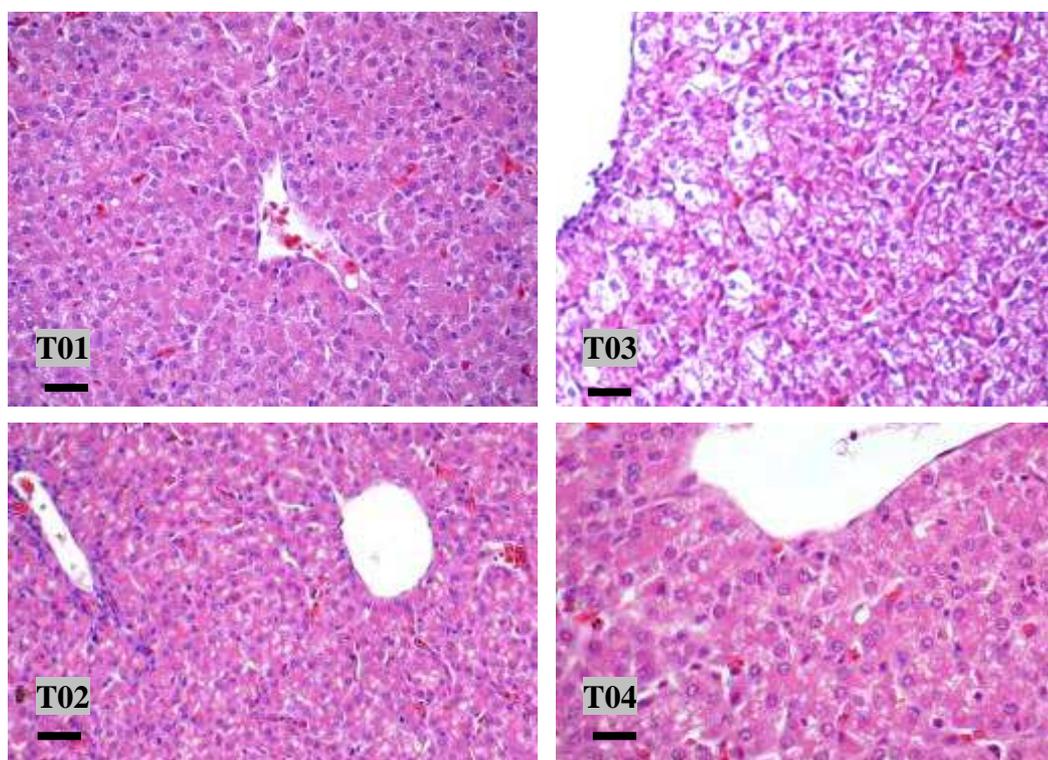


Figura 2: Cortes histológicos (400x, HE) de fígados representativos dos frangos (21 dias de idade) submetidos aos diferentes tratamentos. T01 apresenta-se com histologia normal mostrando cordões de hepatócitos periportais preservados; T02 também apresenta histologia normal, apenas com a presença de alguns aglomerados de células basofílicas. T03 apresenta completa desorganização de hepatócitos com áreas de necrose multifocal e vacuolização intracitoplasmática; T04 apresenta cordões de hepatócitos preservados com áreas localizadas de vacuolização intracitoplasmática e picnose nuclear. Barra equivalente a 10 µm.

Os resultados obtidos estão de acordo com Baptista et al. (2002) e Çelyk; Denly e Savas (2003), os quais observaram desorganização celular, com proliferação de ductos biliares, necrose do parênquima hepático, vacuolização, hepatócitos inchados, degeneração gordurosa e retenção de pigmentos ao examinarem os tecidos hepáticos dos animais que receberam dietas contaminadas por AFs. As informações obtidas no presente trabalho indicam que a dose de AFB₁ ministrada e o tempo de exposição dos animais foram suficientes para que estes manifestassem hepatotoxicidade.

Através destes resultados observa-se que os animais que receberam suplementação com a PCL na concentração de 0,2% apresentaram pronunciada redução dos danos promovidos pela AF aos hepatócitos quando comparados com os animais do grupo controle positivo que recebeu dieta basal mais AFB₁ (T03). Além disso, a histologia hepática destes animais (T02) revela características bastante similares às daquelas do fígado de animais que receberam dieta livre de toxina (T01). Isso reforça a hipótese de que as leveduras, e seus derivados, são capazes de reduzir quadros de micotoxicoses, podendo ser aplicadas em alimentos destinados à produção animal.

4 CONCLUSÕES

- ✓ A presença de AFs na dieta de frangos de corte, durante os primeiros 21 dias de vida determinaram perdas significativas no desempenho destas aves. A inclusão de 1 ppm de AFB₁ na dieta foi capaz de afetar os parâmetros produtivos testados (PV, GP, CR) no grupo das aves intoxicadas em relação ao grupo controle negativo, exceto a CA. Entretanto, a CA não deve ser avaliada isoladamente já que esteve atrelada ao menor ganho de peso das aves de T03.
- ✓ Os pesos relativos dos órgãos (fígado e rins) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos não diferiram estatisticamente, indicando que os efeitos do nível de contaminação (1 ppm) e do tempo de exposição (21 dias) dos animais à AFB₁ não foram suficientes para provocar modificações que pudessem ser observadas pela mudança no peso relativo destes órgãos nos indivíduos avaliados.
- ✓ A AFB₁ na concentração de 1 ppm diminuiu a função hepática, evidenciada principalmente pelo aumento da concentração sérica da ALT e prejudicou a excreção renal de metabólitos, evidenciada pela elevação sérica de ácido úrico.
- ✓ A inclusão do AAM-1, na concentração de 0,2 %, na dieta não produziu nenhum efeito deletério significativo sobre os parâmetros avaliados, sendo inclusive, capaz de melhorar significativamente vários dos parâmetros analisados, em relação ao grupo de animais intoxicados e mesmo quando comparados ao tratamento controle.
- ✓ O AAM-1 demonstrou ser eficaz como aditivo melhorador de desempenho zootécnico e na prevenção dos efeitos tóxicos da AFB₁ sobre a função e o tecido hepático.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG,H.D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2054-2059, 2001.

ALMEIDA, A.V.A.F.; BOTURA, M.B.; ABREU, R.D.; BITTENCOURT, T.C.C.; BATATINHA, M.J.M. Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 76, n. 3, p. 353 - 358, 2009.

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.M. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap59, p. 939-367.

ARAVIND, K.L.; PATIL, V.S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S.P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract micotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 571-576, 2003.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; GLÓRIA, E.M.; SALGADO, J.M.; VIZIOLI, M.R. Utilization of thermolysed and active yeast to reduce the toxicity of aflatoxin. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2 , p. 257-260, 2002.

BATINA, P.N.; LOPES, S.T.A.; SANTURIO, J.M.; SOUZA, C.; MARTINS, D.B. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 826-831, 2005.

BENITES, V.; GILHARRY, R.; GERNAT, A.G.; MURILLO, J.G. Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 4, p. 471-475, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988. Determina os padrões mínimos de matéria prima destinada à alimentação animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 14 de novembro de 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 de julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 05 de agosto de 2009. Estabelece critérios e procedimentos para o registro de produtos, para rotulagem e propaganda e para isenção da obrigatoriedade de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de agosto de 2009.

ÇELÝK, K.; DENLÝ, M.; SAVAS, T. Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. R. Bras. Zootec., 32 (3): 615–619, 2003.

DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.

EFSA. **Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety**. Parma, Italy: European Food Safety Authority. 2009. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/22e.htm>> Acesso em: 10 jan. 2012

EU - EUROPEAN UNION. Commission Directive nº 100 of 01 November 2003. **Official Journal of the European Union**. L. 285, p. 33-37.

FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.A.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S.T.A.; SANTURIO, J.M.; WOLKMER, P.; MACIEL, R.M.; PAULA, M.T.; GARMATZ, B.C.; COSTA, M.M. Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1573-1577, 2006.

GIACOMINI, L.Z.; FICK, F.A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; RAUBER, R.H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GIMENO, A.; MARTINS, M.L. **Micotoxinas en pollos y gallinas: ¿Habrà más riesgos de micotoxicosis con el uso de nuevas materias primas?** XLV Symposium de Avicultura, 2008. Barcelona, España. Disponível em: <<http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/micotoxinas-pollos-gallinas-habra-t1973/165-p0.htm>> Acesso em 10 jan. 2012.

GRANJA PLANALTO. **Manual do Frango de Corte**. Minas Gerais: Granja Planalto Ltda. 2006. Disponível em: <http://www.granjaplanalto.com.br/MANUAL_MOD%20REV.%2003_18_09_06.pdf> Acesso em 11 jan. 2012

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

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LOPES, J.M.; RUTZ, F.; MALLMANN, C.A.; TOLEDO, G.S.P. Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1594-1599, 2006.

MARIANI, G.V.C. **Desempenho produtivo de frangos de corte submetido à intoxicação experimental com aflatoxinas em diferentes idades**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1998. 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

MERKLEY, J.W.; MAXWELL, R.J.; PHILLIPS, J.G.; HUFF, W.E. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poultry Science**, v. 66, n. 1, p. 59-64, 1987.

MIAZZO, R.; PERALTA, M.F.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; FERRERO, S.; CHIACCHIERA, S.M.; CARVALHO, E.C.Q.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 1-8, 2005.

OGUZ, H.; KURTOGLU, V. Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v. 41, n. 4, p. 512-517, 2000.

OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 355-362, 2006.

OSBORNE, D.J.; HAMILTON, P.B. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v. 60, n. 8, p. 1818-1822, 1981.

PARLAT, S.S.; YILDIZ, A.O.; OGUZ, H. Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v. 40, n. 4, p. 495-500, 1999.

PHILLIPS, T.D.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; TAYLOR, D.R.; HEILDEBAUGH, N.D. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. **Poultry Science**, v. 67, n. 2, p. 243-247, 1988.

PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3964-3967, 1992.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A.G.; REYES, J.L. Effects of aflatoxin B(1) on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.125, n. 3, p.265-272, 2000.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 65, n. 1-4, p. 197-206, 1997.

ROLL, V.F.B.; LOPES, L.L.; ROSSI, P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F.; XAVIER, E.G. ; SILVA, S.S. Hematologia de frangos alimentados com dietas contendo aflatoxinas e adsorventes de aflatoxinas. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 93-101, 2010.

ROSA, C.A.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89-96, 2006.

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001.

SALLE, C.T.P.; RODRIGUES, O.; BAVARESCO, Á.; LORENZINI, G.; MORAES, H.L.S.; SILVA, A.B.; SALLE, F.O.; NASCIMENTO, V.P.; FALLAVENA, L.C.B. Detecção de aflatoxina B₁, no organismo de frangos de corte através do emprego de ensaio imunoenzimático utilizando anticorpos monoclonais (ELISA). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 1, p. 27-30, 2002.

SANTIN, E.; PAULILLO, A.C.; KRABBE, E.L.; ALESSI, A.C.; POLVEIRO, W.J.C.; MAIORKA, A. Low level of aflatoxina in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeasts as adsorbent of aflatoxin. **Archives of Veterinary Sciences**, v. 8, n. 2, p. 51-55, 2003.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SCHAEFFER, J.L.; HAMILTON, P.B. Interactions of mycotoxins with feed ingredients. Do safe levels exist? In: SMITH, J.E.; HENDENSON, R.S. (Eds). **Mycotoxins and Animal Foods**. United States: CRC Press, 1991. p. 827-843

SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W.; STUBBLEFIELD, R.D. & SORENSON, W.G. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 425-428, 1966.

STANLEY, V.G.; WINSMAN, M.; DUNKLEY, C.; OGUNLEYE, T.; DALEY, M.; KRUEGER, W.F.; SEFTON, A.E.; HINTON, A. The impact of yeast culture residue on the suppression of dietary aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 4, 533-539, 2004.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **História da Avicultura no Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2675>> Acesso em: 10 jan. 2012

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual Ubabef 2010/2011**. 2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>> Acesso em: 10 jan. 2012

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesta tese de doutorado, tanto as paredes celulares de leveduras como as leveduras vivas provaram ser excelentes alternativas descontaminantes de aflatoxina B₁. E verificamos que novas linhas de pesquisa podem ser projetadas e desenvolvidas no futuro para prevenir e controlar a presença das micotoxinas na alimentação animal. Entre elas podemos destacar:

- * Estudar a influência da co-ocorrência de diferentes micotoxinas na capacidade de adsorção.

- * Realizar estudos de adsorção com concentrações de ocorrência natural das micotoxinas e na presença da matriz (alimento).

- * Confirmar se a remoção das micotoxinas por sequestrantes de origem biológica se dá por um processo exclusivamente de adsorção ou se ocorre degradação, com a formação de novos metabólitos (caracterizar e estabelecer a toxicidade destes novos compostos).

- * Estudar, através de ressonância magnética nuclear, a natureza química dos processos envolvidos na remoção das micotoxinas.

- * Estudar os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos benéficos dos probióticos: analisar a natureza das substâncias antimicrobianas produzidas; verificar modulação do sistema imunológico do hospedeiro; realizar ensaios de toxicidade das cepas para confirmar sua inocuidade aos animais.

Estes estudos seriam necessários para complementar e apoiar de forma significativa os avanços na nutrição animal e melhorar nossa compreensão do papel benéfico da *Saccharomyces cerevisiae* e seus derivados na descontaminação de micotoxinas em alimentos.