



Efeito do probiótico *Lactobacillus plantarum* e prebióticos na  
redução e bioacessibilidade da aflatoxina B<sub>1</sub> no leite

**Rute Alexandra Machado Vasconcelos**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para a obtenção do  
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

**Professora. Dra. Deisy Alessandra Drunkler**

**Professora. Dra. Paula Cristina Azevedo Rodrigues**

**Bragança**

**2016**





Efeito do probiótico *Lactobacillus plantarum* e prebióticos na redução e bioacessibilidade da aflatoxina B<sub>1</sub> no leite

**Rute Alexandra Machado Vasconcelos**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para efeito da obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar e como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos através do acordo de Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

**Bragança**

**2016**



*Aos meus pais, pelo exemplo de vida*  
*Às minhas irmãs*



## **Agradecimentos**

Na concretização deste trabalho não poderia deixar de reconhecer e agradecer aos demais participantes pela conquista dos meus objetivos.

Àquele que me acalma, que incentiva o meu espírito, instiga o meu coração, me leva sempre à descoberta de um novo amanhecer e que enche o meu coração de luz e sabedoria interior.

Aos meus pais João e Filomena Vasconcelos, pelos ensinamentos, educação e compreensão acima de tudo. Por todo amor, carinho e dedicação ao longo destes anos. Sem vocês nada seria possível.

Às minhas irmãs Lia e Matilde Vasconcelos, que em todos os momentos me souberam confortar e incentivar, pela genuinidade e por serem minhas confidentes. Em especial à Lia por ser a minha imagem, por viver no meu mundo paralelo, próprio, nosso.

Ao meu amor Nelson Edra, que me faz sentir completa e valorizada. Que me acalma nas angústias e transmite esperança, mostrando que não existem barreiras quando o amor é verdadeiro.

À minha orientadora e co-orientadora, Professora Dra. Deisy Drunkler e Professora Dra. Paula Rodrigues, exemplos de mulheres sábias, lutadoras e determinadas na procura do “saber mais”; guias incansáveis nesta caminhada e que contribuíram firmemente no despertar do meu entusiasmo e curiosidade sobre todas as interações vivas que nos rodeiam, acrescentando mais um pedaço de ciência em mim. Obrigado pela amizade, carinho, dedicação e disponibilidade.

O meu reconhecimento aos professores e colegas do Departamento de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, especialmente à Professora Dra. Aziza Genena e Professor Dr. Ilton Baraldi por nos acolherem tão bem, por terem sido em muitos momentos a família que precisávamos mostrando que nos caminhos trilhados

podemos sempre aperfeiçoar aquilo que já foi feito; à Kátia Wochner, Andressa Centenaro e Tânia Becker-Algeri pela atenção, companheirismo, tempo dedicado em laboratório e ajuda em todos os momentos. Levo vocês no meu coração.

Agradeço às empresas especializadas SACCO®, Sigma Chemical Company®, Orafti®, DuPont-Danisco e ProamOat™ Tate & Lyle que gentilmente contribuíram com os seus produtos de forma a valorizar ainda mais este trabalho.

Ao Professor Dr. Albino Bento, por ter contribuído vivamente para o desenrolar desta experiência internacional. Um bem haja aos acordos estabelecidos para que possam aos demais interessados ser tão gratificante quanto foi para mim.

Mais uma vez e sempre, aos meus companheiros de viagem Lia Vasconcelos e Hugo Teixeira por juntarem-se nesta aventura, pelas descobertas que fizemos juntos, pelo amparo em momentos difíceis e pelos sorrisos partilhados. Sem vocês seria um dia incompleto.

Aos membros da banca, obrigada pela disponibilidade e contribuições.

“Não tenhamos pressa, mas não percam tempo”.

(José Saramago).

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. mas tenho que querer o que for.  
O êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga,  
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

(fernando pessoa).



## Resumo

O leite constitui uma das fontes de nutrientes da dieta humana devido à sua composição nutricional, rica em proteínas de alto valor biológico, lípidos, minerais e vitaminas. No entanto, o seu consumo está relacionado à ingestão de contaminantes químicos como as micotoxinas. A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é a mais prevalente e a mais tóxica e quando ingerida por animais domésticos, tal como vacas leiteiras, através do consumo de rações contaminadas, é excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais. Considerando que esses contaminantes são estáveis aos tratamentos térmicos, o uso de micro-organismos que por meio de sua capacidade de ligação e/ou inibição com as aflatoxinas podem promover a redução dos níveis disponíveis para absorção e distribuição no organismo, têm despertado a atenção dos pesquisadores. O destaque vai para as bactérias ácido lácticas (BAL) amplamente utilizadas na indústria de laticínios que conferem maior disponibilidade de nutrientes e possível redução de contaminantes. Em relação aos prebióticos, poucos trabalhos tem avaliado a ação de descontaminação destes compostos e sugere-se, ainda, que possam ser sinérgicos aos probióticos na remoção das micotoxinas. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a ação do micro-organismo probiótico do género *Lactobacillus* e dos prebióticos inulina, beta-glucana, polidextrose e oligofrutose, isolados ou combinados, em leites contaminados artificialmente por AFB<sub>1</sub>, para avaliar a redução dessa micotoxina e sua biodisponibilidade após digestibilidade em um modelo de digestão *in vitro*. *Lactobacillus plantarum* foi inoculado nas amostras fortificadas com AFB<sub>1</sub> (10 µg.L<sup>-1</sup>) com compostos prebióticos, de forma isolada e combinada, totalizando 12 ensaios distintos. A biodisponibilidade foi determinada usando a simulação da digestão gastrointestinal que mimetiza as condições fisiológicas do trato digestivo até ao compartimento do cólon. Os ensaios apresentaram capacidade de remoção de AFB<sub>1</sub> do meio, variando de 7,56% a 55,85%. O ensaio realizado com *L. plantarum* na presença de inulina, oligofrutose e beta-glucana foi o que apresentou maior redução (56%) no leite fortificado. A bioacessibilidade para a matriz láctea foi de 15,62 a 35,63% para AFB<sub>1</sub>. O melhor resultado para bioacessibilidade foi demonstrando quando introduzido o prebiótico inulina ou oligofrutose de forma individual.

**Palavras-chave:** Micotoxinas; Derivados lácteos; Bactérias ácido lácticas; Fibras alimentares.



## Abstract

The milk represents one of dietary sources of nutrients for humans due to its nutritional composition rich in high biological value proteins, lipids, minerals and vitamins. However, consumption is related to the ingestion of quimical contaminants such as mycotoxins. The aflatoxin B1 (AFB<sub>1</sub>) is the most prevalent and the most toxic and when ingested by domestic animals, as dairy cattle, through contaminated feed intake, is excreted in milk, tissues and biological fluids of these animals. Considering these contaminants are stable to heat treatments, the use of micro-organisms through its binding capacity and / or inhibition with aflatoxins, can promote the reduction of the available levels for absorption and distribution in the body have attracted the attention of researchers. The highlight is the lactic acid bacteria (LAB) widely used in the dairy industry can also provide greater nutrient availability and possible reduction of contaminants. Regarding prebiotics, few studies have evaluated the decontamination of action of these compounds and it is suggested further that the probiotics to be synergistic in the removal of mycotoxins. In this context, the study aimed to evaluate the effect of the probiotic micro-organism of *Lactobacillus* and the influence of several prebiotics inulin, beta-glucan, polydextrose and oligofructose, alone or in combination, in milk artificially contaminated with AFB<sub>1</sub>, to evaluate the reduction of that mycotoxin and bioavailability after digestibility in a *in vitro* digestion model. *Lactobacillus plantarum*, was inoculated in spiked samples with AFB<sub>1</sub> (10 µg.L<sup>-1</sup>) with prebiotic compounds, isolated and combined, a total of 12 different assays. The bioaccessibility was determined using a simulated gastrointestinal digestion that mimics the physiological conditions of the digestive tract until the colonic compartment. The tests showed capacity to remove the AFB<sub>1</sub> from the environment, ranging from 7,56% to 55,85%. The test carried out in the presence of *L. plantarum*, inulin, oligofructose and beta-glucan showed the reduction (56%) in spiked milk. The bioaccessibility of AFs from milk matrix ranged from 15,62 to 35,63% for AFB<sub>1</sub>. The best result for the bioaccessibility was demonstrated when introduced prebiotic inulin or oligofructose individually.

**Keywords:** Mycotoxins; Dairy products; Lactic acid bacteria; Food fibers.



## Índice

Agradecimentos .....	III
Resumo .....	VII
Abstract .....	IX
Índice de figura .....	XIII
Índice de tabelas .....	XV
Capítulo 1 .....	1
Introdução .....	1
Capítulo 2 .....	7
Objetivos.....	7
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 3 .....	11
Revisão da literatura .....	11
3.1 Industrialização do leite .....	13
3.2 Aflatoxinas.....	17
3.2.1 Aspectos gerais.....	17
3.2.2 Aflatoxina B <sub>1</sub> em leite e derivados lácteos .....	20
3.3 Probióticos .....	24
3.3.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112.....	28
3.4 Prebióticos .....	30
3.5 Simbióticos .....	34
Capítulo 4 .....	37
Material e métodos .....	37
4.1 Materiais, reagentes e prebióticos .....	39
4.2 Micro-organismo e estimativa da concentração bacteriana .....	39
4.3 Elaboração dos ensaios.....	40
4.4 Determinação de AFB <sub>1</sub> .....	43
4.4.1 Preparo da solução padrão de micotoxina .....	43
4.4.2 Extração e purificação da AFB <sub>1</sub> .....	44

<b>4.5 Avaliação do percentual de remoção de AFB<sub>1</sub> dos diferentes ensaios .....</b>	<b>45</b>
<b>4.6 Avaliação da bioacessibilidade de aflatoxina B<sub>1</sub> .....</b>	<b>46</b>
<b>4.7 Detecção e quantificação da AFB<sub>1</sub> .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8 Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>51</b>
<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Curva de concentração bacteriana .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Determinação da AFB<sub>1</sub> em leite .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2.1 Controlo de qualidade analítica do método .....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 Avaliação do percentual de redução e da bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> em leite por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 e prebióticos .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.1 Avaliação da bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> pela ação de probiótico e prebióticos .....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 6 .....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>75</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1 - Estrutura química de algumas aflatoxinas e seus compostos biotransformados.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2 - Amostra de leite liofilizada. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 3 - Visualização das diferentes fases da solução digerida em tubo falcon após centrifugação.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 4 - Representação simplificada do modelo efetuado para a digestibilidade in vitro.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 5 - Curva de concentração bacteriana para a cepa probiótica <i>L. plantarum</i>. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 6 - Placa de petri com colónias típicas de <i>L. plantarum</i> BG112. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 7 - Cromatograma representativo do pico padrão gerado pela aflatoxina quando diluído na amostra (<math>1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}</math>).....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 8 – Exemplos de cromatogramas das amostras em estudo.....</b>	<b>58</b>



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1 - Percentagem das frações de constituição do leite de vaca. ....</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 2 – Produção mundial de leite de vaca (mil t) registado entre os períodos de 2013 a 2016. ....</b>	<b>14</b>
<b>Tabela 3 – Quantidade de leite cru adquirida. 3º Trimestre de 2013 – 2014. ....</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 4 - Delineamento experimental Plackett &amp; Burman de 12 ensaios, com duplicata no ponto central, com os valores reais e codificados das variáveis em estudo. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 5 - Matriz de planeamento Plackett &amp; Burman de 12 ensaios com AFB<sub>1</sub>, probióticos e prebióticos. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 6 - Dados referência para a quantificação de AFB<sub>1</sub> por espectrometria. ...</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 7 - Composição dos sumos digestivos empregues no método de digestibilidade in vitro utilizado em estudo. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 8 - Valor da absorvância e concentração bacteriana. ....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 9 - Valores de precisão, LOD e LOQ para a determinação de AFB<sub>1</sub> em leite e fluido biológico. ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 10 – Matriz de planeamento Plackett &amp; Burman de 12 ensaios, com dois pontos centrais, com as variáveis independentes concentração de micotoxina, tempo, inulina, polidextrose, oligofrutose e beta-glucana e as variáveis dependentes redução (%) e bioacessibilidade (%). ....</b>	<b>60</b>
<b>Tabela 11 – Efeitos estimados e p-valores para a percentagem de redução de AFB<sub>1</sub> em função das variáveis concentração de micotoxina, tempo e prebióticos numa matriz láctea. ....</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 12 – Efeitos estimados, p-valores e percentagem de bioacessibilidade para AFB<sub>1</sub> em função das variáveis concentração de micotoxina, tempo e prebióticos numa matriz láctea. ....</b>	<b>67</b>





## Capítulo 1

### Introdução



Nos primeiros anos de vida, as principais atividades do organismo centram-se no crescimento e desenvolvimento saudável, buscando fontes de nutrientes em alimentos que promovam o bom desempenho destas funções vitais. Neste contexto, grupos de alimentos de origem animal como carne, leite e ovos, bem como os de origem vegetal, entre massas, leguminosas e cereais deverão ser ingeridos em quantidades devidamente balanceadas evitando desequilíbrios.

Como matéria-prima de grande valor, o leite e seus derivados são a base essencial na maioria das dietas alimentares já que do ponto de vista nutricional fornecem cálcio e proteína de alto valor biológico entre outros constituintes multifuncionais como vitaminas e lípidos (ADAMS; MOSS, 2000; BEZERRA, 2008).

Hoje em dia encontram-se vários tipos de leite no mercado que “respondem” às demandas dos consumidores relativamente ao sabor, nutrição, saúde e conveniência. As várias formas de comercialização variam em termos de teor em gordura, teor em lactose ou fortificação com nutrientes (vitaminas A, D e cálcio) (VAMAM; SUTHERLAND, 2001). Das possibilidades existentes, o leite encontra-se nas formas fluída, concentrada ou em pó. A forma fluída, com interesse específico no decorrer do trabalho, é classificada quanto ao tratamento térmico que recebe no estado cru (*in natura*), pasteurizado, ultrapasteurizado e esterilizado. Ainda, em relação ao teor de gordura, pode ser classificado como desnatado, semidesnatado e integral (BRASIL, 2011).

A matriz láctea pode sofrer contaminação química, física ou biológica nas diferentes etapas de processamento e distribuição. Dentre estas, destaca-se a contaminação por micotoxinas, que são compostos químicos produzidos por fungos toxigênicos. Dentre estas micotoxinas, as aflatoxinas produzidas por fungos do género *Aspergillus* spp, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, entre outras de menor significado, figuram como as principais (IHA et al., 2013). Abordando as que preferencialmente estão presentes na matriz láctea, aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) são as que se destacam. A AFM<sub>1</sub>, não sendo uma toxina produzida pelos fungos, resulta da biotransformação da AFB<sub>1</sub>. Por consequência, pela ingestão de rações e forragens contaminadas com AFB<sub>1</sub>, os animais hidroxilam as mesmas, atingindo, à posteriori, o rendimento leiteiro por serem excretadas no leite na forma de AFM<sub>1</sub> (CREPPY, 2002). Quando ingerida pelo animal por via de ração contaminada, entre valores de 0,5 a 5%, a AFB<sub>1</sub> poderá sofrer biotransformação em 90% através do seu organismo em 24 horas

(HUSSEIN, 2001). A fração transferida é variável, isto é, encontra-se dependente da saúde do animal leiteiro que advém de fatores (nutricionais e fisiológicos) conjugados que influenciam esta passagem, entre eles a taxa de ingestão, a taxa de digestão, a biotransformação hepática e a quantidade de leite produzida, criando dessa forma uma variabilidade de aflatoxina não quantificável.

Pesquisadores e autoridades competentes têm divulgado a ocorrência e expressividade de AFM<sub>1</sub> no leite (GIMNEO; MARTINS, 2011; KOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; IHA et al., 2013; DUARTE et al., 2013; BRASIL, 2015; FLORES - FLORES, 2015). No entanto novos estudos referem que não é necessária a conversão de AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub> para que a sua presença e efeito no leite sejam praticados. Visto que AFB<sub>1</sub> tem maior toxicidade que AFM<sub>1</sub> (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011) devem ser aplicados meios de detecção e combate à sua incidência que mostrem a presença de AFB<sub>1</sub> no leite. Desta forma, a revisão à legislação e regulamentações nacionais e mundiais sobre os limites máximos tolerados têm sido reajustados. Em amostras de leite tratadas termicamente a presença de AFB<sub>1</sub> (0,4 µg.L<sup>-1</sup>) recuperada do aflatoxicol, um produto de degradação, foi evidenciada por Carvajal et al. (2003). Valores na ordem de 1,47 e 0,69 g.L<sup>-1</sup>, para leite pasteurizado e UHT, respectivamente, foram comprovadas por Scaglioni et al. (2014).

A AFB<sub>1</sub> é classificada como grupo 1 (agentes cancerígenos para os humanos), (IARC, 2012). Os efeitos adversos causados pela mesma afetam especialmente o fígado, rins, sistema nervoso, endócrino e imunitário (IARC, 2002) em que o mecanismo de ação sobre o organismo se encontra dependente da micotoxina ingerida. Na natureza, estão entre os compostos com maior poder carcinogénico, mutagénico e teratogénico, hepatotóxico e imunossupressivo em seres humanos e animais dependendo da exposição (dose de aflatoxina) a que estão sujeitos (HERNANDEZ-MENDOZA et al., 2009a; BOVO, 2011).

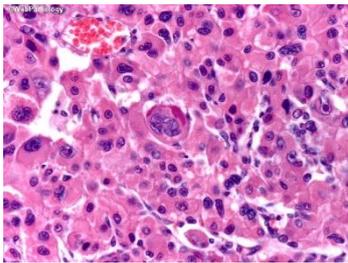
O recurso a bactérias lácticas probióticas tem sido uma das formas de descontaminação de aflatoxinas por métodos biológicos mais utilizados, como confirmam os estudos desenvolvidos por Fuchs et al. (2008); Fazeli et al. (2009); Bovo; Corassin; Oliveira (2010); Dalié; Deschamps; Forget (2010); Granato et al. (2010); EL-Khoury; Atoui; Yaghi (2011); Gerbaldo et al. (2012); Serrano-Nino et al. (2013) e Annuziata; Vecchio (2013), que comprovam que o recurso a estas cepas probióticas removem e/ou

inativam as formas de aflatoxinas ( $M_1$  e  $B_1$ ) impedindo a sua adsorção pelas células intestinais do consumidor. Estes processos resultam na redução da sua bioacessibilidade, minimizando assim os danos causados ao ser humano. Embora pouco se saiba sobre a dose eficaz para estirpes particulares, altos números de bactérias viáveis são recomendados para a eficácia de alimentos probióticos. Com base em culturas vivas ou em metabólitos produzidos por meio de fermentação é possível projetar bactérias de grau alimentício que intensificam a produção de compostos biogénicos e que restabelecem a fisiologia do trato digestivo e intestinal humano.

Existe, também, uma curiosidade crescente por agentes prebióticos, ingredientes não digeríveis pelo consumidor mas que afetam de modo benéfico o hospedeiro através do crescimento e/ou exibição de atividade seletiva em relação a um número limitado de bactérias do intestino, capazes de contribuir beneficentemente para a saúde (FIGUEROA-GONZALEZ et al., 2011; MALLEBRERA et al., 2013). Estes compostos deverão ser absorvidos somente na parte gastrointestinal (exposição interna ao contaminante) promovendo a microflora intestinal de forma seletiva. Mais estudos devem ser realizados na contribuição por parte dos prebióticos juntando-se a Meca et al. (2012a) e Mallebrera et al. (2013) na descoberta da redução da bioacessibilidade de micotoxinas.

O mercado disponibiliza uma ampla gama de produtos funcionais de conteúdo probiótico e prebiótico a título individual ou em conjunto, ou seja, com funções simbióticas, pela preocupação com a alimentação ou como forma de precaução/tratamento de desequilíbrios gastrointestinais. Por impregnação de culturas bacterianas com propriedades probióticas que proporcionem uma atividade intestinal “mais saudável” reduzindo as múltiplas consequências maléficas, pretendeu-se alargar o conhecimento no leite, uma vez que não há dados sobre a dose de probiótico necessária que deve ser incluída neles para que o efeito benéfico no organismo ocorra, bem como que prebiótico(s) poderiam ser adicionados de modo a amplificar o seu efeito.





## Capítulo 2

### Objetivos



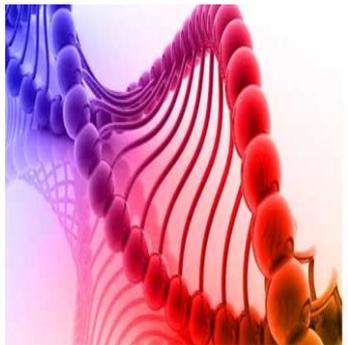
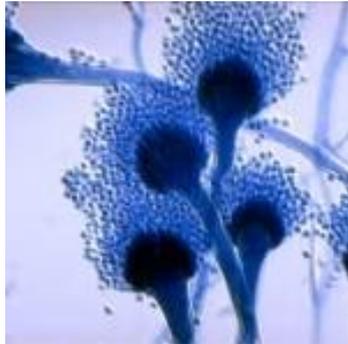
## 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação do micro-organismo probiótico e a contribuição de prebióticos sobre a redução dos níveis da aflatoxina B<sub>1</sub>, bem como sobre a sua bioacessibilidade em leite UHT integral.

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação da cepa *Lactobacillus plantarum* como micro-organismo probiótico e dos prebióticos oligofrutose, inulina, polidextrose e beta-glucana, isolados ou combinados, na redução da aflatoxina B<sub>1</sub> em leite UHT integral artificialmente contaminado.
- Avaliar a ação da cepa *Lactobacillus plantarum* como micro-organismo probiótico e dos prebióticos oligofrutose, inulina, polidextrose e beta-glucana, isolados ou combinados, na bioacessibilidade da micotoxina após a digestão *in vitro* das amostras.
- Avaliar a influência das variáveis concentração de micotoxina, tempo de descontaminação e concentração de prebióticos oligofrutose, inulina, polidextrose e beta-glucana, sobre as respostas de percentual de remoção e bioacessibilidade da aflatoxina B<sub>1</sub> por meio de aplicação de um planejamento de Plackett & Burman de 12 ensaios.





### **Capítulo 3**

Revisão da literatura



### 3.1 Industrialização do leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). O leite de vaca tem especial destaque entre os tipos de leite consumidos correspondendo a 83% da produção mundial de leite. O leite de búfala apresenta o segundo lugar com 13%, a terceira posição para leite de cabra com 2% e quarta para leite de ovelha com 1%. O restante agrupa o conteúdo produzido por outras espécies lactantes entre elas os camelos, equinos e iaques (FAO, 2015).

Quimicamente, o leite é uma dispersão mista, opaca, de cor branca, levemente adocicado, de caráter neutro, constituído de gorduras em emulsão, proteínas em estado coloidal (caseína), hidratos de carbono (lactose), sais (citratos e fosfatos) e vitaminas (A e D) em solução num meio dispersante (água) (OLIVEIRA, 2010). A composição centesimal varia consoante a procedência, dentro da mesma espécie ou entre espécies diferentes no leite fluido (Tabela 1) (AUGUSTINHO, 2010).

**Tabela 1 - Percentagem das frações de constituição do leite de vaca.**

Constituintes do leite	Concentração da fração (g.L <sup>-1</sup> )
Proteínas	34
Lípidos	37
Água	870
Hidratos de carbono (lactose)	48
Vitaminas	Traços
Sais minerais (cálcio, fósforo)	2

**Fonte:** Adaptado de Adams e Moss, (2000).

A economia pode ser afetada em grande escala por perdas de qualidade dos alimentos e o leite e seus derivados não ocorre exceção. Os países com maior índice de produção e consumo de leite fluido são a União Europeia, Índia e Estados Unidos (Tabela 2), com destaque para a constante implementação de avanços tecnológicos nesse segmento.

**Tabela 2 – Produção mundial de leite de vaca (mil t) registado entre os períodos de 2013 a 2016.**

País	2013	2014	2015 (e)	2016 (p) <sup>1</sup>	2014		Taxa de crescimento			Média 2012/14 a 2024 (%) aa <sup>1</sup>
					Prod. Média período	Part. média na prod. (%)	2016/15 (%)	2015/14 (%)	2014/11 (%) aa	
UE (28)	140,1	146,5	147,0	146,98	140,95	30,2	-0,01	0,3	2,0	1,0
Estados Unidos	91,27	93,46	94,71	96,05	91,19	19,5	1,4	1,3	1,6	1,3
Índia	57,50	60,50	63,50	65,97	56,75	12,2	3,9	5,0	4,2	1,9
<b>Brasil</b>	<b>35,35</b>	<b>37,47</b>	<b>38,97</b>	<b>40,60</b>	<b>34,82</b>	<b>7,5</b>	<b>4,2</b>	<b>4,0</b>	<b>4,2</b>	<b>2,5</b>
China	34,30	37,25	37,50	38,374	33,71	7,2	2,3	0,7	6,7	2,6
Rússia	30,52	30,55	29,50	31,123	31,14	6,7	5,5	-3,4	-1,2	0,3
Nova Zelândia	20,20	21,89	21,67	22,000	20,40	4,4	1,5	-1,0	4,9	2,3
México	11,29	11,46	11,68	11,750	11,27	2,4	0,6	1,9	1,2	0,7
Ucrânia	11,18	11,20	11,16	11,227	11,06	2,4	0,6	-0,4	1,2	0,5
Argentina	11,51	11,10	10,70	10,992	11,44	2,4	2,7	-3,6	-1,1	1,7
Austrália	9,40	9,70	9,80	10,123	9,62	2,1	3,3	1,0	0,5	1,8
Canadá	8,44	8,40	8,53	8,620	8,46	1,8	1,0	1,5	0,0	0,5
Japão	7,50	7,31	7,35	7,384	7,48	1,6	0,4	0,5	-0,7	-0,1
Uruguai	2,21	2,216	2,29	2,324	3,30	0,7	1,3	1,9	3,0	1,3
Coreia do Sul	2,09	2,07	2,06	2,060	2,04	0,4	-0,2	-0,4	3,2	0,001
Formosa	3,58	3,47	3,50	3,50	3,47	0,1	0,0	0,9	1,1	-
Filipinas	19	20	20	21	19	0,0	6,3	0,0	5,5	1,9
Total	473,3	491,5	496,8	505,96	467,05	100,0	1,8	1,1	2,4	-

**Nota:** <sup>1</sup> Projeções de percentuais de crescimento da produção para 2016 conforme a publicação OCDE/FAO Agricultura 2015 - 2024. As projeções OECD/FAO levam em conta a produção de leite bovino, búfalos, cabras, ovelhas e camelos até 2022. Para 2015 (e - estimativa) e 2016 (p - projeção). Considerou-se 1 litro = 1,032 kg para o Brasil.

**Fonte:** Adaptado de COMPANHIA...,2015.

No 3º trimestre de 2014 foram adquiridos pelas indústrias processadoras de leite 6,267 bilhões de litros do produto com uma diferença de 2,77 bilhões em relação ao trimestre anterior para o mesmo período contabilizado (COMPANHIA..., 2015, p. 6) o que faz do Brasil uma das potências produtoras de leite a nível mundial, com lugar na 4ª posição de *ranking* (EMBRAPA, 2015).

No Brasil, é notória a disparidade registrada entre as regiões norte, sul e centro em termos de quantidade de leite (Tabela 3), pela percentagem de variação relativa na

comparação de valores em litros de leite produzidos entre 2013 - 14 para os mesmos meses de julho e setembro. O consumo interno previsto para 2015 ronda os 185,7 litros/*per capita*/ano e para 2016 cerca de 191,3 litros/*per capita*/ano.

O leite contém vários compostos que possuem funcionalidade biológica como a caseína e as demais proteínas presentes no soro, por serem fontes de peptídeos bioativos que podem desempenhar funções fisiológicas positivas como a diminuição da hipertensão, atividade antimicrobiana e antioxidante (HARTMANN, 2009). A qualidade nutricional do leite está estreitamente relacionada com as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas que possui. Ambas deverão ser preservadas em toda a cadeia produtiva no segmento da obtenção de um produto íntegro. Alguns fatores podem comprometer este requisito como as elevadas taxas microbianas, as deficiências no sistema de refrigeração, as longas distâncias percorridas pelo leite cru, as temperaturas ambiente elevadas e as falhas nos cuidados com higiene ao longo da cadeia produtiva (HARTMANN, 2009). Desta forma, atividades de produção primária avaliam a qualidade higiênica e sanitária do leite bem como a composição química das formas de consumo na busca de prevenção de possíveis contaminações. A monitorização e controlo de produtos alimentares permitem obter um alimento de alta qualidade tanto pelo seu sabor como pela sua durabilidade. A indústria exige que se entregue leite com parâmetros de qualidade desejados, parâmetros esses de relativa importância no alerta da população sobre o perigo da ingestão de produtos que podem colocar em risco a sua saúde (OLIVEIRA, 2011).

Por fatores diversos, o leite torna-se um produto facilmente exposto aos diferentes tipos de riscos físicos, químicos e biológicos. Dentre os compostos químicos tóxicos, são os resíduos de antibióticos e micotoxinas os que apresentam particular interesse (JAY, 2005; DOS SANTOS et al., 2014), sobretudo as micotoxinas pela sua correlação com a ingestão de alimentos contaminados justificando a necessidade em se estudar o impacto das mesmas na saúde humana e animal.

**Tabela 3 – Quantidade de leite cru adquirida. 3º Trimestre de 2013 – 2014.**

Brasil, Região e UF	Quantidade de Leite cru adquirido (mil toneladas)				Valor relativo (%)
	Julho – Setembro 2013	Julho – Setembro 2013	Valor Absoluto	Valor Absoluto	
Brasil	5 990 936	6 267 346	276 410	276 410	4,6
Norte	299 792	282 061	- 17 731	-17 731	-5,9
Rondônia	180 219	172 842	- 7 377	- 7 377	-4,1
Acre	3 255	3 142	- 113	- 113	-3,5
Amazonas	1 362	1 700	338	338	24,8
Roraima	407	355	- 52	- 52	-12,8
Amapá	-	-	-	-	-
Nordeste	302 374	332 756	30 382	30 382	10,0
Maranhão	20 028	20 171	143	143	0,7
Piauí	4 123	5 026	903	903	21,9
Ceará	60 838	70 307	9 469	9 469	15,6
Rio Grande do Norte	12 233	12 593	360	360	2,9
Paraíba	11 162	14 533	3 371	3 371	30,2
Pernambuco	54 723	57 349	2 626	2 626	4,8
Alagoas	20 232	18 680	- 1 552	- 1 552	-7,7
Sergipe	35 338	43 920	8 582	8 582	24,3
Bahia	83 697	90 179	6 482	6 482	7,7
Sudeste	2 403 614	2 416 261	12 647	12 647	0,5
Minas Gerais	1 553 660	1 581 897	28 237	28 237	1,8
Espirito Santo	69 379	73 611	4 232	4 232	6,1
Rio Janeiro	124 040	122 077	- 1 000	- 1 000	-1,0
São Paulo	655 932	637 776	- 18 156	- 18 156	-2,8
Sul	2 227 130	2 423 748	196 618	196 618	8,8
Paraná	722 457	776 856	54 399	54 399	7,5
Santa Catarina	576 399	655 681	79 282	79 282	13,8
Rio Grande do Sul	928 275	991 210	62 935	62 935	6,8
Centro Oeste	758 026	812 520	54 494	54 494	7,2
Matogrosso	130 083	134 735	4 652	4 652	3,6
Goiás	581 829	631 936	50 107	50 107	8,6

**Fonte:** Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária - Pesquisa Trimestral do Leite. Retirado de INSTITUTO..., 2015 p.45.

## 3.2 Aflatoxinas

### 3.2.1 Aspectos gerais

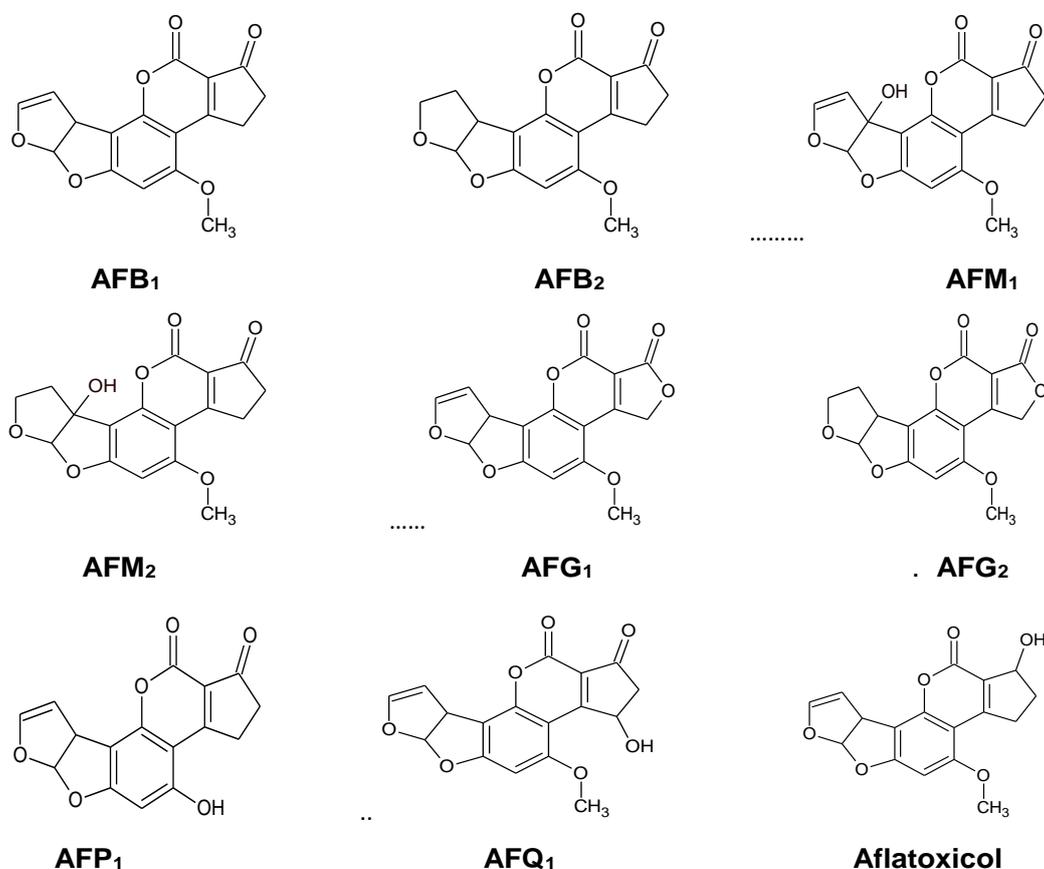
Os contaminantes alimentares são categorizados como biológicos (bactérias, fungos, vírus, parasitas patogênicos e protozoários patogênicos), físicos (metais, madeira ou qualquer tipo de material palpável, vidro ou objeto que possam causar dano ao consumidor) e químicos (toxinas naturais - toxinas paralisantes, neurotóxicas, amnésicas e diarreicas, ciguatoxinas; toxinas fúngicas – micotoxinas, metabólitos e tóxicos de origem microbiana, histaminas e tetrodotoxinas, contaminantes inorgânicos tóxicos, anabolizantes, antibióticos, herbicidas, pesticidas, aditivos, lubrificantes, desinfetantes entre outros) (EARLY, 2000; JAY, 2005; DOS SANTOS et al., 2014).

O termo micotoxina surge do grego “*mykes*” e “*toxicum*” que correspondem a fungo e toxina (GONÇALEZ et al., 2001) existindo inúmeros tipos já descobertos que se agrupam por apresentarem entre si características estruturais similares e o efeito tóxico subjacente (BHAT et al., 2010). As micotoxinas quando absorvidas, ingeridas ou inaladas podem causar doença ou morte (JOBIM et al., 2014).

As aflatoxinas constituem um grupo primordial dentro das micotoxinas e integram os quatro tipos principais: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. Estas podem ser produzidas por várias espécies do gênero *Aspergillus* que contaminam os alimentos, entre os quais *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (IHA et al., 2013). Dentre as aflatoxinas, a B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é a que se destaca pelo seu elevado potencial toxigênico e é produzida principalmente por fungos da espécie *A. flavus*, podendo ainda ser produzidas por *A. parasiticus* e *A. nominus* (DILKIN et al., 2000; JAY, 2005).

Quimicamente as aflatoxinas apresentam estruturas similares, um grupo de compostos heterocíclicos oxigenados com um núcleo de cumarina e dois anéis de bifurano e pentanona, com distinção nas ligações duplas (Figura 1). A série G e B diferem quimicamente entre si pela presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> mas não em B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>. Essas variações que diferem as aflatoxinas estruturalmente estão associadas também às suas atividades, sendo as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> cujo

local responsável pela mutagenicidade se situa na dupla ligação (C<sub>2</sub> - C<sub>3</sub>) da sua estrutura (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A AFM<sub>1</sub> é um produto hidroxilado da AFB<sub>1</sub>, e a AFB<sub>2</sub> surge na forma 2,3 - dhidro da AFB<sub>1</sub> enquanto que a AFG<sub>2</sub> é a forma 2,3 - dihidro da AFG<sub>1</sub> (JAY, 2005). Quando algumas destas substâncias são transformadas (“reação de desintoxicação”) pela associação ao ácido glucurónico ou sulfatos devido à presença do grupo hidroxila na molécula, presente no fígado, surge o AFP<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> e aflatoxicol, consideradas substâncias menos tóxicas e insolúveis (FINK-GREMMELS, 2008; GIMENO; MARTINS, 2011).



**Figura 1 - Estrutura química de algumas aflatoxinas e seus compostos biotransformados.**  
**Fonte:** Adaptado de Juan; Burdaspal; Soriano (2007) e Guengerich et al. (2001, p.1).

A exposição humana e animal às aflatoxinas ocorre predominantemente pela ingestão de alimentos e rações e forragem contaminadas, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2010). A ocorrência natural no caso dos animais ocorre de duas formas: via direta e indireta. Na contaminação direta, o fungo toxigénico utiliza como substrato as forragens

e vegetais para crescimento, desenvolvendo-se com diferentes estágios na produção e no transporte e/ou armazenagem dos alimentos até ser ingerido; a contaminação indireta ocorre quando a micotoxina entra em contato com forragens e rações animais (CREPPY, 2002; DUARTE et al., 2013).

Existe uma relação proporcional entre a dose e o nível de contaminação, sendo que a biodisponibilidade é tomada como pressuposto básico. O termo biodisponibilidade foi definido como a fração de um composto bioativo presente em uma matriz ingerida pelo humano que não se modifica estruturalmente por meio das reações ocorridas no trato digestivo e, assim, torna-se disponível para absorção intestinal (FERNANDEZ-GARCÍA et al., 2009; MALLEBRERA et al., 2013). Desta forma, a matriz em si pode afetar as propriedades específicas dos compostos, ou seja exercer, em parte, alguma influência sobre a absorção ou metabolismo do contaminante. É no intestino delgado que este se considera estar disponível para a absorção intestinal (VERSANTVOORT et al., 2005). A complexidade dos processos digestivos torna difícil a quantificação do risco da ingestão de contaminantes provindos de diferentes matrizes e por isso, modelos de digestão *in vitro* vem sendo amplamente utilizados para avaliar a biodisponibilidade oral humana de compostos contaminantes de leites e outros alimentos (KABAK; OZBEY, 2012b). Até a data, não foram relatados estudos que avaliaram o risco para humanos da ingestão da AFB<sub>1</sub> em leite.

É possível afirmar, com base na literatura, que a taxa de transferência referente à AFB<sub>1</sub> ocorrida da ração para o leite de vacas se situa entre 1 e 3% (CREPPY, 2002). Porém, tais valores podem oscilar uma vez que se encontram fortemente dependentes de: raça, saúde individual e sensibilidade, quantidade de AFB<sub>1</sub> ingerida (tipo de dieta) e produção de leite (JOUANY; DIAZ, 2005; DUARTE et al., 2013). Num conjunto de dez amostras representativas, 2,3% da AFB<sub>1</sub> presente na ração foi excretada na forma de AFM<sub>1</sub> no leite (DE OLIVEIRA et al., 2010). Stoloff (1997) e Battacone et al. (2003) relataram que a AFM<sub>1</sub> pode ser encontrada no leite animal após a primeira ingestão de AFB<sub>1</sub> num período de 12 a 24 h. Jouany e Diaz (2005) mencionaram que a transferência média numa dieta de AFB<sub>1</sub> para AFM<sub>1</sub> no leite é de 1,7%. Os mesmos autores calcularam que 30 ppb de AFB<sub>1</sub> em alimentos irá resultar em 0,5 ppb AFM<sub>1</sub>, valores estes acima dos limites regulamentares estabelecidos nos EUA. Foi ainda expresso para AFB<sub>1</sub> uma

excreção entre 0,3 a 6,2% na forma M<sub>1</sub> após 3 dias com um pico registado nas 3-6 h (CREPPY, 2002; MASOREO et al., 2007; BATTACONE et al., 2012).

Já em humanos, Creppy (2002) alega que ocorre a transformação absoluta em AFM<sub>1</sub> após ingestão da originária, sendo possível estabelecer uma comparação entre as suas propriedades toxicológicas. Murphy et al. (2006), Bando et al. (2007) e Romero et al. (2010) analisaram a urina de pacientes contaminados afirmando que a mesma pode ser utilizada como biomarcador dado que existe uma boa correlação entre AFM<sub>1</sub> presente nos fluidos corporais e a dose de exposição a AFB<sub>1</sub> a que o paciente fica sujeito.

Com base na avaliação da LD<sub>50</sub> (dose letal necessária para a morte de 50% dos indivíduos) a AFB<sub>1</sub> é a mais tóxica entre as aflatoxinas, seguida de AFM<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e por fim AFG<sub>2</sub> como já havia sido reportado pela IARC (LACIAKOVA, et al., 2008). Efeitos mutagénicos, hepatóxicos, carcinogénicos e teratogénicos em animais e humanos são os principais efeitos provocados na saúde de forma contínua (BOVO, 2011). Dados de Wu e Tritscher (2011) revelam que os adultos são menos suscetíveis ao aparecimento de hepatotoxicidade aguda do que as crianças, o que faz delas um grupo de risco ao qual se deverá dar especial importância, devido principalmente ao alto consumo de produtos contaminados pelos diferentes grupos de aflatoxinas, como o leite e derivados lácteos.

Pelo notório risco das aflatoxinas uma maior compreensão sobre as possíveis vias de contaminação, doses disponíveis para absorção no organismo e conhecimento efetivo das consequências que comportam, poderão manifestar-se numa melhoria significativa da qualidade dos alimentos.

### 3.2.2 Aflatoxina B<sub>1</sub> em leite e derivados lácteos

O leite contribui para melhoria da nutrição e segurança alimentar, particularmente nos países em desenvolvimento (KAZEMI; MOHAMMAD; AZIZOLLAHI, 2013). Estudos têm demonstrado que o seu consumo pode modelar o estado de saúde das pessoas em termos de eficiência, quociente de inteligência (QI), redução do risco de doenças infecciosas, regularização das atividades metabólicas, diminuição da pressão arterial, aumento de lípidos benéficos (lipoproteína de alta

densidade), prevenção de cancro do cólon e osteoporose (YITBAREK; TAMIR, 2014). No entanto, este produto, nas diversas formas disponíveis para consumo pode ser um vetor para a introdução de contaminantes de origem química no corpo humano, entre eles as micotoxinas, especialmente aflatoxinas pela estabilidade apresentada durante o processamento térmico aplicado à matéria-prima (SCAGLIONI et al., 2014). Em função disso, são vários os casos de ocorrência de AFM<sub>1</sub> em amostras de leite mas também em seus derivados como queijos, iogurtes e manteigas, onde foram já detetadas (DUARTE et al., 2013; IHA et al., 2013).

Embora a AFM<sub>1</sub> seja relatada como aquela que apresenta a maior ocorrência em leite (COFFEY; CUMMINS; WARD, 2009) é importante que se reúnam esforços para a aplicação de estudos que foquem na sua precursora (AFB<sub>1</sub>). Dependendo da contaminação inicial da ração animal o processo digestivo não evita a presença de AFB<sub>1</sub> nos fluidos corporais (CARVAJAL et al., 2003; SCAGLIONI et al., 2014). Neste âmbito torna-se imprescindível avaliar a sua qualidade e inocuidade, risco de exposição do lactante, vigilância sanitária e quantificar os contaminantes passíveis de intervir, já que se dá início à inclusão de outros tipos de leite, que não o materno, como um nutriente para o desenvolvimento das crianças. A razão desta maior suscetibilidade deve-se ao fato das crianças possuírem uma elevada taxa metabólica, baixo peso corpóreo, baixa habilidade de destoxificação e o incompleto desenvolvimento de alguns órgãos e tecidos, principalmente do sistema nervoso central (WHO, 2006). O consumo frequente expõe-nas ao potencial risco de ingestão o que leva a uma preocupação atual neste tipo de produtos, embora o controlo por parte das autoridades seja exercido (GURBAY et al.; 2010).

São inúmeros trabalhos que dão ênfase à ocorrência de AFM<sub>1</sub> em leite e derivados lácteos, existindo já limites mínimos estipulados para certos alimentos na legislação vigente (BRASIL, 2012). Contudo, para AFB<sub>1</sub> apenas existe regulamentação para controlar os seus níveis em rações e forragem o que comporta a necessidade de uma chamada de atenção especial para pesquisas como Zain (2011), Scaglioni et al. (2014) e Carvajal et al. (2003) que refutam a ideia de que esta aflatoxina é completamente convertida em AFM<sub>1</sub>, ou seja, não são só os produtos biotransformados que se manifestam no leite, a sua precursora (AFB<sub>1</sub>) pode estar contida na matriz alimentar. Avaliou-se a sua ocorrência em amostras de leite pasteurizado e UHT alcançando testes positivos com

médias de 41,7 e 13,3%, respectivamente (Scaglioni et al., 2014); no México amostras tratadas termicamente, com valores na ordem dos 0 a 0,40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  revelaram a existência de uma inter-reconversão entre AFB<sub>1</sub>-Aflatoxicol-AFB<sub>1</sub> (CARVAJAL, 2003). O aflatoxicol poderá ser reconvertido rapidamente por oxidação em AFB<sub>1</sub> e como tal é possível afirmar que o mesmo serve de "reservatório" para AFB<sub>1</sub> *in vivo*, aumentando o tempo de vida eficaz no corpo (WONG; HSIEH, 1980). Em leites fortificados, o aflatoxicol representa um perigo para a saúde, especialmente em crianças uma vez que estas têm dietas alimentares à base de leite. Em seres humanos, no leite materno, foram detetadas aflatoxinas quando mulheres foram submetidas a uma dieta contaminada com AFB<sub>1</sub> como nos trabalhos de Versantvoort et al. (2004); Navas, Sabino e Rodriguez-Amaya (2005); Dashti et al. (2009); Gurbay et al. (2010) e Adjumo et al. (2013). AFB<sub>1</sub> foi descoberto em leite humano na Turquia, com valores de 0,09 a 4,10  $\text{mg.L}^{-1}$  (Gurbay et al., 2010). Existe portanto um consenso entre os especialistas de que a AFB<sub>1</sub> é, na realidade, um pró-carcinogéneo o qual requer ativação metabólica *in vivo* para manifestar os seus efeitos tóxicos (BIEHL; BUCK, 1987; HSIEH; ATKINSON, 1991; WOGAN, 1992). Nesse âmbito, deverá ser dada especial atenção à sua presença efetiva e não apenas aos metabólitos provindos dela, fazendo-se necessária a possibilidade de também ela possuir legislação aplicável para os diferentes países.

Numa abordagem superficial, a degradação de toxinas traduz-se pela completa ou parcial conversão em compostos menos tóxicos, não tóxicos, ou, em alguns casos, mais tóxicos que os iniciais (GROOPMAN; KENSLER; WILD, 2008). A determinação da sua toxicidade num estudo torna-se fundamental.

É por via sanguínea, através de difusão passiva, que ocorre a absorção das aflatoxinas no trato digestivo e que células podem ser tornadas tóxicas em locais como glândula mamária e placenta (WILD; TURNER, 2002; VERMA, 2004; WILD; GONG, 2010) promovendo a secreção de fluidos corporais tóxicos. Em termos de toxicidade, a bioativação enzimática é um pré-requisito fundamental para a metabolização e excreção tóxica/cancerígena de uma toxina. (FERLAY et al., 2010). O fígado é o órgão central ainda que possa também ocorrer no rim. É também no trato intestinal que os produtos químicos ingeridos se deparam com uma das barreiras do organismo, e como tal um alvo vulnerável, especialmente para crianças lactantes uma vez que se encontram dependentes de produtos lácteos e apresentam maior suscetibilidade (Scaglioni et al., 2014).

A indução de carcinoma hepatocelular (HCC) em seres humanos é considerado uma das principais causas de morte no mundo atribuídas ao cancro (FERLAY et al., 2010). Caracterizado por ser um tumor maligno primário do fígado, está intimamente ligado à exposição à AFB<sub>1</sub> (PEERS et al, 1987; LIU; WU, 2010; WILD; GONG, 2010) refletindo a prevalência à exposição aos alimentos contaminados e um aumento da suscetibilidade a HCC. Liu e Wu (2010) revelam dados de casos registrados nos valores de 4,6 a 28,2% atribuídos a AFB<sub>1</sub>.

A maioria das pesquisas focaliza a biotransformação de AFB<sub>1</sub> com formação do AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido (AFBO), considerada a biotransformação hepática mais significativa perante outros compostos, menos tóxicos, que podem ser originados e assim exercer a sua toxicidade e mutagenicidade. A razão está na formação de adutos com macromoléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas executada por enzimas específicas do Citocromo P450 (AFB<sub>1</sub> hidroxilase, envolvida no metabolismo xenobiótico humano) que podem originar mutações ou causar toxicidade aguda (aflatoxicose) (GUENGERICH, 2001; GROOPMAN et al., 2008; HAMID et al., 2013).

Pessoas expostas às aflatoxinas na dieta excretam AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina na urina (Groopman et al., 1985) por apresentarem bastante solubilidade. AFB<sub>1</sub> pode provocar uma série de efeitos, direta ou indiretamente, associados à sua toxicidade: inibição de enzimas de síntese; imunossupressão, produção de moléculas precursoras de hormônios sexuais modificados, redução da reprodutividade, redução da taxa de crescimento, e consequências na absorção e eficiência dos alimentos (WILD; TURNER, 2002; VERMA, 2004; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010) e ainda carcinomas nos rins, pulmão, cólon e sistema nervoso (SHUAIB et al., 2010). Como consequência, a aflatoxicose aguda é manifestada por vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsões e aparecimento de gordura no fígado, rim e coração (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Por esta razão, existe uma grande procura de novas estratégias para reduzir a sua biodisponibilidade ou bioacessibilidade como forma de combate (SERRANO-NINO et al., 2013) salvaguardando a saúde dos consumidores.

### 3.3 Probióticos

A palavra probiótico significa “a favor da vida” sendo aplicada quando se pretende designar os efeitos benéficos proporcionados pelos mesmos para seres humanos e animais a partir de bactérias. Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando consumidos nas doses apropriadas e com alguma frequência, podem ser acrescentados aos alimentos com o propósito de regular a microflora intestinal do hospedeiro resultando em efeitos benéficos (FAO/WHO, 2006).

Nos últimos 20 anos, pesquisas relativas aos probióticos progrediram consideravelmente com notáveis informações sobre a seleção e caracterização de culturas específicas, justificando o seu emprego e alegações de saúde em relação ao consumo (FAO/WHO, 2006). Mais de metade do peso da matéria encontrada no cólon corresponde a células bacterianas, cujo número é dez vezes maior do que as células dos tecidos que constituem o corpo humano (FAO/WHO, 2006). O destaque atual centraliza-se no desenvolvimento de produtos onde os géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* figuram como os probióticos mais empregados em alimentos estudados *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* (Hernandez-Mendoza, García e Steele (2009), Hernandez-Mendoza, Guzman-De-Pena e García (2009), Hernandez-Mendoza et al. (2010), Hernandez-Mendoza et al. (2011); Deshpande; Rao; Patolea (2011); Karimi; Sohrabvandi; Mortazavian (2012); Serrano-Nino et al. (2013) e os derivados lácteos como os meios mais utilizados para a incorporação destes micro-organismos (SAAD, 2006). A garantia das capacidades funcionais dos probióticos na matriz láctea está inteiramente associada a fatores de processamento e armazenamento (GRANATO et al., 2010).

No decorrer do processo de biodegradação, o auxílio de micro-organismos torna-se uma mais-valia na redução da concentração de aflatoxinas em produtos alimentares, desde que asseguradas as normas e requisitos de qualidade e segurança alimentar indispensáveis na cadeia. No entanto, terão de apresentar eficiência, especificidade e garantias de que a AF seja removida com sucesso (WU et al., 2009). Além de poderem ser utilizados como compostos naturais e não prejudicarem o meio ambiente (WU et al., 2009) são frequentemente utilizados em estudos que visam a degradação das micotoxinas pela apresentação de resultados promissores (BOVO, 2011; KABAK; OZBEY, 2012b). Pretende-se assegurar o equilíbrio da microflora no intestino, constituindo uma barreira

eficaz contra a colonização de patógenos e substratos metabólicos produzidos (vitaminas e ácidos gordos de cadeia curta) com estímulo do sistema imunitário para criar defesas imunológicas. Como resultado dessa ação seletiva, ocorre menor produção de amônia e toxinas patogénicas que preservam o epitélio intestinal (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; FRITZEN-FREIRE, 2013).

Várias bactérias probióticas comumente utilizadas em produtos alimentares, revelaram ligar-se de forma eficiente a AFB<sub>1</sub> *in vitro* (EL-NEZAMI et al., 1998; HASKARD et al., 2001; LEE et al., 2011). Acresce dizer que praticamente a totalidade dos trabalhos realizados para remoção de aflatoxinas por BAL em leites são testados com recurso a soluções tampão justificados pelos muitos interferentes que o leite possui, como a caseína, que diminuem a sua biodisponibilidade (PIERIDES et al., 2000). No entanto, um método prático, económico e seguro para desintoxicação não está disponível.

Dentre a grande variedade de efeitos de carácter saudável a eles atribuídos, as ações biológicas pelas “substâncias bioativas” são as que despertam maior interesse focando-se nas anticancerígenas, as hipocolesterolémicas e as antagónicas dos agentes patogénicos intestinais.

A substância Bioativa significa que além dos nutrientes, os não nutrientes possuem ação metabólica ou fisiológica, seguido do nome da fonte da qual foi extraída e acompanhada da forma de apresentação do produto específico. No caso dos Probióticos, deve constar a quantidade dos micro-organismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto. Esta informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e ou de saúde do produto e fora da Tabela de Informação Nutricional (BRASIL, 2002)

Tais características serão reforçadas se houver adição de pro e prebióticos, que poderão conferir uma proteção adicional. Na seleção da bactéria probiótica a tolerância à acidez do estômago, a estimulação imunológica contra patogénicos, a aderência às paredes da mucosa intestinal, a segurança na sua utilização e a disponibilidade em termos tecnológicos são aspetos que devem ser tidos em conta (FUKUSHIMA et al., 1998). Ainda em termos de benefícios, podem citar-se: facilidade de digestão e absorção dos alimentos com regulação do pH em dietas com altos níveis de açúcares (Hidratos de carbono) (Kotzampassi; Giamarellos-Bourboulis, 2012), aumento das defesas naturais

(Annunziata; Vecchio, 2013), diminuição do risco de doença cardiovasculares e dos sintomas de intolerância à lactose (Nagpal et al., 2007), redução dos níveis séricos de colesterol e efeitos anti-hipertensivos (Nagpal et al., 2012) e estabilização da microflora intestinal (SAAD et al., 2013).

Como inibidores produzidos pelas bactérias ácido-lácticas (BAL) podem ser mencionados compostos anti-fúngicos e anti-bacterianos entre eles o ácido láctico característico e metabolitos de síntese responsáveis pelo aumento da acidez intestinal, que competem microbialmente com as aflatoxinas pelos recursos disponíveis e diminuem os danos provocados no epitélio intestinal. Mais exemplos podem ser dados, como os mencionados por Dálíe et al. (2010) provindos de diferentes espécies: ácidos orgânicos, compostos fenólicos, ácidos gordos, peróxido de hidrogénio, reuterina e bacteriocinas (compostos proteicos) como subprodutos da atividade metabólica. O mesmo autor refere ainda que é nas primeiras etapas da fase de crescimento exponencial que se dá o efeito inibitório sobre a acumulação de aflatoxina. Também Magnusson et al. (2003) explicam os mecanismos de rendimento de ácido orgânico, competição nutricional e produção antagónica destes compostos. Conclui-se que através destes meios característicos das BAL, o processo de destoxificação perante micotoxinas contaminadoras de produtos lácteos é favorecido, sendo considerada uma das novas funcionalidades associadas ao consumo de bactérias probióticas.

Por meio de um fenómeno de superfície estabelece-se a ligação entre a aflatoxina e a bactéria. Sugere-se uma união física, isto é, a adesão a componentes da parede celular bacteriana (polissacarídeos, peptidoglicanos e algum nível de proteína) em vez de se ligar/degradar pelo mecanismo covalente das bactérias (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Pelo fato da remoção de aflatoxinas também ocorrer em soluções aquosas acredita-se que as BAL também se possam ligar à aflatoxina de forma extracelular por uma ligação não covalente fraca, ou seja associando-se às regiões hidrofóbicas da superfície bacteriana (Haskard et al., 2001) na zona da parede celular (LAHTINEN et al., 2004). Assim, a perspectiva de utilização para redução da sua biodisponibilidade é influenciada, em parte, pela estabilidade da ligação e, por isso, este é um aspeto importante de avaliação de cepas de BAL no aumento de remoção de AF (GERBALDO et al., 2012). Outros autores revelam que a parede celular é o meio de ligação, sem recurso a reações metabólicas de degradação das aflatoxinas (EL-NEZAMI et al., 1998; LAHTINEN et al., 2004;

CORASSIN et al., 2013). Há um impacto significativo na formação de ligação e metabolismo destas bactérias, podendo ocorrer a redução do efeito da aflatoxina. No caso de aflatoxina M<sub>1</sub>, a ligação é menos proeminente do que com AFB<sub>1</sub>.

A verdadeira preocupação está na adesão da aflatoxina-célula bacteriana no trato digestivo. Após formação deste complexo, a aderência ao muco é prejudicada, no entanto, se as bactérias já aderiram ao muco, a capacidade das mesmas blindarem a AF poderá ficar reduzida. Gratz et al. (2004) verificaram esta situação, quando observaram que a capacidade de ligação intestinal das AFB<sub>1</sub> com bactérias tratadas termicamente foi reduzida quando entraram em contato com o muco. Contudo, uma vez que a absorção de micotoxinas tem lugar no intestino delgado a formação do complexo deve ocorrer antes do alimento contaminado chegar ao intestino delgado (KABAK; OZBEY, 2012a). No trato gastrointestinal o complexo bactéria-micotoxina é rapidamente excretado mostrando claros benefícios para os seres humanos e animais que constantemente ficam expostos às mesmas (GRATZ et al., 2004). A estabilidade do mesmo dependerá de condições como nutrientes, pH, temperatura, possíveis solventes adicionados e da própria bactéria, ocasionando algumas alterações na sua eficiência.

O número de células viáveis deverá estar presente no alimento para potencializar a sua ação e encontrar-se numa dose mínima situada entre as 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Tal nível poderá ser atingido se for administrada uma dose diária de 100 mL de produtos lácteos com bactérias probióticas à volta de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (OLIVEIRA et al.; 2002; KAILASAPATHY, 2008).

Como um recurso biológico passível de ser usado no meio científico, já permitiu a realização de múltiplos trabalhos (EI-NEZAMI et al., 1998; PELTONEN et al., 2001; HASKARD et al., 2001; LAHTINEN et al., 2004; KABAK; VAR, 2008; OLUWAFEMI et al., 2010; DÀLIE; DESCHAMPS; FORGET, 2010; EI-KHOURY, ATOUI; YAGHI, 2011; KABAK; OZBEY 2012b; CORASSIN et al., 2013 e FRITZEN-FREIRE, 2013) nomeadamente sobre o seu efeito no controlo da contaminação de AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub>.

### 3.3.1 *Lactobacillus plantarum* BG112

Os *Lactobacillus* compreendem inúmeras espécies diferentes. Classificados como bacilos, Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos e anaeróbios facultativos (ANAL; SINGH, 2007; HOLZAPFEL et al., 2001; SAVIJOKI et al., 2006; MOZZI et al., 2010) capazes de sintetizar peptídeos ou proteínas antimicrobianas conhecidas como bacteriocinas além de ácidos orgânicos como ácido láctico, ácido acético e ácido succínico e assim serem grupos reconhecidos cientificamente como limitadores do crescimento fungos toxigênicos (MASCO et al., 2005; ANEKELLA, 2013; ARASU et al., 2016). Tais bactérias podem dividir-se em mesofílicas (30 °C) e termofílicas (perto de 42 °C) com base na sua temperatura de crescimento (SYBESMA; HUGENHOLTZ; DE VOS, 2006). A sua faixa ótima de valores de pH varia entre 5,5 a 6,0 (SALMINEN; ISOLAURI; SALMINEN, 1996). A cepa possui a capacidade de utilizar uma grande variedade de açúcares, especialmente monossacarídeos e dissacarídeos bem como produzir enzimas extracelulares, como amilase e protéase conferindo-lhe grande vantagem (ARASU et al., 2016).

As estirpes mais utilizadas são *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. paraplantarum* e *L. kefir* (EFSA, 2007). O género *Lactobacillus* é reconhecido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Por este motivo, o mercado de BAL mantém-se promissor e foco constante de investigação. São intencionalmente introduzidas na cadeia alimentar pela contribuição importante na microbiota intestinal normal de humanos e animais, como hospedeiras dependentes, em variados alimentos e rações fermentadas, aplicadas como probióticos (FLORES-FLORES, et al., 2014).

Estes géneros provêm do trato digestivo, de preferência dos locais de colonização intestinal dos lactobacilos e das bifidobactérias (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002). Tal distribuição é influenciada por fatores ambientais como pH, disponibilidade de oxigénio, quantidade de substratos e a presença de secreções e interações bacterianas (SALMINEN; ISOLAURI; SALMINEN, 1996).

Estirpes de *L. plantarum* são utilizadas como probióticos comerciais disponíveis no mercado caracterizando produtos de saúde (DE VRIES et al., 2006; LEE et al. 2011; JENSEN et al. 2012; VIJAYAKUMAR et al., 2015). A sua habilidade em sobreviver ao trânsito gástrico, adaptação a diferentes locais e substratos e colonização do trato

intestinal de seres humanos e outros mamíferos foi já comprovada (DE VRIES et al, 2006; GEORGIEVA et al, 2009). Diferentes estirpes demonstraram elevada tolerância à exposição subsequente ao ácido clorídrico (pH 2,0) e sais biliares, tanto para estirpes intestinais isoladas como de alimentos fermentados, comprovando a sua adaptação a diferentes condições do meio (HALLER et al., 2001).

Por sua vez é fundamental que o micro-organismo possa ser cultivado a nível industrial com recurso a linhagens específicas que executem com maior eficácia o processo de descontaminação e que, por sua vez, não modifiquem o produto onde são inseridos. Com o objetivo de promover a redução por parte das BAL e conseqüentemente facilitar o seu mecanismo de ação, diferentes técnicas têm sido utilizadas como forma de aumentar a habilidade das BAL, entre elas a realização de alguns tratamentos prévios (aplicação de ácido clorídrico, tratamento térmico em autoclave ou fervura a 100 °C e adição de etanol) que aumentem o poder de ligação às aflatoxinas. Inúmeros géneros, espécies e cepas de BAL inativadas pelo calor comprovaram ter capacidade se ligar AFB<sub>1</sub> de uma maneira específica (HASKARD et al., 2001; ZINEDINE et al., 2007; OLUWAFEMI; DA-SILVA, 2009; VAR; KABAK, 2009).

Três estudos *in vitro* mostraram alterações na morfologia da parede celular, presumivelmente para proteger a célula das condições adversas, quando *L. plantarum* foi exposto a ácidos biliares. O *L. plantarum* comprovou ter capacidade para sobreviver ao trânsito gástrico e colonizar o intestino, com uma aparente segurança para o consumidor (KLEEREBEZEM et al., 2003). Piotrowska e Zakowska (2005) estudaram a capacidade de remover a ocratoxina A em meios líquidos contaminados através de 29 estirpes de BAL pertencentes a géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*. Todas as estirpes testadas foram capazes de reduzir a sua concentração, alcançando a maior percentagem (50% do teor inicial) com cepas *L. acidophilus* CH-5, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* BS, *L. brevis* e *L. sanfranciscensis*. De igual forma, Bovo (2011) também verificou que após testar sete cepas de diferentes géneros, incluindo *L. plantarum*, viáveis e não viáveis, entre 15 min e 48 h de tempo de contato entre BAL e AFM<sub>1</sub> em TFS, conseguiu resultados de 26,6% e 28,9%, respectivamente. Cinco estirpes de *Lactobacillus* (*L. plantarum* ATCC 4008, *L. plantarum* 12006, *L. plantarum* 299v, *L. paracasei* LMG 13552 e *L. rhamnosus* VT1) foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* NRRL-2999. Os autores verificaram que inicialmente

a mesma foi efetivamente afetada pela presença de todas as estirpes (85-92%) mas os dados indicaram ainda que o efeito inibitório sobre produção de aflatoxina B<sub>1</sub> observado após 10 dias de incubação chegou a valores de 96,3 a 98,3% quando comparados ao controlo, aumentando-se assim o potencial redutor (GOMAH; RAGAB; BULLERMAN, 2010). Fazeli et al. (2009) entre um painel de BAL testadas e isoladas de sourdough iraniano e laticínios relataram que cepa *L. plantarum* apresentou uma considerável ligação com AFB<sub>1</sub>. Oluwafemi e Da-Silva (2009) com *L. plantarum* conseguiram atingir uma ligação de até 95% após 48 horas de ligação quando inoculadas artificialmente em milho fermentado.

Abrem-se então novas perspectivas no uso destas bactérias no combate à contaminação dos produtos lácteos por micotoxinas como um método seguro, eficaz e específico.

### 3.4 Prebióticos

Os prebióticos foram definidos como ingredientes alimentares não digeríveis (MALLEBRERA et al., 2013) que são fermentados seletivamente e que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal já estabelecida no cólon, conferindo benefícios sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; FIGUEROA-GONZALEZ et al., 2011).

São considerados prebióticos mais promissores, com base nas suas características fisiológicas, os hidratos de carbono não digeríveis (oligossacarídeos – oligofrutanos, inulina; e polissacarídeos -  $\beta$ -glucanos) alguns peptídeos, proteínas, dissacarídeos (lactulose) e certos lípidos (ésteres) (GIBSON; ROBERFROID, 1999; KOLIDA; TUOHY; GIBSON, 2002). Estes compostos são fermentados no cólon por bactérias endógenas para libertar energia, substratos metabólicos e ácidos carboxílicos de cadeia curta (ácido acético, butírico e propiónico) como produtos finais da fermentação (QUIGLEY, 2010) atuando diretamente ou indiretamente sobre as células intestinais e dessa forma intervir no controlo de processos de inflamação, carcinogénese e eliminação de compostos nitrogenados (SAAD, 2006). Podem ainda promover a proliferação de probióticos (QIANG et al. 2009). A alteração da microflora intestinal causada pelo uso

de prebióticos pode assim ocorrer por duas vias: pelo fornecimento de nutrientes para as bactérias desejáveis ou pelo reconhecimento por parte das bactérias patogênicas de locais de ligações presentes nos oligossacarídeos como sendo da mucosa intestinal, suprimindo a colonização intestinal indesejável, e por consequência a menor incidência de infecções, preservando a integridade da mesma. Além disso, estão relacionados ao aumento da absorção de certos minerais (cálcio e magnésio) (Nagpal et al., 2007); inibição de lesões, como carcinomas no intestino e dessa forma tudo o que possa estar correlacionado com doenças colo-retais (Pintero et al., 2008; SAAD et al., 2013); diminuição do tempo de trânsito fecal; redução do colesterol, resposta glicêmica e alívio dos sintomas da doença inflamatória do intestino (MALLEBRERA et al., 2013).

Três critérios são fundamentais para considerar um composto como prebiótico: o substrato não deve ser hidrolisado ou absorvido no estômago e/ou intestino delgado; seletividade para bactérias benéficas comensais no intestino grosso; e a fermentação do substrato deve induzir efeitos benéficos sistêmicos no hospedeiro (SCANTLEBURY-MANNING et al., 2004). A capacidade de resistência a teores de pH ácido proveniente da digestão gástrica é outro dos aspectos a referir. Simplesmente, o relato sobre a fermentação em culturas puras de cepas microbianas individuais ou um aumento em um número limitado de géneros bacterianos no complexo de misturas de bactérias, quer *in vitro* ou *in vivo*, não pode confirmar por si só que se trata de um efeito prebiótico.

Embora os probióticos e os prebióticos possuam mecanismos comuns de atuação, especialmente quanto à modulação da microflora endógena, eles diferem na sua composição e no seu metabolismo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011). Os prebióticos atuam sobretudo no intestino grosso, embora possam exibir algum efeito no intestino delgado (KOLIDA; TUOHY; GIBSON, 2002).

Dentre os prebióticos, frutooligossacarídeos (FOS) e inulina estão entre os mais estudados com propriedades bem estabelecidas (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2005; CARDARELLI et al., 2007), ou seja são altamente fermentáveis e estimulam o crescimento intestinal das bactérias comensais as quais, por efeito antagonista, suprimem a atividade de outras bactérias putrefativas como *Escherichia coli*, *Streptococcus faecales*, *Proteus* spp. entre outros diminuindo, conseqüentemente, a formação de metabólitos tóxicos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011). Estudos *in vitro* indicam que ambos

têm uma fermentação específica (WANG; GIBSON, 1993). Pesquisas identificaram redução do número de micro-organismos patogénicos na flora intestinal de crianças suplementadas com FOS (SANTACRUZ; GAUFFIN, 2010). Barclay et al. (2010) relataram que a inulina pode ser ideal para o transporte de substâncias para o cólon, uma vez que é estável para a gama de pH ácido da zona gastrointestinal humana. Mantzouridou, Spanou e Kiosseoglou (2012) afirmam que as moléculas de inulina não são hidrolisadas por enzimas do trato gastrointestinal e, portanto, proporcionam um efeito benéfico sobre a saúde

A inulina é um hidrato de carbono de reserva presente nas plantas enquanto a oligofrutose é produzida pela hidrólise parcial da inulina (GIBSON et al., 2004). Quimicamente, os oligofrutanos são hidratos de carbono polidispersos compostos por cadeias lineares de unidades de frutose, ligadas entre si com ou sem uma unidade final de glicose (ROBERFROID, 2007). Dependendo do comprimento da cadeia, definido pelo número de unidades de monossacarídeos (3-10 moléculas) denominado grau de polimerização (DP), tem-se a inulina e a oligofrutose (SAAD, 2006). Biedrzycka e Bielecka (2004) mostraram que frutanos de cadeia curta, como a oligofrutose, atuam na região proximal do cólon, ao passo que a inulina é mais efetiva na parte distal.

As beta-glucanas são polissacarídeos formados por polímeros (mais de 10 moléculas) de monossacarídeos de glicose ou seus derivados, ligados entre si por meio de ligações glicosídicas do tipo beta ( $\beta$ ) apresentando uma função estrutural. Entre as vantagens proporcionadas a sua capacidade para reduzir o índice glicémico, pelo favorecimento mais lento e gradual da absorção de hidratos de carbono, evita picos de glicemia. Tal facto deve-se ao metabolismo da glicose. Por exemplo, a baixa solubilidade e peso molecular mediano característico das mesmas, causam uma viscosidade inferior no conteúdo intestinal ou a capacidade de perder substâncias biliares e ácidos gordos numa dieta alimentar, uma vez que ambos mecanismos parecem ser causa do abaixamento do colesterol (MANTOVANI et al., 2008).

Polidextrose é um polímero de hidratos de carbono não disponíveis, com grau médio de polimerização, sintetizado a partir da glicose e sorbitol. Esta é parcialmente fermentada pela microbiota presente do cólon (cerca de 50%), apresentando também propriedades prebióticas com redução do impacto glicémico (STOWELL, 2009). Os seus

efeitos fisiológicos e atributos tecnológicos estão a ser aplicados em alimentos (STOWELL, 2009).

Parâmetros como a estrutura primária, solubilidade, grau de ramificação (DB) e o peso molecular (MW), polímeros e estrutura em meio aquoso, determinam a atividade biológica que exibem. Desta forma, a sua incorporação recente em alimentos tem despertado interesse na realização de estudos sobre sua capacidade em retardar ou reduzir a absorção de nutrientes e ação como auxiliadores na avaliação da contaminação de micotoxinas.

Inulina e oligofrutose, frutanos fermentáveis não digeríveis estão entre os mais estudados e bem estabelecidos entre os prebióticos que podem promover uma alteração significativa na composição da microflora do cólon (GIBSON et al., 2004). Manzini et al. (2014) e Meca et al. (2012) testaram diferentes tipos de prebióticos, em diferentes concentrações por simulações gástricas *in vitro* observando que a biodisponibilidade de micotoxina beauvericina (BEA) foi menor para fibras insolúveis do que solúveis, e que quando comparadas com a solução modelo (sem adição delas) se verificava uma redução de 3,3 vezes do valor detetado no controlo. O valor mais alto de bioacessibilidade conseguida foi para as fibras glucomanano, enquanto o menor foi determinado no modelo com celulose. As fibras insolúveis como a celulose exercem um efeito importante sobre a redução da BEA provavelmente pela alta dificuldade das bactérias na fermentação da fibra. Por sua vez Mallebrera et al. (2013) avaliaram o efeito isolado ou de probióticos ou de prebióticos sobre a descontaminação de BEA, observando que o efeito era dependente do tipo de micro-organismo e do prebiótico estudado. Utilizando também eles fibras alimentares, solúveis e insolúveis, observaram que as mesmas reduziram significativamente a micotoxina quando avaliados os três compartimento gastrointestinais analisados (estômago com 38,8%; digestão gástrica + duodenal com 26,8% e cólon com 32,9%). Em particular, a maior da redução biodisponibilidade foi observada numa solução tratada com celulose HMW (fibra insolúvel a 5%) com 14,1%. Estes autores concluíram assim que, independentemente do composto prebiótico utilizado, a redução ocorria por um mecanismo de retenção exercido por eles, similar aos processos reativos observados para polifenóis, proteínas e sais minerais e que esta mesma redução é dependente da dose empregada, ou seja, com menores doses conseguem-se melhores resultados. A explicação está relacionada com a presença de mais locais de

ligação ativos na estrutura de fibras de compostos utilizados na concentração de 5%, o que ajudaram a reduzir bioacessibilidade BEA.

Assim, um prebiótico eficiente pode estimular mudanças consideráveis na flora intestinal permanecendo no organismo ao invés dos contaminantes por competição ou suprimento dos mesmos pelas condições adversas proporcionadas, por disponibilizarem maior número de locais de ligação ou pelos mecanismos similares que alguns compostos apresentam.

### 3.5 Simbióticos

O emprego de pró e prebióticos contribuem para proteção de alimentos contra contaminantes. Simbiose é definida como uma associação de conveniência mútua entre seres diferentes (FERREIRA, 1984). O mesmo poderá acontecer quando se agrupam estes compostos, já que o crescimento do probiótico no intestino pode ser estimulado pela fermentação do prebiótico, e/ou o prebiótico pode ajudar a criar um ambiente intestinal mais favorável, no qual o probiótico se torna mais competitivo. A FAO menciona como uma "mistura de probióticos e prebiótico que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e implantação de suplementos alimentares com base em micro-organismos que vivem no trato digestivo do hospedeiro" (FAO/WHO, 2006). Assim, ambos apresentam o intestino como alvo de ação (OUWEHAND et al., 2007), onde a principal diferença reside nas substâncias prebióticas não serem degradadas ou absorvidas e frequentemente serem incorporadas auxiliando na viabilidade e manutenção da capacidade das cepas probióticas na sobrevivência à passagem pelo trato digestivo. Desta forma, a sinergia de ação estabelecida no cólon aumenta o número populacional de células viáveis de lactobacilos e bifidobactérias em comparação com qualquer probiótico ou prebiótico que atue sozinho (GIBSON, 1999; GONZALEZ; ADHIKARI; SANCHO-MADRIZ, 2011; RODRIGUES et al., 2011).

A mistura por si só não é garantia de atividade simbiótica. Torna-se necessário o estudo das combinações de substâncias prebióticas selecionadas e cepas probióticas testadas, *in vitro* e *in vivo*, a fim de se encontrar a melhor junção ativa e sinérgica. A interação *in vivo* será favorecida quando houver uma adaptação do probiótico ao substrato

prebiótico, anterior ao consumo que, em alguns casos, resulta numa vantagem claramente competitiva para o probiótico se este for consumido juntamente com o prebiótico (SAAD, 2006). Bielecka, Biedrzycka e Majkowska (2002) confirmaram a adequação desta combinação, demonstrando uma maior eficácia quando comparado com o uso individualizado de probióticos.

A sua associação já possui elaboração prática em produtos lácteos simbióticos, com efeitos benéficos de ambas as partes (CARDARELLI, 2006). Esta matriz é a base mais provável para a sua suplementação. Em formulações de iogurte os frutooligossacarídeos mostraram-se eficazes na manutenção da viabilidade do probiótico (CAPELA; HAY; SHAN, 2006).

Como descrito por Fritzen-Freire et al. (2012) as ações da inulina, como protetores das células de *Bifidobacterium*, mostram um efeito positivo sobre a sua sobrevivência durante a simulação gástrica. Barclay et al. (2010) relataram que a inulina pode ser ideal para o transporte de substâncias para o cólon, uma vez que é estável para os teores de pH ácido da zona gastrointestinal humana. Mantzouridou, Spanou e Kiosseoglou (2012) afirmam que as moléculas de inulina não são hidrolisadas por enzimas do trato gastrointestinal e, portanto, proporcionam um efeito benéfico sobre a saúde.

Perante a doença hepática, um estudo avaliou a eficácia de um produto simbiótico, recorrendo ao uso de *Bifidobacterium longum* com FOS. Os resultados mostraram-se significativamente melhores em relação aos controlos sem simbiótico em apenas 90 dias (MARTEAU; SEKSIK, 2004). Por sua vez Mallebrera et al. (2013) avaliaram o efeito isolado ou de probióticos ou de prebióticos sobre a descontaminação de beauvericina (BEA), observando que o efeito era dependente do tipo de micro-organismo e do prebiótico estudado.





## Capítulo 4

### Material e métodos



#### 4.1 Materiais, reagentes e prebióticos

O leite *Ultra High Temperature* (UHT) integral (Frimeza®, Marechal Cândido Rondon, Brasil) foi adquirido no comércio local. A cultura pura de *Lactobacillus plantarum* BG112 foi fornecida pela SACCO®, Brasil. O padrão de micotoxina AFB<sub>1</sub> bem como os reagentes e enzimas utilizadas na análise de digestibilidade *in vitro* foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*®. Os prebióticos oligofrutose (Raftilose P95, Orafti®), inulina (Raftiline GR, Orafti®), polidextrose (Litesse, DuPont-Danisco) e beta-glucana (ProamOat™ Tate & Lyle) foram gentilmente doados pelas empresas especializadas. No preparo das soluções, todos os solventes utilizados para a cromatografia líquida possuíram pureza analítica grau HPLC e a água utilizada foi ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (Osmose 10 LX, Gehaka, 2010) acoplado a sistema ultrapurificador de água (*Master System* P&D TOC, MS 2000, Gehaka).

#### 4.2 Micro-organismo e estimativa da concentração bacteriana

A cultura de *Lactobacillus plantarum* BG112 liofilizada (SACCO®, Brasil) foi reativada (0,1% m.v<sup>-1</sup>) em 100 mL de caldo MRS - Man, Rogosa & Sharpe (Merck, Darmstadt, Alemanha) adicionado de 0,05% de L- cisteína - Cisteína HCL monohidratada por incubação a 37 °C durante 12 horas em estufa bacteriológica (Orion® 502, Fanem, São Paulo, Brasil). Durante esse tempo, em intervalos de tempo regular, alíquotas de 1 mL foram retiradas para enumeração do micro-organismo e determinação da densidade ótica (DO). A enumeração do micro-organismo, expressa como log UFC.mL<sup>-1</sup>, seguiu a metodologia proposta por Da Silva et al. (2007), que consistiu no plaqueamento em profundidade, em duplicata, para as diluições 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-9</sup> pela inoculação em série de 1 mL em placas de petri esterilizadas seguida da adição do ágar MRS. As placas foram incubadas de forma invertida em jarras de anaerobiose (Lucadema, Brasil) com gerador de anaerobiose (Anaerobac®, Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), a fim de manter as condições de microaerofilia, a temperatura de 37 ± 1 °C por 48 horas em estufa de cultura bacteriológica (LTDA 002 CB, Fanem, São Paulo, Brasil). Foram selecionadas para

contagem as placas com 25 a 250 colónias, sendo o cálculo do resultado feito de acordo com o número de colónias e a diluição inoculada. Paralelamente, foi determinada a densidade ótica através da técnica de turbidimetria, que seguiu o disposto por BOVO et al. (2013), com a determinação da densidade ótica (DO) em espectrofotómetro (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) calibrado no comprimento de onda de 600 nm na diluição correspondente. A estimativa da concentração bacteriana foi realizada por meio da construção de uma curva exponencial de crescimento bacteriano através da correlação da medida de absorvância com o logaritmo da concentração bacteriana obtida através da contagem das colónias por plaqueamento em profundidade (BOVO et al., 2013). A partir desses dados, foi gerada a equação para calcular a concentração bacteriana no meio e o volume de caldo de cultura necessário para obter  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> concentração esta utilizada no trabalho devido ao fato de que de acordo com a Lista de Alegações de Propriedades Funcionais e de Saúde, para que o probiótico exerça efeito benéfico ele deve estar presente na concentração de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/porção (BRASIL, 1999). O ajuste da equação aos dados foi avaliado a partir da análise do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

#### 4.3 Elaboração dos ensaios

Para avaliar o efeito do probiótico e dos prebióticos na percentagem de redução e bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> em leite integral, foi aplicado um planejamento experimental Plackett & Burman, com 12 ensaios acrescidos de 2 pontos centrais, cujas variáveis reais e codificadas encontram-se descritas na Tabela 4. Para comparação, juntamente com os 12 ensaios e os 2 pontos centrais em estudo, mais três tratamentos denominados "controlo" foram realizados, (CT<sub>1</sub>, CT<sub>2</sub> e CT<sub>3</sub>) (Tabela 5). A faixa de tempo estudada (0 e 6 h) foi escolhida com base no tempo médio requerido na fabricação de iogurte, já que o *L. plantarum* poderia ser utilizado como um probiótico a ser adicionado neste derivado lácteo.

**Tabela 4 - Delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios, com duplicata no ponto central, com os valores reais e codificados das variáveis em estudo.**

Variáveis/Níveis	Micotoxina (µg.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Inulina (%)	Beta-glucana (%)	Oligofrutose (%)	Polidextrose (%)
-1	5,0	0	0	0	0	0
0	7,5	3	0,38	0,38	0,38	0,38
1	10,0	6	0,75	0,75	0,75	0,75

**Tabela 5 - Matriz de planejamento Plackett & Burman de 12 ensaios com AFB<sub>1</sub>, probióticos e prebióticos.**

Ensaio	x <sub>1</sub> <sup>a</sup>	x <sub>2</sub> <sup>b</sup>	x <sub>3</sub> <sup>c</sup>	x <sub>4</sub> <sup>d</sup>	x <sub>5</sub> <sup>e</sup>	x <sub>6</sub> <sup>f</sup>
1	+1 (10)	-1 (0)	+1 (0,75)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
2	+1 (10)	+1 (6)	-1 (0)	+1 (0,75)	-1 (0)	-1 (0)
3	-1 (5)	+1 (6)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)	-1 (0)
4	+1 (10)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)
5	+1 (10)	+1 (6)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)
6	+1 (10)	+1 (6)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)
7	-1 (5)	+1 (6)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)
8	-1 (5)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)
9	-1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	+1 (0,75)
10	+1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)
11	-1 (5)	+1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,75)
12	-1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
13/14	0 (7,5)	0 (3)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)
CT <sub>1</sub>	(7,5)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)
CT <sub>2</sub>	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)
CT <sub>3</sub>	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)

**Nota:** <sup>a</sup> Concentração de micotoxina (µg.L<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> Tempo (h); <sup>c</sup> Inulina (%); <sup>d</sup> Oligofrutose (%); <sup>e</sup> Beta-glucana (%); <sup>f</sup> Polidextrose (%). CT<sub>1</sub>: leite + AFB<sub>1</sub> (7,5 µg.L<sup>-1</sup>); CT<sub>2</sub>: leite + *L. plantarum* BG112 (10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) e CT<sub>3</sub>: leite.

Inicialmente, os ensaios foram fortificados com AFB<sub>1</sub>, nas concentrações estipuladas no delineamento (Tabela 4), utilizando uma solução de trabalho de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. Para tal, partiu-se da diluição de 10 µg do padrão da AFB<sub>1</sub> em 10 mL de benzeno:acetoneitrila (98:2, v.v<sup>-1</sup>) em frasco âmbar previamente higienizado (1 µg.mL<sup>-1</sup>, solução estoque). Posteriormente, retiraram-se alíquotas da presente solução e transferiram-se para os erlenmeyers correspondentes, seguindo a concentração final

determinada pelo planejamento (Tabela 5). Sequencialmente foi realizada a evaporação do eluente em estufa a 45 °C (CIENLAB, CTM45, São Paulo).

Foram adicionados aos erlemeyers o leite UHT integral (200 mL) e os prebióticos em estudo, que foram previamente dissolvidos em goblé nas concentrações determinadas no planejamento (Tabela 5) numa pequena porção de leite (50 mL dos 200 mL de amostra) e levados a ultrassom (Elmasonic P60h, Elma, Singen Alemanha) na temperatura de 28 °C por 5 minutos a 80 Hz, posteriormente o volume foi completado para 200 mL.

Por fim, a biomassa de *L. plantarum* BG112 foi adicionada aos ensaios requeridos, na concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para tal, o probiótico foi previamente incubado (0,1% m.v<sup>-1</sup>) em caldo MRS com 0,05% (m.v<sup>-1</sup>) de L - cisteína por 8 h a  $37 \pm 1$  °C e quantificado através de leitura de absorvância (em triplicata) em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Waltham, São Paulo) e posterior estimativa da concentração bacteriana utilizando-se a curva de crescimento (item 4.2), determinando desta forma o volume de caldo MRS a ser inoculado ao leite a fim de obter concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O caldo foi submetido à centrifugação (CT-5000R, Cientec, Piracicaba, SP, Brasil) a 3000 rpm por 5 minutos a 25 °C de acordo com Pisan, Hewitt e Stapley (2013). O sobrenadante foi descartado e a biomassa (*pellet*) adicionada aos ensaios.

Os ensaios foram incubados em Estufa Incubadora B.O.D (403-3D, Nova Ética, Brasil), a  $37 \pm 1$  °C, por até 06 horas, onde amostras foram retiradas nos tempos estabelecidos no planejamento (Tabela 4), submetidas ao congelamento (-18°C / 48 h) e liofilizadas (FreeZone 6L, Labconco, Kansas, EUA) a temperatura de  $25 \pm 1$  °C e pressão de 0,050 mBar por 24 h (Figura 2). As amostras liofilizadas foram mantidas a temperatura de congelamento ( $-18 \pm 2$  °C) até a realização das determinações analíticas posteriores, percentual de redução e bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub>.



**Figura 2 - Amostra de leite liofilizada.**

#### 4.4 Determinação de AFB<sub>1</sub>

##### 4.4.1 Preparo da solução padrão de micotoxina

O padrão da AFB<sub>1</sub> foi preparado conforme proposto pela Portaria n. 49 (BRASIL, 1999) e o Manual de Garantia Analítica (BRASIL, 2011). O preparo partiu da diluição de 5 mg do padrão de AFB<sub>1</sub> (*Sigma Chemical Company*<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) em 100 mL de benzeno:acetonitrila (98:2 v.v<sup>-1</sup>), divididos em frascos âmbar (50 µg.mL<sup>-1</sup>) e evaporados sob corrente de N<sub>2</sub> (TE – 019, Evaporador Tecnal, São Paulo, Brasil) (solução estoque) e armazenados sob temperatura de refrigeração (3 ± 1 °C). A solução de trabalho adotada continha 10 µg.mL<sup>-1</sup>. O padrão foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Waltham, São Paulo) calibrado para o comprimento de onda de 360 nm segundo Trucksess e Pohland (2001), consoante ao disposto na Tabela 6.

**Tabela 6 - Dados referência para a quantificação de AFB<sub>1</sub> por espectrometria.**

Micotoxina	Peso Molecular	Comprimento de onda (nm)	Absortividade	Solvente
Aflatoxina B <sub>1</sub>	312	360	21800	Metanol

**Fonte:** Brasil, 2011.

A concentração foi calculada a partir da equação (01):

$$\mu\text{gAF mL}^{-1} = \frac{A \times \text{MW} \times 1000}{\varepsilon} \quad (01)$$

Onde: “A” representa absorvância, “MW” o peso molecular do composto e “ε” a sua absortividade molar.

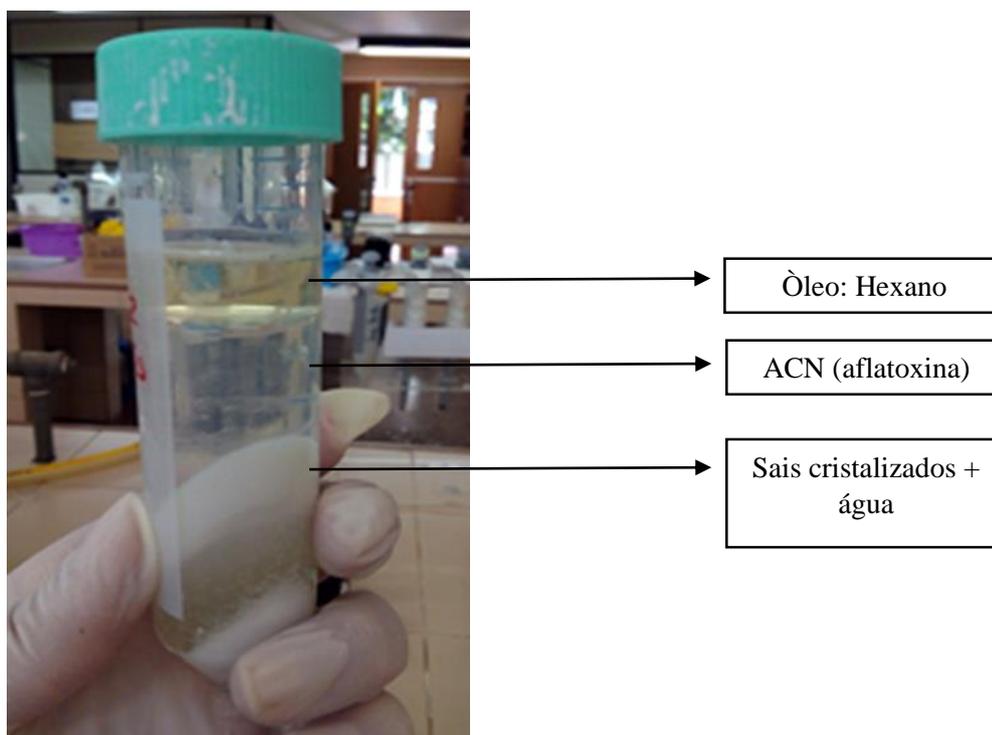
#### 4.4.2 Extração e purificação da AFB<sub>1</sub>

As etapas de extração e purificação da AFB<sub>1</sub> procederam-se conforme descrito por Sartori et al. (2015) através do método tipo QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) com algumas modificações (APÊNDICE B).

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 15 mL de água destilada. A seguir, foram adicionados de 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila acidificada a 1% v.v<sup>-1</sup> com ácido acético e submetidos à agitação vigorosa durante 30 s utilizando vortex (IS Logen, lsm 56/4, Brasil). Foram adicionados à mistura 6 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (Êxodo Científica, Hortolândia, SP) e 1,5 g de cloreto de sódio (NaCl) (LABSynth Ltda, Dieadema, SP), promovendo a sua agitação em vortex (LS Logen, LSM 56/4, Brasil) durante 1 min. Seguiu-se centrifugação (Cientec, CT 5000 R, Brasil) a 3000 rpm durante 7 min à temperatura ambiente (25 ° ± 1 °C) em que a fase hexano foi removida e uma alíquota de 5 mL da fase acetonitrila foi recolhida (Figura 3) e submetida a secagem em estufa a 45 ± 1 °C por 72 ± 1h (PRESTES et al., 2011; MICHELANGELO, et al., 2003). Após total evaporação do solvente, o resíduo foi ressuspense em 500 µL da

composição da fase móvel (ACN:MetOH:H<sub>2</sub>Oacid., 35:10:55, v:v:v), novamente centrifugada a 9000 rpm e submetida a determinação cromatográfica.

Os ensaios de recuperação efetuaram-se em triplicata com base nos níveis de fortificação das amostras de AFB<sub>1</sub> a 10 µg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 3 - Visualização das diferentes fases da solução digerida em tubo falcon após centrifugação.**

#### 4.5 Avaliação do percentual de remoção de AFB<sub>1</sub> dos diferentes ensaios

A avaliação do percentual de remoção da AFB<sub>1</sub> dos diferentes ensaios seguiu a equação 02 conforme proposto por KHOURI, ATOUI e YAGHI (2011).

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{Concentração esperada } (\mu\text{g. L}^{-1}) - \text{Concentração obtida } (\mu\text{g. L}^{-1})}{\text{Concentração esperada } (\mu\text{g. L}^{-1})} \times 100 \quad (02)$$

Onde “ Concentração esperada” é referente à quantidade de composto adicionada no início do ensaio e a “ concentração obtida”.é referente ao valor lido no equipamento.

#### 4.6 Avaliação da bioacessibilidade de aflatoxina B<sub>1</sub>

O modelo de digestão *in vitro* empregado seguiu o esquema apresentado na Figura 4.

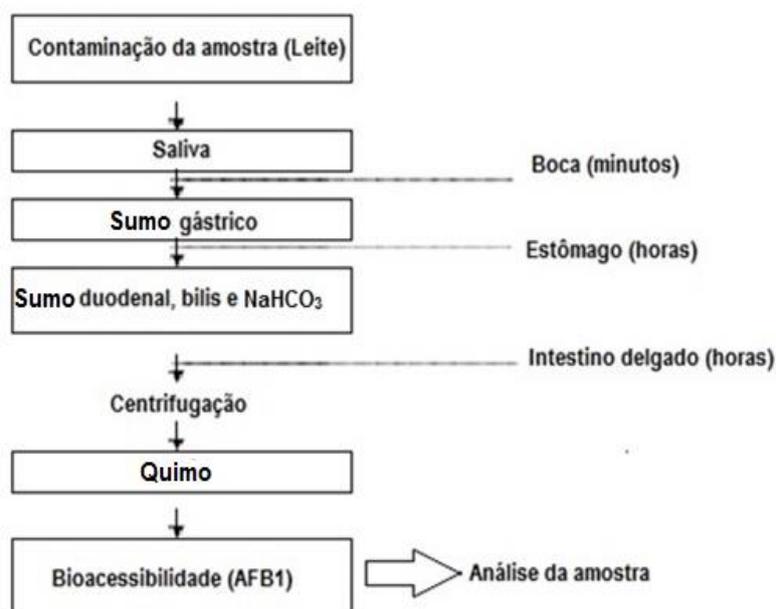


Figura 4 - Representação simplificada do modelo efetuado para a digestibilidade *in vitro*.

Para tal, adicionou-se aos 4,5 mL de leite contaminado por AFB<sub>1</sub>, 6 mL de saliva (pH 6,5 ± 0,5) durante 5 min em “shaker” a 37 ± 2 °C com 5000 rpm para início do processo digestivo. Em seguida 12 mL de suco gástrico (pH 2,5± 0,5) foram acrescentados promovendo a mistura por 2 h a 37 °C mantendo temperatura e velocidade de agitação constantes. Finalmente, adicionou-se, simultaneamente, 12 mL de suco duodenal (pH 6,5± 0,5), 6 mL de bile e 2 mL de solução bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub> a 1 M) à amostra e seguiu agitação em “shaker” por mais 2 h a 37 °C. Decorrido o tempo

de digestão, as amostras digeridas foram centrifugadas por 7 min a 5340 rpm a 25 °C promovendo a separação do sobrenadante (quimo) e o *pellet* (matriz não digerida). O quimo foi submetido à extração da AFB<sub>1</sub>. A composição dos sumos digestivos está descrita na Tabela 7.

**Tabela 7 - Composição dos sucos digestivos empregues no método de digestibilidade *in vitro* utilizado em estudo.**

	Saliva	Sumo Gástrico	Sumo Duodenal	Sumo Bile
<b>Solução Inorgânica</b>	10 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	15,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	30 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL KSCN 20 g.L <sup>-1</sup>	3,0 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	68,3 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	9,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g.L <sup>-1</sup>	4,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaSO <sub>4</sub> 57 g.L <sup>-1</sup>	18 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>	6,3 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	0,15 mL HCl (37%)
	1,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	10 mL NH <sub>4</sub> Cl 30,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL MgCl <sub>2</sub> 5 g.L <sup>-1</sup>	
	20 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	6,5 mL HCl (37%)	0,18 mL HCl (37%)	
<b>Solução Orgânica</b>	8 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>	10 mL glicose 65 g.L <sup>-1</sup> 10 mL ácido glucurónico 2 g.L <sup>-1</sup> 3,4 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup> 10 mL glucosamina hidroclorada 33 g.L <sup>-1</sup>	4 mL urea 25g.L <sup>-1</sup>	10 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>
<b>Demais Compostos</b>	290 mg α-amilase	1 g BSA	9 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>	30 g bile
	15 mg ácido úrico	2,5 g pepsina	1 g BSA	10 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>
	25 mg mucina	3 g mucina	9 g pancreatina  1,5 g lipase	1,8 g BSA
<b>pH</b>	6,8 ± 0,2	1,3 ± 0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

**Fonte:** Adaptado de VERSANTVOORT et al., (2005).

As fases inorgânicas foram preparadas com antecedência (máximo 24 h) e as fases orgânicas no momento do procedimento. As soluções orgânicas e inorgânicas foram completadas para 500 mL com água destilada e posteriormente adicionadas as misturas com os demais compostos (enzimas) seguindo o mesmo protocolo. Os valores de pH dos sumos digestivos foram verificados e, quando necessário, ajustados para o intervalo apropriado com solução de NaOH 1 M ou HCl concentrado. As soluções de CaCl<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O e NH<sub>4</sub>Cl foram preparadas no dia da determinação para se obter a mudança de pH

instantânea do compartimento do estômago e do intestino, respectivamente. Antes da realização da análise, as soluções que continham os sumos digestivos eram aquecidos a 37 °C.

A bioacessibilidade dos compostos foi calculada a partir da equação 03.

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \frac{\text{concentração de AFB}_1 \text{ obtida do quimo} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{concentração de AFB}_1 \text{ obtida da amostra antes da digestão} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})} \times 100 \quad (03)$$

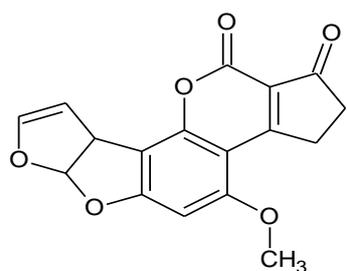
#### 4.7 Deteção e quantificação da AFB<sub>1</sub>

Para a quantificação da AFB<sub>1</sub> foi utilizado cromatógrafo a líquido de ultra alta eficiência acoplado de detetor de fluorescência (UHPLC-FLD) (*Dionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos*) e processamento no *software Chromeleon 7.2*. Foi utilizando fase móvel composta por acetonitrila:metanol:água acidificada (1% ácido acético) na proporção de 35:15:55 (v:v:v), após filtração e desgaseificação prévia, sob eluição isocrática. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 *Acclaim PA2, 5 μm Analítica (4,6 x 250 mm)*, com vazão de fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 35 °C com quantificação em triplicata. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram de 360 e 450 nm, respectivamente, tendo 20 μL como volume de injeção da amostra com tempo de corrida cromatográfica foi de 10 min. Os compostos foram identificados baseados no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando solução padrão que promovia o aumento de sinal do composto. A quantificação foi realizada por normalização externa com base na curva de calibração, que foi traçada pela área do pico para cada padrão contra a quantidade de AFB<sub>1</sub> injetada. A equação da curva de calibração foi utilizada para calcular o teor de AFB<sub>1</sub> no extrato da amostra.

#### 4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) com comparação por análise de Plackett & Burman com 12 ensaios, duplicata no ponto central e utilizando três ensaios “controle” com significância estatística determinada ao nível de 10% de probabilidade foram considerados. A análise de efeitos foi realizada empregando o *Statistica 7.0*.





## Capítulo 5

### Resultados e discussão



## 5.1 Curva de concentração bacteriana

Para maior eficácia no desenvolvimento de colônias que necessitam de microaerofilia ou anaerobiose frequentemente adiciona-se L-cisteína ao meio de incubação. O uso da mesma nos meios de cultura para probióticos não causa perdas de viabilidade celular mesmo que sejam empregadas para diferentes cepas (Champagne et al., 2010).

A curva representada expressa a correlação obtida entre as medidas de absorvância e a enumeração dos probióticos (Figura 5), expressa em  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>. O crescimento das colônias em estufa pode ser visualizado na Figura 6. Tal curva foi construída com o objetivo de obter uma equação (Tabela 8) visando determinar qual volume de caldo MRS deveria ser coletado para que se atingisse a concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Ainda, a literatura reforça que nestas concentrações o consumo de probióticos pode promover os efeitos benéficos, tais como aumentar as defesas da mucosa intestinal contra patógenos e assim estabelecer o equilíbrio da microbiota, auxiliar na digestão de lactose em indivíduos intolerantes, estimular e modular o sistema imunológico, aliviar a prisão de ventre e aumentar a absorção de minerais. Ainda, os trabalhos de remoção de micotoxinas costumam trabalhar com  $10^7$  a  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, faixa esta similar a utilizada no trabalho (BRASIL, 1999).

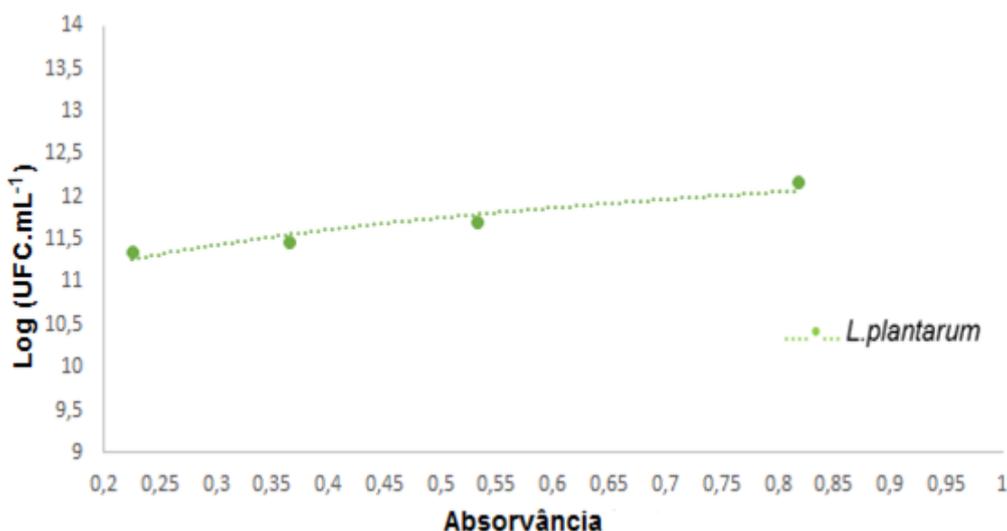


Figura 5 - Curva de concentração bacteriana para a cepa probiótica *L. plantarum*.

**Tabela 8 - Valor da absorvância e concentração bacteriana.**

Cepa	Equação	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )
<i>L. plantarum</i>	$Y = 12,2 * X^{0,0536}$	0,9017

X: Média das absorvâncias

Y: Log (UFC.mL<sup>-1</sup>)



**Figura 6 - Placa de petri com colónias típicas de *L. plantarum* BG112.**

## 5.2 Determinação da AFB<sub>1</sub> em leite

### 5.2.1 Controlo de qualidade analítica do método

É imprescindível que se continue a desenvolver métodos analíticos para identificação e quantificação de contaminantes químicos nos alimentos, especialmente em leite. Na atualidade, a determinação de micotoxinas em leite baseia-se na extração com solventes orgânicos, purificação cromatográfica (em fase sólida) ou imunoafinidade, combinada com HPLC (de fase reversa) e detetor de fluorescência (com ou sem derivatização) (SABINO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005; GURBAY et al., 2010; NAVAS). No presente estudo, o método de extração tipo QuEChERS foi adaptado e validado para a extração e determinação da AFB<sub>1</sub> em leite e fluido biológico conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

Para a validação do método no equipamento, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados consoante os limites de detecção (LODi;

0,30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e quantificação (LOQi; 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) da AFB<sub>1</sub> (BRASIL, 2003) após aplicação das equações 04 e 05, respectivamente.

$$LOQ = \frac{10 \times s}{m} \quad (04)$$

e

$$LOD = \frac{3 \times s}{m} \quad (05)$$

Onde: “s” é obtido segundo o desvio padrão do branco ou segundo o desvio padrão do declive ou da ordenada na origem da curva de calibração e “m” referente ao declive da curva de calibração.

Cada amostra foi fortificada segundo uma concentração conhecida de AFB<sub>1</sub> (co-cromatografia) comparada com a amostra padrão (amostra sem contaminação) determinando-se assim a sua seletividade. Não foram observados sinais interferentes por parte da aflatoxina no tempo de retenção registrado (~8,0 min) como pode ser visualizado na figura 7.

A linearidade da curva de calibração foi verificada nos intervalos de concentração estudados com coeficiente de determinação satisfatório ( $R^2 = 0,99768$ ), evidenciando dessa forma o ajuste ideal dos dados à linha de regressão. A curva de regressão linear apresentou a equação  $y = 96,9x + 0,39$ . O intervalo de concentração para a curva de trabalho da AFB<sub>1</sub> foi de 0,5 - 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Para a construção das curvas de calibração de trabalho e do solvente foram utilizados seis níveis de concentração das micotoxinas. As diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2003) e a *International Conference on Harmonisation (ICH)* (1995) especificam um mínimo de cinco níveis de concentração para a construção da curva.

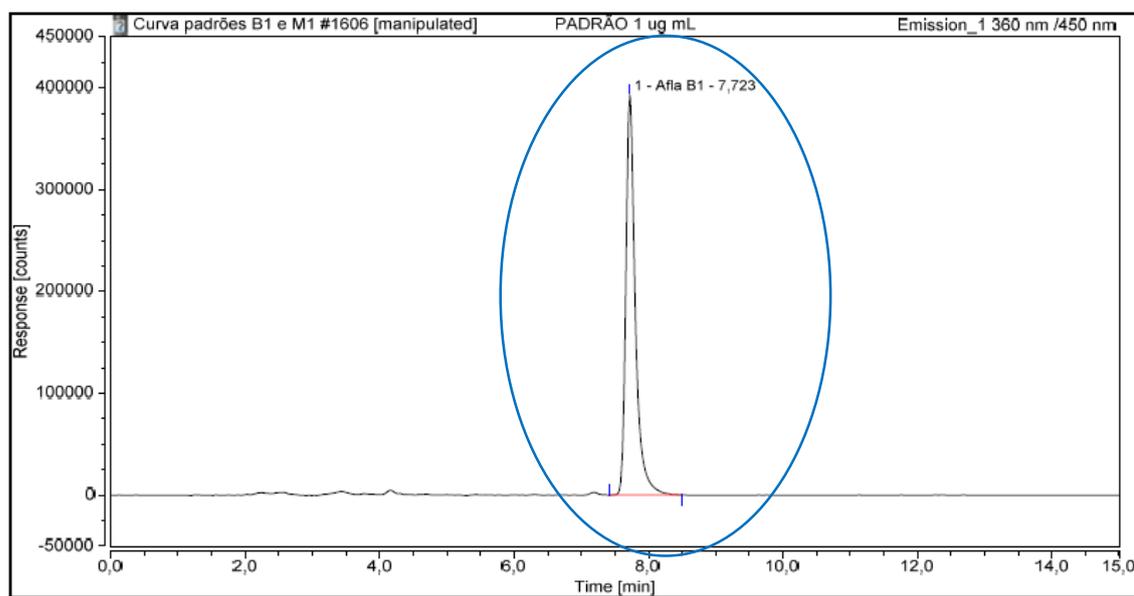
A repetibilidade do método foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo percentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação (%R) do método sintetizados na Tabela 9. O valor de recuperação (%R) variou de 60,4 a 87,54%. Na determinação de micotoxinas consideram-se como aceitáveis valores de recuperação no intervalo de 70 a 120% e coeficiente de variação inferior a 30%

(HORWITZ; ALBERT; NESHEIM, 1993; HORWIT; KAMPS; BOYER, 1980). A precisão foi comprovada a partir dos valores de RSD (%) que não ultrapassaram os 8,3% adequando-se aos padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

**Tabela 9 - Valores de precisão, LOD e LOQ para a determinação de AFB<sub>1</sub> em leite e fluido biológico.**

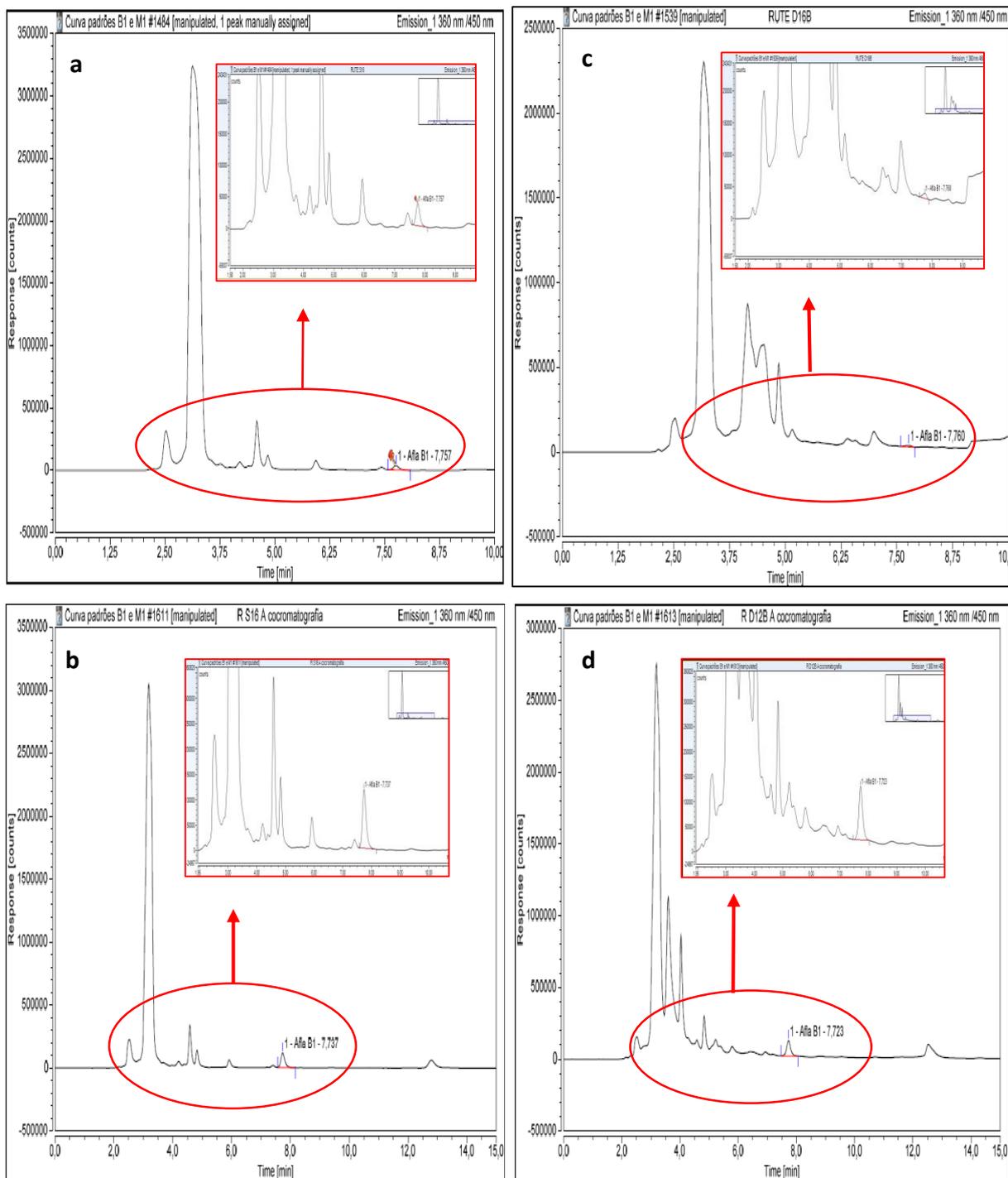
	Fortificação AFB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Repetibilidade (n = 3)		LOD ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
		Recuperação (%)	RSD (%)		
Leite	0,5	64,80	8,1	0,1	0,3
	5,0	66,72	4,1		
	10,0	68,25	0,2		
Fluído Biológico <sup>(a)</sup>	0,5	87,54	3,9	0,9	2,8
	5,0	62,83	8,3		
	10,0	60,4	1,6		

**Nota:** <sup>(a)</sup> Os teores de LOD e LOQ para as amostras de fluido biológico correspondem à concentração mínima da aflatoxina B<sub>1</sub> que deve estar presente na amostra inicial submetida à digestão, quando coletados 5 mL do digerido para extração pela metodologia de QuEChERS.



**Figura 7 - Cromatograma representativo do pico padrão gerado pela aflatoxina quando diluído na amostra (1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).**

Os ensaios foram submetidos a extração e quantificação da AFB<sub>1</sub> por cromatografia de alta eficiência (CLAE) com obtenção de cromatogramas (Figura 8). Os compostos foram identificados baseados no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando soluções padrão que promoviam o aumento de sinal do composto ao seu dobro. O tempo de retenção da AFB<sub>1</sub> foi 7,72 min no pico padrão, 7,75 min para amostra de sobrenadante e 7,76 min para amostra digerida.



**Figura 8 – Exemplos de cromatogramas das amostras em estudo.**

**Nota:** a) Amostra fortificada com AFB<sub>1</sub> (55 µg.L<sup>-1</sup>); b) cocromatografia da amostra fortificada com AFB<sub>1</sub> (adição de padrão 120 µg.L<sup>-1</sup>); c) amostra digerida fortificada com AFB<sub>1</sub> (13 µg.L<sup>-1</sup>); d) cocromatografia da amostra digerida fortificada com AFB<sub>1</sub> (adição de padrão 150 µg.L<sup>-1</sup>).

### 5.3 Avaliação do percentual de redução e da bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> em leite por *Lactobacillus plantarum* BG112 e prebióticos

Muitas das pesquisas já desenvolvidas são referentes à contaminação do leite provocada por AFB<sub>1</sub> e os níveis determinados para sua regulamentação estão já em vigor; no entanto, tem-se demonstrado que a conversão de AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub> não é de todo realizada e esta pode ser detectada na matriz láctea (CARVAJAL et al., 2003; GURBAY et al., 2010 e SCAGLIONI et al., 2014).

Uma vez que é passível de contaminar o leite e derivados, apresenta-se como um problema de saúde pública, fazendo-se necessária a sua avaliação já que AFB<sub>1</sub> possui maior poder de toxicidade perante a sua fração hidroxilada (AFM<sub>1</sub>) (ZAIN, 2011).

Assim, o estudo de técnicas que permitam a redução do percentual ou da bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> torna-se interessante, em especial quando estas técnicas envolvem ingredientes corriqueiramente utilizados na indústria láctea, como os probióticos e prebióticos.

Como forma de evidenciar os resultados referentes aos diferentes ensaios avaliativos da redução e bioacessibilidade, a Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento realizado com valores reais e codificados (concentração de micotoxina, tempo de incubação e diferentes prebióticos) em termos de percentual de redução e de bioacessibilidade.

**Tabela 10 – Matriz de planejamento Plackett & Burman de 12 ensaios, com dois pontos centrais, com as variáveis independentes concentração de micotoxina, tempo, inulina, povidexrose, oligofrutose e beta-glucana e as variáveis dependentes redução (%) e bioacessibilidade (%).**

Ensaio	x <sub>1</sub> <sup>a</sup>	x <sub>2</sub> <sup>b</sup>	x <sub>3</sub> <sup>c</sup>	x <sub>4</sub> <sup>d</sup>	x <sub>5</sub> <sup>e</sup>	x <sub>6</sub> <sup>f</sup>	Red. (%)	Bioac. (%)
1	+1 (10)	-1 (0)	+1 (0,75)	- 1 (0)	- 1 (0)	- 1 (0)	7,57 ± 1,56	15,92 ± 0,79
2	+1 (10)	+1 (6)	-1 (0)	+ 1 (0,75)	- 1 (0)	- 1 (0)	22,98 ± 0,60	15,62 ± 0,55
3	-1 (5)	+1 (6)	+1 (0,75)	- 1 (0)	+ 1 (0,75)	- 1 (0)	- 57,49 ± 0,08	26,53 ± 2,13
4	+1 (10)	-1 (0)	+1 (0,75)	+ 1 (0,75)	- 1 (0)	+ 1 (0,75)	- 4,51 ± 8,28	21,25 ± 1,60
5	+1 (10)	+1 (6)	-1 (0)	+ 1 (0,75)	+ 1 (0,75)	- 1 (0)	0,02 ± 2,52	20,00 ± 2,00
6	+1 (10)	+1 (6)	+1 (0,75)	- 1 (0)	+ 1 (0,75)	+ 1 (0,75)	30,18 ± 1,97	30,76 ± 1,74
7	-1 (5)	+1 (6)	+1 (0,75)	+ 1 (0,75)	- 1 (0)	+ 1 (0,75)	- 2,50 ± 3,45	35,63 ± 0,28
8	-1 (5)	-1 (0)	+1 (0,75)	+ 1 (0,75)	+ 1 (0,75)	- 1 (0)	55,85 ± 0,66	51,09 ± 0,99
9	-1(5)	-1 (0)	-1 (0)	+ 1 (0,75)	+ 1 (0,75)	+ 1 (0,75)	5,48 ± 0,41	39,34 ± 0,77
10	+1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	+ 1 (0)	+ 1 (0,75)	+ 1 (0,75)	25,43 ± 3,42	26,78 ± 0,81
11	-1 (5)	+1 (6)	-1 (0)	- 1 (0)	- 1 (0)	+ 1 (0,75)	- 15,77 ± 0,62	30,55 ± 0,74
12	-1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	- 1 (0)	- 1 (0)	- 1 (0)	31,45 ± 2,94	27,12 ± 0,93
13	0 (7,5)	0 (3)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	25,64 ± 1,54	28,01 ± 0,27
14	0 (7,5)	0 (3)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	21,71 ± 2,57	21,00 ± 0,39
CT <sub>1</sub>	(7,5)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	101 ± 6,3
CT <sub>2</sub>	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	ND	ND
CT <sub>3</sub>	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	-

**Nota:** <sup>a</sup> Concentração de micotoxina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); <sup>b</sup> Tempo (h); <sup>c</sup> Prebiótico inulina (%); <sup>d</sup> Prebiótico Oligofrutose (%); <sup>e</sup> Prebiótico Beta-glucana (%); <sup>f</sup> Prebiótico Povidexrose (%); CT<sub>1</sub>: leite + mico ( $7,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) – controle positivo (amostra de leite fortificada com micotoxina, sem probiótico e sem prebióticos); CT<sub>2</sub>: leite + probiótico ( $10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e CT<sub>3</sub>: leite. ND – Não Detetado

Diversos autores (El-NEZAMI et al., 1998; OATLEY et al., 2000; HASKARD et al., 2001; PELTONEN et al., 2001; El-LAHTINEN et al., 2004; KHOURY, ATOUI; YAGHI, 2011 e CORASSIN et al., 2013) abordaram o efeito de bactérias ácido lácticas (BAL) no controlo de contaminação de aflatoxinas B<sub>1</sub> e M<sub>1</sub> utilizando soluções tampão ou leite artificialmente contaminado. No entanto, nenhum dos trabalhos já publicados foca a real presença de AFB<sub>1</sub> em leites e por consequência a contribuição da BAL em termos de descontaminação do meio, agindo sobre este tipo de micotoxina.

Analisando individualmente a ação do probiótico (ensaio 12, Tabela 10) verificou-se que o percentual redutivo sobre a aflatoxina foi de 31,45%. Este valor foi superior ao encontrado por Bovo (2011) quando avaliou o efeito do probiótico *L. plantarum* sobre AFB<sub>1</sub> em uma solução TFS, obtendo 5,60% de redução em 15 min e 8,08% em 24 h. Elgerbi et al. (2006) utilizando cepas de *Lactobacillus* spp. em 24 h alcançou uma redução de 0 a 14,6% que aumentou de 4,5% a 73,1% se aplicadas 96 h numa solução TFS para AFM<sub>1</sub>. Por sua vez, Gomah, Ragab e Bullerman (2010) obteve valores de 96,3 a 98,3% após 10 dias de incubação utilizando diferentes estirpes de *L. plantarum* numa solução contendo extratos de levedura. No estudo de Duarte et al. (2013) *L. plantarum* evidenciou maiores percentuais na capacidade de degradar a AFM<sub>1</sub> e na estabilidade do complexo por ela formado perante o desempenho de outros micro-organismos testados (*L. acidophilus* ATCC 20552, *L. rhamnosus* TISTR 541, *Bifidobacterium angulatum* DSMZ 20098 *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) na forma viável e aquecida ou após incubação em HCl (2M) alcançando 27,5%. No presente trabalho o micro-organismo mostrou ser mais eficaz e promissor agindo individualmente do que nos tratamentos adicionados de um ou mais prebióticos onde a sua ação pode ter sido prejudicada, isto é a adição de prebióticos aos ensaios promoveu apenas a funcionalidade a eles atribuída ao invés de agirem como auxiliares para o desempenho do micro-organismo. A exceção verificou-se para o ensaio 08 com 55,85% onde efetivamente ocorreu um aumento desta redução para igual concentração de aflatoxina presente no meio (5,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e igual tempo de contato disponibilizado (0 h) após ter sido aplicado inulina, oligofrutose e beta-glucana junto da bactéria. Esta associação permitiu potencializar a ação isolada do probiótico em relação ao percentual de redução. Porém, isoladamente, ou associada aos pares, estes prebióticos exercerem menor poder redutor quando comparado ao ensaio 12 (Tabela 10).

Os resultados estão de acordo com El-Nezami et al. (1998) que visualizaram que, de forma rápida e nos primeiros minutos (33,2% com 0 h; 57,6% em 72 h de incubação), algum tipo de ligação e inibição era exercido pelas bactérias quando aplicada para AFB<sub>1</sub> em solução tampão. Ainda que o mecanismo de ligação e redução da AFB<sub>1</sub> pelas BAL se encontre em fase de descoberta, alguns autores mencionam que certos compostos por elas sintetizados possibilitam a reação com a parede celular bacteriana e não são metabolicamente degradados (EL-NEZAMI et al., 1998; LAHTINEN et al., 2004;

CORASSIN et al., 2013). Ainda é possível acrescentar que efetivamente a BAL atuou de forma eficaz na inativação da AFB<sub>1</sub> acreditando-se que o mecanismo de ação se procedeu de forma física, pela ligação aos compostos da membrana celular (polissacarídeos e peptidoglicano) como mencionado por diversos autores. Haskard e seus colaboradores (2001) também demonstraram que *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) e *L. rhamnosus* LC-705 (DSM 7061) foram capazes de eliminar a AFB<sub>1</sub> a partir do meio de cultura por um processo físico. Por fenômenos específicos como ligação e inibição da biossíntese pode ser desenvolvida uma interação entre BAL e a acumulação de algumas micotoxinas. Assim, nos resultados onde não houve redução ou menor do que a redução promovida pelo ensaio 12 (Tabela 10) a ligação da AF com a bactéria pode ter sido anulada, uma vez que é reversível e houve a introdução de prebióticos. Acresce referir que pela distância verificada entre os pontos centrais (13 e 14), o efeito negativo observado em algumas variáveis (Tabela 11) pode estar associado a um erro inerente ao processo, uma vez que o valor de t baixa e p-valor aumenta. No caso concreto, polidextrose (-9,46%) estatisticamente não significativa e que apresenta um efeito negativo.

No geral, os efeitos redutivos sobre a contaminação por AFB<sub>1</sub> em leite foram notoriamente maiores quando estabelecido o contato inicial (0 h) entre os componentes, na presença de baixa concentração de aflatoxina (5,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e utilizando alguns prebióticos (como inulina e oligofrutose) na quantidade máxima (0,75%).

Ao avaliar o efeito de cada variável estudada sobre o percentual de redução de AFB<sub>1</sub>, obtiveram-se os resultados dispostos na Tabela 11. Os valores negativos alcançados na Tabela 10 foram considerados nulos quando aplicado o planejamento estatístico experimental para o cálculo dos efeitos das variáveis.

**Tabela 11 – Efeitos estimados e p-valores para a percentagem de redução de AFB<sub>1</sub> em função das variáveis concentração de micotoxina, tempo e prebióticos numa matriz láctea.**

Resposta	Variáveis	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
<b>Redução de AFB<sub>1</sub> (%)</b>	Média	16,1651	5,3203	3,0384	0,0189*
	Concentração AFB <sub>1</sub> (µg.L <sup>-1</sup> )	-1,0979	11,4931	-0,0955	0,9266
	Tempo (h)	-12,0986	11,4931	-1,0527	0,3275
	Inulina (m.v <sup>-1</sup> )	1,3713	11,4931	0,1193	0,9084
	Oligofrutose (m.v <sup>-1</sup> )	-1,7186	11,4931	-0,1495	0,8854
	Bglucana (m.v <sup>-1</sup> )	9,1607	11,4931	0,7971	0,4516
	Polidextrose (m.v <sup>-1</sup> )	-9,4625	11,4931	-0,8233	0,4375

\*p≤0,10.

Apesar de nenhuma das variáveis estudadas terem apresentado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) pode observa-se que a concentração da micotoxina e tempo, um aumento dentro da faixa de concentração estudada apresentou efeito negativo, ou seja, quanto maior a concentração de micotoxina e tempo, menor foi o percentual de remoção. Passando da faixa de menor valor (-1) para a de maior valor (+1) a variável tempo regista 12% de redução, significando que algum erro pode estar inerente à variabilidade obtida durante a aplicação do processo e como o tal a mesma ser negativa. Assim, e uma vez que neste estudo ambas as variáveis se fizeram presentes em todos os ensaios, a sua interferência em termos de redução é negativa, não auxiliando o processo de descontaminação. Um maior tempo de contato entre o probiótico e a toxina não fará com que maiores teores de AFB<sub>1</sub> sejam removidos do meio; assim ensaios onde foram disponibilizadas mais horas de contato não traduziram melhores percentagens de redução (Tabela 11). Por sua vez, naqueles onde uma maior concentração de micotoxina estava presente, o comportamento foi similar, verificando-se que tratamentos onde a faixa mínima foi aplicada proporcionaram um maior sucesso. Por sua vez, Kabak e Var (2008) utilizando 4 cepas de *Lactobacillus* spp. e 2 cepas de *Bifidobacterium* spp. num estudo avaliativo da redução de AFM<sub>1</sub> em tampão fosfato salino, verificaram que o nível de contaminação e o período de incubação poderia interferir nos resultados obtidos. Alguns dos trabalhos científicos que avaliam a quantidade de aflatoxinas contaminantes removidas por meio de bactérias

ácido lácticas têm em consideração nos seus estudos a influência do binômio tempo-concentração, no entanto outros autores desconsideram esse fato visando o enfoque apenas nos teores reductivos que podem ser alcançados pelo(s) micro-organismo(s) no meio em que estão inseridos. El Nezami et al. (1998) por aplicação de *L. acidophilus* observaram que utilizando 72 h de incubação eram obtidos valores de remoção de até 77% da AFB<sub>1</sub> e que sem incubação só atingia os 33,2%. BECKER-ALGERI (2016) no seu trabalho visualizou maior ação das BAL sobre os níveis de AFB<sub>1</sub> do que AFM<sub>1</sub>, independente da fortificação ser realizada de forma simultânea ou separadamente da AFM<sub>1</sub>. A redução variou de 8,96 a 100% para AFB<sub>1</sub>, quando as amostras foram fortificadas separadamente utilizando um período de incubação 0 e 4 h. Somente o *L. acidophilus* proporcionava redução da micotoxina chegando perto dos 73,7%, mas quando utilizadas BAL combinadas, os teores de redução foram maiores conseguindo uma média de 85%. Peltonen et al. (2001) relataram que as quantidades de AFB<sub>1</sub> removidas por bactérias, viáveis ou tratadas termicamente, foram dependentes das concentrações iniciais de AFB<sub>1</sub>, e que esse processo acontece de forma rápida (de 52,6% a 66,5% com 0 h de incubação). Se aumentar a concentração de micotoxina sem aumentar a concentração de BAL, o percentual de remoção tem de ser menor. Segundo Lee et al. (2003) a concentração de AFM<sub>1</sub> no meio influencia a taxa de adsorção da mesma ou seja, maiores quantidades de toxina vão ser removidas se forem disponibilizadas maiores concentrações de BAL.

Se avaliado os efeitos dos prebióticos sobre o percentual de redução, é possível verificar que oligofrutose e polidextrose exerceram efeitos negativos, ou seja, dentro da faixa estudada, um aumento na concentração diminuiu o percentual de redução da AFB<sub>1</sub>. Por sua vez, a inulina e a beta-glucana apresentaram efeito positivo, ou seja dentro da faixa estudada, um aumento na concentração favorece o percentual de redução da AFB<sub>1</sub>. Esse efeito positivo pode estar associado ao resultado obtido em termos de redução percentual no ensaio 08 (Tabela 10). Sugere-se que um possível fenômeno de adsorção tenha acontecido visto que nas 0 h, o tempo de contato com prebiótico é muito limitado e as condições do meio não foram ainda modificadas pela ação do probiótico. Foi também demonstrado por Oatley et al. (2000) que a remoção de AFB<sub>1</sub> não ocorre unicamente pela ligação da toxina com o *pellet* bacteriano já que sobre diferentes formas e de forma

reversível, a ligação com AFB<sub>1</sub> se dá pela presença de sítios ativos da parede celular bacteriana provavelmente causados pelas diferenças morfológicas e estruturais da mesma.

### 5.3.1 Avaliação da bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> pela ação de probiótico e prebióticos

A interação *in vivo* será favorecida quando houver uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico, anterior ao consumo que, em alguns casos, resulta numa vantagem claramente competitiva para a BAL se esta for consumida juntamente com o prebiótico (SAAD, 2006). Bielecka, Biedrzycka e Majkowska (2002) confirmaram a adequação desta combinação, demonstrando uma maior eficácia na descontaminação do meio quando comparado com o uso individualizado de probióticos.

No que diz respeito a estudos avaliativos da bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> em amostras de leite empregando modelos *in vitro* nada foi publicado. Até então, foram reportados valores consideráveis em certos alimentos (85,9 e 98,5%), após aplicação de etapa digestiva, como frutos secos (amendoim, milho e trigo) (KABAK; OZBEY, 2012b). Versantvoort et al. (2005) também verificou que 94% da micotoxina disponível para absorção podia ser conseguida numa amostra constituída por amendoins igualmente ao referido por Carolien et al. (2005) com igual valor (94%) para a biodisponibilidade do AFB<sub>1</sub> em pasta de amendoim. Estes valores foram inferiores aos obtidos neste estudo (maior bioacessibilidade), no entanto a matriz utilizada foi notoriamente diferente e os resultados obtidos adequados à mesma.

Com o intuito de avaliar e estimar a biodisponibilidade deste composto contaminante (AFB<sub>1</sub>), os ensaios foram submetidos a um modelo de digestão *in vitro*. A bioacessibilidade da AFB<sub>1</sub> na amostra de leite adicionada apenas de AFB<sub>1</sub> (CT<sub>1</sub>) foi de 101% (Tabela 10). Os níveis de redução da biodisponibilidade variaram de 15,62% (ensaio 2) a 51,09% (ensaio 8), onde os ensaios 1 e 2 apresentaram os menores valores e o ensaio 08 o maior valor de bioacessibilidade.

A adição de *L. plantarum* BG112 em leite contaminado por AFB<sub>1</sub> resultou numa bioacessibilidade de  $27,12 \pm 0,93\%$  para a micotoxina em estudo. Becker-Algeri (2016) em leite pasteurizado, contaminado artificialmente por AFB<sub>1</sub>, alcançou o seu melhor resultado ( $28,0 \pm 1,18\%$ ) utilizando *L. acidophilus* isoladamente. Também Kabak e

Ozbey (2012a) utilizando uma matriz de leite (fortificada com AFB<sub>1</sub>) teve reduções da bioacessibilidade entre 15,5 a 31,6% em comparação com os controles por aplicação de géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Serrano-Niño et al. (2013) conquistaram reduções na bioacessibilidade da AFB<sub>1</sub> em leites fermentados de 22,7 a 45,2% com destaque para *B. bifidum* NRRL.

Analisados os resultados é possível concluir que a bactéria em estudo ficou próxima dos níveis de bioacessibilidade que outros autores apresentaram, e como tal também ela demonstrou a capacidade de ligação das BAL com as AFB<sub>1</sub> uma vez que as mesmas são liberadas da sua matriz para o fluido biológico. *L. plantarum* poderá ser incorporado numa matriz alimentar como forma de reduzir a bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub>.

Os resultados referentes à análise de efeitos encontram-se na tabela 12. A concentração de micotoxina apresentou efeito negativo significativo na bioacessibilidade, ou seja, quanto maior a concentração de AFB<sub>1</sub>, dentro da faixa estudada, menor foi a bioacessibilidade. A concentração de uma micotoxina foi estudada e comparada quanto a sua bioacessibilidade. Numa experiência efetuada por Meca et al (2012a) utilizando pão crocante de trigo produzido com compostos prebióticos e contaminado com 5 e 25 mg.L<sup>-1</sup> de micotoxina BEA, os dados médios de bioacessibilidade dos compostos bioativos testados (nas duas concentrações) foram de 2,4% e 1,5%, respectivamente. Todo o prebiótico aplicado reduziu efetivamente a micotoxina e, em particular, essa redução teve a faixa de 96% a 99% considerando as duas concentrações empregadas.

**Tabela 12 – Efeitos estimados, p-valores e percentagem de bioacessibilidade para AFB<sub>1</sub> em função das variáveis concentração de micotoxina, tempo e prebióticos numa matriz láctea.**

Resposta	Variáveis	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
<b>Bioacessibilidade (%)</b>	Média	27,8277	1,6542	16,8221	0,0000*
	Concentração micotoxina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	-13,3238	3,5736	-3,7284	0,0074*
	Tempo (h)	-3,7351	3,5736	-1,0452	0,3307
	Inulina ( $\text{m.v}^{-1}$ )	3,6247	3,5736	1,0143	0,3442
	Oligofrutose ( $\text{m.v}^{-1}$ )	4,2124	3,5736	1,1788	0,2770
	B-glucana ( $\text{m.v}^{-1}$ )	8,0680	3,5736	2,2577	0,0585*
	Polidextrose ( $\text{m.v}^{-1}$ )	4,6700	3,5736	1,3068	0,2326

\* $p \leq 0,10$

As pesquisas de Meca et al. (2012a) demonstram que a capacidade de ligação do composto bioativo para as fibras avaliadas é maior quando a aflatoxina foi utilizada na concentração mais baixa (5 mg / L) contrariamente ao nosso caso.

Este fenómeno pode, provavelmente, ser relacionada com a presença de restritos locais de ligação nas fibras que impedem a ligação com aflatoxinas para a concentração mais elevada como anteriormente dito.

Alguns autores (Carolien et al., 2005; Meca et al., 2012b) comparando a biodisponibilidade de aflatoxinas com outros compostos mas contidos em alimentos líquidos ou sólidos concluíram que a biodisponibilidade diferia entre si ou seja, a matriz alimentar quando enriquecida com fibras tem a propriedade de capturar a toxina, reduzindo assim a sua biodisponibilidade e também ela pode suscitar alterações nas porções que estão biodisponíveis. Kabak et al. (2009) em frutos secos e alimentos infantis teve biodisponibilidade média de AFB<sub>1</sub> em cerca de 90%, variando consoante a matriz entre 85,1 - 98,1% dependendo de diferentes fatores, tais como produto alimentar, nível de contaminação, composto e tipo de contaminação (fortificada vs. naturalmente contaminado) o que confirma o referido inicialmente para o presente trabalho.

Por sua vez, o tempo não influenciou na bioacessibilidade da AFB<sub>1</sub>. Avantiato et al. (2003) estudaram absorção intestinal de ZEA usando um modelo de laboratório que simula a fisiologia do trato gastrointestinal de suínos saudáveis. Perto de 32% de ZEA foi transferida a partir da matriz de alimentos durante 6 h de digestão e rapidamente absorvida a nível intestinal se complementado os tratamentos com adsorventes. Contudo, neste trabalho, para AFB<sub>1</sub> o tempo não teve o mesmo comportamento. Inulina dispendo de 0h e oligofrutose dispendo de 6 h, tiveram percentuais praticamente idênticos (15%) para a mesma concentração de micotoxina. O mesmo foi visto entre povidone e probiótico sozinho, ambos com igual teor de aflatoxina mas com diferenças no tempo, ambos ficaram muito próximos de 30%.

A adição dos prebióticos não apresentou efeito significativo ( $p > 0,10$ ); salvo a adição de beta-glucana, ou seja, a medida em que a concentração de beta-glucana aumenta, dentro da faixa de concentração estudada, a bioacessibilidade aumenta.

Apesar dos ensaios 1 (inulina) e 2 (oligofrutose) terem apresentados os menores valores de bioacessibilidade, estes prebióticos não tiveram efeitos significativos neste parâmetro. Reforçando, portanto, que a concentração exerce maior efeito do que o tipo de prebiótico empregado, já que estes ensaios trabalharam com concentrações maiores de AFB<sub>1</sub>. O fato da inulina apresentar efeito positivo, apesar de não significativo, pode ser explicado por Barclay et al. (2010), que relataram que a inulina pode ser ideal para o transporte de substâncias para o cólon, uma vez que é estável para a gama de pH ácido da zona gastrointestinal humana. Como descrito por Fritzen-Freire et al. (2012), as ações da inulina, como protetores das células de *Bifidobacterium* Bb-12 mostram um efeito positivo sobre a sua sobrevivência durante a simulação gástrica. Num trabalho elaborado por Meca et al. (2012a) através da inulina, a biodisponibilidade da micotoxina BEA foi consideravelmente reduzida utilizando a concentração de 5% com valores de  $2,6 \pm 0,5\%$ . Já a menor redução foi evidenciado pelas fibras FOS (5%), com  $21,5 \pm 1,4\%$ . No entanto, no seu geral e perante outras estudadas (glucomanano, celulose) elas foram melhores, fenómeno este provavelmente devido à elevada capacidade das enzimas microbianas degradarem os fruto-oligosacarídeos como FOS e inulina, em relação a outras fibras alimentares.

Não obstante ao referido anteriormente, no que diz respeito aos prebióticos espera-se que ocorram diferenças significativas em termos de desempenho, quando

adicionados no processo de descontaminação após simulação gástrica. Tal é justificado pelos locais ativos de ligação existentes na estrutura dos compostos, impedindo que os tóxicos se fixem ou pelas suas capacidades na captura de compostos bioativos presentes na matriz alimentar, como polifenóis e depois a hidrólise da sua estrutura pelo complexo de enzimas das bactéria presentes no compartimento do cólon intestinal antes da absorção pelo epitélio intestinal, reduzindo a bioacessibilidade da aflatoxina. Espera-se que as células utilizadas resistam à passagem gastrointestinal combatendo a adsorção das toxinas no epitélio intestinal, reduzindo a sua biodisponibilidade, sem implicações para os alimentos e com garantias de excreção fecal.

A aplicação de menores quantidades de probiótico poderiam ter sido mais significativas sobre a contaminação em estudo, já que para ambas as respostas (red. e bioc.) o seu aumento contribuiu negativamente para o sucesso do processo. *In vivo*, logo que um composto é libertado da sua matriz no quimo, pode ser transportado através do epitélio intestinal, sendo absorvido internamente e assim não ser possível a redução da sua concentração. No modelo de digestão, os compostos não são removidos do quimo durante esse processo e, portanto, a bioacessibilidade pode ser superestimada, quando a saturação do composto ocorre no quimo (VERSANTVOORT et al., 2005). A centrifugação foi realizada a baixa velocidade porque se parte do princípio que todas as moléculas mobilizadas a partir da matriz estão, à partida, disponíveis para o transporte através o epitélio intestinal e, portanto, representam uma situação (realista) no caso de tal situação não ocorrer de forma tão eficiente. Também deverá ser tido em consideração que os valores de bioacessibilidade obtidos com recurso a modelos de digestão *in vitro* podem ser dificultados pelas diferenças nas condições experimentais quando as análises são realizadas em diferentes laboratórios nomeadamente na separação do quimo (quimo) a partir da matriz (*pellet*) (VERSANTVOORT et al., 2005). A inclusão de bactérias probióticas no estudo de Kabak e Ozbey (2012) mostrou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na biodisponibilidade de AFs: próximo de 35,6% para AFB<sub>1</sub>, 35,5% para AFB<sub>2</sub>, 31,9% para AFG<sub>1</sub> e 33,6% para AFG<sub>2</sub>. Atividade de bactérias probióticas quando formado o complexo comprovou ser reversível com 10,3 a 39,8% destes a serem liberados de volta para os sumos de digestão.

Fazendo a mesma analogia, o tratamento 08, no caso, contribuiu para o maior aumento da bioacessibilidade (51,09%) seguido do 09 (39,34%) e do 07 (35,63%). No

primeiro caso, se por um lado o tratamento é o ideal para reduzir a concentração da aflatoxina, por outro também permite que a mesma esteja acessível para absorção por parte do organismo, já que 85,08% está disponível para ser incorporado pelo organismo. Em termos de efeito, há uma semelhança entre as percentagens de bioacessibilidade (Tabela 12) quando analisada a variável inulina e oligofrutose, ambas com efeito significativo em termos de redução de bioacessibilidade. Utilizando estas variáveis, dentro da faixa estudada, elas apresentam um maior papel na redução da bioacessibilidade, confirmando os percentuais alcançados nos ensaios mencionados.

Num estudo realizado para biodisponibilidade da micotoxina BEA a inulina reduziu consideravelmente a sua quantidade e quando utilizada com uma concentração de 5% mostrou valores na ordem dos 2,6% (MECA et al., 2012a). Ainda nesta pesquisa outras das fibras estudadas evidenciaram uma boa ação de captura da BEA na solução modelo referente ao digerido, mais eficaz no intestino do que no compartimento duodenal, onde as mesmas podem complexar eficazmente a micotoxina. Também a amostra 04 (*L. plantarum*+ inulina + oligofrutose + polidextrose) demonstraram uma boa capacidade de ligação da BAL com a AFB<sub>1</sub> quando digeridas, contrariamente ao que foi verificado na redução. A justificação pode estar na libertação dos constituintes presentes na matriz para o fluido biológico e nas reações ocorridas pelo auxílio de enzimas do trato digestivo como já havia sido mencionado. No estudo Oluwafemi et al. (2010) a capacidade desintoxicante a diferentes níveis de AFB<sub>1</sub> contaminando artificialmente, com 5 dias de incubação, obteve a maior remoção (44,5%) quando aplicado o menor nível de toxina de AFB<sub>1</sub>. Isso não foi notado nos nossos tratamentos, com o nível máximo de micotoxina a bioacessibilidade foi influenciada. Tal é possível observar quando analisados os tratamentos com prebióticos individualizados, em que a maior faixa de aflatoxina (+1) estava aplicada. Pelo trabalho elaborado por Hernandez-Mendoza et al. (2010) sugere-se que a diminuição do poder de ligação das aflatoxinas ocorrido na presença de BAL, se deve à capacidade das mesmas se ligarem às micotoxinas em meio intestinal conduzindo à redução da sua absorção. Uma vez que a matriz láctea possui bastantes interferentes, os mesmos podem ter causado uma certa dificuldade na libertação do composto bioativo e, mesmo após digestão, elevadas quantidades de aflatoxina terem ficado disponíveis para absorção intestinal. *L. plantarum* pode crescer sobre baixa capacidade de tamponamento no estômago e outras secreções de sais biliares em

complexas condições proporcionadas pelo organismo de seres humanos e outros mamíferos (REJINIEMON et al., 2015). E termos de efeito, tanto a oligofrutose como a polidextrose, dentro da faixa aplicada, alcançaram valores de bioacessibilidade e significância similares (aproximadamente 4% para  $p = 0,2$ ).

Assim, mais uma vez, é reforçada a ideia de que um dos fatores que potencialmente afeta a bioacessibilidade é o nível de contaminação. Se não vejamos o seguinte, se apenas tivermos em conta a concentração de aflatoxina (sem olhar a interferência das restantes variáveis ou a complexidade do tratamento), o grupo de amostras contaminadas com o valor mais alto ( $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) apresentou uma faixa de 15,62% a 30,76% já as amostras contaminadas com o valor mais baixo ( $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) registaram valores de 26,53% a 51,09% (valores mínimo e máximo, respectivamente para ambos). Daqui pode concluir-se que a dose aplicada tem efeito na resposta, e que como visualizado a sua concentração em termos de bioacessibilidade implica maiores e menores taxas de redução. Estatisticamente ela foi significativa ( $p < 0,05$ ). Kabak e Ozbey (2012a) utilizando géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na diminuição da bioacessibilidade da AFM<sub>1</sub> em amostras de leite contaminadas, assinalaram reduções de bioacessibilidade na ordem dos 15,5 a 31,6% quando comparadas aos seus controlos. A eficiência enquanto bactérias probióticas ficou comprovada, com destaque para o *Lactobacillus*, uma vez que a redução da bioacessibilidade, quando alterada a concentração da aflatoxina M<sub>1</sub>, não foi influenciada. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com o autor. EL-NEZAMI (1998) também constatou valores de 80% de remoção quando utilizadas bactérias gram-positivas perante gram-negativas e 50% de remoção para AFB<sub>1</sub> quando utilizada uma dose mínima de  $10^9$  UFCmL<sup>-1</sup>. Numerosas investigações, especialmente utilizando subprodutos lácteos, relataram que baixos níveis de pH, falta de nutrientes e competição microbiana também explicam a razão para inibição AF. Contudo, deve ser feita uma chamada de atenção para o facto do processo digestivo não diminuir a disponibilidade de micotoxinas para absorção intestinal e que existe efetivamente o risco de alimentos contaminados quimicamente não sofrerem nenhum tipo de efeito redutor exercido pela ação das BAL quando sujeitas a novas condições.

Algumas pesquisas confirmam que perante a diversidade de constituintes presentes nesta matriz, as particularidades existentes entre géneros/estirpes de BAL e as

condições laboratoriais aplicadas, alteram a específica habilidade da BAL para estabelecer a ligação com a AFB<sub>1</sub> variando consideravelmente (ZINEDINE et al., 2007; SHAHIN, 2007). Uma vez que a matriz láctea possui bastantes interferentes, os mesmos podem ter causado uma certa dificuldade na libertação do composto bioativo e, mesmo após digestão, elevadas quantidades de aflatoxina terem ficado disponíveis para absorção intestinal. Nesse contexto, tanto o complexo aflatoxina-bactéria formado como os compostos individuais produzidos (polissacarídeos, peptidoglicanos da parede celular e ácido lipoteicóico) são critérios chave para o bom desempenho redutor e consequente processo de descontaminação.







## Capítulo 6

### Conclusão



Pela sua eficácia na capacidade em restringir as aflatoxinas no leite o *L. plantarum* pode ser aplicado em processos de descontaminação. Verificou-se que foi possível reduzir o teor de AFB<sub>1</sub> quando adicionado individualmente e nos ensaios com os prebióticos inulina, oligofrutose e beta-glucana no seu conjunto, no entanto em algumas combinações promovidas ele não foi tão eficaz como foi o caso da introdução de polidextrose.

Em termos de bioacessibilidade, a mesma foi reduzida em todos os ensaios avaliados, mas o destaque verificou-se quando incorporada inulina ou oligofrutose individualmente com o probiótico. Ainda que em alguns ensaios se pudesse observar que para determinadas condições estipuladas, os resultados que obtinham as maiores taxas de remoção eram por sua vez os que tinham as maiores taxas de bioacessibilidade, opta-se por prevalecer a bioacessibilidade. Aquele que apresenta a maior influência sobre a diminuição dos níveis de toxinas disponíveis para absorção pelo organismo seria a opção escolhida para aplicação.

Os resultados ajudam a explicar como alguns componentes naturais presentes no alimento podem ajudar a modular a ingestão de certos compostos tóxicos. Este auxílio é uma via segura na cadeia alimentar industrial em termos de ação conjunta, e o efeito poderá ser de forma sinérgica ou antagônica. No entanto, ambos trazem vantagens acrescidas no seu uso poupando tempo, custos com otimização do processo em termos de prevenção. Aliado a isto, duas estratégias adicionais estão atualmente em fase de avaliação: incorporação de BAL em biofilmes, processos de encapsulação em diferentes matrizes e o recurso a adsorventes que não se dissociam no trato digestivo que poderão aumentar ainda mais a eficácia dos compostos.



## Referências

- ADAMS, R.; MOSS, O. Food Microbiology. **Royal Society of Chemistry**, v. 2, p. 221-279, 2000.
- ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, p. 348-355, 2013.
- ARASU, M.V.; AL-DHABI, N.A.; ILAVENIL, S.; CHOI, K.C.; SRIGOPALRAM, S. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. 23, p. 6-10, 2016.
- AUGUSTINHO, A.S.E. **A importância do leite**. Associação Paranaense de criadores de bovinos da raça Holandesa, 2010. Disponível em: <http://www.holandeparana.com.br/artigos/Importancia%20do%20LeiteSITE.pdf>. Acessado em: 02 nov. 2015.
- AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. **Food Chemical Toxicology**, v.41, p.1283–1290, 2003.
- BARCLAY, T.; GINIC-MARKOVICA, M.; COOPER, P.; PETROVSKY, N. Inulin - A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, p. 27-50, 2010.
- BATTACONE G.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; CAPPIO, A.B.; BOMBOI, G.; PULINA, G. Excretion of Aflatoxin M1 in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, n. 86, p. 2667-75, 2003.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; RASSU, S.P.; DECANDIA, M.; PULINA, G. Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of afltoxin B1. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2656-2661, 2012.
- BECKER-ALGERI, T.A.; CASTAGNARO, D.; KENNIDY DE BORTOLI, C.S.; DRUNKLER, D.A.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products:A Review. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 3, p. 143-200, 2016
- BECKER-ALGERI, Tania Aparecida. **Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite**. 208f. Doutorado em engenharia e ciência de alimentos na Universidade Federal do Rio Grande Escola de Química e Alimentos. Rio Grande Sul, 2016.
- BEZERRA, J.R.M.V. **Tecnologia da fabricação de derivados do leite**. Departamento de Engenharia de Alimentos. Guarapuava: Unicentro, 2008.

- BHAT, R.; RAI, R.V.; KARIM, A.A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns: A Review. **Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 57-81, 2010.
- BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.170-175, 2004.
- BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, p. 1058-73, 1987.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, p. 125-131, 2002.
- BOVO, F.; CORASSIN C.H.; OLIVEIRA, C.A.F. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. UNOPAR Científica, **Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 2, p. 15-21, 2010.
- BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; DE OLIVEIRA, C.A.F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1-5, 2012.
- BOVO, Fernanda. **Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para a descontaminação de aflatoxina M1**. 2011. 70f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Faculdade de zootecnia e engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.
- BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Alimentos. Alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 07 nov. 2015.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 42, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União da Republica Federativa do Brasil**; Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2002.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União da Republica Federativa do Brasil**; Poder Executivo, 09 de março de 2011.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. - **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de Propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fb>>

c4c6735/RESOLUCAO\_18\_1999.pdf?MOD=AJPERES >. Acesso em: 25 abr. 2013.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB. **Conjuntura mensal: Leite e Derivados**, p. 5-8, Julh, 2015.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministério. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado, Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 de agosto de 2003.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; Shah, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze dried yoghurt. **Food Research International**, n. 39, p. 203-211, 2006.

CARDARELLI, H. R. Desenvolvimento de queijo petit-suisse simbiótico. 2006. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc2OTU=> Acesso em: 06 nov. 2015.

CAROLIEN, H.M.; VERSANTVOORT, H.; OOMEN, A.G.;VAN DE KAMP, E., ROMPELBERG, C.J.M.; ADRIENNE, J.A.M. Sips Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food Chemical Toxicology**, v. 43, p.31–40, 2005.

CARVAJAL M.; ROJO, F.; MÉNDEZ I.; BOLANOS, A. Aflatoxin B1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 11, p.1077-86, 2003.

Champagne, C.P.; Raymond, Y.; Tompkins, T.A. The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. **Food Microbiology**, v.24, p. 1104–1111, 2010.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, v. 20, p. 239 - 246, 2009.

CORASSIN, C.H.; BOVO, F.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.A.F. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 80-83, 2013.

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

CRIEGLER, A.; MINTZLAFF, H.J.; WEISLEDER, D. Potential production and detoxification of penicillic acid in mold-fermented sausage (salami). **Applied Microbiology**, v. 24, p. 114-119, 1972.

- DA SILVA, N.; AMSTALDEN, V.C.A.J.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; DOS SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, LOGOMARCA VARELA, São Paulo, 3ª edição, Cap. 4, p. 61-74, 2007.
- DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; FORGET, F.R. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: review. **Food Control**, v. 21, p. 2-8, 2010.
- DE OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in animal feed and aflatoxin M<sub>1</sub> in milk in dairy farms of São Paulo State. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 30, n. 1, p. 221-225, 2010
- DE SOUZA, Camila. **Avaliação da interação entre AFLAM1 e AFLAB1 com a fração proteica do leite**. 2014 f. Iniciação Científica (Graduando em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Fundação Araucária; Medianeira, 2014.
- DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1018-1028, 2006.
- DESHPANDE, G.; RAO, S.; PATOLEA, S. Progress in the field of probiotics: year 2011. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, nr.1, p. 13-18, 2011.
- DILKIN, P.; MALLMAN, C.A.; SANTURIO, J.M.; HICKMAN, J.L. Macroscopic classification, identification of fungal microbiota and aflatoxins production in corn hybrids. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.
- DOS SANTOS, J.S.; OKANO, W; ARRAIS, B.C.D.; COSTABEBER, I. H; SANTANAA, E.H.W. Aflatoxin M1 in Dairy Products and Acid Lactic Bacteria as Biocontrol Agent in Milk **Uniciências**, v. 18, n. 1, p. 51-56, Jun. 2014
- Duarte, S.C.; Almeida, A.M.; Teixeira, A.S.; Pereira, A.L.; Falcão, A.C.; Pena, A. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: assessment of human and animal exposure. **Food Control**, n. 30, 411-417, 2013.
- EARLY, Ralph. **Tecnologia de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, p. 2-8, 2000.
- EL-KHOURY, A.; ATOUI, A; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, v.22, n.10, p.1695-1699, 2011.
- EL-NEZAMI, H.S.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; ANHOKAS, J. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. **Journal of Food Protection**, v. 61, p.446-448,

EMBRAPA. Embrapa gado leiteiro. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br>. Acesso em 01 jun. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**, v. 587, p.1–16, 2007.

FAO. **Dairy Animals**. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairygateway/milkproduction/dairy-animals/en/#.VS6myfB5JOY>. Acesso em: 11 abril 2015.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Probióticos en los alimentos**. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, p.45, 2006. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>>. Acesso em: 11 out.2015.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. **Working group report on drafting guidelines for the evaluation probiotics in food**. Joint working group report on drafting. London: Ontario, p. 1-11, 2002.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food**. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, p.1-34, 2001

FAZELI, M.R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M.R.; VAGHARI, E.; POURAGAH, S. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.

FERLAY J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, n. 127, p. 2893-2898, 2010.

FERNANDEZ-GARCÍA,E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FERREIRA, Antonio Jacinto. Estudos de microbiologia geral e imunologia. Fundação Caloute Gulbenkian, Lisboa, p. 374, 1984.

FIGUEROA-GONZALEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMIREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics: perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1341-1348, 2011

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

- FLORES-FLORES, M.E.; LIZARRAGA, E.; CERREIN, A.L.; GONZALEZ-PENA, E. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**, n. 52, p. 163-176, 2015.
- FOSTER, P.L.; EISENSTADT, E.; MILLER, J.H. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, p. 2695-2698, 1983.
- FREIRE, Carlise B.F. Microencapsulação de Bifidobacterium bb-12 com agentes prebióticos pelo método de spray drying: caracterização de microcápsulas. 2013. 170 f. Tese (Doutoramento em Ciências dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- FREIRE, F.C.O.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Embrapa Agroindústria Tropical. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza, p. 48, 2007.
- FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; PINTO, S.S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A.N.; MURAKAMI, F.S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306-312, 2012.
- FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; PINTO, S.S.; MUÑOZ, I.B.; AMBONI, R.D.M.C. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 39-44, 2013.
- FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Detoxification of patulin and ocratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1398-1407, 2008.
- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, Y.; TEREDA, A.; MITSUOKA, T. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 39-44, 1998.
- FURLONG, E. B.; BUFFON, J. G.; PRIMEL, E. G.; DRUNKLER, D. A.. Redução dos níveis de Aflatoxina B1 e M1 em leite utilizando a casca de arroz como adsorvente. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande.
- FURRIE, E.; MACFARLANE, S.; KENNEDY, A.; CUMMINGS, J.H.; WALSH, S. V.; O'NEIL, D.A.; MACFARLANE, G.T. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. **Gut**, v. 54, n. 2, p. 242-249, 2005.

- GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production: Review. **International Journal of Food Microbiology**. Elsevier B.V, p.1-8, 2010.
- GARNER, R.C.; MILLER, E.C.; MILLER, J.A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530. **Cancer Research**, n. 32, p. 2058-2066, 1972.
- General Principles of Food Hygiene. **Principles and Guidelines for the Establishment and Application of Microbiological Criteria Related to Foods: CAC/GL 21 – 1997**, 1997. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/listofstandards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>>. Acesso em: 03 out. 2015.
- GEORGIEVA, R.; ILIEV, I.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.M.; IVANOVA, I.; DANOVA, S. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 696-702, 2009.
- GERBALDO, G.; BARBERIS, C.; PASCUAL, L.; DALCEROA, A.; BARBERIS, L. Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties. **FEMS Microbiology Letters**, n. 332, p. 27-33, 2012.
- GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Review**, v. 17, p. 259-275, 2004.
- GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **The Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p. 1438-1441, 1999
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.
- GIMNEO, A.; MARTINS, M.L. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. **Special Nutrients**, Florida, p. 50-53, 2011.
- GOMAH, N.H.; RAGAB, W.S.; BULLERMAN, L.B. Inhibition of Fungal Growth and Aflatoxin B1 Production by Some Lactobacillus Strains. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, v. 40, n. 4, p. 27-36, 2010.
- GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELICIO, J.D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. Divulgação técnica do Instituto biológico, Centro de Saúde Animal, São Paulo, v. 68, n. 1/2, p. 15-19, 2001.
- GONZALEZ, N.J.; ADHIKARI, K.; SANCHO-MADRIZ, M.F. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. **Food Science and Technology**, v. 44, n.1, 158-163, 2011.

- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455–470, 2010.
- GRATZ, S.; MYKKANEN, H.; OUWEHAND, A.C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 70, p. 1-4, 2004.
- GROOPMAN, J.D.; KENSLER, T.W.; WILD, C.P. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. **Annual Review of Public Health**, n. 29, p. 187-200, 2008.
- GUENGERICH, F. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx0002583>>. Acessado em: 26 maio 2016.
- GURBAY, A.; SABUNCUOGLU, G.; GIRGIN, G.; SAHIN, S.; YIGIT, M.; YURDAKOK, G. Exposure of newborns to aflatoxina M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 314-319, 2010.
- HALLER, D., H. COLBUS, DE M. G. GANZLE, P. SCHERENBACHER, C. BODE, AND W. P. HAMMES. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. **Systematic and Applied Microbiology**, n. 24, p. 218-226, 2001.
- HAMID, A.S.; TESFAMARIAM, I.G.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.G. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: geographical distribution, mechanism of action and prevention. **Oncology Letters**, n. 5, p.1087-1092, 2013.
- HAMMES, W.P.; HERTEL, C. The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. In: Dworkin, M., Hansen, P.A., Lessel, E.F. (Eds.), *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer-Verlag, New York, 2007.
- HARTMANN, Wellington. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *Listeria monocytogenes***. 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- HASKARD, C.; EL-NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3086-3091, 2001.

- HERNANDEZ-MENDONZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of Lactobacillus casei strains for their ability to bind aflatoxin B1. **Food Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1064-1068, 2009a.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PENA, D.; GARCÍA, H.S. Key role of teichoic acids on Aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, n. 107, p. 395-403, 2009b.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GONZALEZ-CORDOVA, A.F.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GARCÍA, H.S. Effect of oral supplementation of Lactobacillus reuteri in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B1 in rats. **Journal of Basic Microbiology**, n. 51, p. 1-6, 2011.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GUZMAN-DE-PENA, D.; GONZALEZ-CORDOVA, A.F.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GARCÍA, H.S. In vivo assessment of the potential protective effect of Lactobacillus casei Shirota against aflatoxin B1. **Dairy Science and Technology**, n. 90, p. 729-738, 2010.
- HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S-373S, 2001.
- HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 283, p. 525-32, 1991.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, v. 100F, 2012.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_, v. 82, p.171, 2002.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**, v. 56, p. 19-23, 1993.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da produção pecuária 2015. 2015 III – Tabelas de resultados-Unidades de Federação-1º Trimestre**. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria](http://www.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria)>. Acesso em 11 out. 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção pecuária, junho de 2013. 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201301\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publ_completa.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2014.

- IHA, H.M.; BARBOSA C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M.W. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, Reino Unido, v. 29, p. 1-6, 2013.
- \_\_\_\_\_. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 12, p. 1971-1974, 2011.
- ITSARANUWAT, P.; KHAWLA, S.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming “health promoting” fermented dairy products; a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 203-210, 2003.
- JAGER, A.V.; TEDESCO, M.P.; SOUTO, P.C.M.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo. **Food Control**, Brasil, v. 33, p. 1-6, 2013.
- JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 633-638, 2005.
- JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 216–222, 2012.
- JIANG, Y; JOLLY, P.; ELLIS, W.; WANG, J.; PHILLIPS, T.; WILLIAMS, J. Aflatoxin: B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. **International Immunology Journal**, v. 17, n. 6, p. 807-812, 2005.
- JOBIM, C.C., GONÇALVES, G.D., SANTOS, G.T. **Qualidade Sanitária de Grãos e de Forragens Conservadas “versus” Desempenho Animal e Qualidade de seus Produtos. Pecuária de corte**. 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/forragem/artigos/qualidade-sanitaria-graos-forragens-t754/089-p0.htm>. Acessado em: 09 de agosto de 2014.
- JOUANY, J.P.; DIAZ, D.E. Effects of mycotoxins in ruminants. In: *The Mycotoxin Blue Book* (DIAZ, D. E. ed). UK: Nottingham University Press, p. 295-321, 2005.
- JUAN, C.; BURDASPAL, P.; SORIANO, J.M. Aflatoxinas del grupo B y G. En: *Micotoxinas en Alimentos*. Madrid: Soriano del Castillo, p. 167-181, 2007.
- KABAK, B., OZBEY, F. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. **Food Control**, v. 28, p. 338-344, 2012b.
- KABAK, B.; OZBEY, F. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 21-31, 2012a.
- KABAK, B.; VAR, I. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Journal of Environmental Science and Health**. Part B, n. 43, p. 617-624, 2008.

- KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *L. acidophilus* and *B. animalis* ssp. *Lactis* in stirred fruit yogurts. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1317-1322, 2008.
- KARIMI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 437-452, 2012.
- KLEEREBEZEM, M.J.;BOEKHORST, R.; VAN KRANENBURG, D.; MOLENAAR, O.P.; KUIPERS, R.; LEER, R.; TARCHINI, S.A.; PETERS, H.M.; SANDBRINK, M.W.E.J.; FIERS, W.; STIEKEMA, R.M.K.; LANKHORST, P.A.; BRON, S.M.; HOFFER, M.N.N.; GROOT, R.; KERKHOVEN, M.; DE VRIES, B.; URSING, W.M. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n.100, p. 1990-1995, 2003.
- KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in Health and Disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.
- KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.193-197, 2002.
- KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 288-296, 2012.
- LACIAKOVA, A.; CICOÓOVÀ, P.; MÀTÉ, D.; LACIAK, V. Aflatoxin and possibilities for their biological detoxification. **Medycyna Weterynaryja**, v. 64, n. 3, 2008.
- LAHTINEN, S.J.; HASKARD, C.A.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; AHOKAS, J.T. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, p. 158-164, 2004.
- LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBETTI, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21 B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4084–4090, 2000.
- LEE, J.; YUN, H. S.; CHO, K. W.; OH, S.; KIM, S. H.; CHUN, T.; KIM, B.; WHANG, K. Y. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 80–86, 2011.
- LIU, Y.; WU, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environtal Health Journal**, n. 118, p. 818-824, 2010.
- MAGAN, N.; OLSEN, M. Mycotoxins in foods. Boston: Boca Ráton, p. 496, 2004
- Magnusson, J. Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences,2003.

- MALLEBRERA, B.; MECA, G.;MANYES,L.; MANES, J.; MANES, G. Influence of pro- and prebiotics on gastric, duodenal and colonic bioaccessibility of the mycotoxin beauvericina. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 141-149, 2013.
- MARTEAU, P.R.; SEKSIK, P. Place des probiotiques dans la prevention et le traitement des diarrhees post-antibiotiques. **Revue Française des Laboratoires**, n. 368, p. 73-76, 2004.
- MASCO, L.; HUYS, G.; DE BRANDT, E.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p.221-230, 2005.
- MASOREO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**, v.1, n. 9, p. 1344-1350, 2007.
- MECA, G.; MENEGHELLI, G.; RITIENE, A.; MAÑES, J.; FONT, G. Influence of different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1362-1368, 2012a.
- MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications.. Wiley-Blackwell, 1. Ed, p. 417, 2010.
- MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P. V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, p. 1-15, 2012.
- NAGPAL, R.; YADAV,H.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K.; JAIN, S.; MAROTTA, F. Potential of probiotics and prebiotics for symbiotic functional dairy foods. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v.2, p. 75-84, 2007.
- NAVAS, S.A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Aflatoxin M (1) and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 5, p. 457-462, 2005.
- OATLEY, J.T.; RARICK, M.D.; JI, G.E.; LINZ, J.E. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.1133-1136, 2000.
- OECD-FAO. **Organization for Economic Co-operation and Development** / Food and Agriculture Organization/Agricultural. Outlook 2015-2024. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4738e.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

- OLIVEIRA, C.A.F.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, p. 196-201, 2006.
- OLIVEIRA, C.A.F.; SBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 221-225, 2010.
- OLIVEIRA, Lilian P. **Qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos do leite cru e pasteurizado tipo c consumido no Recôncavo da Bahia**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Programa de Pós graduação em Ciência Animal-Centro de Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p.1-21, 2002.
- OLIVEIRA, MAURICIO S. **Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M1 e sua ocorrência em leite bovino comercializado no sul do Brasil**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Rurais) - Centro de Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- OLUWAFEMI, F.; KUMAR, M.; BANDYOPADHYAY, R.; OGUNDBANWO, T.; AYANWANDE, K.B. Bio-detoxification of aflatoxin B1 in artificially contaminated maize grains using lactic acid bacteria. **Toxin Reviews**, n. 29, p. 115-122, 2010.
- OUWEHAND, A.; TIIHONEN, K.; MAKIVUOKKO, H.; RAUTONEN, N. Synbiotics: combining the benefits of pre-and probiotics. **Functional Dairy Products**, v. 2, p.195-213, 2007.
- PEERS, F.; BOSCH, X.; KALDOR, J.; LINSELL, A.; PLUIJMEN, M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. **International Journal of Cancer**, n. 39, p. 545-553, 1987.
- PELTONEN, K.; EL-ZENAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2152-2156, 2001.
- PELTONEN, K.; EL-ZENAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 62, p. 2152-2156, 2000.
- PIERIDES, M.; EL-NEZAMI, H.; PELTONEN, K.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 645-48, 2000.

- PINERO, M.; ASP, N.G.; REID, G.; MACFARLANE, S.; MORELLI, L.; BRUNSER, O. FAO Technical meeting on Prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. 156-159, 2008.
- PIOTROWSKA, M.; ZAKOWSKA, Z. The limitation of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 279-286, 2005.
- QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Journal Carbohydrate Polymers**, n. 77, p. 35-44, 2009.
- QUIGLEY, E.M.M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological Research**, n. 61, p. 213-218, 2010.
- RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOMBE J.R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, n. 89, p. 325-327, 2010
- ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. **The Journal of Nutrition**, v.137, p 2493-2502, 2007.
- RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A; PEREIRA, C.I; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.
- ROMERO, A.C.; FERREIRA, T.R.B.; DIAS, C.T.S; CALORI-DOMINGUES, M.A.; DA GLORIA, E.M. Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, v. 21, p. 554-558, 2010.
- RONKART, S. N.; PAQUOT, M.; FOUGNIES, C.; DEROANNE, C.; BLECKER, C. S. Effect of water uptake on amorphous inulin properties. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 922–927, 2009.
- SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIE, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical Uses of Probiotics for tabilizing the Gut Mucosal Barrier: Successful Strains and Future Challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 347–358, 1996.
- SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, p. 394–406, 2006.
- SCAGLIONI, P.T; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 68-74, 2014.

- SCANTLEBURY-MANNING, T.; GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 287-298, 2004
- SERRANO-NINO, J.C.; CAVAZOS-GUARDUNO, A.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; APPLGATE, B.; FERRUZZI, M.G.; SAN MARTIN, G.M.F.; GARCIA, H.S. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, n.31, p. 202-207, 2013.
- SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Food Science and Technology**, n. 17, p. 48-54, 2006.
- SHUAIB, F.M.B.; EHIRI J.; ABDULLAHI, A. WILLIAMS, J.H.; JOLLY P.E. Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature. **Jornal of Reproductive Toxicology**, n. 29, p. 262-268, 2010.
- SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 655-657, 2006.
- STOLOFF, L. Aflatoxins: an overview. In Proceedings of a conference on mycotoxins in human and animal health. Park Forest South, Illinois: Pathotox Publisher Inc. p. 7-28, 1997.
- VAMAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Milk and Milk Products. **Technology, Chemistry and Microbiology**. Springer, n. 1, 2001.
- VAR, I.; KABAK, B. Detection of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 1, p. 15-18, 2009.
- VERMA, R.J. Aflatoxin cause DNA damage. **International Journal of Human Genetics**, v. 4, n. 4, p. 231-6, 2004.
- VERSANTVOORT, C.H.M.; OOMEN, A.G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERGCATHY, C.J.M.; SIPS, A.J.A.M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from Food. **Food and Chemical Toxicology**, p. 31-33, 2004.
- WHO. World Health Organization. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additive Series, n. 47, Geneva, 2001.
- WILD C.P.; TURNER P.C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 471-81, 2002.
- WILD, C.P.; GONG, Y.Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis** n. 31, p. 71-82, 2010.

- WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in clinical and biological research**, v. 374, p. 123-37, 1992.
- WONG, Z. A.; HSIEH, D.P.H. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in monkey, rat and mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n. 55, p. 115-125, 1980.
- WU, F.; TRISTHER, A. **Aflatoxins: a global public health problem**. 2011. Disponível em:  
<<http://www.agriskmanagementforum.org/sites/agriskmanagementforum.org/files/WHO%20-%20Aflatoxin-public%20health%20issue.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2016.
- WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2009.
- ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, n.15, p. 129-144, 2011.
- ZINEDINE, A.; GONZLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J.M.; MOLEA, J.C.; IDRISSE, L.; MAES, J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, n. 114, p. 25-29, 2007

## APÊNDICE A – Modelo de digestão *in vitro*

### Procedimento do método de digestibilidade de amostras *in vitro*

- Preparar previamente as soluções representativas da saliva, sucos gástrico, duodenal e biliar conforme descrito na Tabela 1.
- Transferir 4,5 mL de leite fortificado com AFB<sub>1</sub> para tubos digestivos (tubos de centrífuga de 50 mL);
- Adicionar 6 mL de saliva artificial com incubação por 5 min a 37° C;
- Adicionar 12 mL de suco gástrico com agitação e incubação a 2 h a 37°C;
- Adicionar 12 mL de suco duodenal, 6 mL de bile e 2 mL de NaHCO<sub>3</sub> 1 M, com agitação e incubação por 2 h a 37°C;
- Centrifugar amostra a 2750 x g por 5 min para obtenção do quimo (sobrenadante) e matriz digerida (concentrado).
- Quantificar o composto de interesse no sobrenadante.

Referências: (KABAK; OZBEY, 2012a; OOMEN et al., 2003; VERSANTVOORT et al., 2005)

**Tabela 1 - Reagentes e respectivas concentrações para realização de sucos digestivos sintéticos do modelo de digestão *in vitro*.**

	Saliva	Suco Gástrico	Suco Duodenal	Suco Bile
<b>Solução Inorgânica</b>	10 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	15,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	30 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL KSCN 20 g.L <sup>-1</sup>	3,0 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NAHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	68,3 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	9,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g.L <sup>-1</sup>	4,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaSO <sub>4</sub> 57 g.L <sup>-1</sup>	18 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>	6,3 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	0,15 mL HCl (37%)
	1,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	10 mL NH <sub>4</sub> Cl 30,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL MgCl <sub>2</sub> 5 g.L <sup>-1</sup>	
	20 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	6,5 mL HCl (37%)	0,18 mL HCl (37%)	
	<b>Solução Orgânica</b>	8 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>	10 mL glicose 65g.L <sup>-1</sup> 10 mL ácido glucurônico 2 g.L <sup>-1</sup> 3,4 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup> 10 mL glucosamina hidrocloreada 33 g.L <sup>-1</sup>	4 mL úrea 25g.L <sup>1</sup>
290 mg α-amilase		1 g BSA	9 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>	30 g bile
<b>Demais Compostos</b>	15 mg ácido úrico	2,5 g pepsina	1 g BSA	10 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>
	25 mg mucina	3 g mucina	9 g pancreatina  1,5 g lipase	1,8 g BSA
<b>pH</b>	6,8 ± 0,2	1,3 ± 0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

**Nota:** As soluções orgânicas e inorgânicas foram aumentadas para 500 mL com água destilada. Após misturar a solução orgânica e inorgânica, alguns constituintes foram adicionados e dissolvidos. Quando necessário, o pH foi ajustado para o intervalo apropriado.

**Fonte:** Adaptado de Versantvoort et al. (2005).

## APÊNDICE B – Extração de Aflatoxina B<sub>1</sub> em leite – QuEChERS

---

Agitar em vórtex por 30 min 15 g de leite UAT (liofilizado) + 10 mL hexano + 15 mL de acetonitrila (1% ácido acético, v/v).



Adicionar 6 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) + 1,5 cloreto de sódio (NaCl)



Agitar em vórtex por 1 min



Centrifugar (3000 rpm a 7 min)



Remover o sobrenadante (hexano).



Recolher 5 mL da fase acetonitrila



Evaporar sob corrente de nitrogênio (N<sub>2</sub>) até resíduo

---

**Figura 2 – Etapas para procedimento de extração de AFB<sub>1</sub> em leite – QhEChERS**

**Fonte:** Adaptado de SARTORI et al., (2015).