

Avaliação *in vitro* da adsorção de aflatoxina B₁ por produtos comerciais utilizados na alimentação animal

In vitro evaluation of aflatoxin B₁ adsorption by commercial products used in animal feed

Raizza Eveline Escórcio Pinheiro^{1*}, Carina Maricel Pereyra², Josyanne Araújo Neves³, Rodrigo Maciel Calvet³, Julliet Teixeira de Oliveira Santos⁴, Cristiane Evangelista Lima⁴, Verbena Carvalho Alves⁵, Maria Marluca Gomes Pereira⁴, Maria Christina Sanches Muratori⁴

RESUMO: Objetivou-se avaliar a capacidade de adsorção *in vitro* de aflatoxina B₁ (AFB₁) por produtos comerciais utilizados na alimentação animal. Muitas pesquisas estão sendo realizadas para a descontaminação de AFB₁ em alimentos. Os produtos comerciais utilizados frequentemente na alimentação de peixes, disponíveis na forma de probióticos, são formados por cepas de bactérias e leveduras utilizadas na maioria dos ensaios de adsorção de micotoxinas. Foram utilizados três produtos comerciais: A, composto por *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*; B, por leveduras secas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de cervejaria; e C, por *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*. Cinco suspensões da dose máxima recomendada pelo fabricante de cada produto (0; 25; 50; 75 e 100%) foram testadas contra AFB₁ (1000 ng.mL⁻¹) em microtubos para determinação da capacidade de adsorção. Para simular o pH do estômago e do intestino de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram formuladas soluções tampão fosfato salino (PBS), com pH 1,5 e 7,5; respectivamente. Os microtubos foram introduzidos em uma centrífuga com agitação mecânica, a 37°C por 1 h e depois centrifugados por 10 min a 14.000 rpm; os sobrenadantes foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. Os produtos comerciais, nas concentrações máximas, foram capazes de adsorver AFB₁ em quantidades de 45,01 a 129,59; 123,90 a 215,59 e 209,98 a 370,73 ng.mL⁻¹, respectivamente. Concluiu-se que todos os produtos comerciais analisados adsorvem AFB₁ em condições simuladas de pH gastrointestinal e são candidatos potenciais para adsorção de AFB₁ para futuros ensaios *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus* sp.; bactérias ácido-láticas; detoxificação; *Saccharomyces cerevisiae*; tilápia do Nilo.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the aflatoxin B₁ (AFB₁) adsorption capacity, *in vitro*, by commercial products used in animal feed. Many studies are being conducted for the decontamination of aflatoxins in feed. The commercial products destined to fish feed that are available as probiotics and are formed by strains of bacteria and yeasts used in most mycotoxins adsorption assays. Three commercial products were studied: A, consisting of *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*; B, consisting of dry yeast of *Saccharomyces cerevisiae* from brewery; and C, consisting of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*. Five suspensions of the maximum dose recommended by the manufacturer of each product (0; 25; 50; 75 and 100%) were tested against AFB₁ (1000 ng.mL⁻¹) in microtubes to determine the adsorption capacity. To simulate the pH of the stomach and intestine of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), phosphate buffered saline solutions (PBS) at pH 1.5 and 7.5, respectively, were formulated. Microtubes were introduced into a centrifuge with mechanical agitation at 37°C for 1 h and then centrifuged for 10 min at 14.000 rpm; the supernatants were quantified by high-performance liquid chromatography. The commercial products in the maximum concentration were capable of adsorbing AFB₁ in amounts from 45.01 to 129.59; from 123.90 to 215.59; and from 209.98 to 370.73 (ng.mL⁻¹), respectively. It was concluded that all commercial products, which are added to animal feed, adsorbed AFB₁ under simulated gastrointestinal pH conditions and are potential candidates for AFB₁ adsorption for future *in vivo* studies.

KEYWORDS: *Bacillus* sp.; lactic acid bacteria; detoxification; *Saccharomyces cerevisiae*; Nile tilapia.

¹Campus Professora Cinobelina Elvas, Universidade Federal do Piauí (UFPI) – Bom Jesus (PI), Brasil.

²Departamento de Microbiología y Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto – Córdoba, Argentina.

³Instituto Federal do Maranhão (IFMA) – Codó (MA) e Caxias (MA), Brasil.

⁴Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFPI – Teresina (PI), Brasil.

⁵Fiscal de Defesa Agropecuária da ADAPAR – Ivaiporã (PR), Brasil.

*Autor correspondente: raizza_eveline@hotmail.com

Recebido em: 27/01/2015. Aceito em: 04/10/2016

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos e sua ingestão pode ocasionar danos ao desempenho e à saúde dos animais. As aflatoxinas (AFs) são as micotoxinas mais predominantes nos ingredientes usados nas rações para animais no Brasil e no mundo (KUBITZA, 2010). Os principais fungos produtores de AFs fazem parte do gênero *Aspergillus*, principalmente as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*. A aflatoxina B₁ (AFB₁) destaca-se por ser tóxica para os animais, com potencial carcinogênico, mutagênico, teratogênico, hepatotóxico e imunossupressor (KLICH, 2007). Alimentos para animais aquáticos contaminados com AFs podem causar anormalidades que resultam na queda da produtividade do cultivo (GOPINATH *et al.*, 2012). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), principal espécie de peixe cultivada no Brasil (BRASIL, 2010), é sensível à contaminação por AFs, caracterizada pela ocorrência de quadros de caquexia, despigmentação das escamas, icterícia e lesões hepáticas, responsáveis por gerar prejuízos econômicos em seu cultivo (KUBITZA, 2010).

Os aditivos antimicotoxinas (AAM) incluem os produtos que, quando adicionados a alimentos para animais, sejam capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar micotoxinas. O controle biológico tem proporcionado resultados promissores para a descontaminação de AFs sem alterar as características do alimento (BARBOSA *et al.*, 2005). Dentre as categorias de produtos à base de micro-organismos, existem os probióticos e os suplementos dietéticos. De acordo com FULLER (1989), os probióticos são suplementos alimentares de micro-organismos vivos que produzem efeitos benéficos no hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal, além de auxiliar na diminuição das concentrações de substâncias tóxicas em ambientes de cultivo. Segundo SHETTY; JESPERSEN (2006), ingredientes básicos e suplementos dietéticos, tais como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, podem ter propriedades funcionais na dieta e apresentarem resultados satisfatórios quando adicionados à ração como células ativas ou como componentes de parede celular.

No Brasil, foi estabelecido um protocolo para reavaliação do uso de adsorventes de micotoxinas como aditivo autorizado para a alimentação animal. A proposta propõe a realização de testes *in vitro* simulando as condições do trato gastrointestinal de animais, utilizando pH 3,0 e 6,0 (BRASIL, 2006). No entanto, os níveis de pH de espécies aquáticas, especificamente de tilápias do Nilo, diferem dos estabelecidos no protocolo. Desse modo, é importante avaliar a eficiência da adsorção de micotoxinas em faixas de pH específicas para cada espécie.

Com base nos dados expostos, objetivou-se avaliar a capacidade antimicotoxina de produtos comerciais compostos à base de leveduras secas de cervejaria e de probióticos utilizados na alimentação animal para adsorção *in vitro* de AFB₁.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. Para avaliação *in vitro* de produtos comerciais para adsorção de AFB₁ foram utilizados três produtos com formulação diferenciada (Tabela 1).

Para simular o pH do estômago e intestino de tilápias do Nilo, foram formuladas soluções em tampão fosfato salino (PBS: NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 14,4 g, KH₂PO₄ 2,4 g, água destilada em quantidade suficiente para 1.000 mL), sendo posteriormente ajustadas com adição de ácido clorídrico (HCl 0,1 N) para pH 1,5 e com hidróxido de sódio (NaOH 0,1 N) para pH 7,5, (ROTTA, 2003), respectivamente, sendo ambos ajustados por pHmetro digital (Labmeter Modelo pHs-3B). A AFB₁ (Sigma Aldrich® Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%) utilizada foi diluída em acetonitrila para obtenção da concentração final de 1,0 µg.mL⁻¹ (1.000 ng.mL⁻¹). Para a obtenção da solução de trabalho (1.000 ng.mL⁻¹), a acetonitrila foi evaporada com nitrogênio gasoso e, em seguida, adicionaram-se soluções em PBS para cada pH.

Tabela 1. Composição e concentração testada de produtos comerciais para ensaio de adsorção *in vitro* de aflatoxina B₁.

Produto comercial	Composição	Concentração de micro-organismos	Dose máxima recomendada pelo fabricante	Quantidade do produto usado nas diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹)				
				0%	25%	50%	75%	100%
A	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,5x10 ⁷ UFC.g ⁻¹	10 kg.t ⁻¹	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0
B	Leveduras secas de cervejaria, da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Integral	3,0 kg.t ⁻¹	0,0	0,75	1,5	2,25	3,0
C	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus pumilus</i>	1,0x10 ¹⁰ UFC.g ⁻¹	6,0 kg.t ⁻¹	0,0	1,5	3,0	4,5	6,0

UFC: unidades formadoras de colônias.

O teste foi realizado com concentração única de AFB₁ (1.000 ng.mL⁻¹). As concentrações dos produtos utilizados corresponderam a 0; 25; 50; 75 e 100% da dose máxima recomendada por cada fabricante (Tabela 1). Também foram preparadas amostras em triplicata de controle positivo (AFB₁ em PBS com pH 1,5 e 7,5) e controle negativo (somente PBS) para realização dos cálculos de adsorção.

Foram transferidas para microtubos, alíquotas de 500 µL das soluções de PBS contendo as diferentes concentrações de cada produto comercial e acrescentaram-se 500 µL de AFB₁, obtendo-se um volume final de 1.000 µL, com concentração final de 1.000 ng.mL⁻¹ de AFB₁. As soluções nos microtubos foram homogeneizadas em agitador tipo *Vortex* e introduzidas em uma centrífuga com agitação mecânica a 200 rpm, a 37°C por 1 h, para promover o contato entre a toxina e o produto comercial utilizado. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 rpm para ocorrer a separação da toxina livre da toxina unida ao produto comercial utilizado. Logo, recuperou-se a toxina livre presente no sobrenadante e realizou-se a detecção e quantificação de AFB₁.

Para a detecção e quantificação de AFB₁, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu®, modelo Prominence com detector de fluorescência modelo RF-10AXL Super, loop de 20 µL, com excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente (TRUCKSESS *et al.*, 1994), equipado com coluna de fase reversa de sílica gel C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula, Phenomenex, Luna) conectada a uma pré-coluna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula, Supelco). Para análise, utilizou-se uma alíquota de 100 µL do extrato da amostra, que foi acrescida de 350 µL de solução derivatizante, composta por ácido trifluoroacético:ácido acético glacial:água (20:10:70 v/v). Como fase móvel, utilizou-se um sistema isocrático acetoneitrila:metanol:água (17:17:66 v/v) a uma vazão de 1,5 mL.min⁻¹.

A curva de quantificação da toxina foi elaborada através da correlação das alturas dos picos do extrato da amostra com o da curva padrão ($y=0,0003x-0,0077$; $R^2=0,99$). O limite de detecção do método analítico utilizado foi de 0,4 ng.g⁻¹, enquanto o de quantificação resultou em 1,2 ng.g⁻¹. As quantificações de AFB₁ adsorvidas foram realizadas pela equação a seguir, onde: $A=[(B-C)xD]/E$, sendo A=quantidade (ng.mL⁻¹) de toxina adsorvida pelo produto comercial; B=altura do pico cromatográfico da amostra; C=altura do pico cromatográfico do controle negativo; D=concentração (ng.mL⁻¹) do controle positivo; E=altura do pico cromatográfico do controle positivo.

Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3x5, sendo: 2 valores de pH (1,5 e 7,5); 3 produtos comerciais (A, B e C) e 5 concentrações (0; 25; 50; 75 e 100%), com 3 repetições

por tratamento, totalizando 90 amostras. Os dados obtidos foram analisados segundo os procedimentos do *software* SAS 9.0 (SAS, 2009) e submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo SNK, baseado no *Lsmeans* a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio *in vitro* de adsorção de AFB₁ foi realizado com base nas recomendações da proposta para registro de AAM do Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas (BRASIL, 2006). A proposta do Grupo de Trabalho recomenda a utilização de valores de pH 3,0 e 6,0 para avaliação de AAM, porém, para adequar à fisiologia do estômago e intestino das tilápias do Nilo, foram realizadas adaptações de pH para 1,5 e 7,5; respectivamente. Além disso, foi utilizada solução de PBS como solução de reação do ensaio, de acordo com BOVO *et al.* (2011) e PEREYRA *et al.* (2012).

Nesta pesquisa, realizada para avaliar a capacidade de produtos comerciais adsorverem 1.000 ng.mL⁻¹ de AFB₁, observou-se um percentual de adsorção variável. Os produtos comerciais A, B e C; quando testados em pH 1,5 e 7,5; apresentaram percentuais de adsorção de AFB₁ que variaram de 0,5 a 37,1% (Tabela 2). A média dos valores do controle positivo (somente toxina AFB₁) em PBS com pH 1,5 foi de 998,54 ng.mL⁻¹; e em pH 7,5 se obteve o valor médio de 964,12 ng.mL⁻¹. No probiótico A, composto majoritariamente por bactérias ácido-láticas (BAL) (0,5 a 13,0%), e no B, formado por leveduras mortas secas da espécie *S. cerevisiae* (8,8 a 21,6%), os valores de adsorção foram menores, quando comparados aos resultados de PIZZOLITTO *et al.* (2011), que utilizaram concentração de 500 ng.mL⁻¹ e obtiveram valores de 11,8 a 67,6% para cepas de BAL e 18,4 a 65,7% para cepas de *S. cerevisiae*. Essa variação de resultados pode ter ocorrido pelo fato dos autores citados terem utilizado uma concentração menor de toxina e testado apenas cepas puras de bactérias e de leveduras, em contraste com este experimento, que foi realizado com produtos comerciais formulados para alimentação animal que continham várias cepas bacterianas e leveduras mortas secas da espécie *S. cerevisiae*.

BOLOGNANI *et al.* (1997) relataram que cepas de *S. cerevisiae* na concentração mínima de 2 a 5x10⁹ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹) adsorveram de 13 a 50% de AFB₁. MALLMANN *et al.* (2006) obtiveram percentuais de adsorção de 90% em suco gástrico e intestinal, ao estudarem diversos compostos em avaliações *in vitro*. É possível que fatores como concentração dos micro-organismos utilizados, pH, concentração dos produtos e tempo de contato (EL-NEZAMI; AHOKAS, 1998; PIZZOLITTO *et al.*, 2011) possam ter influência nos resultados de adsorção.

Embora a quantidade média de cepas utilizadas nas formulações comerciais seja compatível com resultados satisfatórios obtidos por outros pesquisadores (EL-NEZAMI; AHOKAS, 1998; HASKARD *et al.*, 2001), a atividade antimicotóxina dos produtos comerciais testados foi próxima à encontrada pelos autores citados.

Pode-se verificar que a melhor adsorção de AFB₁ ocorreu quando os produtos comerciais foram utilizados na concentração 100% (Tabela 2). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a capacidade antimicotóxina dos produtos nas concentrações utilizadas, ocorrendo um aumento proporcional de adsorção quando eram adicionadas maiores concentrações desses produtos. Essa tendência não se aplicou ao probiótico C, que apresentou resultados semelhantes em concentrações 50 e 75%; e no produto B em pH 1,5, cujo percentual melhor foi em concentração 75%. Ensaios de adsorção frequentemente utilizam uma única concentração de AFB₁ (HASKARD *et al.*, 2001), entretanto, a eficiência dos micro-organismos altera-se quando as concentrações de AFB₁ são modificadas (BUENO *et al.*, 2007; PIZZOLITTO *et al.*, 2011), tendo em vista que ocorrem oscilações naturais nos níveis de AFB₁ nos alimentos. Desse modo, além de avaliar diferentes concentrações de micotoxinas nos testes de adsorção, deve-se também analisar se diferentes concentrações de micro-organismos e de produtos comerciais interferem na atividade antimicotóxina. Os componentes das paredes microbianas possuem número limitado de polos de ligação para AFB₁ (PIZZOLITTO *et al.*, 2011), e podem não apresentar disponibilidade para tal ligação devido a uma saturação dos polos (TAPIA-SALAZAR *et al.*, 2010). Desse modo, a associação de diferentes tipos de micro-organismos utilizados na formulação de produtos comerciais permitiria uma maior disponibilidade desses polos de ligação.

De um modo geral, o pH 7,5 favoreceu a adsorção dos produtos comerciais em condições experimentais, com exceção do produto B, que apresentou adsorção semelhante na concentração 25% quando submetido ao pH 1,5 e pH 7,5 (Tabela 2). Entretanto, as bactérias que foram utilizadas na formulação dos probióticos testados estavam viáveis e poderiam crescer em ampla variação de pH (4,8 a 9,6), devido ao tempo de contato em temperatura favorável ao qual foram submetidas na fase inicial do experimento. Constatou-se que a eficiência da capacidade antimicotóxina dos produtos comerciais testados foi variável, sendo o probiótico C, composto por três cepas de *Bacillus* sp. (12,10 a 37,10%) mais eficiente do que o A, formado por BAL associada a *B. subtilis* (5,15 a 13,00%) e do que o B, composto por leveduras secas de cervejaria da espécie *S. cerevisiae* (8,80 a 21,60%). Esse fato pode ser comprovado pelas propriedades benéficas atribuídas à união das três espécies de *Bacillus* e pela maior concentração bacteriana presente ($1,0 \times 10^{10}$ UFC.g⁻¹). PIZZOLITTO *et al.* (2011) observaram que o aumento da concentração de bactérias ou leveduras, na presença de uma concentração fixa de AFB₁, promoveu um aumento na ligação desses compostos, mas ainda insuficiente para ligar todas as toxinas presentes.

Resultados eficientes de adsorção de AFB₁ foram encontrados por HAI (2006), em que cepas de *B. subtilis* foram eficazes como inibidores na produção e adsorção de AFB₁. Estudos com a utilização de espécies de *Bacillus* em alimentos mostram que esses possuem grande habilidade de adesão à parede intestinal, aumento de respostas imunológicas, enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular de fungos patogênicos e são considerados importantes no controle biológico. BARBOSA *et al.* (2005) e GAO *et al.* (2011) obtiveram remoção de 81,5% de AFB₁ na concentração de 500 ng.mL⁻¹, para cepas isoladas de *Bacillus* e ainda demonstraram que essas possuem alta

Tabela 2. Valores e percentuais de adsorção de 1.000 ng.mL⁻¹ de aflatoxina B₁ em dois valores de pH e diferentes concentrações de produtos comerciais utilizados na alimentação animal.

Concentração	Quantidade adsorvida de Aflatoxina B ₁ (ng.mL ⁻¹)					
	A		B		C	
	pH		pH		pH	
	1,5	7,5	1,5	7,5	1,5	7,5
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0%	0,00 ^{eA} (0,0)	0,00 ^{eA} (0,0)	0,00 ^{eA} (0,0)	0,00 ^{eA} (0,0)	0,00 ^{eA} (0,0)	0,00 ^{dA} (0,0)
25%	5,15 ^{dB} (0,5)	54,04 ^{dA} (5,4)	87,54 ^{dA} (8,8)	88,55 ^{dA} (8,9)	121,48 ^{dB} (12,1)	292,50 ^{cA} (29,3)
50%	14,53 ^{cB} (1,5)	67,96 ^{cA} (6,8)	116,96 ^{cB} (11,7)	124,64 ^{cA} (12,5)	134,10 ^{cB} (13,4)	326,97 ^{bA} (32,7)
75%	16,60 ^{bB} (1,7)	108,45 ^{bA} (10,8)	132,32 ^{bB} (13,2)	157,68 ^{bA} (15,8)	190,37 ^{bB} (19,0)	327,63 ^{bA} (32,8)
100%	45,01 ^{aB} (4,5)	129,59 ^{aA} (13,0)	123,90 ^{aB} (12,4)	215,83 ^{aA} (21,6)	209,98 ^{aB} (21,0)	370,73 ^{aA} (37,1)
CV = 0,57						

^{a,b,c,d,e}Médias na mesma coluna, para o mesmo produto e mesmo pH, seguidas da mesma letra minúscula diferem significativamente entre si pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ($p < 0,05$); ^{A,B}médias na mesma linha, para o mesmo produto e mesma concentração, seguidas da mesma letra maiúscula diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,05$).

resistência ao simularem condições semelhantes do conteúdo estomacal e intestinal de animais, assim como também contra patógenos desse ambiente, entretanto, a adsorção de AFB₁ não foi avaliada em diferentes pH, nem o sinergismo entre as cepas.

O Brasil, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece o limite de 50 µg.kg⁻¹ de aflatoxinas para alimentos de consumo animal, matérias primas e rações (BRASIL, 1988). Sendo assim, os três produtos comerciais podem agir efetivamente na adsorção de AFB₁, já que os valores de incidência natural deveriam ser menores do que 50 µg.kg⁻¹ e adsorveram quantidades maiores do que as regulamentadas. Pesquisas realizadas em rações comerciais para pisciculturas relataram níveis de aflatoxinas que variaram de não detectáveis a 15,60 µg.kg⁻¹ (HASHIMOTO *et al.*, 2003); desse modo, os produtos comerciais analisados poderiam ser úteis no processo de adsorção da toxina desses alimentos destinados à alimentação de peixes.

CONCLUSÕES

Produtos comerciais à base de leveduras secas de cervejaria e de probióticos formados por bactérias possuem capacidade de adsorção *in vitro* de AFB₁. Probióticos, à base de *Bacillus* sp., são mais eficientes do que os compostos principalmente por BAL e leveduras secas de cervejaria.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos para a realização deste trabalho e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e Universidad Nacional de Rio Cuarto, Córdoba, Argentina, pela parceria científica.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, T.M.; SERRA, C.R.; RAGIONE, R.M.L.; WOODWARD, M.J.; HENRIQUES, A.O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.968-978, 2005.
- BOLOGNANI, F.; RUMNEY, C.J.; ROWLAND, I.R. Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and *in vivo* mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, v.35, p.45-535, 1997.
- BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; KOBASHIGAWA, E.; ROSIM, R.E.; DE OLIVEIRA, C.A.F. Eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M1 em solução tampão fosfato. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v.13, p.151-156, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 7, de 9 de novembro de 1988. Fixa padrões de tolerância para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias primas e rações. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 130, de 24 de maio de 2006. Estabelece protocolos para reavaliação do uso de adsorventes de micotoxinas como aditivo autorizado na alimentação animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010*. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/Docs/_Estatisticas/BoletimMPA2010.pdf>. Acesso em: 2 out. 2014.
- BUENO, D.; CASALE, C.H.; PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of Food Protection*, v.70, p.2148-2154, 2007.
- EL-NEZAMI, H.S.; AHOKAS, J. Lactic acid bacteria: approach to detoxify aflatoxins. In: SALMINEN, S.; VON, W.A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1998. p.359-367.
- FULLER, R. Probiotic in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, v.66, p.365-378, 1989.
- GAO, X.; MA, Q.; ZHAO, L.; LEI, Y.; SHAN, Y.; JI, C. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *European Food Research and Technology*, v.232, p.957-962, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-011-1463-3>>. Acesso em: 21 jul. 2014. DOI: 10.1007/s00217-011-1463-3
- GOPINATH, R.; PAUL RAJ, R.; GEORGE, K.C.; SANIL, N.K. Ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B₁ diets. *Aquaculture Research*, v.43, p.32-43, 2012.
- HAI, N.N. *Bacillus subtilis* possibly used for aflatoxin control, Ho Chi Minh, Vietnam, 2006. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE, Ho Chi Minh, Vietnam, 2006. *Proceedings...* Ho Chi Minh: Nong Lam University, 2006. p.75-77.
- HASHIMOTO, E.H.; SANTOS, M.A.; ONO, E.Y.S.; HAYASHI, C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Seminário: Ciências Agrárias*, v.24, p.123-132, 2003. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2134>>. Acesso em: 27 jul. 2014.

- HASKARD, C.A.; EL-NEZAMI, H.S.; KANKAANPAA, P.E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J.T. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.3086-3091, 2001.
- KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, v.8, p.713-722, 2007.
- KUBITZA, F. Micotoxinas e seus efeitos sobre os peixes. *Panorama da Aquicultura*, v.20, n.121, p.14-23, 2010.
- MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.Z.; RAUBER, R.H. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, SP, 2006. *Anais...* Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p.213-224.
- PEREYRA, C.M.; PEREYRA, C.M.; CAVAGLIERI, L.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A. The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B₁ and zearalenone by yeast cell wall. *Journal of Applied Microbiology*, v.114, p.655-662, 2012.
- PIZZOLITTO, R.P.; BUENO, D.J.; ARMANDO, M.R.; CAVAGLIERI, L.; DALCERO, A.M.; SALVANO, M.A. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*: a useful model to determine the most efficient microorganism. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. *Aflatoxins: biochemistry and molecular biology*. InTech, 2011. p.323-346.
- ROTTA, M.A. *Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 48p.
- SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 48-55, 2006.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. *System for linear models*. Cary: SAS Institute, 2009.
- TAPIA-SALAZAR, M.; GARCÍA-PÉREZ, O.D.; NIETO-LÓPEZ, M.; RICQUE-MARIE, D.; VILLARREAL-CAVAZOS, D.; CRUZ-SUÁREZ, L.E. Uso de sequestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 2010. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 10., Nuevo León, México, 2010. *Proceedings...* San Nicolás de los Garza: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2010. 726p. p. 514-546.
- TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R.H.; ROMER, T.R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.77, p.1512-1521, 1994.