

ALINE MARIA DOURADO RODRIGUES

**CAPACIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B₁ POR
LEVEDURAS ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA**

TERESINA, PIAUÍ
2018

ALINE MARIA DOURADO RODRIGUES

**CAPACIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B₁ POR
LEVEDURAS ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,
como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Doutora em Ciência Animal, área de
concentração Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Christina Sanches
Muratori

TERESINA, PIAUÍ
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCN

R696c Rodrigues, Aline Maria Dourado.
Capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B₁
por leveduras isoladas de viveiros de piscicultura / Aline
Maria Dourado Rodrigues – Teresina, 2018.
103f.: il. color

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal, 2018.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Christina Sanches
Muratori.

1. Aquicultura. 2. Adsorção. 3. Encapsulamento -
Leveduras. 4. Probióticos. 5. *Saccharomyces cerevisiae* -
Levedura. I. Título.

CDD 639.8

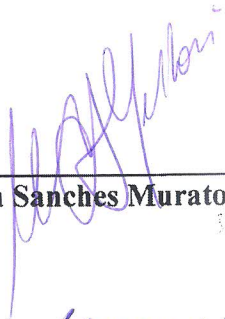
Bibliotecária: Caryne Maria da Silva Gomes – CRB / 1461

**CAPACIDADE PROBIÓTICA E ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B₁ POR
LEVEDURAS ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA**


ALINE MARIA DOURADO RODRIGUES

Tese aprovada em: 12/04/2018

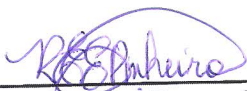
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria de Nasaré Bona de Alencar Araripe (Interna) / DZO/CCA/UFPI



Profa. Dra. Raizza Eveline Escorcio Pinheiro (Interna) CPCE/UFPI



Profa. Dra. Adriana Mabel Torres (Externa) / UNRC/CONICET



Profa. Dra. Carina Maricel Pereyra (Externa) / UNRC/CONICET

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

Autor: Marcelo Camelo

Música: Além do que se vê

DEDICATÓRIA

À Deus, por me conceder saúde, força e serenidade para enfrentar os desafios desta caminhada.

À minha amada mãe, Elisabeth Dourado, pelo apoio, conselhos, ensinamentos e esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos.

À minha irmã, Anália Kristinna Dourado Venancio Rodrigues, pela amizade, compreensão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí por me acolher e proporcionar tantas oportunidades na graduação, mestrado e doutorado, que contribuíram para minha formação científica e acadêmica.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, por estarem sempre dispostos a ajudar e contribuir para minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudo durante o curso de doutorado e também no doutorado *sadúiche*, em parceria com o Ministerio de Ciencia, Tecnología y Innovación Productiva (Mincyt – Argentina).

À Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori, que desde a graduação sempre me disse palavras de carinho e incentivo, pela amizade, por me orientar e me capacitar a enfrentar e superar as dificuldades da vida.

À Profa. Dra. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro, que eu chamo carinhosamente de “*sias*” e minha amiga desde o primeiro dia de aula do curso de Medicina Veterinária, pela parceria, companheirismo, apoio, incentivo e pelos momentos de alegria e descontração no laboratório e nas viagens.

À Profa. Dra. Maria Marlúcia Gomes Pereira pela amizade, por me escutar nos momentos de tristeza e me aconselhar, e por sempre me receber de braços abertos em sua casa.

À Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares, pela amizade, conhecimentos compartilhados e por sempre torcer por mim nas minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Manoel Henrique Klein Júnior pela amizade e incentivo na vida acadêmica e profissional.

À Profa. Dra. Maria de Nasaré Bona de Alencar Araripe, pelo carinho e por todo o apoio no experimento *in vivo*, além de ter disponibilizado da infraestrutura do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPESPI/CCA/UFPI).

Ao amigo Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet pela disponibilidade e apoio.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões propostas para elaboração da versão final da tese.

À Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina, onde fui bem acolhida pelos alunos de pós-graduação, professores, pesquisadores e funcionários durante o doutorado

sanduíche. Em especial agradeço à profa. Dra. Adriana Mabel Torres, pela amizade e orientação durante minha missão de estudos. À profa. Dra. Lilia Renée Cavaglieri pelo acolhimento e ensinamentos sobre adsorção de micotoxinas. Ao Dr. Guillermo Gíaj-Merlera, pela amizade, gentileza e auxílio valioso na identificação das leveduras por biologia molecular. À minha amiga Carina Maricel Pereyra pela amizade desde os tempos de “cursos das argentinas”, pelos ensinamentos, paciência e pela preocupação comigo durante minha estadia em Río Cuarto.

Ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) através do prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes, pela colaboração e parceria no microencapsulamento das leveduras por *spray-dryer*. Ao amigo Oskar Almeida Silva, pela disponibilidade em ajudar na operação do equipamento. Estendo meus agradecimentos aos alunos e funcionários do NTF pela prestatividade no laboratório.

Ao meu amigo Dr. Márcio dos Santos Rocha, pela colaboração no planejamento e execução do microencapsulamento das leveduras.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Instituto federal do Piauí (IFPI), em especial ao Prof. Dr. Ayrton de Sá Brandim e ao técnico André, pelo apoio técnico na realização das fotomicrografias das microcápsulas de leveduras.

Ao laboratório de Patologia Animal/CCA/UFPI, em especial aos residentes que me ajudaram na centrifugação das leveduras, e aos técnicos Ricardo e Sr. Manoel que realizaram o processamento histológico das lâminas dos peixes.

Ao Prof. Evando e à colega Silvia do Laboratório de Solos (LASO/CCA/UFPI), pela contribuição e auxílio na biologia molecular.

Ao José, funcionário do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPESPI), pelo auxílio fundamental durante o manejo dos alevinos no experimento *in vivo*.

Ao Núcleo de Apoio Estatístico à Pesquisa (NAEP/PROPESQ/UFPI), em especial ao Tito Lívio da Cunha Lopes e seus estagiários que realizaram a análise estatística, sempre contribuindo para a melhoria da qualidade do trabalho.

Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos, pela disponibilidade em me ajudar na análise histológica das lâminas dos peixes.

À minha querida amiga Aline Marques Monte, pelos conselhos, amizade, momentos de descontração e pelo auxílio no laboratório e no experimento *in vivo*.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Estudos e Processamento de Alimentos (NUEPPA/CCA/UFPI): Cristiane Evangelista Lima, João Farias de Sousa Junior, José

Humberto Santos Filho, Juliana Alexandre Ianiceli, Rafael Gomes Abreu Bacelar, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho e pelos momentos de alegria no laboratório.

Aos integrantes da família NUEPPA: Aline Martins, Amália, Barbara, Derick, Eldo, Juliana de Abreu, Julliet, Karol, Larisse, Leidiane, Leniza, Livia, Márcio Leonardo, Rosana, Sabrina, Simone, Tathiana e Tony. Obrigada pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do NUEPPA, em especial, a Lusmarina, Sr. Francisco, Sr. Aminthas, Dona Nasaré, Dona Socorro e Edna, pelo apoio e convívio harmonioso, e ao técnico do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, George Emanuel, pela ajuda fundamental no laboratório.

Ao meu pai, Ribamar Venancio Rodrigues, por transmitir amor e me incentivar nos estudos.

À minha querida amiga Ione Silva, que mesmo em minha ausência sempre transmite energias boas pra mim.

Ao meu filho de quatro patas Carreirinha, pelo amor incondicional e por ficar ao meu lado durante horas de estudo.

Aos meus amigos da graduação em Medicina Veterinária, da graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental, do Mestrado em Alimentos e Nutrição e a da Pós-Graduação em Ciência Animal pelo aprendizado em conjunto, apoio e momentos de alegria.

Por fim, a todos, os meus familiares e demais amigos que aqui não foram citados, mas que contribuíram nesta caminhada e sempre torceram por mim. **MUITO OBRIGADA!!!**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3 Capítulo I: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambiente de piscicultura: potencial probiótico e capacidade adsorvente de Aflatoxina B ₁	23
Resumo.....	25
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	28
Resultados.....	36
Discussão.....	41
Conclusão.....	45
Referências.....	45
4 Capítulo II: Efeito da microencapsulação por <i>spray drying</i> sobre a viabilidade e capacidade adsorvente de Aflatoxina B ₁ por <i>Sacharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	49
Resumo.....	51
Abstract.....	52
Introdução.....	53
Material e métodos.....	54
Resultados e discussão.....	59
Conclusões.....	64
Referências.....	65
5 Capítulo III: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> microencapsulada como adsorvente de aflatoxina B ₁ em rações para alevinos de tilápia-do- Nilo.....	70
Resumo.....	72

Abstract.....	72
Introdução.....	73
Material e métodos.....	75
Resultados e discussão.....	84
Conclusão.....	93
Referências.....	94
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
7 LITERATURA CITADA.....	99

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Espécies de leveduras isoladas de água e substrato de viveiros de piscicultura.....	35
Tabela 2. Capacidade de auto-agregação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI.....	36
Tabela 3. Co-agregação entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI e cepas de bactérias patogênicas.....	37
Tabela 4. Atividade antimicrobiana (medido em mm) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI contra cepas de bactérias patogênicas.....	37
Tabela 5. Sobrevivência <i>in vitro</i> das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI simulando as condições fisiológicas enzimáticas e de pH estomacal e intestinal de tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	39
Tabela 6. Influência entre os fatores pH e presença de sais biliares sobre a viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI, durante tempo de incubação.....	38
Tabela 7. Adsorção (%) na concentração de 50 ng mL ⁻¹ de AFB ₁ por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI.....	40

Capítulo II

Tabela 1. Rendimentos de material recuperado após o processo de encapsulamento em <i>spray dryer</i> (SD).....	58
Tabela 2. Contagem de células viáveis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8L3 na suspensão encapsulante e das microcápsulas obtidas após <i>spray drying</i> (SD), redução da viabilidade, eficiência da microencapsulação, umidade (%) e atividade de água.....	60
Tabela 3. Viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada com amido e maltodextrina durante 60 dias de armazenamento a 4°C.....	61
Tabela 4. Capacidade de adsorção de aflatoxina B ₁ pela cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada com maltodextrina.....	62

Capítulo III

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água das caixas de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB ₁ e <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada no período de 32 dias.....	84
Tabela 2. Desempenho de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB ₁ e <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada no período de 32 dias.....	85
Tabela 3. Contagem de leveduras da ração e do intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB ₁ e <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada no período de 32 dias.....	89

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1. *Spray dryer* co-corrente, de escala laboratorial (B-290 mini *spray dryer*, Buchi®)..... 55

Figura 2. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das microcápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 encapsuladas com amido (A, 1000x) e maltodextrina (B, 1000x)..... 63

Capítulo III

Figura 1. Estudo histológico de tecido esplênico em alevinos de tilapia-do-Nilo expostos a dietas contaminadas com AFB₁ durante 32 dias, coloração por H-E (aumento 40x). (A) T1 - Polpa vermelha (seta preta) e polpa branca (seta branca); (B) T2 - Polpa vermelha (seta preta) e polpa branca (seta branca); (C) T3 – Presença de centros melonomácrofagos (seta preta) e (D) T4 - Aumento do tecido linfoide da polpa branca..... 91

Figura 2. Estudo histológico de tecido renal em alevinos de tilapia-do-Nilo expostos a dietas contaminadas com AFB₁ durante 32 dias, coloração por H-E (aumento 40x). (A) T1- tecido hematopoiético; (B) T2- tecido hematopoiético com predomínio de linfócitos; (C) T3 - moderada vacuolização e (D) T4 – aumento de células linfoides.... 93

CAPACIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B₁ POR LEVEDURAS ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversos fungos, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* que contaminam matérias-primas, alimentos e rações para animais. A utilização de adsorventes biológicos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para remoção de micotoxinas apresenta-se como alternativa para minimizar o impacto negativo destes contaminantes na sanidade animal. Dessa forma, objetivou-se isolar, identificar e testar *in vitro* a capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B₁ (AFB₁) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de viveiros de piscicultura; avaliar o rendimento dos agentes encapsulantes: amido e maltodextrina e a recuperação de células viáveis da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3, isolada da água de viveiros de piscicultura, após o processo de encapsulamento por *spray drying* com os mesmos agentes, assim como avaliar a viabilidade das células encapsuladas durante o tempo de armazenamento e analisar a capacidade destas na adsorção *in vitro* de AFB₁; avaliar os efeitos da inclusão da cepa microencapsulada *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 em rações contaminadas com AFB₁ sobre o desempenho zootécnico e a resposta imunológica de alevinos de tilápia-do-Nilo. A identificação das leveduras foi realizada através de técnicas morfológicas e moleculares (*fingerprinting* e sequenciamento da região ITS - 5.8S) para confirmação das espécies. Foram indentificadas quatro cepas provenientes da água: *Saccharomyces cerevisiae* (n = 3) e *Debaryomyces nepalensis* (n = 1); e seis cepas obtidas do substrato: *Saccharomyces cerevisiae* (n = 3), *Candida parapsilosis* (n = 1), *Cryptococcus laurentii* (n = 1) e *Meyerozyma caribbica* (n = 1). Todas as cepas isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* (A8L1, A8L2, A8L3, S11L2, S12L1 e S12L2) seguiram para os testes *in vitro* de capacidade de adsorção de AFB₁ e de avaliação do potencial probiótico pelos testes: autoagregação, co-agregação e atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, inibição homóloga e sobrevivência às condições gastrointestinais. Todas as seis cepas apresentaram capacidade probiótica, no entanto apenas as cepas A8L2 e A8L3 tiveram habilidade de adsorver AFB₁. A cepa A8L3 foi escolhida para o encapsulamento por *spray drying* com os agentes encapsulantes amido e maltodextrina. Posteriormente as microcápsulas de amido e maltodextrina contendo a levedura foram armazenadas em refrigeração a 4°C e avaliadas a sua viabilidade durante 60 dias. A maltodextrina tem potencial como encapsulante devido a uma maior recuperação de células viáveis, viabilidade das células constante por 60 dias e capacidade de adsorção *in vitro* de AFB₁. No ensaio *in vivo* foram avaliados os parâmetros: qualidade da água, desempenho zootécnico, alterações histopatológicas e determinação da concentração de AFB₁ em músculo e órgãos hematopoiéticos, contagem e isolamento das leveduras da ração e intestino. Constatou-se que a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina em rações contaminadas com AFB₁ não exerceu influência negativa sobre o desempenho zootécnico e apresentou efeito imunoestimulante nos órgãos hematopoiéticos de alevinos de tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Adsorção; Encapsulamento; Imunoestimulante; Probióticos; *Saccharomyces cerevisiae*.

PROBIOTIC CAPACITY AND ADSORPTION OF AFLATOXIN B₁ BY ISOLATED YEASTS OF PISCICULTURE TANKS

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi belonging to the *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genera that contaminate food and animal feeds. The use of biological adsorbents, such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, to remove mycotoxins is an alternative to minimize the negative impact of these contaminants on animal health. The aims of this study were to isolate, identify and conduct *in vitro* tests regarding the probiotic and adsorbent capacity of aflatoxin B₁ (AFB₁) by *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fish farms; evaluate the yield of the starch and maltodextrin as encapsulating agents and the recovery of viable cells from the *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 strain, isolated from fish tank water, after the encapsulation process by spray drying with the same agents, as well as evaluate encapsulated cell viability during storage and analyze their *in vitro* AFB₁ adsorption capacity. In addition, the effects of the inclusion of the microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 strain in contaminated feeds on the zootechnical performance and immune response of Nile tilapia fingerling hematopoietic organs were also evaluated. Yeast identification proceeded through morphological and molecular techniques (fingerprinting and sequencing of the ITS-5.8S region) for species confirmation. Four strains from the water samples were identified, namely: *Saccharomyces cerevisiae* (n=3) and *Debaryomyces nepalensis* (n=1); and six strains from the substrate: *Saccharomyces cerevisiae* (n=3), *Candida parapsilosis* (n=1), *Cryptococcus laurentii* (n=1) and *Meyerozyma caribbica* (n=1). *Saccharomyces cerevisiae* A8L1, A8L2, A8L3, S11L2, S12L1 and S12L2 strains were then studied by *in vitro* AFB₁ adsorption capacity tests and their probiotic potential was evaluated by autoaggregation, co-aggregation and antimicrobial activity assays against pathogenic bacteria, homologous inhibition and survival to gastrointestinal conditions. All six strains displayed probiotic capacity, however only the A8L2 and A8L3 strains exhibited the ability to adsorb AFB₁. Strain A8L3 was chosen for spray drying encapsulation using starch and maltodextrin as the encapsulating agents. Subsequently the yeast-containing maltodextrin and starch microcapsules were stored at 4°C and evaluated for viability for 60 days. Maltodextrin shows potential as an encapsulant due to increased viable cell recovery, constant cell viability for 60 days, and *in vitro* AFB₁ adsorption capacity. The following parameters were evaluated in the *in vivo* assays: water quality, zootechnical performance, histopathological changes, determination of AFB₁ concentrations in hematopoietic organs and yeast counts and isolation in feeds and intestine. Supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulated with maltodextrin in feeds contaminated with AFB₁ showed no negative influence on zootechnical performance and had an immunostimulatory effect on the hematopoietic organs of Nile tilapia fingerlings.

Key words: Adsorption; Encapsulation; Immunostimulant; Probiotics; *Saccharomyces cerevisiae*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem se destacado pelo seu potencial para a aquicultura, em especial por sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas que conciliam interesse zootécnico e mercadológico (BRABO et al., 2016). Esta atividade tende a ser mais valorizada devido ao aumento do interesse dos consumidores por peixes.

A piscicultura brasileira produziu 507,12 mil toneladas em 2016, representando aumento de 4,4% em relação ao ano anterior. A produção de peixes tem se desenvolvido nos últimos anos no Nordeste, e o estado do Piauí tem investido em piscicultura, com produção de 8,80 mil toneladas de peixes, registrando aumento de 7,4% em relação a 2015. A tilápia é a espécie mais cultivada do Brasil, com 239,09 mil toneladas despescadas em 2016, representando quase metade (47,1%) do total da piscicultura (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016).

A alimentação dos peixes está entre os principais fatores que aumentam o custo da produção em piscicultura, desta forma, a qualidade das rações depende de muitos aspectos, dentre os quais: a qualidade dos ingredientes utilizados na formulação, o balanceamento nutricional da ração e o controle do processamento (KUBITZA, 2009). Os ingredientes das rações constituem-se substratos ideais para o desenvolvimento de micro-organismos, principalmente os fungos que ao contaminarem as matérias-primas das rações podem produzir micotoxinas (GONÇALVES-NUNES et al., 2015). Desse modo, a qualidade da ração fornecida tem sido o fator determinante para o máximo desempenho dos peixes, tornando importante à seleção dos fornecedores e o controle das condições de armazenamento como formas de prevenir a contaminação e deterioração da ração (MURATORI et al., 2013).

As micotoxinas são agentes químicos decorrentes do metabolismo secundário de fungos filamentosos toxigênicos que contaminam alimentos e rações para animais, causando efeitos agudos ou crônicos (micotoxicoses) (MÍDIO e MARTINS, 2000; MAZIERO e BERSOT, 2010, PEREYRA et al., 2010). Elas são produzidas principalmente por cinco gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. As principais micotoxinas encontradas em alimentos são: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), ocratoxina A, patulina, citrinina, zearalenona e tricotecenos (PITT e HOCKING, 2009; MAZIERO e BERSOT, 2010). No Piauí, foram encontrados fungos de gêneros variados em rações para piscicultura e seus ingredientes, prevalecendo os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, que possuem espécies produtoras de aflatoxinas (CARDOSO FILHO et al., 2013; GONÇALVES-NUNES et al., 2015).

Entre as principais micotoxinas, a aflatoxina B₁ (AFB₁) destaca-se por ser um dos metabólitos mais tóxicos para maioria dos animais, sendo responsável por desencadear efeitos teratogênicos, hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (BRYDEN, 2012; ROCHA et al., 2014). Alimentos contaminados com aflatoxinas são responsáveis por causar danos em várias espécies cultivadas em ambiente aquático, gerando desequilíbrios fisiológicos, redução do crescimento, alterações histológicas, morfológicas, e conseqüentemente oferecem riscos à saúde do consumidor, pela presença da toxina na musculatura de peixes (DENG et al., 2010; SELIM et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015).

Devido à natureza tóxica das micotoxinas, estratégias têm sido desenvolvidas, tais como: prevenção da contaminação e do crescimento fúngico; descontaminação de alimentos e ainda, inibição ou a adsorção no trato gastrointestinal de micotoxinas presentes no alimento consumido (MALLMANN et al., 2006). Dentre estas, a melhor forma de controle micotoxicológico baseia-se na utilização de condições desfavoráveis para o desenvolvimento de fungos. Caso este controle não seja eficiente, podem ser utilizados procedimentos físicos, químicos e biológicos que propiciem redução de contaminantes tóxicos nos alimentos (RAHAIE et al., 2012). Tem-se demonstrado o uso de substâncias inorgânicas capazes de adsorver múltiplas toxinas, porém podem ocasionar problemas ao sequestrar moléculas de alto valor nutritivo da dieta do animal (HUWIG et al., 2001; DESHENG et al., 2005; JANSEN VAN RENSBURG et al., 2006; DAKOVIC et al., 2008). Diante disto, a busca de novos compostos com atividade antifúngica e anti micotoxígena, com potencial ação preventiva e de controle sobre fungos toxígenos é imprescindível.

Uma das alternativas promissoras de procedimentos biológicos para controle de micotoxinas é a detoxificação biológica realizada por bactérias e leveduras que tenham propriedades probióticas. Possíveis adsorventes para micotoxinas em rações têm sido pesquisados como aditivos. Estes produtos normalmente são formados por cepas de bactérias e leveduras que possuem a capacidade de reduzir a quantidade destes agentes tóxicos (PIZZOLITTO et al., 2011; RAHAIE et al., 2012).

Baseado nestes fatos formulou-se a seguinte hipótese: As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em viveiros de piscicultura possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB₁ para serem incluídas na alimentação animal, influenciando no desempenho e sanidade de alevinos de tilápia-do-Nilo. Para testar a hipótese, os objetivos do presente trabalho foram: a) isolar, identificar e testar *in vitro* a capacidade probiótica e adsorvente de AFB₁ por cepas de *S. cerevisiae*; b) avaliar o rendimento dos agentes encapsulantes: amido e maltodextrina, e a recuperação de células viáveis da cepa *S. cerevisiae* A8L3, após o processo de

encapsulamento por *spray drying* com os mesmos agentes; c) determinar a viabilidade das células encapsuladas durante o tempo armazenamento e analisar a capacidade destas na adsorção *in vitro* de AFB₁; d) estudar os efeitos da inclusão da cepa microencapsulada *S. cerevisiae* A8L3 em rações contaminadas com AFB₁ sobre o desempenho zootécnico e a resposta imunológica de órgãos hematopoiéticos de alevinos de tilápia-do-Nilo.

O trabalho foi dividido estruturalmente em três capítulos, apresentados na forma de artigos científicos: Capítulo I: “*Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambiente de piscicultura: potencial probiótico e capacidade adsorvente de Aflatoxina B₁”; Capítulo II: “Efeito da microencapsulação por *spray drying* sobre a viabilidade e capacidade adsorvente de Aflatoxina B₁ por *Sacharomyces cerevisiae*”; Capítulo III: “*Saccharomyces cerevisiae* microencapsulada como adsorvente de aflatoxina B₁ em rações para alevinos de tilápia-do-Nilo”. Os artigos foram elaborados respectivamente de acordo com as normas das revistas: The Veterinary Journal, Food and Bioproducts Processing e Pesquisa Agropecuária Brasileira, às quais serão submetidos para publicação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Micotoxinas

As micotoxinas são agentes químicos, de baixo peso molecular, produzidos durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos, que sob condições adequadas de temperatura e umidade, podem se desenvolver em vários alimentos e rações, causando sérios riscos para a saúde humana e animal (BENNETT; KLICH, 2003; ZAIN, 2011). Atualmente, mais de 300 micotoxinas são conhecidas e, de modo geral, apresentam grande estabilidade química que permite sua permanência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos de industrialização, ou seja, mesmo que o alimento sofra o processamento a micotoxina ainda poderá estar presente (CAST, 2003; ZAIN, 2011; ROCHA et al., 2014).

Os fungos toxigênicos produzem um ou mais tipos de micotoxinas, porém nem todos os compostos produzidos pelos fungos são tóxicos e nem todas as espécies de fungos potencialmente toxigênicos produzem toxinas. As fontes mais frequentes de micotoxinas são os gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Outros gêneros como *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Diplodia*, *Myrothecium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Pithomyces* e *Strachybotrys*, também contêm espécies toxigênicas, (D'MELLO; MACDONALD, 1997; BRYDEN, 2012; ZAKI et al., 2012). Entre as micotoxinas de maior destaque em saúde pública e agricultura incluem: aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OTA), tricotecenos, zearalenona (ZEN), fumonisinas (F), toxinas tremorgênicas e alcalóides de ergot (BENNETT; KLICH, 2003; ZAIN, 2011; MARIN et al., 2013).

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. No entanto, mais recentemente, as espécies *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus pseudotamari* e *Aspergillus ochraceoroseus* também se mostraram aflatoxigênicas (PETERSON et al., 2001; BRYDEN, 2012; ROCHA et al., 2014). As quatro principais toxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ são produzidas pelo *A. parasiticus*, enquanto que o *A. flavus* produz apenas AFB₁ e AFB₂ (D'MELLO; MACDONALD, 1997; SANTACROCE et al., 2008). Devido à sua estrutura química heterocíclica, as aflatoxinas B e G apresentam fluorescência apenas quando expostas à luz ultravioleta (B = Azul, G = Verde) (SANTACROCE et al., 2008; ROCHA et al., 2014).

A AFB₁ é considerada o tipo mais tóxico, podendo induzir intoxicação aguda e crônica, além disso, apresenta efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e imunossupressores em uma variedade de espécies animais, incluindo

vertebrados aquáticos. A ingestão de grandes doses de aflatoxinas é letal e resultam em uma doença chamada aflatoxicose (MATEJOVA et al., 2017).

As micotoxinas podem ser responsáveis pela indução de muitos distúrbios em peixes, como induzir alterações celulares e orgânicas, produzir efeitos funcionais e morfológicos e, em casos mais graves, a mortalidade. Assim, as perdas na aquicultura causadas por micotoxinas em rações podem ser significativas, resultando em perdas econômicas na produção de peixes (DENG et al., 2010; ANATER et al., 2016; MATEJOVA et al., 2017).

Métodos de prevenção e controle de micotoxinas

O crescimento de fungos em alimentos e a produção de micotoxinas são influenciados por fatores abióticos e bióticos e suas complexas interações. Dentre esses fatores destacam-se: pH, atividade de água (Aa), umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento do fungo, estabelecimento no substrato, perda da integridade dos grãos causada por insetos, danos mecânicos, tamanho do inóculo e as características de interação/competição genética (MALLMANN et al., 2006; JARD et al., 2011).

A melhor maneira para controlar a contaminação por micotoxinas no campo inclui estratégias pré e pós-colheita, como a prevenção do desenvolvimento fúngico, e conseqüentemente a formação de micotoxinas no campo e armazenamento, mas isso geralmente é insuficiente e outras estratégias são necessárias (JARD et al., 2011). Deste modo, várias estratégias estão disponíveis para a desintoxicação ou descontaminação de matérias-primas e rações contendo micotoxinas, utilizando métodos físicos, físico-químicos, químicos e (micro) biológicos (DIAZ et al., 2004; VARGA et al., 2010).

Estes métodos devem ter como características a completa inativação, destruição ou remoção da toxina; não produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos, preservando seu valor nutritivo e palatabilidade; destruir os esporos e os micélios dos fungos para prevenir a produção ou o reaparecimento da toxina; não modificar as propriedades físicas do alimento significativamente, possuir custo acessível e ser de fácil utilização (BOVO et al., 2010). Portanto, a indústria de alimentos para consumo animal tem se preocupado na pesquisa por uma tecnologia de descontaminação de micotoxinas eficaz, específica e viável.

Os métodos físicos de remoção de micotoxinas envolvem procedimentos como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes, e os métodos químicos utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas, como o uso de cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio,

ozônio e bissulfito de sódio), ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia) (BOVO et al., 2010).

Quanto aos métodos físico-químicos para descontaminação de alimentos e rações com micotoxinas, a abordagem mais prevalente na indústria de rações é a inclusão de materiais adsorventes na ração para obter remoção seletiva de toxinas por adsorção durante a passagem pelo trato gastrointestinal, ou ao adicionar enzimas ou micro-organismos capazes de detoxificar certas micotoxinas (BRYDEN, 2012). Os agentes adsorventes podem ser classificados em diferentes grupos com base em sua origem: não biológicos (por exemplo, aluminossilicatos, carvão ativado, bentonitas, montmorillonitas, zeólitas, entre outros) e biológicos (por exemplo, leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas, enzimas microbianas, entre outros) (VARGA et al., 2010; HOJNIK et al., 2017).

A desintoxicação biológica de micotoxinas, utilizando micro-organismos e/ou enzimas para degradar as micotoxinas em compostos não-tóxicos ou menos tóxicos pode ser uma alternativa natural e eficaz (JI; FAN; ZHAO, 2016). De todos os tipos de micro-organismos que podem ser utilizados para a remoção de micotoxinas de alimentos e rações contaminadas, as bactérias ácido-láticas e as leveduras são as mais estudadas e que apresentam resultados mais promissores, pois juntamente a capacidade adsorvente deve possuir propriedade probiótica (BOVO et al., 2010).

Leveduras adsorventes de micotoxinas com capacidade probiótica

Leveduras são fungos unicelulares disseminados em ambientes naturais, incluindo a flora microbiana normal de seres humanos e animais, em plantas, em partículas transportadas pelo ar, na água, em produtos alimentícios e em muitos outros nichos ecológicos (KURTZMAN et al., 2011). Estes micro-organismos eucarióticos possuem representantes no filo Ascomycota e Basidiomycota. Os fungos leveduriformes destes dois filos possuem reprodução assexuada por brotamento ou fissão, mas também podem produzir esporos: os ascósporos e os basidiósporos. Além disso, as leveduras estão envolvidas em muitas interações com outros micro-organismos, incluindo simbiose, mutualismo, parasitismo e competição. (KURTZMAN et al., 2011; HATOUM et al., 2012).

Entre as leveduras pertencentes ao filo Ascomycota, o gênero *Saccharomyces* é o mais estudado. Muitas das cerca de 20 espécies deste gênero são de grande importância biotecnológica devido a aplicações que incluem fermentação alcoólica, panificação, produção de vitamina, síntese de proteínas recombinantes e controle biológico (HATOUM et al., 2012).

Porém uma das aplicações mais significativas das leveduras é como micro-organismo probiótico. A Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) da Organização Mundial de Saúde (OMS) define probióticos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO; WHO, 2002).

Os probióticos podem ser usados como uma alternativa para evitar o uso de antibióticos, eliminando assim a possibilidade de gerar bactérias resistentes a antibióticos nos sistemas de aquicultura, e como promotores de crescimento gerado incremento na saúde dos peixes (NAVARRETE; TOVAR-RAMREZ, 2014; BANERJEE; RAY, 2017).

Os procedimentos de seleção (*in vivo* e *in vitro*) de micro-organismos probióticos precisam ser adaptados para as diferentes espécies e ambientes em aquicultura. Segundo Pandiyan et al., (2013) e Banerjee; Ray, (2017) os parâmetros gerais para seleção de cepas probióticas para uso em aquicultura consistem principalmente em: (1) não ser patogênica para peixes; (2) tolerar uma ampla faixa de pH (de baixa acidez a alta alcalina) e alta concentração (> 2,5%) de sais biliares; (3) propriedade de aderir à superfície da mucosa epitelial do intestino; (4) atividade antagonista contra uma variedade de patógenos de peixes; (5) fornecer uma quantidade suficiente de enzimas e vitaminas para o suporte nutricional do hospedeiro; (6) isolar e selecionar cepas nativas do intestino ou de *habitats* aquáticos para evitar competição com a microbiota intestinal; (7) apresentar elevada viabilidade em uma mistura de cepas e/ou espécies; e (8) garantir a sobrevivência e persistência no hospedeiro.

A levedura *S. cerevisiae* tem sido utilizada há mais de uma década na alimentação de peixes como promotor de crescimento e estimulante do sistema imune (OZÓRIO et al., 2012; NAVARRETE; TOVAR-RAMREZ, 2014; NEWAJ-FYZUL et al., 2014). A Food and Drug Administration (FDA) classifica a *S. cerevisiae* como um micro-organismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Outra classificação de importância para a utilização segura de micro-organismos probióticos é o *status* QPS, (do inglês Qualified Presumption of Safety), “Presunção de Segurança Qualificada”, que é concedido pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) aos micro-organismos que passaram por avaliações de segurança, antes de serem comercializados, para estabelecimento de sua identidade, patogenicidade e o uso pretendido das cepas (EFSA, 2015).

Por ser considerado um micro-organismo GRAS, cepas de *S. cerevisiae* têm sido estudadas como potencial adsorvente de micotoxinas, ou seja, são capazes de se ligarem às moléculas das micotoxinas no trato gastrointestinal (TGI) e ainda estimulam efeitos benéficos

no organismo dos animais (VARGA et al., 2010; ARMANDO et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2011, 2012, 2013, POLONI et al., 2015, 2017).

A parede celular da levedura torna as células capazes de adsorver uma grande variedade de compostos do ambiente. Células viáveis, células não viáveis e produtos da parede celular de leveduras probióticas com alta capacidade de adsorção são capazes de reduzir a biodisponibilidade de toxinas em alimentos e rações (PFLIEGLER et al., 2015). Demonstrou-se que os componentes da parede celular de levedura β -D-glucanos (YIANNIKOURIS et al., 2006), glucomananas (RAJU; DEVEGOWDA, 2002) e manano-oligossacarídeos (OGUZ; PARLAT, 2004) são responsáveis pela adsorção de micotoxinas.

Diante do exposto, a utilização de leveduras como potenciais adsorventes e com capacidade probiótica se tornou uma ferramenta possível na alimentação de animais para a prevenção de micotoxicoses.

Encapsulamento de probióticos

Os micro-organismos probióticos devem ser adequados para produção industrial em grande escala. Dessa maneira, no campo da produção de alimentos probióticos existe a preocupação que as cepas probióticas mantenham as propriedades funcionais preservadas e que estejam em quantidade suficiente no momento do consumo, esta é uma aplicabilidade que pode ser fornecida pela microencapsulação (PHAM-HOANG et al., 2013; TRIPATHI; GIRI, 2014). A microencapsulação é o processo de envolver as células, revestindo-as com uma substância adequada de uma maneira que resulte em uma liberação celular apropriada no meio intestinal (TRIPATHI; GIRI, 2014).

A secagem por *spray drying* ou pulverização é o método de microencapsulação mais comumente usado na indústria de alimentos, uma vez que é econômico e flexível. O consumo de energia da secagem por pulverização é de 6 a 10 vezes menor em comparação com a liofilização e produz um produto de boa qualidade (MARTÍN et al., 2015). Este método envolve a atomização de uma emulsão ou de uma suspensão de probióticos e agentes de encapsulação em uma câmara de secagem por ar quente, resultando na rápida evaporação de água (SILVA et al., 2015).

Os materiais que asseguram boa capacidade de encapsulação devem exibir propriedades térmicas e protetoras, como dissacarídeos (lactose, sacarose ou trealose), dextrose ou polióis (manitol, sorbitol), e substâncias estimulantes do crescimento probiótico (fruto e galacto-oligossacarídeos) (BEHBOUDI-JOBBEHDAR et al., 2013). É importante

destacar que na microencapsulação por *spray-drying* a alimentação do produto, o fluxo de gás e a temperatura devem ser controlados (SILVA et al., 2015). Outros fatores que afetam a viabilidade da cultura probiótica seca por *spray-drying* são o tipo de cepa e sua tolerância às condições de estresse, o tempo de exposição ao calor (antes do processo de secagem) e as condições de umidade no armazenamento (após o processo de secagem) (MARTÍN et al., 2015).

A microencapsulação de leveduras com capacidade probiótica e adsorvente de micotoxinas pode servir como um método eficiente de fornecer células viáveis em número suficiente para atuarem no trato gastrointestinal, e assim proporcionar melhorias para a sanidade e o desempenho de peixes.

3 Capítulo I¹

Saccharomyces cerevisiae isoladas de ambiente de piscicultura: potencial probiótico e capacidade adsorvente de Aflatoxina B₁

¹Elaborado conforme as normas da revista The Veterinary Journal.

***Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambiente de piscicultura: potencial probiótico e capacidade adsorvente de Aflatoxina B₁**

***Saccharomyces cerevisiae* isolated from fish culture environment: probiotic potential and Aflatoxin B₁ adsorbent capacity**

Aline Maria Dourado Rodrigues^a, Raizza Eveline Escórcio Pinheiro^b, José Humberto Santos Filho^a, Cristiane Evangelista Lima^a, Carina Maricel Pereyra^c, Guillermo Gaj-Merlera^c, Adriana Mabel Torres^c, Lilia Reneé Cavaglieri^c, Maria Christina Sanches Muratori^a

^a Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Núcleo de Estudos e Pesquisas de Processamento em Alimentos (NUEPPA), Campus Socopo, CEP: 64055-350, Teresina, Piauí, Brasil

^b Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Professora Cinobelina Elvas, CEP: 64900-000, Bom Jesus, Piauí, Brasil

^c Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta N 36 km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

RESUMO

Objetivou-se nesta pesquisa isolar, identificar e testar *in vitro* a capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B₁ (AFB₁) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de viveiros de piscicultura. Foram isoladas e identificadas 10 cepas de leveduras por meio de técnicas morfológicas e moleculares (*fingerprinting* e sequenciamento da região ITS - 5.8S), sendo quatro cepas provenientes da água: *Saccharomyces cerevisiae* (n = 3) e *Debaryomyces nepalensis* (n = 1); e seis cepas obtidas do substrato: *Saccharomyces cerevisiae* (n = 3), *Candida parapsilosis* (n = 1), *Cryptococcus laurentii* (n = 1) e *Meyerozyma caribbica* (n = 1). Posteriormente, as seis cepas de *S. cerevisiae* (A8L1, A8L2, A8L3, S11L2, S12L1 e S12L2) selecionadas foram submetidas aos seguintes testes probióticos *in vitro* sob condições simuladas da fisiologia de Tilápia-do-Nilo: auto-agregação, co-agregação, atividade antibacteriana, inibição homóloga, tolerância ao pH baixo e aos sais biliares, sobrevivência às condições gastrointestinais de peixes e adsorção de AFB₁. Todas as seis cepas apresentaram habilidade de auto-agregação e co-agregação com bactérias patogênicas (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium) e também inibiram o crescimento das bactérias patogênicas. No ensaio de inibição homóloga não houve inibição entre as cepas. As cepas A8L1 e S12L1 foram as mais tolerantes ao pH baixo durante 12 horas de ensaio, porém as demais mostraram redução da viabilidade ao final do teste. Na presença de sais biliares, todas as cepas apresentaram boas contagens após 8 horas de ensaio. Entretanto todas as leveduras testadas foram capazes de sobreviver à passagem simulada do trato gastrointestinal. No ensaio de adsorção, apenas as cepas A8L2 e A8L3 tiveram habilidade de adsorver AFB₁. Os resultados mostram que as cepas A8L2 e A8L3 possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB₁, sendo promissores aditivos na alimentação de peixes.

Palavras-chave: Aflatoxina B₁. Adsorvente. Leveduras probióticas. Ambiente de piscicultura.

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and identify *Saccharomyces cerevisiae* strains from fish culture tanks with potential probiotic and AFB₁ adsorbent capacity. Ten yeast strains were isolated and identified by morphological and molecular techniques (*fingerprinting* and sequencing of the ITS-5.8S region), with four strains isolated from the water samples:

Saccharomyces cerevisiae (n=3) and *Debaryomyces nepalensis* (n=1), and six strains from the substrate: *Saccharomyces cerevisiae* (n=3), *Candida parapsilosis* (n=1), *Cryptococcus laurentii* (n=1) and *Meyerozyma caribbica* (n=1). Subsequently, the six selected *S. cerevisiae* strains (A8L1, A8L2, A8L3, S11L2, S12L1 and S12L2) were subjected to the following *in vitro* probiotic tests under simulated Nile Tilapia physiology: self-aggregation, co-aggregation, antibacterial activity, homologous inhibition, tolerance to low pH and bile salts, survival to fish gastrointestinal conditions and AFB₁ adsorption. All six strains displayed the ability to self-aggregate and co-aggregate with pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium serovar) and were able to inhibit pathogenic bacteria growth. No inhibition between strains was observed in the homologous inhibition assay. Strains A8L1 and S12L1 were the most tolerant of low pH during the 12-hour assay, while the other strains displayed a decrease in viability at the end of the test. All strains exhibited good counts after 8 hours in the presence of bile salts. However, all evaluated yeasts were able to survive the simulated passage of the gastrointestinal tract. Regarding the adsorption assay, only strains A8L2 and A8L3 displayed the ability to adsorb AFB₁. The results demonstrate that strains A8L2 and A8L3 exhibit probiotic characteristics and AFB₁ adsorbent potential, and seem to be promising fish feed additives.

Key words: Aflatoxin B₁. Adsorbent. Probiotic yeasts. Fish farming environment.

1. Introdução

A aquicultura é uma atividade produtiva com grande importância para suprir o aumento da demanda alimentar de uma população em crescimento exponencial (Brabo et al., 2016; FAO, 2016). A produção mundial de pescado cultivado em 2014 foi de 73,8 milhões de toneladas, destes 49,8 milhões de toneladas são provenientes da piscicultura (FAO, 2016).

A piscicultura intensiva se caracteriza pela alta densidade de estocagem com uso de rações balanceadas para alimentação. Neste tipo de produção, os peixes estão expostos a condições de estresse pela alta densidade de estocagem, levando a graves perdas econômicas (Aly et al., 2008). Para um efetivo controle das doenças mais comuns em peixes é recorrente o uso de antibióticos. No entanto, a ocorrência de micro-organismos resistentes a estes fármacos que propagam essas características genéticas de resistência entre bactérias patogênicas/comensais e o impacto ambiental da contaminação de água e sedimentos

associados à antibioticoterapia, levou à busca de novas alternativas para tratamento e profilaxia de doenças, incluindo a utilização de probióticos (Newaj-Fyzul et al., 2014; Caruffo et al., 2015).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002). Muitos micro-organismos são utilizados como probióticos, dentre eles, os gêneros mais utilizados de bactérias ácido lácticas são: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Pisano et al., 2014). As leveduras também constituem outro grupo de micro-organismos que possuem atributos para serem consideradas como probiótico. Entre as vantagens, as leveduras não são afetadas por substâncias antibacterianas e contêm vários compostos imunoestimulantes (β -glucanos, ácidos nucleicos e mananoligossacarídeos), o que pode explicar em parte, o efeito protetor contra patógenos (Caruffo et al., 2015). Além de já terem sido reportadas como promotores de saúde em seres humanos e animais, as leveduras têm sido pesquisadas como agentes descontaminantes de micotoxinas (Armando et al., 2011; Pizzolitto et al., 2012; Pfliegler et al., 2015).

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular que são produzidas durante o metabolismo de alguns fungos filamentosos. Esses metabólitos são estáveis a temperaturas elevadas utilizadas ($> 150^{\circ}\text{C}$) nas técnicas de extrusão durante os processamentos de cereais e rações, e também quando submetidas a valores de pH ácidos próximos aos encontrados no suco gástrico de peixes (Bullerman and Bianchini, 2007; Matejova et al., 2017). As micotoxinas quando estão presentes em alimentos e rações para animais representam um risco potencial para a sanidade pela toxicidade elevada, acarretando perdas econômicas substanciais pela redução dos parâmetros da eficiência na produção animal (Pfliegler et al., 2015; Matejova et al., 2017).

As aflatoxinas (AF) são consideradas como as mais importantes micotoxinas produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo as espécies mais conhecidas *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, e *A. pseudotamarii* (CAST, 2003; Marin et al., 2013). Embora aproximadamente 20 AF tenham sido isoladas, os tipos mais importantes são B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo a aflatoxina B₁ a que mais causa impactos à saúde que pode ser hepatotóxica, carcinogênica, mutagênica, teratogênica e imunossupressiva (Anater et al., 2016; Matejova et al., 2017).

Devido à natureza tóxica das micotoxinas, estratégias têm sido desenvolvidas, tais como: prevenção da contaminação e multiplicação fúngicas; descontaminação de alimentos e redução da absorção das micotoxinas presentes no alimento consumido no trato

gastrointestinal pela inibição ou a adsorção (Mallmann et al., 2006). Uma das alternativas promissoras de procedimentos biológicos para controle de micotoxinas é a detoxificação biológica realizada por bactérias e leveduras que tenham propriedades probióticas. Estes micro-organismos quando adicionados aos alimentos contaminados são capazes de adsorver micotoxinas, propiciando a redução da quantidade destes agentes tóxicos (Pizzolitto et al., 2012; Rahaie et al., 2012).

Deste modo, com o presente estudo objetivou-se isolar, identificar e testar *in vitro* a capacidade probiótica e adsorvente de AFB₁ por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de viveiros de piscicultura.

2. Material e métodos

2.1 Coleta das amostras

O número de amostras foi definido após visita a quatro propriedades piscicultoras da região da zona rural de Teresina (Latitude: 05° 05' 21" S Longitude: 42° 48' 07" W), Piauí, Brasil. De novembro de 2014 a janeiro de 2015 pela manhã, em cada propriedade, foram realizadas nove coletas de amostras de água e nove de substrato dos viveiros disponíveis, deste modo, foram coletadas 36 de água e 36 de substrato totalizando 72 amostras.

As amostras de água e de substrato foram depositadas em frascos de vidro esterilizados, com capacidade de 250 gramas. Em seguida, as mesmas foram acondicionadas em recipiente isotérmico com gelo reciclável e conduzidas para o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Processamento em Alimentos (NUEPPA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

A coleta das amostras foi solicitada aos responsáveis das propriedades piscicultoras após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido de participação neste experimento. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, sob o protocolo nº 302/17.

2.2 Isolamento de leveduras

De cada amostra foram tomados assepticamente 25 g de substrato e 25 mL de água e adicionados a 225 mL de água peptonada a 0,1% que seguiu para homogeneização durante 30 minutos em agitador orbital (150 rpm). A partir dessa diluição inicial (10⁻¹) foram preparadas

diluições decimais seriadas até 10^{-3} . A inoculação de cada uma das diluições foi efetuada em duplicata com alíquotas de 0,1 mL por placa de Petri, pelo método de semeadura por espalhamento em superfície no ágar extrato de levedura peptona dextrose suplementado com cloranfenicol (YPD – 10 g de peptona; 10 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 7,5 g de ágar; 0,1 g de cloranfenicol, em 500 mL de água destilada), com auxílio de alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas a 25°C por até 48 horas em estufa microbiológica. Para a obtenção de isolados puros, cada colônia foi repicada em placas de YPD pelo método de esgotamento em placas por estrias. Os isolados obtidos a partir de uma única unidade formadora de colônia (UFC) foram subcultivados em tubos inclinados de ágar extrato de malte (MEA: 20 g de extrato de levedura; 1,0 g de peptona; 20 g de glicose; 20 g de ágar dissolvidos em um litro de água destilada) para posterior identificação das espécies.

2.3 Seleção inicial das cepas

Realizou-se uma seleção inicial das cepas de leveduras que apresentavam tolerância a pH 2,0, simulando o suco gástrico de peixes, com metodologia adaptada de Gotcheva et al. (2002), na qual aquelas que sobreviveram por 60 minutos em pH baixo foram escolhidas para confirmação da espécie por técnicas moleculares.

2.4 Identificação molecular

2.4.1 Cultura de leveduras e extração de DNA

As leveduras foram cultivadas em meio sólido MEA e incubadas a 28°C durante 24 h. Uma alçada de cada cepa foi transferida para microtubos estéreis e estocadas *overnight* a -20°C, em seguida foi adicionado 500 µL de tampão de lise (50 mmol de Tris-HCl L⁻¹, 250 mmol de NaCl L⁻¹, 50 mmol de EDTA L⁻¹, 0,3% p/v de SDS, pH 8) e 5 µL de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®) e incubou-se a 65°C durante 60 min. Após a incubação, adicionou-se 500 µL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada vigorosamente, centrifugada durante 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se igual volume de isopropanol (Sigma-Aldrich®), para precipitação do DNA genômico a -20°C *overnight*. O microtubo foi centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos, o precipitado de DNA lavado com etanol 70%, e após evaporação do etanol a temperatura ambiente, o precipitado foi dissolvido em 100 µL de tampão TE (Tris-

HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1,0 mM, pH 8,0), quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000; 220-750nm) da Thermo Scientific e mantido a -20°C.

2.4.2 PCR-Fingerprinting

As leveduras selecionadas previamente tiveram seus perfis agrupados utilizando o *primer* GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). As reações de PCR foram feitas em um volume total de 25 µl contendo 5 µl de DNA genômico (25-250 ng/µl) de DNA das leveduras, 1X tampão de reação 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U Taq DNA polimerase (5 U/µl), 0,2 mM de cada dNTP e 0,6 µM de *primer* GTG₅. Um controle negativo, contendo todos os reagentes sem DNA, foi incluído em cada conjunto de reações. O PCR foi conduzido de acordo com as seguintes condições cíclicas: desnaturação inicial a 94°C durante dois minutos, seguido por 35 ciclos consistindo de 94°C durante 45 segundos, 50°C durante um minuto e 72°C durante um minuto e um final passo de extensão de 72 °C durante seis minutos, e depois mantido a 4,0°C indefinidamente. Os padrões de banda de DNA foram visualizados após eletroforese utilizando 1,5% de gel de agarose corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Os géis foram fotografados usando um analisador de sistemas MiniBIS Pro, DNI Bioimaging. Os padrões de impressão das bandas dos isolados foram comparados para agrupamento de perfis similares.

2.4.3 Sequenciamento da região ITS (5.8S)

Os resultados da PCR-*fingerprinting* foram confirmados com o sequenciamento na região ITS com os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). A reação de PCR foi realizada em uma mistura com volume total de 50 µl contendo 5 µl de DNA genômico (25-250 ng/µl), 1X de tampão de reação 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U Taq DNA polimerase (5 U/µl), 0,2 mM de cada dNTP e 0,3 µM de cada *primer*. Um controle negativo, contendo todos os reagentes sem DNA, foi incluído em cada conjunto de reações. A amplificação foi realizada num termociclador MJ Research PTC-200 (GMI Inc. Minnesota, MN, EUA) e ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por cinco minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguido de extensão final 72°C por cinco minutos. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em 1,5% de gel de agarose corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Os produtos de PCR amplificados foram enviados para MacroGen Inc. na Coreia do Sul para sequenciamento do DNA. Os dados das sequências foram submetidos à ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), baixada por programa com o banco de dados NCBI (GenBank), para determinar a identidade dos isolados.

2.5 Testes probióticos das cepas

Das cepas selecionadas (item 2.3) foi realizada uma triagem para escolher as que seriam testadas para: ensaios probióticos e capacidade para adsorver AFB₁. Após identificação molecular, apenas as cepas de leveduras que pertenciam à espécie *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas para os demais ensaios, por ser considerada um micro-organismo geralmente reconhecido como seguro (GRAS).

2.5.1 Capacidade de autoagregação e co-agregação

A metodologia descrita por Kos et al. (2003), com algumas modificações, foi utilizada para determinar a propriedade de adesão célula-célula das leveduras pelos ensaios de autoagregação e co-agregação. Os inóculos de cada cepa foram cultivados em caldo YPD e incubados em estufa microbiológica a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente, lavadas duas vezes, ressuspensas em 4,0 mL de tampão fosfato salino (PBS - pH 7,2) e homogeneizadas em agitador tipo vórtex. Em ambos os ensaios, as suspensões de células foram padronizadas para uma densidade ótica $(DO_{inicial})_{600\text{ nm}} = 0,5$. Os tubos com as suspensões foram incubados a 37°C por duas horas sem agitação. Em seguida, os valores de absorvância da camada superior foram medidos a 600 nm (DO_{final}) em espectrofotômetro. Para determinar a porcentagem de autoagregação de cada cepa foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Autoagregação\%} = 1 - (DO_{final}/DO_{inicial}) \times 100$$

Onde:

DO_{final} = Densidade ótica final após duas horas de incubação

$DO_{inicial}$ = Densidade ótica inicial no tempo zero de incubação

O método de preparação das suspensões de leveduras para co-agregação foi o mesmo utilizado para o ensaio de autoagregação e a metodologia deste teste foi realizada como

descrito por Pizzolitto et al. (2012). Foram utilizados neste ensaio seis diferentes micro-organismos patógenos cedidos pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ: *Aeromonas hydrophila* INCQS 00318 (IOC/FDA 110-36), *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923), *Streptococcus agalactiae* INCQS 00128 (ATCC 27853), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium INCQS 00150 (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 27853).

Foi realizado um cultivo de cada bactéria patogênica em caldo cérebro coração (BHI) e incubado por 24 horas a 37 °C, a seguir cada cultivo foi centrifugado a 5.000 rpm durante 10 minutos. Na sequência descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em PBS (pH 7,2). Foram realizadas diluições com a mesma solução tampão para ajustar a concentração final tanto de leveduras quanto de bactérias a $DO_{600\text{ nm}} = 0,7$. Posteriormente, volumes iguais (2,0 mL) de leveduras e bactérias patogênicas foram misturados em tubos estéreis, homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados a 37°C durante duas horas sem agitação. Em seguida, o sobrenadante da mistura descrita acima (DO_{mix}) e dos tubos controle com suspensões de leveduras (DO_{levedura}) e bactérias ($DO_{\text{patógeno}}$) tiveram a absorbância medida a 600 nm. Para determinação da porcentagem de co-agregação foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Co-agregação\%} = [1 - DO_{\text{Mix}} / (DO_{\text{Patógeno}} + DO_{\text{Levedura}} / 2)] \times 100$$

Onde:

DO_{Mix} = Densidade ótica da mistura levedura + patógeno;

$DO_{\text{Patógeno}}$ = Densidade ótica do patógeno

DO_{levedura} = Densidade ótica da levedura

2.5.2 Atividade antimicrobiana

As cepas de leveduras foram testadas para a produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas usando o método *slab test* no meio YPD de acordo com metodologia de Strus (1998). Nesta análise avaliaram-se as seguintes bactérias: *Aeromonas hydrophila* INCQS 00318 (IOC/FDA 110-36), *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923), *Streptococcus agalactiae* INCQS 00128 (ATCC 27853), *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium INCQS 00150 (ATCC 14028).

Inicialmente, para ajustar a concentração bacteriana suficiente para atingir 0,5 na escala de Mc Farland, as bactérias patogênicas foram semeadas em ágar Nutriente a 37°C por 24 horas em estufa microbiológica. Posteriormente, do ágar foi retirado com alça de platina inóculos de cada cultivo para ressuspender em solução salina (0,9%), procedendo dessa maneira até a obtenção de suspensões bacterianas correspondentes a 0,5 da escala de Mc Farland. Após ajuste do inóculo, com auxílio de *swab* esterilizado (Cral®) as bactérias foram semeadas em estrias por toda a superfície de placas de Petri com ágar Nutriente. Em seguida, discos de ágar YPD de 14 mm contendo as leveduras semeadas previamente a 25°C por 48 horas, foram cortados asépticamente e adicionados às placas com ágar Nutriente que foram semeadas anteriormente com as bactérias patogênicas. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após 24 horas de incubação a 37°C, mediram-se os diâmetros das zonas de inibição do crescimento em torno das placas de ágar. Os resultados foram descritos em milímetros (mm), subtraindo-se o diâmetro do disco de ágar de YPD.

2.5.3 Inibição homóloga

Para este ensaio as seis cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram testadas entre si pelo método de estrias cruzadas descrito por Muzzolón (2010). A partir de tubos de MEA previamente semeados, com cada um dos isolados de *S. cerevisiae*, foram realizadas suspensões de 10^7 células mL⁻¹ para cada cepa em teste, sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Cada cepa foi semeada em uma estria central em placas de Petri contendo ágar YPD, depois foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após o crescimento da estria central as placas foram expostas a vapores de clorofórmio durante 10 minutos para inativação dos cultivos. Posteriormente, as diferentes cepas foram semeadas por estrias cruzadas até a borda da estria central. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Decorrido o tempo proposto, as placas foram consideradas positivas quando havia a presença de halos de inibição de crescimento (≥ 5 mm) ao redor da estria central, e negativas quando se detectava ausência de halo ou inibição (< 5 mm).

2.5.4 Sobrevivência às condições gastrointestinais de peixes

A sobrevivência das leveduras as condições gastrointestinais foram testadas *in vitro* com metodologia adaptada de Pizzolitto et al. (2012). O procedimento adotado neste ensaio

foi ajustado para simular as condições gastrointestinais de tilápia-do-Nilo (Rotta, 2003). Primeiramente, foram realizadas suspensões de 10^7 células mL^{-1} em solução salina estéril (NaCl 0,9%), a partir de tubos de MEA previamente semeados com cada um dos isolados de *S. cerevisiae*, sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de cada cepa foi retirada (T0), realizada diluições seriadas e semeada em ágar YPD para determinação do inoculo inicial. Em seguida, os concentrados de células foram centrifugados por 10 min a 5000 rpm em temperatura ambiente e ressuspensos em 1 mL de solução de fluido gástrico artificial (NaCl 125 mmol; KCl 7 mmol; NaHCO_3 , 45 mmol e pepsina, 3 g/L - Sigma-Aldrich[®], ajustado para pH 2,0 com HCl). As células foram incubadas durante 60 min a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação (150 rpm) para simular o peristaltismo (T1). Após centrifugação, adicionou-se às células 1,0 mL de fluido artificial de enzimas digestivas presentes no intestino (tripsina - Sigma-Aldrich[®], 1,0 mg mL^{-1} ; quimi tripsina - Sigma-Aldrich[®], 1,0 mg mL^{-1} ; sais de bile 0,5 % (p/v) em água e ajustado para pH 7 com NaOH 1N), logo após foram incubadas durante 60 min a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação (T2). Para a determinação da contagem viável, foram recolhidas alíquotas de células de levedura (100 μL) após a simulação das condições gástricas (T1) e intestinais (T2). As contagens de células viáveis das cepas de *S. cerevisiae* foram realizadas por diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 48 h a 37°C .

2.5.5 Tolerância ao pH baixo e aos sais biliares

A padronização do inóculo seguiu mesma metodologia já citada no ensaio de sobrevivência às condições gastrointestinais. Em seguida, 100 μL da suspensão foram adicionados a 900 μL de caldo YPD ajustado a pH 2,0. As soluções contendo as células foram incubadas sob agitação constante (150 rpm) em diferentes tempos: 4, 8 e 12 h a $30 \pm 2,0^\circ\text{C}$. Ao final de cada tempo de incubação foram retiradas alíquotas de 100 μL para a contagem de células viáveis pela diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 24 h a 37°C .

Para a determinação da viabilidade e tolerância das cepas de leveduras à presença de sais de bile nas condições do intestino de tilápia-do-Nilo, realizou-se o teste utilizando-se a metodologia semelhante ao ensaio de tolerância ao pH baixo. Para isso foi utilizado o caldo YPD suplementado com sais de bile a 0,5% (Sigma-Aldrich[®]) ajustado para pH 7,0. Ao final dos diferentes tempos de incubação: 4, 8 e 12 h, foram retiradas alíquotas de 100 μL para a

contagem de células viáveis através da diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 24 h a 37°C.

Controles do ensaio foram realizados submetendo-se cada cepa ao mesmo procedimento descrito, porém com inoculação em caldo YPD pH 7,0 e sem o acréscimo dos sais de bile.

2.5.6 Teste de adsorção de AFB₁

O ensaio de adsorção de AFB₁ foi realizado de acordo com Pizzolitto et al. (2011) e Poloni et al. (2015), incluindo algumas modificações. A solução inicial de AFB₁ utilizada no ensaio foi de um núcleo produzido da cepa de *A. parasiticus* NRRL 2999 (USDA, Agricultural Research Service, Peoria, IL), com concentração de 2,67 µg/mL, conforme recomendado pela metodologia de Magnoli et al. (2011).

A partir de tubos de MEA previamente semeados, com cada um dos isolados de *S. cerevisiae*, foram realizadas suspensões para cada cepa em teste de 10⁷ células mL⁻¹, sendo a padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Foram preparadas soluções de trabalho de AFB₁ (25 e 50 ng mL⁻¹) em PBS (pH 7,0). Em seguida, 1,0 mL de cada suspensão de células foram colocados em microtubos, submetidos à centrifugação durante 15 min a 5000 rpm à temperatura ambiente. Logo após, foram lavados duas vezes com água destilada e submetidos novamente à centrifugação. Foram adicionados 1,0 mL da solução de PBS (pH 2,0), para simular a acidez do estômago de tilápia-do-Nilo e incubados a 30°C por 60 minutos em agitação constante (150 rpm). Em seguida, foram centrifugados e aos concentrados de células adicionou-se 1,0 mL de PBS em pH 7,0 contendo AFB₁ nas concentrações testadas (25 e 50 ng mL⁻¹). Os mesmos foram incubados por 60 minutos a 30±2°C e submetidos à agitação constante.

Após este período, as células foram sedimentadas por centrifugação durante 15 min a 5.000 rpm à temperatura ambiente, e o sobrenadante contendo micotoxinas não ligadas foi recolhido e armazenado a -20°C para análise do percentual de adsorção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os controles positivos (somente AFB₁) e controles negativos (somente PBS) foram incluídos no ensaio.

A quantificação da AFB₁ não adsorvida foi realizada em cromatógrafo HPLC Shimadzu[®] (modelo Prominence) com detector de fluorescência modelo RF-10AXL Super, de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al. (1994). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360 nm e 460 nm, respectivamente. Foi utilizada uma coluna de

fase reversa C18 (de sílica gel, 150 x 4,6mm id., 5,0 µm de tamanho de partículas, Varian, Inc. Palo Alto, EUA). Para análise, uma alíquota de 200 µL da amostra foi derivatizada com 700 µL de solução composta por ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: água (20:10:70, v/v/v). A fase móvel foi um sistema isocrático acetonitrila: metanol: água (17:17:66 v/v) a um fluxo de 1,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL.

A curva de quantificação da toxina foi realizada por medição das áreas e sua interpolação a uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de padrão de AFB₁, de onde foram extraídos os limites de detecção e quantificação da técnica. As quantificações de AFB₁ adsorvidas foram estabelecidas por meio da correlação entre as áreas dos picos das amostras e da curva padrão. As porcentagens de adsorção de AFB₁ foram realizadas pela equação a seguir:

$$\text{Adsorção \%} = \left(\frac{\text{área do pico da amostra}}{\text{área do pico de micotoxina no controle positivo}} \right) \times 100$$

2.6 Análise estatística

Os dados foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x4 (seis cepas; quatro tempos de viabilidade) para o teste de tolerância ao pH baixo e aos sais biliares, 6x3 (seis cepas; três tempos de análise) para o teste de sobrevivência às condições gastrointestinais e 6x2 (seis cepas de leveduras; duas concentrações de AFB₁) para o teste de adsorção, com duas repetições por tratamento. As contagens de colônias obtidas no teste de sobrevivência às condições gastrointestinais e tolerância ao pH baixo e aos sais biliares foram analisadas e o número de células de levedura transformado em escala logarítmica $\log_{10}^{(x+1)}$ e depois aplicada à análise de variância. Os dados obtidos foram analisados segundo os procedimentos do *software* livre R versão 3.3.2 e submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey considerando-se um nível de 5% de significância.

3. Resultados

3.1 Isolamento e identificação molecular

Um total de 30 cepas foram isoladas e identificadas morfológicamente como leveduras (Pitt and Hocking, 2009). Em seguida, após triagem realizada pelo teste de tolerância ao pH

baixo, dez cepas foram selecionadas para identificação molecular. A identificação das cepas, bem como sua origem e seu registro estão descritos na tabela 1.

As cepas de *S. cerevisiae* (tabela 1) foram utilizadas nos ensaios probióticos e de adsorção de AFB₁ por serem considerados micro-organismos GRAS (geralmente reconhecido como seguro).

Tabela 1. Espécies de leveduras isoladas de água e substrato de viveiros de piscicultura.

Origem	Cepa	Identificação molecular
Água	A8L1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	A8L2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	A8L3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	A25L1	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
Substrato	S11L2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	S12L1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	S12L2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	S32L1	<i>Candida parapsilosis</i>
	S34L1	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	S35L1	<i>Meyerozyma caribbica</i>

3.2 Auto-agregação

Observa-se que não houve diferença significativa entre as cepas no teste de auto-agregação (Tabela 2). Os resultados mostram que a maioria das cepas apresentaram porcentagens superiores a 80%, sendo consideradas de forte agregação, com exceção da A8L1 que teve 75%.

Tabela 2. Capacidade de auto-agregação de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI.

Cepas*	DO ₆₀₀ (t ₀) ¹ ($\bar{X} \pm DP$)	DO ₆₀₀ (t ₁) ² ($\bar{X} \pm DP$)	Auto-agregação (%) ($\bar{X} \pm DP$)	Escore de Agregação ³
A8L1	0,590 ± 0,021	0,144 ± 0,125	75,82 ^a ± 20,83	+
A8L2	0,578 ± 0,032	0,085 ± 0,071	85,36 ^a ± 12,18	++
A8L3	0,528 ± 0,049	0,034 ± 0,003	93,56 ^a ± 0,92	++
S11L2	0,564 ± 0,017	0,079 ± 0,057	86,16 ^a ± 9,73	++
S12L1	0,580 ± 0,023	0,059 ± 0,035	90,02 ^a ± 5,71	++
S12L2	0,533 ± 0,036	0,030 ± 0,002	94,35 ^a ± 0,56	++

\bar{X} : Média, DP: desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tuckey (p<0,05). ¹ Densidade ótica inicial; ² Densidade ótica após duas horas; ³ (-): agregação ≤ 60, (+): agregação < 80 > 60, (++) : agregação ≥ 80. *Origem: A= água e S= substrato

3.3 Co-agregação

A co-agregação entre as cepas de *S. cerevisiae* e as bactérias patogênicas selecionadas estão apresentadas na Tabela 3. Todas as cepas apresentaram bons percentuais de co-agregação, no entanto a habilidade das leveduras em se ligar a um micro-organismo varia entre as cepas e quanto à bactéria envolvida. Nos resultados descritivos observa-se que apenas a cepa A8L3 apresentou baixa co-agregação para a bactéria *Aeromonas hydrophila* ($\leq 10\%$), no entanto a mesma obteve bons percentuais de ligação com as demais bactérias utilizadas neste ensaio.

Tabela 3. Co-agregação entre *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI e cepas de bactérias patogênicas.

Cepas*	Co-agregação (%)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Salmonella enterica</i>
A8L1	76,63 ^b ± 1,5	75,10 ^a ± 1,4	36,90 ^e ± 0,8	88,94 ^a ± 1,0	72,60 ^a ± 0,7
A8L2	87,87 ^a ± 1,4	60,79 ^d ± 0,8	53,09 ^d ± 0,9	67,64 ^b ± 0,3	59,05 ^b ± 1,3
A8L3	39,07 ^d ± 2,1	66,59 ^c ± 0,8	72,03 ^b ± 0,8	7,37 ^d ± 0,4	76,97 ^a ± 1,8
S11L2	61,71 ^c ± 2,1	70,48 ^b ± 0,9	74,32 ^b ± 2,2	58,89 ^c ± 0,4	74,83 ^a ± 0,9
S12L1	73,27 ^b ± 0,6	22,68 ^e ± 0,8	85,49 ^a ± 1,5	57,39 ^c ± 0,8	31,09 ^d ± 1,1
S12L2	21,69 ^e ± 0,6	59,38 ^d ± 0,9	43,07 ^d ± 1,3	87,79 ^a ± 0,8	45,39 ^c ± 1,2

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tuckey ($p < 0,05$). *Origem: A= água e S= substrato.

3.4 Atividade antimicrobiana

Não houve diferença entre as cepas por bactéria e entre as bactérias por cepa no teste de atividade antimicrobiana ($P < 0,05$) (Tabela 4). Todas as leveduras inibiram o crescimento dos patógenos utilizados no ensaio, demonstrando uma forte atividade antagonista.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana (medido em mm) de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI contra bactérias patogênicas.

CEPA*	Halo de inibição (mm) ¹				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
A8L1	15 ^a ± 1,4	16,5 ^a ± 0,7	13 ^a ± 1,4	14 ^a ± 0,0	13,5 ^a ± 0,7
A8L2	15 ^a ± 1,4	16 ^a ± 2,8	15 ^a ± 0,0	16 ^a ± 1,4	14,5 ^a ± 0,7
A8L3	16 ^a ± 0,0	17,5 ^a ± 0,7	16 ^a ± 0,0	16,5 ^a ± 0,7	14 ^a ± 0,0
S11L2	13 ^a ± 1,4	17 ^a ± 1,4	13,5 ^a ± 0,7	14 ^a ± 0,0	13,5 ^a ± 0,7
S12L1	16 ^a ± 1,4	16 ^a ± 0,0	12,5 ^a ± 0,7	14 ^a ± 0,0	14 ^a ± 0,0
S12L2	16 ^a ± 0,0	17 ^a ± 1,4	13,5 ^a ± 2,1	14,5 ^a ± 0,7	15 ^a ± 0,0

¹+: zona de inibição ≥ 3 mm e ≤ 9 mm; ++: zona de inibição ≥ 10 mm e ≤ 15 mm; -: zona de inibição ≤ 3 mm; *Origem: A= água e S= substrato.

3.5 Inibição homóloga

No ensaio de inibição homóloga, constatou-se que as cepas de *S. cerevisiae* avaliadas desenvolveram-se naturalmente entre as estrias nas placas sem a ocorrência de inibição entre elas. Este resultado mostra que as cepas podem ser incluídas em uma formulação de um produto probiótico, e assim potencializar os efeitos benéficos.

3.6 Sobrevivência às condições gastrointestinais de peixes

O resultado da sobrevivência das cepas de *S. cerevisiae* às condições gastrointestinais simuladas de tilápia está apresentado na Tabela 6. Todas as cepas testadas permaneceram viáveis em fluido estomacal por 60 min, e demonstraram capacidade de multiplicação, mesmo estando em pH 2,0 com enzimas que simulam o suco gástrico. A etapa que simulou as condições dos fluidos intestinais demonstrou que ao final do ensaio todas as cepas apresentaram contagem de células maiores do que a inicial, comprovando capacidade de sobrevivência destas leveduras durante passagem simulada do TGI, propriedade ideal para um probiótico.

Tabela 5. Sobrevivência *in vitro* das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI simulando as condições fisiológicas enzimáticas e de pH estomacal e intestinal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Cepas*	Viabilidade de leveduras (log UFC mL ⁻¹) durante simulação da passagem pelo TGI ($\bar{X} \pm DP$)		
	Inicial	pH 2,0 com fluido gástrico por 60 min	pH 7,0 com fluido intestinal por 120 min.
A8L1	7,45 ^{ab} ± 0,14	8,09 ^{aA} ± 0,07	7,95 ^{aA} ± 0,12
A8L2	7,66 ^{ab} ± 0,13	8,23 ^{aA} ± 0,04	7,99 ^{aAB} ± 0,09
A8L3	7,40 ^{ab} ± 0,12	8,02 ^{abA} ± 0,03	7,91 ^{aA} ± 0,06
S11L2	7,34 ^{ab} ± 0,05	7,97 ^{abA} ± 0,05	7,93 ^{aA} ± 0,04
S12L1	7,55 ^{ab} ± 0,04	7,68 ^{bAB} ± 0,17	7,96 ^{aA} ± 0,03
S12L2	7,51 ^{ab} ± 0,05	8,06 ^{aA} ± 0,21	7,99 ^{aA} ± 0,10

\bar{X} : Média, DP: desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tuckey (p<0,05). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste Tuckey (p<0,05). * Origem: A= água e S= substrato

3.7 Tolerância ao pH baixo e aos sais biliares

O efeito da tolerância das cepas pesquisadas ao pH baixo e a presença de sais biliares (0,5%) está apresentado na tabela 5. A cepa S12L1 foi tolerante a pH 2,0 em todos os períodos de incubação, sem afetar sua viabilidade, sendo comparável aos valores obtidos em pH 7,0 (controle do ensaio), indicando a estabilidade desta cepa. Em pH 2,0 a cepa A8L1 também mostrou capacidade de manter a contagem de células viáveis constante até o final das 12h de ensaio. As demais cepas sofreram redução significativa nos níveis de contagem durante o período de incubação, sendo que a A8L3 e S11L2 foram as que tiveram maior redução.

Em pH 7,0 (controle) foi possível observar a estabilidade das cepas de leveduras S12L1 e S12L2 em todos os tempos testados. As demais cepas exibiram no período de quatro horas de incubação redução das contagens, porém após 12 horas todas elas conseguiram recuperar a capacidade de multiplicação.

Na presença de sais biliares em meio de pH 7,0 a cepa A8L2 manteve sua estabilidade durante o período pesquisado, já a levedura A8L3 apresentou aumento significativo da viabilidade das células ao final de 12h (Tabela 5). No entanto, ocorreu diminuição das contagens das outras cepas até quatro horas de cultivo, porém conseguiram melhorar o desempenho após oito horas, e no período de 12 h apresentaram contagens superiores ao tempo inicial (0 h) (exceto S11L2 e S12L1).

Tabela 6. Influência entre os fatores pH e presença de sais biliares sobre a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI, durante tempo de incubação.

CEPAS*	pH	Tempo (Horas)			
		0	4	8	12
A8L1	pH 2,0	7,46 ^{aA}	6,84 ^{bcA}	7,07 ^{abA}	7,03 ^{abA}
A8L2		7,58 ^{aA}	6,56 ^{cB}	6,74 ^{bcB}	6,56 ^{bcB}
A8L3		8,00 ^{aA}	6,63 ^{cB}	6,21 ^{cBC}	5,93 ^{cC}
S11L2		8,12 ^{aA}	6,90 ^{bcB}	6,36 ^{bcBC}	6,05 ^{cC}
S12L1		8,15 ^{aA}	7,62 ^{aA}	7,73 ^{aA}	7,46 ^{aA}
S12L2		7,75 ^{aA}	7,36 ^{abA}	6,52 ^{bcB}	5,91 ^{cB}
A8L1		pH 7,0 (controle)	7,70 ^{abA}	6,76 ^{bbB}	7,34 ^{aAB}
A8L2	7,51 ^{bbB}		6,75 ^{bbB}	7,60 ^{abB}	8,57 ^{aA}
A8L3	7,69 ^{abA}		6,73 ^{bbB}	7,87 ^{aA}	8,01 ^{aA}
S11L2	7,85 ^{abA}		6,73 ^{bbB}	7,81 ^{aA}	7,91 ^{aA}
S12L1	8,57 ^{aA}		7,86 ^{aA}	7,91 ^{aA}	7,86 ^{aA}
S12L2	7,66 ^{abA}		7,23 ^{abA}	7,87 ^{aA}	7,98 ^{aA}
A8L1	pH 7,0 com sais de bile		7,77 ^{baB}	6,87 ^{bcC}	7,24 ^{bbcC}

A8L2	7,65 ^{bA}	6,92 ^{bA}	7,75 ^{abA}	8,07 ^{aA}
A8L3	7,36 ^{bB}	7,56 ^{aAB}	7,85 ^{aAB}	8,09 ^{aA}
S11L2	8,38 ^{aA}	7,47 ^{aB}	7,95 ^{aAB}	7,83 ^{aB}
S12L1	8,59 ^{aA}	7,58 ^{aC}	7,80 ^{aBC}	8,14 ^{aAB}
S12L2	7,41 ^{bB}	7,62 ^{aAB}	8,05 ^{aA}	7,80 ^{aAB}

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tuckey ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Contagens de células viáveis (Log UFC.mL⁻¹); *Origem: A= água e S= substrato.

3.8 Teste de adsorção de AFB₁

A capacidade de adsorver AFB₁ *in vitro* das cepas de *S. cerevisiae* isoladas em ambiente de cultivo foi resumida na tabela 7. As cepas testadas não foram capazes de adsorver AFB₁ em concentração de 25 ng mL⁻¹. No entanto, em 50 ng mL⁻¹ apenas as cepas isoladas da água de cultivo foram capazes de adsorver AFB₁ em percentuais variados, sendo as cepas A8L2 e A8L3 que apresentaram melhores percentuais.

Tabela 7. Adsorção (%) na concentração de 50 ng mL⁻¹ de AFB₁ por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambientes de piscicultura em Teresina, PI.

Cepas*	AFB ₁ Adsorvida ¹ (ng mL ⁻¹)	
	50 ng mL ⁻¹ ($\bar{X} \pm DP$)	%
A8L1	1,08 ^b ± 3,3	3,2
A8L2	11,2 ^a ± 6,6	32,9
A8L3	17,5 ^a ± 5,4	33,4
S11L2	NA	-
S12L1	NA	-
S12L2	NA	-

X: Média, DP: desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tuckey ($p < 0,05$). NA: não adsorveu. ¹A adsorção de AFB₁ foi calculada como a diferença entre a AFB₁ no meio e a quantidade de AFB₁ livre (sobrenadante). *Origem: A= água e S= substrato

4. Discussão

O presente estudo relata o isolamento e a identificação de cinco espécies de leveduras provenientes de ambiente de piscicultura (água e substrato): *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces nepalensis*, *Meyerozyma caribbica* e *Saccharomyces cerevisiae*. Durante a seleção de um micro-organismo probiótico é desejável que a levedura escolhida tenha sido isolada da microbiota do trato gastrointestinal, pois está adaptada ao ambiente do intestino, sendo indicado por evitar dificuldades de colonização e problemas imunológicos (Navarrete and Tovar-Ramrez, 2014; Banerjee and Ray, 2017). Porém, nesta

pesquisa foram isoladas leveduras de viveiros de piscicultura com o intuito de encontrar espécies adaptadas ao ambiente aquático e, conseqüentemente, as condições fisiológicas dos peixes.

As seis cepas de *S. cerevisiae* isoladas do ambiente (água: A8L1, A8L2, A8L3; substrato: S11L2, S12L1, S12L2), pertencem a uma espécie reconhecida pelos efeitos positivos sobre os parâmetros de desempenho e na sanidade dos peixes (Abdel-Tawwab et al., 2008; Pinpimai et al., 2015), além de ser um micro-organismo geralmente reconhecido como seguro (*generally recognized as safe* - GRAS), de acordo com a Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos. Por esse motivo, pode ser usado com segurança como probiótico em piscicultura. Além disso, estudos reportam que esta levedura tem capacidade de adsorção devido a grande área superficial da parede celular que se liga as micotoxinas (Armando et al., 2011; Dogi et al., 2011; Pizzolitto et al., 2011; Pfliegler et al., 2015; Poloni et al., 2015).

A triagem de um probiótico bem-sucedido requer muitos testes (*in vitro* e *in vivo*), que devem ser direcionados para o modo de ação desses micro-organismos de acordo com sua finalidade e fisiologia do organismo que vai ser beneficiado. A avaliação da eficácia *in vitro* das cepas de *S. cerevisiae* isoladas foi baseada na fisiologia de Tilápia-do-Nilo, que é um peixe onívoro (Rotta, 2003).

A propriedade de auto-agregação está relacionada à capacidade de adesão da cepa às células epiteliais da mucosa gastrointestinal (Newaj-Fyzul et al., 2014). Todas as cepas de *S. cerevisiae* utilizadas nesta pesquisa mostraram boa habilidade agregativa quando comparada aos resultados de Armando et al. (2011) que relataram capacidade de auto-agregação de cepas de *S. cerevisiae* variando de 85,3% a 97,9% enquanto que Pizzolitto et al. (2012) apresentaram valores intermediários com percentuais de 68,4 a 84,7% para *S. cerevisiae* isoladas de fezes de frango. Ogunremi; Sanni; Agrawal (2015) isolaram leveduras de produtos alimentares fermentados tradicionais à base de cereais nigerianos que apresentaram forte aptidão de auto-agregação (81,24 - 91,85%), assim como as cepas testadas nesta pesquisa. Estes resultados são favoráveis para a utilização destas cepas na formulação de um produto probiótico comercial para piscicultura.

A capacidade de co-agregação dos probióticos pode prevenir a entrada de agentes patogênicos ao organismo do hospedeiro, formando uma barreira que evita a colonização por bactérias patogênicas e removendo os micro-organismos patogênicos do lúmen intestinal (Collado et al., 2008; Binetti et al., 2013; Abbasiliasi et al., 2017). Todas as cepas de *S. cerevisiae* testadas no presente trabalho mostraram habilidade de co-agregação com as

bactérias patogênicas estudadas, entretanto a cepa A8L3 foi a única com baixa adesão à bactéria *Aeromonas hydrophila* e a cepa A8L1 apresentou melhor porcentagem de co-agregação para a mesma bactéria. Em pesquisa de Binetti et al. (2013) foram estudadas diferentes cepas das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Galactomyces geotrichum* e *Pichia kudriavzevii*, isoladas da microbiota autóctone de queijo, que apresentaram baixa, intermediária e alta co-agregação contra *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli*. Caruffo et al. (2016) testaram a capacidade de co-agregação de cepas de *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* contra *Vibrio anguillarum*, um patógeno de peixes, porém houve baixa co-agregação demonstrando que esta habilidade é uma interação entre levedura e bactéria. Estes resultados sugerem que a propriedade de co-agregação pode ser favorecida com a habilidade de auto-agregação de cada cepa, pois quanto melhor a auto-agregação maior será a facilidade das leveduras de formarem uma barreira que previne a invasão de bactérias patogênicas no TGI.

De acordo com Hatoum et al. (2012) e Starmer e Lachance (2011), o antagonismo dos micro-organismos por leveduras tem sido atribuído principalmente a (1) competição por nutrientes, (2) mudanças de pH no meio como resultado da troca de íons com crescimento ou produção de ácido orgânico, (3) produção de altas concentrações de etanol, (4) secreção e liberação de micocinas, substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos, tais como leveduras, fungos e bactérias. Rajkowska et al. (2012) comprovaram atividade antagonista de *S. cerevisiae* var. *bouardii* apenas contra *Staphylococcus aureus* utilizando a metodologia *slab test*, assim como neste trabalho, porém foi constatado efeito inibitório das cepas testadas, também, para *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. No estudo de Armando et al. (2011) as cepas RC008 e RC016 da espécie *S. cerevisiae*, isoladas do ambiente de suínos, mostraram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *Salmonella entérica* e *Enterobacter cloacae*. Nesta pesquisa, também foi possível constatar que as *S. cerevisiae* isoladas no ambiente de piscicultura foram capazes de inibir bactérias patogênicas, entretanto, a natureza da substância antimicrobiana não foi investigada.

A produção de um probiótico visa oferecer benefícios à saúde do consumidor, assim à utilização de vários micro-organismos combinados no mesmo produto pode potencializar seu efeito. É importante destacar que a complexidade do intestino pode levar a variações individuais (De Angelis et al., 2006). Dessa forma, cepas podem ser combinadas para formular a composição de um probiótico. Assim, os resultados de inibição homóloga, neste estudo, revelaram que as diferentes cepas de *S. cerevisiae* isoladas podem ser utilizadas

juntas, pois elas não apresentaram poder de inibição entre si. Em um estudo *in vivo* com suínos, Gardiner et al. (2004) comprovou que uma mistura de cinco bactérias ácido lácticas, isoladas de intestino destes animais, reduziu em 97% a contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae após 21 dias de administração da cultura de bactérias. Devido aos escassos estudos de leveduras com potencial probiótico, é de grande importância trabalhos que utilizem uma combinação de leveduras probióticas para avaliar sua eficácia *in vivo*.

Os probióticos em aquicultura, geralmente são administrados com alimentos, dessa forma devem enfrentar um ambiente de variações no pH do trato gastrointestinal. Ainda podem ocorrer diferentes condições fisiológicas, durante o metabolismo, como variação do pH do trato gastrointestinal de ácido (estômago) ao básico (intestino), e pela ação de diferentes enzimas digestivas e sais biliares. Deste modo, para que um micro-organismo seja considerado probiótico deve ter a capacidade de tolerar uma ampla variação de pH e alta concentração (> 2,5%) de sais biliares (Banerjee and Ray, 2017). Autores comprovaram em testes *in vitro* a capacidade de sobrevivência das leveduras em condições gastrointestinais (Dogi et al., 2011; Pizzolitto et al., 2012; Greppi et al., 2017; Poloni et al., 2017). No presente estudo com as cepas de *S. cerevisiae* isoladas de ambiente de piscicultura as cepas pesquisadas foram capazes de tolerar variações de pH, as enzimas do suco gástrico e do fluido intestinal, e ainda a presença de sais biliares caracterizando-se como um probiótico estável.

A seleção de micro-organismos na dieta, que além de possuir propriedades probióticas sejam eficientes em adsorver à aflatoxina B₁, favorece a redução do impacto desta micotoxina no desempenho dos animais (Pizzolitto et al., 2011). A fim de investigar a capacidade de adsorção das cepas de *S. cerevisiae* com AFB₁, avaliou-se a descontaminação desta micotoxina em duas concentrações diferentes. Apenas as cepas A8L2 e A8L3 apresentaram eficiência na adsorção de AFB₁ na concentração 50 ng mL⁻¹. Por outro lado, percentuais elevados de adsorção entre *S. cerevisiae* e AFB₁ foram relatados por Pizzolitto et al. (2012), que compararam três concentrações diferentes de AFB₁. Estes autores ao utilizarem uma concentração de 500 ng mL⁻¹ de AFB₁ obtiveram valores de 37,4 a 65,5% de adsorção para cepas viáveis de *S. cerevisiae* isoladas de fezes de frango. A cepa RC016 de *S. cerevisiae* isolada de intestino de suínos obteve 82% de adsorção de AFB₁ na concentração de 50 ng. mL⁻¹ (Armando et al., 2011), uma porcentagem elevada comparada a encontrada no presente estudo. Em pesquisa de Pinheiro et al. (2017), verificou-se a capacidade anti-micotoxina de leveduras secas de cervejaria da espécie *S. cerevisiae* em diferentes valores de pH e obteve percentuais de 12,4 a 21,6% em teste de concentração única de 1.000 ng mL⁻¹ de AFB₁, simulando o pH do estômago e do intestino de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

5. Conclusão

O presente estudo isolou e identificou seis cepas de *S. cerevisiae* de viveiros de piscicultura com comprovada ação probiótica e capacidade de sobrevivência às condições do trato gastrointestinal de Tilápia-do-Nilo. As cepas A8L2 e A8L3 apresentaram melhores percentuais de adsorção de AFB₁. Portanto, a inclusão destas cepas na dieta em futuros estudos *in vivo* pode possibilitar uma melhoria nos aspectos de sanidade de peixes e, também reduzir a quantidade de AFB₁ ingerida ocasionalmente em rações contaminadas.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse a declarar.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), em parceria com o Ministerio de Ciencia, Tecnología y Innovación Productiva (Mincyt – Argentina) que concederam bolsa de doutorado sanduíche a primeira autora deste trabalho. Agradecemos a Universidad Nacional de Río Cuarto pela parceria na realização do projeto e pela ajuda na identificação das leveduras, ensaios probióticos e de adsorção de micotoxina.

Referências

- Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Bashokouh, F., Ibrahim, T.A.T., Mustafa, S., Vakhshiteh, F., Sivasambo, S., Ariff, A.B., 2017. In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. BMC Microbiol. 17, 121. doi:10.1186/s12866-017-1000-z
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael, N.E.M., 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 280, 185–189. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.055
- Aly, S.M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol. 25, 128–136. doi:10.1016/j.fsi.2008.03.013
- Anater, A., Manyes, L., Meca, G., Ferrer, E., Luciano, F.B., Pimpão, C.T., Font, G., 2016.

- Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture* 451, 1–10. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.022
- ANVISA, 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c (accessed 15 Apr 2018).
- Armando, M., Dogi, C., Pizzolitto, R., Escobar, F., Peirano, M., Salvano, M., Sabini, L., Combina, M., Dalcerro, A., Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin J.* 4, 59–68. doi:10.3920/WMJ2010.1208
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* 115, 66–77. doi:10.1016/j.rvsc.2017.01.016
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., Suárez, V., 2013. Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. *J. Appl. Microbiol.* 115, 434–444. doi:10.1111/jam.12228
- Brabo, M.F., Pereira, L.F.S., Santana, J.V.M., Campelo, D.A. V., Veras, G.C., 2016. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. *Aquat. Res.* 4, 50–58. doi:10.2312/ActaFish.2016.4.2.50-58
- Bullerman, L.B., Bianchini, A., 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 140–146. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C.G., Navarrete, P., 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.01093
- Caruffo, M., Navarrete, N.C., Salgado, O.A., Faúndez, N.B., Gajardo, M.C., Feijóo, C.G., Reyes-Jara, A., García, K., Navarrete, P., 2016. Protective yeasts control *V. anguillarum* pathogenicity and modulate the innate immune response of challenged zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 1–14. doi:10.3389/fcimb.2016.00127
- CAST, 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA.
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1065–1073. doi:10.1007/s00217-007-0632-x
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., Gobbetti, M., 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res. Microbiol.* 157, 792–801. doi:10.1016/j.resmic.2006.05.003
- Dogi, C.A., Armando, R., Ludueña, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C.A.R., Dalcerro, A., Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Addit. Contam. Part A* 1–7. doi:10.1080/19440049.2011.605771
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. doi:978-92-5-306675-9
- FDA, 2018. Food And Drug Administration. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm> (accessed 25 feb 2018).
- Gardiner, G.E., Casey, P.G., Casey, G., Lynch, P.B., Lawlor, P.G., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus*

- murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1895–1906. doi:10.1128/AEM.70.4.1895-1906.2004
- Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., Angelov, A., 2002. Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnol.* 16, 211–225. doi:10.1081/FBT-120016668
- Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J.P., Cocolin, L., 2017. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiol.* 62, 169–177. doi:10.1016/j.fm.2016.09.016
- Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I., 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Front. Microbiol.* 3, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2012.00421
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94, 981–987. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x
- Magnoli, A.P., Monge, M.P., Miazzo, R.D., Cavaglieri, L.R., Magnoli, C.E., Merkis, C.I., Cristofolini, A.L., Dalcerro, A.M., Chiacchiera, S.M., 2011. Effect of low levels of aflatoxin B₁ on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B₁ in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poult. Sci.* 90, 48–58. doi:10.3382/ps.2010-00971
- Mallmann, C.A., Dilkin, P., Giacomini, L.Z., Rauber, R.H., 2006. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. *An. da Conferência APINCO Ciência e Tecnol. Avícolas* 213–224.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60, 218–237. doi:10.1016/j.fct.2013.07.047
- Matejova, I., Svobodova, Z., Vakula, J., Mares, J., Modra, H., 2017. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A Review. *J. World Aquac. Soc.* 48, 186–200. doi:10.1111/jwas.12371
- Muzzolón, J., 2010. Uso de bacterias lácticas y / o levaduras en la prevención de aflatoxicosis en animales de compañía. Trabajo Final para optar el título de Microbiólogo, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Navarrete, P., Tovar-Ramrez, D., 2014. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. *Sustain. Aquac. Tech.* doi:10.5772/57196
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H., Austin, B., 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431, 1–11. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.08.026
- Ogunremi, O.R., Sanni, A.I., Agrawal, R., 2015. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *J. Appl. Microbiol.* 119, 797–808. doi:10.1111/jam.12875
- Pfliegler, W.P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., 2015. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* 55, 805–818. doi:10.1002/jobm.201400833
- Pinheiro, R.E.E., Pereyra, C.M., Neves, J.A., Calvet, R.M., Santos, J.T. de O., Lima, C.E., Alves, V.C., Pereira, M.M.G., Muratori, M.C.S., 2017. Avaliação *in vitro* da adsorção de aflatoxina B₁ por produtos comerciais utilizados na alimentação animal. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 84. doi:10.1590/1808-1657000072015
- Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M., Pirarat, N., 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Res. Vet. Sci.* 102, 103–111. doi:10.1016/j.rvsc.2015.07.021

- Pisano, M.B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, M.P., Deiana, M., Cosentino, S., 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. *Biomed Res Int* 2014, 286390. doi:10.1155/2014/286390
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 2009. 3 ed. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 524p.
- Pizzolitto, R.P., Armando, M.R., Combina, M., Cavaglieri, L.R., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A., 2012. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J. Environ. Sci. Heal. B*. 47, 933–941. doi:10.1080/03601234.2012.706558
- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A., 2011. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: A useful model to determine the most efficient microorganism., in: *Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology*. InTech - Open Access Publisher, pp. 323–346.
- Poloni, V., Dogi, C., Pereyra, C.M., Fernández Juri, M.G., Köhler, P., Rosa, C.A.R., Dalcerro, A.M., Cavaglieri, L.R., 2015. Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B₁. *Food Addit. Contam. Part A* 32, 970–976. doi:10.1080/19440049.2015.1024761
- Poloni, V., Salvato, L., Pereyra, C., Oliveira, A., Rosa, C., Cavaglieri, L., Keller, K.M., 2017. Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces cerevisiae* strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. *Food Chem. Toxicol.* 107, 630–636. doi:10.1016/j.fct.2017.02.040
- Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S.H., Mazaheri, M., 2012. Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 1647–1653. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03015.x
- Rajkowska, K., Kunicka-Styczyńska, A., Rygala, A., 2012. Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* against human pathogens. *Food Technol. Biotechnol.* 50, 230–236.
- Rotta, M.A., 2003. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Embrapa Pantanal, Corumbá.
- Santacroce, M.P., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G., Crescenzo, G., 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Rev. Fish Biol. Fish.* 18, 99–130. doi:10.1007/s11160-007-9064-8
- Starmar, W.T., Lachance, M.-A., 2011. Chapter 6 - Yeast Ecology A2 - Kurtzman, Cletus P., in: Fell, J.W., Boekhout, T.B.T.-T.Y. (Fifth E. (Eds.), . Elsevier, London, pp. 65–83. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9
- Strus, M., 1998. [A new method for evaluation of the antagonistic action of bacterial lactic acid (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria]. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 50, 123–130.
- Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R.H., Romer, T.R., 1994. 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. *J. AOAC Int.* 77, 1512–1521.

4 Capítulo II²

Efeito da microencapsulação por *spray drying* sobre a viabilidade e capacidade adsorvente de Aflatoxina B₁ por *Sacharomyces cerevisiae*

² Elaborado conforme as normas da revista Food and Bioproducts Processing.

Efeito da microencapsulação por *spray drying* sobre a viabilidade e capacidade adsorvente de Aflatoxina B₁ por *Sacharomyces cerevisiae*

Effect of microencapsulation by *spray drying* on the viability and adsorbent capacity of Aflatoxin B₁ by *Sacharomyces cerevisiae*

Aline Maria Dourado Rodrigues^{a*}, João Farias de Sousa Júnior^a, Aline Marques Monte^a, Raizza Eveline Escórcio Pinheiro^b, Márcio dos Santos Rocha^c, Oskar Almeida Silva^d, Lívio César Cunha Nunes^d, Carina Maricel Pereyra^e, Maria Christina Sanches Muratori^a

^a Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Núcleo de Estudos e Pesquisas de Processamento em Alimentos (NUEPPA), Campus Socopo, CEP: 64055-350, Teresina, Piauí, Brasil

^b Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Professora Cinobelina Elvas, CEP: 64900-000, Bom Jesus, Piauí, Brasil

^c Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências da Natureza (CCN), Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil

^d Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil

^e Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta N 36 km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

*Autor correspondente

Aline Maria Dourado Rodrigues, Pós-graduação em Ciência Animal
Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Núcleo de Estudos e Pesquisas de Processamento em Alimentos (NUEPPA), Campus Socopo, CEP: 64055-350, Teresina, Piauí, Brasil

alinemary2@yahoo.com.br

Telefone: +55 (86) 99902-8423

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o rendimento dos agentes encapsulantes: amido e maltodextrina, e a recuperação de células viáveis da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 após o processo de encapsulamento por *spray drying* com os mesmos agentes, assim como avaliar a viabilidade das células encapsuladas durante o tempo armazenamento e analisar a capacidade destas na adsorção *in vitro* de AFB₁. Para o processo de microencapsulação utilizando a tecnologia de secagem por *spray dryer*, foram preparadas suspensões com 2,5% de células de levedura, 2,5% de agente encapsulante (amido ou maltodextrina) e 95% de água destilada, com temperatura de entrada e saída de 105°C e 70 ± 3°C. Os agentes encapsulantes amido e maltodextrina formaram microcápsulas com bom rendimento de material recuperado após *spray drying*, entretanto a levedura encapsulada com maltodextrina teve maior contagem de células viáveis após secagem e elevada porcentagem de eficiência da microencapsulação. As microcápsulas de maltodextrina e amido sobreviveram ao armazenamento. A levedura encapsulada com maltodextrina foi eficaz na adsorção *in vitro* de AFB₁ nas concentrações 25 e 70 ng/mL. Os resultados indicam que a maltodextrina tem potencial como encapsulante devido a uma maior recuperação de células viáveis, viabilidade constante por 60 dias e capacidade de adsorção *in vitro* de AFB₁.

Palavras-chave: *Spray-dryer*, Adsorção, Probióticos, Sobrevivência, Microcápsulas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the performance of starch and maltodextrin as encapsulating agents, and the recovery of viable cells from the A8L3 *Saccharomyces cerevisiae* strain after the spray drying process with the same agents, as well as to evaluate the viability of the encapsulated cells during storage and analyze their capacity concerning the *in vitro* adsorption of AFB₁. For the microencapsulation process applying spray dryer technology, suspensions were prepared with 2.5% yeast cells, 2.5% of the encapsulating agent (starch or maltodextrin) and 95% distilled water, with input and output temperatures of 105 °C and 70 ± 3 °C, respectively. Starch and maltodextrin formed microcapsules resulting in adequate yields of recovered material after spray drying, however yeast encapsulated with maltodextrin displayed a higher viable cell count after drying and a high percentage of microencapsulation efficiency. Both maltodextrin and starch microcapsules survived storage. Maltodextrin encapsulated yeast were effective in the *in vitro* adsorption of AFB₁ at 25 and 70 ng mL⁻¹. The results indicate that maltodextrin displays potential as an encapsulant due to increased viable cell recovery, 60-day continuous viability and *in vitro* AFB₁ adsorption capacity.

Key words: Spray-dryer, Adsorption, Probiotics, Survival, Microcapsules.

1. Introdução

A microencapsulação de probióticos é um processo no qual as células são retidas dentro de uma matriz ou membrana encapsulante, com o intuito de preservar as propriedades benéficas (Anal e Singh, 2007). Entre as várias aplicações dessa tecnologia, na indústria de alimentos, a principal envolve a proteção de compostos biologicamente ativos ou células, como as bactérias e leveduras probióticas, para eficiente liberação nos locais alvos (Doherty et al., 2011).

A secagem por *spray drying* consiste na dispersão do material do núcleo, formando uma emulsão, seguida da homogeneização do líquido, e depois a atomização da mistura na câmara de secagem. Isso leva à evaporação do solvente. É importante destacar que, nesta técnica, a alimentação do produto, o fluxo de gás e a temperatura devem ser controlados (Martín et al., 2015). A técnica de encapsulamento por *spray drying* ou atomização tem como vantagem ser de alta viabilidade econômica e de boa capacidade de maleabilidade para melhorar a estabilidade das culturas. No entanto, muitas vezes ocorrem perdas de viabilidade dos micro-organismos, resultante da desidratação e inativação térmica das culturas probióticas (Sunny-Roberts e Knorr, 2009).

As leveduras são adsorventes naturais de micotoxinas com comprovada propriedade probiótica, por estudos *in vitro* com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que possuem a habilidade de descontaminar os alimentos (Armando et al., 2011; Pizzolitto et al., 2012). As células viáveis, não viáveis e produtos de paredes celulares de leveduras probióticas são capazes de reduzir a biodisponibilidade de toxinas nos alimentos e rações para animais (Shetty e Jespersen, 2006; Pfliegler et al., 2015; Poloni et al., 2015). Estes adsorventes são eficientes apenas se o complexo é estável no trato digestivo de um animal, de modo que as micotoxinas ligadas são canalizadas pela urina e pelas fezes (Jard et al., 2011).

As micotoxinas são metabólitos secundários que podem estar presentes em todo o mundo nos produtos agrícolas. Estas toxinas são produzidas por espécies de fungos filamentosos e podem causar micotoxicoses (Jard et al., 2011; Marin et al., 2013). As aflatoxinas (AF) são consideradas como as mais importantes micotoxinas produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo as espécies mais conhecidas *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, e *A. pseudotamarii* (CAST, 2003; Santacroce et al., 2008; Marin et al., 2013). Embora aproximadamente 20 AF tenham sido isoladas, apenas as quatro mais tóxicas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) foram submetidas a estudos substanciais sobre suas propriedades biológicas e impactos na saúde (Santacroce et al., 2008).

Para a utilização de um micro-organismo vivo na alimentação é necessário que as células se mantenham viáveis em número suficiente nos possíveis locais de ação, por exemplo, o trato gastrointestinal. Dessa forma, a inserção de leveduras vivas em rações para aquicultura constitui-se em um desafio, pois muitas vezes estas não atingem o intestino devido ao ambiente aquático e às diversas condições intestinais destes animais (Pinpimai et al., 2015).

Objetivou-se com o presente estudo avaliar o rendimento dos agentes encapsulantes: amido e maltodextrina, e a recuperação de células viáveis da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 após o processo de encapsulamento por *spray drying* com os mesmos agentes, assim como avaliar a viabilidade das células encapsuladas durante o tempo de armazenamento e analisar a capacidade destas na adsorção *in vitro* de AFB₁.

2. Material e métodos

2.1 Preparação da cepa e encapsulamento

Saccharomyces cerevisiae A8L3 foi isolada da água de viveiros de piscicultura da cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Esta cepa foi previamente identificada por técnicas moleculares, PCR-*fingerprinting* e sequenciamento da região ITS-5.8S (Brandão et al., 2011), e testada para a capacidade probiótica e adsorvente de AFB₁ (Armando et al., 2011; Dogi et al., 2011; Pizzolitto et al., 2012).

A levedura foi cultivada em 100 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose - YPD (5,0 g de extrato de levedura; 5,0 g de peptona; 40 g de glicose, em 1000 mL de água destilada) e incubada sob agitação a 150 rpm durante 48 h a 30°C. Após incubação, as células foram centrifugadas (4000 rpm por 10 min) e lavadas duas vezes com água destilada esterilizada, resultando num concentrado de células (*pellets*).

Para o processo de encapsulamento, foi estabelecido que as soluções encapsulantes devessem conter 5% de sólidos, composto por 2,5% dos *pellets*, 2,5% do agente (amido ou maltodextrina) e 95% de água destilada. Inicialmente pesaram-se os *pellets*, em seguida pesou-se a mesma quantidade de encapsulante amido (Isofar[®]) e maltodextrina (Pryme Foods[®]), para suas respectivas soluções.

Para o preparo da solução, primeiramente o agente encapsulante foi ressuspenso em água destilada e posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriar, os *pellets* foram acrescentados asépticamente às duas soluções encapsulantes para

preparo da solução de alimentação do *spray dryer* (figura 1). Utilizou-se como temperatura de entrada e saída 105°C e 70±3°C, respectivamente. A solução encapsulante contendo *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 foi mantida em agitador magnético à temperatura ambiente e conduzida para a câmara de secagem por bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 3,0 mL/min, fluxo do ar de secagem de 35 m³/h e pressão do compressor de ar de 0,7 MPa. As microcápsulas foram coletadas da base do ciclone e armazenadas em frascos esterilizados hermeticamente fechados.



Figura 1. *Spray dryer* co-corrente, de escala laboratorial (B-290 mini *spray dryer*, Buchi®).

2.2 Rendimento do processo de encapsulamento

A taxa de recuperação do produto ou o rendimento do processo seguiu a recomendação de Souza (2003) e Souza et al. (2015). Os valores foram obtidos pelo percentual entre a quantidade de microcápsulas total coletada (massa experimental) e a quantidade de sólidos alimentada no *spray dryer* (SD) (massa teórica).

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa experimental/massa teórica}) \times 100$$

2.3 Contagem de leveduras na solução de alimentação antes e depois da secagem por *spray drying* (SD)

O efeito do encapsulamento na viabilidade das leveduras probióticas foi avaliado por contagem do número de leveduras viáveis antes e depois do processo de secagem e seguiu metodologia adaptada de Aponte et al. (2016). Foi utilizado o método de semeadura por espalhamento em superfície no ágar extrato de levedura peptona dextrose suplementado (YPD – 10 g de peptona; 10 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 7,5 g de ágar, em 500 mL de água destilada).

Para análise, uma alíquota de 1,0 mL de cada suspensão dos agentes encapsulantes foi diluída em série decimal seriada até 10^{-6} em solução peptonada estéril e plaqueadas em duplicata em ágar YPD.

Para a avaliação da sobrevivência da levedura após SD, 1,0 g de microcápsulas foi reidratada em 9,0 mL de solução peptonada esterilizada e preparada diluições decimais seriadas até 10^{-3} . A inoculação de cada uma das diluições foi efetuada em duplicata com alíquotas de 0,1 mL por placa de Petri com ágar YPD. As placas foram incubadas em estufa microbiológica B.O.D. a 25°C durante 48 h. Em seguida realizou-se a contagem (UFC/g) de células viáveis utilizando o contador de colônias do tipo Quebec.

2.4 Eficiência da microencapsulação

A eficiência da microencapsulação foi calculada pela fórmula (Castro-Cislaghi et al., 2012):

$$\text{Rendimento (\%)} = (N/N_0) \times 100,$$

Onde:

N_0 é o número em log UFC/g de células viáveis da solução de alimentação do *spray dryer*

N é o número em log UFC/g de células viáveis das microcápsulas obtidas

2.5 Sobrevivência de *Sacharomyces cerevisiae* durante armazenamento

Lotes com aproximadamente 20 g de microcápsulas com levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 foram armazenados em temperatura de refrigeração (4°C) dentro de frascos hermeticamente fechados e vedados com Parafilm por 60 dias. A viabilidade das cepas foi

avaliada por contagem de células viáveis em ágar YPD, como previamente detalhado, em quatro períodos diferentes: tempo inicial (zero), após 15, 30 e 60 dias.

2.6 Determinação da atividade de água e umidade das microcápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3

A determinação da atividade de água das microcápsulas foi efetuada com o auxílio do determinador modelo Decagon Pawkit digital (Decagon - EUA) previamente calibrado, pela técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado para medir a atividade de água de um produto. A umidade das microcápsulas foi determinada por secagem em estufa a 105°C, de acordo com metodologia da AOAC (2005).

2.7 Determinação da capacidade das microcápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* como adsorvente de aflatoxina B₁ (AFB₁)

O ensaio de adsorção de AFB₁ foi realizado de acordo com Pizzolitto et al. (2011); Poloni et al. (2015), incluindo algumas modificações. A solução inicial de AFB₁ utilizada no ensaio foi extraída de um núcleo produzido com a cepa padrão de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (USDA, 149 Agricultural Research Service, Peoria, IL), pertencente à micoteca do NUEPPA, em concentração de AFB₁ 2,67 µg/mL, conforme recomendado pela metodologia de Magnoli et al. (2011). A metodologia adotada neste ensaio avalia a capacidade de adsorção simulando as condições gastrointestinais de tilápia-do-Nilo (Rotta, 2003). Para esta análise foram utilizadas apenas as leveduras encapsuladas com o agente que proporcionou melhor eficiência da microencapsulação.

A concentração para o ensaio foi padronizada em 10⁷ células/mL, assim, foi utilizado 0,1 g (10⁷ células/mL) da levedura encapsulada para o teste. Foram preparadas em microtubos soluções de trabalho de AFB₁ (25 e 70 ng/mL) em PBS (pH 7,0). A seguir, para simular a acidez do estômago de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), adicionou-se 1,0 mL da solução de PBS (pH 2,0) aos microtubos, que, a seguir foram incubados a 30°C por 60 minutos em agitação constante (150 rpm) em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab[®]). Logo após, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga Hermle (modelo Z216MK). Desprezou-se o sobrenadante e aos concentrados de células resultantes, adicionou-se 1,0 mL de PBS em pH 7,0 contendo AFB₁ nas

concentrações testadas (25 e 70 ng/mL). Os mesmos microtubos foram incubados por 60 minutos a 30°C e submetidos à agitação constante em mesa agitadora.

Após este período, os microtubos foram novamente centrifugados a 5000 rpm durante 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo micotoxinas não ligadas foi recolhido para um microtubo e armazenado para análise do percentual de adsorção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em paralelo, também foi realizado o controle positivo (AFB₁ em meio PBS).

A detecção e a quantificação da AFB₁ foram realizadas utilizando um cromatógrafo SHIMADZU[®], modelo PROMINENCE com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al. (1994). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6mm id., 5,0µm de tamanho de partículas, Varian, Inc. Palo Alto, EUA). Para análise, utilizou-se uma alíquota de 200 µL da amostra, que foi acrescida de 700 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 acetonitrila: metanol: água (17:17:66 v/v) a uma vazão de 1,5 mL/min. O limite de detecção do método analítico utilizado foi de 0,4 ng.g⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL.

A curva de quantificação da toxina foi realizada por medição das áreas e sua interpolação a uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de padrão de AFB₁, de onde foram extraídos os limites de detecção e quantificação da técnica. As quantificações de AFB₁ adsorvidas foram estabelecidas por meio da correlação entre as áreas dos picos das amostras e da curva padrão. As porcentagens de adsorção de AFB₁ foram realizadas pela equação a seguir:

$$100 \times [1 - (\text{área do pico de micotoxina da amostra} / \text{área do pico de micotoxina no controle positivo})]$$

2.8 Análise morfológica das microcápsulas

A morfologia das microcápsulas foi investigada por microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Shimadzu[®], modelo SSX-550. As amostras foram metalizadas para melhor visualização, e aderidas a um porta amostra de alumínio, por uma fita condutora de carbono. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Federal do Piauí (IFPI).

2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do *software* R versão 3.4.1, em que foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas entre médias com nível de significância de 5%. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3. Resultados e discussão

A utilização do método *spray dryer* pode ser promissora para encapsulamento de probióticos. Para tanto é necessário pesquisar a taxa de recuperação de produto utilizando possíveis agentes encapsulantes. Na tabela 1, é possível observar que não houve diferença ($P < 0,05$) entre os rendimentos do processo de encapsulamento (%) para os dois agentes encapsulantes pesquisados: amido (31,50%) e maltodextrina (38,83%). Estes resultados se assemelham ao de Abadias et al. (2005), que utilizando 10% de *skim milk* como encapsulante de *Candida sake* e obtiveram 34 % de porcentagem de recuperação do produto após secagem. Na preparação da solução de alimentação do SD do presente estudo, obteve-se o peso úmido do total de leveduras recuperadas após centrifugação, valor que representa o concentrado de células e a água, que não pode ser retirada da massa celular, e adicionou-se a este peso úmido a mesma quantidade de agente encapsulante, portanto, a concentração de sólidos da solução encapsulante pode ter sido menor. Este fato pode ter relação com o rendimento observado, uma vez que o *spray dryer* tem a função de evaporar a água da mistura, quanto maior o teor de sólidos na solução, maior será o rendimento produtivo.

Tabela 1. Rendimentos de material recuperado após o processo de encapsulamento em *spray dryer* (SD)

Análise	Agente encapsulante	
	Maltodextrina ($\bar{X} \pm DP$)	Amido ($\bar{X} \pm DP$)
Quantidade de microcápsulas total coletada (g)	23,32 ^a \pm 5,93	15,37 ^a \pm 5,15
Quantidade de sólidos alimentada no SD (g)	59,92 ^a \pm 14,51	53,64 ^a \pm 17,51
Rendimento (%)*	38,83 ^a \pm 0,52	31,50 ^a \pm 14,69

\bar{X} : Média, DP: desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *Rendimento (%) = (Quantidade de microcápsulas total coletada/Quantidade de sólidos alimentada no SD) x100.

A secagem por *spray dryer* é considerada apropriada para conservação das leveduras, sendo um processo ajustável para preservação das estruturas celulares dos micro-organismos e dos produtos, mantendo a viabilidade dos probióticos (Luna-Solano et al., 2005; Behboudi-Jobbehdar et al., 2013). Na tabela 2, é possível observar que embora tenham utilizadas quantidades semelhantes de células para testar os agentes encapsulantes, ao final do processo de microencapsulação por *spray dryer*, ocorreram maiores contagens ($P > 0,05$) das leveduras microencapsuladas com maltodextrina do que as que foram encapsuladas com amido. Ou seja, a eficiência da microencapsulação foi maior quando a maltodextrina foi utilizada como agente encapsulante.

Tabela 2. Contagem de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 na suspensão encapsulante e das microcápsulas obtidas após *spray drying* (SD), redução da viabilidade, eficiência da microencapsulação, umidade (%) e atividade de água.

Análise	Agente encapsulante	
	Maltodextrina ($\bar{X} \pm DP$)	Amido ($\bar{X} \pm DP$)
Contagem inicial de células por mililitro na suspensão encapsulante (log UFC/g)	8,52 ^a ± 0,43	7,76 ^a ± 0,37
Contagem final de células por grama de microcápsulas (log UFC/g) após encapsulamento	8,27 ^a ± 0,30	6,10 ^b ± 0,39
Redução da quantidade de células após SD (log UFC/g)*	0,25 ^b ± 0,13	1,66 ^a ± 0,63
Eficiência da microencapsulação (%)	97,08 ^a ± 1,42	78,78 ^b ± 7,18
Umidade (%)	0,42 ^a ± 0,22	0,74 ^a ± 0,08
Atividade de água (Aa)	0,12 ^a ± 0,05	0,11 ^a ± 0,01

\bar{X} : Média, DP: desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *Diferença entre a contagem de células viáveis (log UFC/g) na suspensão de encapsulamento e nas microcápsulas obtidas após *spray drying*.

Apesar de ambos os agentes encapsulantes utilizados no processo por *spray drying* terem obtido semelhante taxa de recuperação do material encapsulado, a maltodextrina proporcionou maior viabilidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 (tabela 2), apresentando contagem final de 8,27 log UFC/g com redução de 0,25 log UFC/g da contagem inicial após microencapsulação. Entretanto, para a microencapsulação com amido a contagem final foi menor 6,10 log UFC/g de células viáveis, com redução de 1,66 log UFC/g, nas mesmas condições de temperatura. Em estudo de Aponte et al. (2016) a microencapsulação por *spray drying* permitiu a obtenção de produto com 10,1 log UFC/g de leveduras vivas e

houve uma redução de 0,8 log UFC/g na viabilidade de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de vinho e crescidas previamente em meio sintético, quando foram utilizadas concentrações de 3,5% de amido e 1,75% de maltose para microencapsulação, acopladas a temperaturas de entrada 110°C e saída de 55 °C. Duongthingoc et al. (2013) comprovaram que a solução encapsulante de soro de leite moderadamente desnaturado por pH entre 4,0 a 5,0 com 90°C como temperatura de entrada no *spray dryer*, favoreceu viabilidade de 8,07 log UFC/mL de *Saccharomyces boulardii*, obtendo uma pequena redução da quantidade de células após SD (0,43 log UFC/g). De acordo com Pham-Hoang et al. (2013) um dos pontos mais interessantes no encapsulamento de leveduras é a resistência da estrutura celular a tratamentos drásticos e particularmente a altas temperaturas, resultando em elevada proteção destes micro-organismos durante processos de microencapsulação. Assim como relatado anteriormente, a seleção do agente encapsulante e das temperaturas de entrada e saída no processo de secagem são pontos críticos no encapsulamento de leveduras que pode interferir na sobrevivência da *S. cerevisiae* A8L3 ao processo de secagem.

Apesar de terem sido diferentes ($P < 0,05$), os percentuais de eficiência da microencapsulação obtidos neste estudo tanto com maltodextrina ($97,08 \pm 1,42\%$) quanto com amido ($78,78 \pm 7,18\%$), ambos foram satisfatórios (tabela 2). Sosa et al. (2016) utilizaram maltodextrina adicionada a galacto-oligossacarídeos comerciais (GOS) em secagem por *spray dryer*, e recuperaram 93% para *Lactobacillus plantarum*. Estes resultados quando comparados ao presente estudo indicam que a maltodextrina pode ser caracterizada como agente encapsulante eficiente para probióticos.

A atividade da água e a umidade são fatores importantes que afetam a estabilidade de produtos secos e desidratados durante o armazenamento. Algumas pesquisas consideram que os probióticos encapsulados são compatíveis com um longo período de armazenamento quando a atividade de água é inferior a 0,20 (Golowczyc et al., 2010). No presente trabalho, os valores de A_w obtidos foram baixos para ambos encapsulantes, sendo 0,12 para maltodextrina e 0,11 para o amido. Os valores de umidade foram similares estatisticamente para as microcápsulas obtidas com ambos agentes encapsulantes: 0,42% para maltodextrina e 0,74% para amido. Segundo Gardiner et al. (2000) e Meng et al. (2008), é necessária uma umidade residual de 4% ou menos para o armazenamento prolongado de microcápsulas contendo probióticos. Luna-Solano et al. (2000) observaram que a umidade para armazenamento de levedura de cervejaria variou de 5,1 a 10,1% e para atividade de água obteve-se 0,55 a 0,65, estes valores foram superiores aos obtidos neste trabalho. A umidade e a atividade de água obtidos neste estudo para as microcápsulas de *Saccharomyces cerevisiae*

A8L3 com maltodextrina e com amido são adequadas para armazenamento de cepas por 60 dias (tabela 3).

Tabela 3. Viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada com amido e maltodextrina durante 60 dias de armazenamento a 4°C.

Tempo (dias)	Agentes encapsulantes	
	Maltodextrina (log UFC/g) ($\bar{X} \pm DP$)	Amido (log UFC/g) ($\bar{X} \pm DP$)
0	8,27 ^a ± 0,30	6,10 ^a ± 0,39
15	8,20 ^a ± 0,64	6,13 ^a ± 0,90
30	8,21 ^a ± 0,80	5,83 ^a ± 1,02
60	8,17 ^a ± 0,82	5,92 ^a ± 0,99

\bar{X} : Média, DP: desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (P<0,05).

O encapsulamento de micro-organismos probióticos pode ser uma alternativa importante para aumentar a sobrevivência ao processamento térmico na indústria de alimentos, e no prolongamento da vida útil do produto (Golowczyc et al., 2010). O encapsulamento pode ser também um processo alternativo para fábricas de rações que utilizam probióticos, porque é um método capaz de desidratar e preservar as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada viáveis (tabela 2) mesmo quando armazenadas em refrigeração por 60 dias (tabela 3).

De um modo geral, a concentração recomendada é aproximadamente 10⁶ UFC/g de probiótico no alimento (Simon, 2005). Luna-Solano et al. (2000) testaram a viabilidade de três tratamentos com amido e dois com maltodextrina para encapsulamento de *Saccharomyces cerevisiae* e não foi observada diminuição da viabilidade das células (10⁷ UFC/g) armazenadas a 5°C por 110 dias, resultados similares ao nosso trabalho que mostraram a sobrevivência das células encapsuladas pelo amido e maltodextrina. Aponte et al. (2016) analisaram a sobrevivência da cepa *Saccharomyces cerevisiae* LM52 cultivada previamente em meio à base de melão, obtida por *spray dryer* e armazenada por seis meses à 4°C e -18°C, encontraram contagem de células viáveis de 10,4 Log UFC/g e este valor não alterou significativamente ao longo do armazenamento em ambas temperaturas. Castro-Cislighi et al. (2012) avaliaram o efeito da temperatura de armazenamento na viabilidade de *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulada com goma arábica, sendo que a viabilidade das microcápsulas armazenadas a 4°C manteve-se adequada até 196 dias de armazenamento. A concentração de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 obtida neste trabalho para microcápsulas foi: 10⁸ UFC/g em maltodextrina e 10⁶ UFC/g em amido, portanto os dois tipos de

encapsulantes garantem a concentração de células adequada para a formulação de um alimento probiótico, mantendo as mesmas viáveis durante 60 dias de armazenamento a 4°C.

A fim de avaliar o efeito da secagem por *spray dryer* sobre a habilidade da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 de adsorver aflatoxina B₁, realizou-se um ensaio testando duas concentrações da micotoxina (25 ng/mL e 70 ng/mL). Neste teste foi utilizada a levedura encapsulada com maltodextrina por ter apresentado melhor eficiência da microencapsulação (tabela 2). As microcápsulas de *S. cerevisiae* apresentaram porcentagens de adsorção superiores a 50% nas duas concentrações testadas, demonstrando que o encapsulamento melhorou esta característica da cepa (tabela 4), sendo que em testes *in vitro* antes do encapsulamento a mesma adsorveu 33,8% em solução contendo 50 ng/mL de AFB₁. Diversas pesquisas comprovaram o poder de adsorção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* diante de AFB₁ (Armando et al., 2011; Dogi et al., 2011; Pizzolitto et al., 2012; Poloni et al., 2017), porém não foram encontrados relatos da utilização destas leveduras encapsuladas para descontaminação de micotoxinas *in vitro* ou *in vivo*. A microencapsulação de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 por *spray drying* com maltodextrina, aplicada neste trabalho, mostrou-se como uma técnica eficaz em melhorar o poder de adsorção desta cepa contra AFB₁.

Tabela 4. Capacidade de adsorção de aflatoxina B₁ pela cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina.

Análise	Concentração de AFB ₁	
	25 ng/mL ($\bar{X} \pm DP$)	70 ng/mL ($\bar{X} \pm DP$)
Concentração do sobrenadante (ng/mL)	9,86 ^b ± 1,2	25,08 ^a ± 4,6
Concentração adsorvida (ng/mL)	13,42 ^a ± 1,2	44,41 ^b ± 4,6
Adsorção (%)	57,63 ^a ± 5,17	63,9 ^a ± 6,6

\bar{X} : Média, DP: desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (P<0,05).

As características estruturais das microcápsulas afetam a preservação de micro-organismos durante a produção industrial ou o armazenamento prolongado e, em particular, a formação da cápsula na secagem por *spray drying* deve ter um papel significativo na proteção do material do núcleo (Duongthingoc et al., 2013). As imagens capturadas pela microscopia eletrônica de varredura (figura 1) demonstraram a forma irregular das microcápsulas de amido (A), com algumas fissuras ou poros pronunciados, comprovando que não se formaram cápsulas regulares (setas vermelhas). Enquanto que a maltodextrina (B) formou pequenas microcápsulas, com formato esférico, e ainda assim promoveu proteção às células.

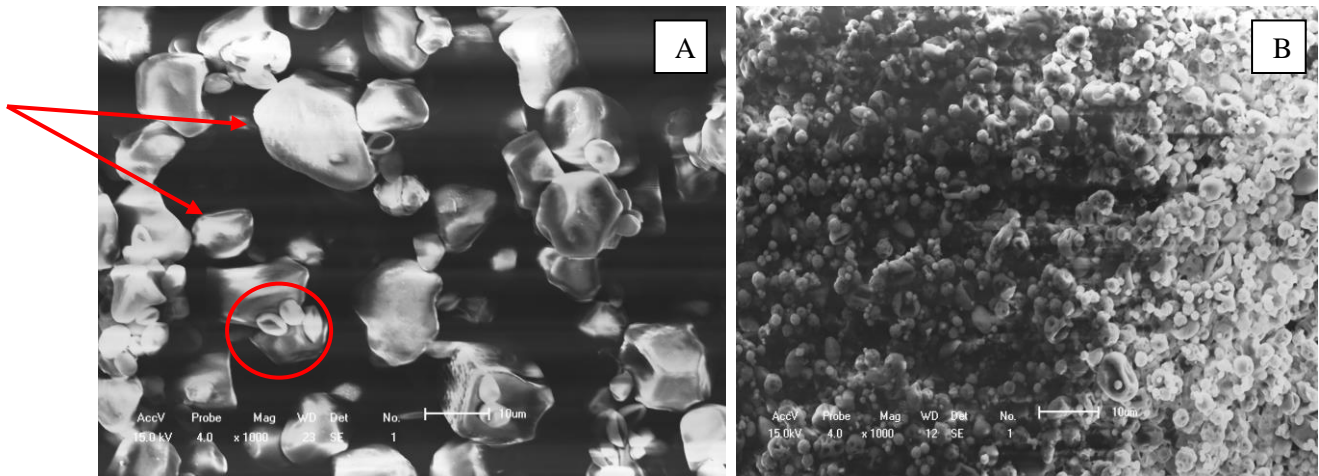


Figura 2. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das microcápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 encapsuladas com amido (A, 1000x) e maltodextrina (B, 1000x).

A maltodextrina e o amido proporcionaram rendimentos semelhantes de microcápsulas após secagem. Entretanto a maltodextrina favoreceu uma maior eficiência de encapsulação, pois houve uma maior recuperação de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 após *spray drying*, quando comparado ao amido. Além disso, as leveduras encapsuladas em maltodextrina sobrevivem ao armazenamento a 4°C por 60 dias e possuem capacidade de adsorção *in vitro* de AFB₁. Dessa forma, é possível empregar a maltodextrina na tecnologia de microencapsulação de probióticos e adsorventes de micotoxinas, o que contribui para a utilização deste micro-organismo vivo em alimentos para animais com a finalidade de melhorar a sanidade e reduzir a presença de micotoxinas.

4. Conclusões

A maltodextrina e o amido forneceram bom rendimento no processo de encapsulamento da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 por *spray dryer*. A microencapsulação com maltodextrina apresentou maior recuperação de células viáveis, quando comparada ao amido. As células microencapsuladas sobreviveram ao tempo de armazenamento de 60 dias, para os dois agentes encapsulantes. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina possui capacidade de adsorção *in vitro* de AFB₁.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) em parceria com o Ministerio de Ciencia, Tecnología y Innovación Productiva (Mincyt – Argentina) que concederam bolsa de doutorado sanduíche a primeira autora deste trabalho, ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela parceria científica na utilização do *spray dryer* e ao Laboratório de Materiais – LabMat do Instituto Federal do Piauí (IFPI) pela realização das fotomicrografias em microscópio eletrônico.

Referências

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C., Viñas, I., 2005. Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 835–846. doi:10.1080/09583150500187041
- Anal, A.K., Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 240–251. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004
- Anater, A., Manyes, L., Meca, G., Ferrer, E., Luciano, F.B., Pimpão, C.T., Font, G., 2016. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture* 451, 1–10. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.022
- Aponte, M., Troianiello, G.D., Di Capua, M., Romano, R., Blaiotta, G., 2016. Impact of different spray-drying conditions on the viability of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–9. doi:10.1007/s11274-015-1956-5
- Armando, M., Dogi, C., Pizzolitto, R., Escobar, F., Peirano, M., Salvano, M., Sabini, L., Combina, M., Dalcerro, A., Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin J.* 4, 59–68. doi:10.3920/WMJ2010.1208
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the association analytical chemists. 18.ed. Gaithersburg, MD, 2005. 1526p.
- Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I., 2013. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Dry. Technol.* 31, 1274–1283. doi:10.1080/07373937.2013.788509

- Brandão, L.R., Libkind, D., Vaz, A.B.M., Espírito Santo, L.C., Moliné, M., de García, V., van Broock, M., Rosa, C.A., 2011. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): Diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 1–13. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x
- Bryden, W.L., 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173, 134–158. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014
- Carão, Á.C. de P., Burbarelli, M.F. de C., Polycarpo, G. do V., Santos, A.R. dos, Albuquerque, R. de, Oliveira, C.A.F. de, 2014. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. *Ciência Rural* 44, 699–705. doi:10.1590/S0103-84782014000400021
- CAST, 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA.
- Castro-Cislaghi, F.P. de, Fritzen-Freire, C.B., Sant’Anna, E.S., 2012. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por spray drying: comparação com goma arábica. *Ciência Rural* 42, 1694–1700. doi:10.1590/S0103-84782012005000067
- D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 155–166. doi:10.1016/S0377-8401(97)81630-6
- Dogi, C.A., Armando, R., Ludueña, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C.A.R., Dalcero, A., Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Addit. Contam. Part A* 1–7. doi:10.1080/19440049.2011.605771
- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A., 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocoll.* 25, 1604–1617. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.012
- Duongthingoc, D., George, P., Katopo, L., Gorczyca, E., Kasapis, S., 2013. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. *Food Chem.* 141, 1782–1788. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.093
- Gardiner, G.E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P., Stanton, C., 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying.

- Appl. Environ. Microbiol. 66, 2605–2612.
- Golowczyc, M.A., Silva, J., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., Teixeira, P., 2010. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 7–12. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02759.x
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. Part A* 28, 1590–1609. doi:10.1080/19440049.2011.595377
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M.A., Rodríguez-Jimenes, G.C., García-Alvarado, M.A., 2005. Optimization of brewer's yeast spray drying process. *J. Food Eng.* 68, 9–18. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.019
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M. a., Garcia-Alvarado, M. a., Rodriguez-Jimenes, G., 2000. Improved Viability of Spray Dried Brewer'S Yeast By Using Starch (Grits) and Maltodextrin As Processing Aids. *J. Food Process Eng.* 23, 453–462. doi:10.1111/j.1745-4530.2000.tb00526.x
- Magnoli, A.P., Monge, M.P., Miazzi, R.D., Cavaglieri, L.R., Magnoli, C.E., Merkis, C.I., Cristofolini, A.L., Dalcerro, A.M., Chiacchiera, S.M., 2011. Effect of low levels of aflatoxin B₁ on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B₁ in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poult. Sci.* 90, 48–58. doi:10.3382/ps.2010-00971
- Mallmann, C.A., Dilkin, P., Giacomini, L.Z., Rauber, R.H., 2006. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. *An. da Conferência APINCO Ciência e Tecnol. Avícolas* 213–224.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60, 218–237. doi:10.1016/j.fct.2013.07.047
- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 15–25. doi:10.1016/j.ifset.2014.09.010
- Matejova, I., Svobodova, Z., Vakula, J., Mares, J., Modra, H., 2017. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. *J. World Aquac. Soc.* 48, 186–200. doi:10.1111/jwas.12371
- Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P., 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* 106, 1406–1416.

- doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076>
- Pfliegler, W.P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., 2015. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* 55, 805–818. doi:10.1002/jobm.201400833
- Pham-Hoang, B.N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., Waché, Y., 2013. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: Yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6635–6645. doi:10.1007/s00253-013-5044-1
- Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M., Pirarat, N., 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Res. Vet. Sci.* 102, 103–111. doi:10.1016/j.rvsc.2015.07.021
- Pizzolitto, R.P., Armando, M.R., Combina, M., Cavaglieri, L.R., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A., 2012. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J. Environ. Sci. Heal. B.* 47, 933–941. doi:10.1080/03601234.2012.706558
- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A., 2011. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: A useful model to determine the most efficient microorganism., in: *Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology*. InTech - Open Access Publisher, pp. 323–346.
- Poloni, V., Dogi, C., Pereyra, C.M., Fernández Juri, M.G., Köhler, P., Rosa, C.A.R., Dalcerro, A.M., Cavaglieri, L.R., 2015. Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B₁. *Food Addit. Contam. Part A* 32, 970–976. doi:10.1080/19440049.2015.1024761
- Poloni, V., Salvato, L., Pereyra, C., Oliveira, A., Rosa, C., Cavaglieri, L., Keller, K.M., 2017. Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces cerevisiae* strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. *Food Chem. Toxicol.* 107, 630–636. doi:10.1016/j.fct.2017.02.040
- Rotta, M.A., 2003. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Embrapa Pantanal, Corumbá.
- Santacroce, M.P., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G., Crescenzo, G., 2008. Aflatoxins in aquatic species: Metabolism, toxicity and perspectives. *Rev. Fish Biol. Fish.* 18, 99–130. doi:10.1007/s11160-007-9064-8
- Shetty, P.H., Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 48–55. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.004

- Simon, O., 2005. Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Adv. Pork Prod.* 16, 161–167.
- Sosa, N., Gerbino, E., Golowczyc, M.A., Schebor, C., Gómez-Zavaglia, A., Tymczyszyn, E.E., 2016. Effect of galacto-oligosaccharides: Maltodextrin matrices on the recovery of *Lactobacillus plantarum* after spray-drying. *Front. Microbiol.* 7, 1–8.
doi:10.3389/fmicb.2016.00584
- Souza, C.R.F., Fernandes, L.P., Bott, R.F., Oliveira, W.P., 2015. Influência do processo de secagem e condição de armazenamento de extratos secos de bauhinia forficata e passiflora alata sobre seu perfil de dissolução. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 67–75.
doi:10.1590/1983-084X/11_137
- Souza, C.R.F. de, 2003. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro. Universidade de São Paulo.
- Sunny-Roberts, E.O., Knorr, D., 2009. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *Int. Dairy J.* 19, 209–214. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.008
- Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R.H., Romer, T.R., 1994. 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. *J. AOAC Int.* 77, 1512–1521.

5 Capítulo III³

Saccharomyces cerevisiae microencapsulada como adsorvente de aflatoxina B₁ em rações
para alevinos de tilápia-do-Nilo

³ Elaborado conforme normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

Saccharomyces cerevisiae microencapsulada como adsorvente de aflatoxina B₁ em rações
para alevinos de tilápia-do-Nilo

Saccharomyces cerevisiae microencapsulated as aflatoxin B₁ adsorbent in feed for Nile
tilapia fingerlings

Aline Maria Dourado Rodrigues⁽¹⁾, Aline Marques Monte⁽¹⁾, Juliana Alexandre Ianiceli⁽¹⁾,
João Farias de Sousa Junior⁽¹⁾, Rafael Gomes Abreu Bacelar⁽¹⁾, Raizza Eveline Escórcio
Pinheiro⁽²⁾, Carina Maricel Pereyra⁽³⁾, Maria de Nasaré Bona de Alencar Araripe⁽⁴⁾, Anilton
César Vasconcelos⁽⁵⁾, Maria Christina Sanches Muratori⁽¹⁾

(1) Universidade Federal do Piauí (UFPI), Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias, Campus Socopo, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil. E-mail: alinemary2@yahoo.com.br, montealine@yahoo.com.br, JubA_DAzvdo@hotmail.com j.f.s.j@hotmail.com, rafael.bacelar@hotmail.com, chrismuratori@uol.com.br (2) UFPI, Campus Professora Cinobelina Elvas, Rodovia Municipal Bom Jesus/Viana, Km 01, CEP 64900-000 Bom Jesus, PI, Brasil. E-mail: raizza_eveline@hotmail.com, (3) Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km 601 (5800), Río Cuarto, Córdoba, Argentina. E-mail: carinapereyra06@hotmail.com, (4) UFPI, Departamento de Zootecnia (DZO), Centro de Ciências Agrárias, Campus Socopo, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil. E-mail: nasare@ufpi.edu.br (5) Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 2486 – CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil. Email: anilton@icb.ufmg.br

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada em rações contaminadas com aflatoxina B₁ sobre o desempenho zootécnico e a resposta imunológica de órgãos hematopoiéticos de alevinos de tilápia-do-Nilo. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, representados por quatro tratamentos: T1- 0,0 µg/kg de AFB₁ e 0,0 UFC/g de levedura; T2 - 0,0 µg/kg de AFB₁ e 10⁷ UFC/g de levedura; T3 - 100 µg/kg de AFB₁ e 0,0 UFC/g de levedura; T4 - 100 µg/kg de AFB₁ e 10⁷ UFC/g de levedura, com quatro repetições por tratamento. Foram avaliados os seguintes parâmetros: qualidade da água, desempenho zootécnico, histologia e determinação da concentração de AFB₁ de baço, rim e músculo, contagem de leveduras da ração e do intestino. A adição da levedura na ração contaminada com AFB₁ não influenciou o desempenho dos peixes (p<0,05) quanto ao ganho de peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar aparente e taxa de sobrevivência. Na análise histológica, foi observado aumento de células da linhagem linfóide no baço e rim. A suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 em rações contaminadas com AFB₁ não exerceu influência negativa sobre o desempenho zootécnico, mas apresentou efeito imunoestimulante nos órgãos hematopoiéticos de alevinos de tilápia-do-Nilo.

Termos para indexação: Microencapsulação, Aflatoxina B₁, parâmetros zootécnicos, adsorção, imunoestimulação.

Abstract - The aim of this study was to evaluate the effects of the inclusion of the A8L3 *Saccharomyces cerevisiae* strain microencapsulated in aflatoxin B₁-contaminated feeds on the zootechnical performance and immune response of Nile tilapia fingerling hematopoietic organs. A completely randomized design was applied, represented by four treatments: T1- 0.0 µg/kg AFB₁ and 0.0 CFU/g yeast; T2 - 0.0 µg/kg AFB₁ and 10⁷ CFU/g yeast; T3 - 100 µg/kg

AFB₁ and 0.0 UFC/g of yeast; T4 - 100 µg/kg AFB₁ and 10⁷ CFU/g yeast, with four replicates per treatment. The following parameters were evaluated: water quality, zootechnical performance, histology, AFB₁ concentration determinations in spleen, kidney and muscle, and feed and intestinal yeast counts. Yeast additions to the AFB₁-contaminated feed did not influence fish performance ($p < 0.05$) regarding weight gain, specific growth rate, apparent feed conversion, and survival rate. The histological analyses revealed increased lymphoid cells in the spleen and kidney. Supplementation with A8L3 *Saccharomyces cerevisiae* in AFB₁-contaminated feeds exhibited no influence on zootechnical performance, but led to an immunostimulatory effect on the hematopoietic organs of Nile tilapia fingerlings.

Index terms: Microencapsulation, Aflatoxin B₁, zootechnical parameters, adsorption, immunostimulation

Introdução

As Aflatoxinas (AF) são micotoxinas produzidas principalmente por duas espécies de *Aspergillus* da seção Flavi, especialmente encontradas em climas quentes e úmidos (MARIN et al., 2013). As principais aflatoxinas conhecidas são chamadas B₁, B₂, G₁ e G₂, com base na sua fluorescência sob luz ultravioleta (B = azul, G = verde). O *Aspergillus flavus* produz aflatoxinas B e o *Aspergillus parasiticus* produz B e G (ROCHA et al., 2014).

AF são rapidamente absorvidas e metabolizadas principalmente no fígado, sendo a Aflatoxina B₁ (AFB₁) considerada a mais tóxica, pois apresenta efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e imunossupressores em uma variedade de espécies animais, incluindo vertebrados aquáticos (MARIN et al., 2013; MATEJOVA et al., 2017).

A alimentação é fator fundamental para todos os sistemas de produção animal e qualquer aspecto que afete sua segurança e qualidade é uma restrição significativa no desempenho produtivo dos animais (BRYDEN, 2012). O principal objetivo da nutrição dos peixes é fornecer, de forma econômica, uma mistura de ingredientes nutricionalmente equilibrada para promover o crescimento, o desempenho reprodutivo, a qualidade da carne e a saúde dos animais. A qualidade dos produtos utilizados em alimentos para peixes cultivados tornou-se um aspecto limitante para a atividade porque esses alimentos são substratos ideais para o crescimento de fungos, que, em condições ideais, podem favorecer a síntese de micotoxinas (ANATER et al., 2016).

Numerosas estratégias têm sido estudadas como métodos de prevenção e controle de micotoxinas em alimentos (MALLMANN et al., 2006). A descontaminação biológica dos alimentos por bactérias ácido lácticas e leveduras probióticas destacam-se como alternativas para prevenir a absorção intestinal da toxina pelo animal (BRYDEN, 2012; PINHEIRO et al., 2015).

A detoxificação por adsorção é realizada por inclusão de cepas probióticas de micro-organismos vivos, que possuem *status* geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (FAO; WHO, 2002), adicionados à ração e são responsáveis por diversos efeitos benéficos à saúde, além de reduzir os efeitos deletérios das micotoxinas nos animais de produção (PIZZOLITTO et al., 2011; PFLIEGLER et al., 2015). Várias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram estudadas como agentes adsorventes de micotoxinas em estudos *in vitro* (ARMANDO et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2012), porém estudos *in vivo* com espécies aquáticas são escassos. As propriedades benéficas dos micro-organismos são cepa-dependentes, dessa forma faz-se necessária a avaliação de cada novo produto originado a partir de uma nova cepa de levedura (KELLER et al., 2012).

A utilização de probióticos/adsorventes em aquicultura ainda é vista como um desafio, devido às condições do ambiente aquático e do trato gastrointestinal, os micro-organismos viáveis podem não estar em números suficientes nos possíveis locais de ação (PINPIMAI et al., 2015). Nesse sentido, o microencapsulamento da cepa de levedura, a ser utilizada em um novo produto para aquicultura, é uma forma de manter a viabilidade e as características benéficas desse micro-organismo no produto alimentar até o momento do consumo (GARDINER et al., 2002).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da inclusão da cepa microencapsulada *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 em rações contaminadas com aflatoxina B₁ sobre o desempenho zootécnico e a resposta imunológica de órgãos hematopoiéticos de alevinos de tilápia-do-Nilo.

Material e Métodos

Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais e foi aprovada pela Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, sob o protocolo nº 302/17. O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPESPI) no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), com duração de 32 dias, compreendidos entre os meses de setembro a outubro de 2017, e as demais análises, no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA/CCA/UFPI). Foram utilizadas 16 caixas d'água de polietileno com capacidade para 250 litros de água, dotadas de sistema de entrada e saída de água individual, sendo abastecida por meio de um reservatório externo com água de poço

tubular, supridas com aeração constante por meio de pedra microporosa ligada a um compressor de ar.

O ensaio seguiu delineamento inteiramente casualizado, representado por quatro tratamentos e quatro repetições, sendo 10 peixes por unidade experimental. Os tratamentos foram classificados em: Tratamento 1 (T1) com 0,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 e 0,0 UFC/g de levedura, sendo o controle; Tratamento 2 (T2) com 0,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 e 10^7 UFC/g de levedura; Tratamento 3 (T3) com 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 e 0,0 UFC/g de levedura; Tratamento 4 (T4) com 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 e 10^7 UFC/g de levedura.

Para o preparo dos tratamentos, foram produzidos núcleos de aflatoxina conforme metodologia adaptada de Magnoli et al. (2011), que utiliza fermentação de arroz parbolizado. Para tanto, foram utilizados 20 frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, e cada um recebeu aproximadamente 100 g de arroz cru. Em seguida foram esterilizados em autoclave 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada frasco. Depois, transferiu-se uma alçada da cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (USDA, Agricultural Research Service, Peoria, IL) para cada frasco que foi incubado em estufa BOD a $25 \pm 3,0^\circ\text{C}$ por 14 dias, com 15 minutos de homogeneização manual realizada três vezes por dia.

Após incubação, o arroz contaminado foi moído formando um núcleo que seguiu para quantificação das aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo SHIMADZU[®], modelo PROMINENCE com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al. (1994). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6mm id., 5,0 μm de tamanho de partículas, VARIAN, Inc. Palo Alto, EUA). Para análise, utilizou-se uma alíquota de 200 μL da amostra, que foi acrescida de 700 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. O limite de detecção do método analítico utilizado foi de 0,4 ng/g. O volume de injeção foi de 20 µL.

Para preparo das microcápsulas foi utilizada a cepa de *Sacharomyces cerevisiae* A8L3 isolada de ambiente de piscicultura, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA/CCA/UFPI), que tem capacidade probiótica e adsorvente de AFB₁ comprovadas por testes *in vitro*. Para obtenção de massa celular para encapsulamento, a levedura foi cultivada em tubos Falcon com 10 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose esterilizado (caldo YPD composto por: 5,0 g de extrato de levedura; 5,0 g de peptona; 40,0 g de glicose, em 1000 mL de água destilada) e incubada sob agitação a 150 rpm durante 24 h a 28 ± 2°C. Após incubação, 5,0 mL do cultivo foram transferidos para 25 frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, comportando 200 mL de caldo YPD e incubados sob agitação a 150 rpm durante 48 h a 28 ± 2°C. O meio de cultivo com as células foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada.

O concentrado de células presentes no sedimento (*pellets*) foi pesado e reservado, em seguida pesou-se o encapsulante maltodextrina em quantidade equivalente a obtida com os *pellets*. O cálculo da quantidade de água destilada necessária para preparo da solução de alimentação do *spray dryer* (de escala laboratorial, B-290 mini *spray dryer*, Buchi) foi realizado baseado no somatório dos *pellets* e do encapsulante, correspondendo a 5% de sólidos. Em seguida, a maltodextrina foi pesada e transferida para um frasco tipo Erlenmeyer que continha água destilada correspondente aos 95% da solução de alimentação do *spray dryer*. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriar, os *pellets* foram acrescentados asépticamente à solução encapsulante para finalização do

preparo da solução de alimentação do *spray dryer*. Foram utilizadas as seguintes temperaturas: de entrada de 105°C e de saída de 70°C para obtenção das microcápsulas, que foram coletadas na base do ciclone e, posteriormente armazenadas em frascos esterilizados hermeticamente fechados, sendo armazenadas em refrigeração (4,0°C) até o momento da preparação das dietas experimentais. O procedimento de encapsulamento da levedura foi realizado duas vezes para a obtenção de microcápsulas suficiente para a composição dos tratamentos.

Após o encapsulamento foi realizada a contagem do número de leveduras viáveis pelo método de semeadura por espalhamento em superfície no ágar extrato de levedura peptona dextrose suplementado com cloranfenicol (ágar YPD, composto por: 10 g de peptona; 10 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 7,5 g de ágar, em 500 mL de água destilada).

Em seguida, para o preparo dos tratamentos, amostras de ração comercial para peixes foram analisadas para detecção de AFB₁ por CLAE no laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do NUEPPA/CCA/UFPI. As amostras que apresentaram níveis não detectáveis foram utilizadas para constituir a ração controle (T1) e para formular os demais tratamentos (T2; T3 e T4). Para a preparação das dietas, a ração comercial selecionada foi moída em liquidificador doméstico (Durabrand[®]).

A formulação dos tratamentos foi realizada com a mistura da ração moída com o núcleo de aflatoxinas e as microcápsulas de *S. cerevisiae* conforme a composição de cada tratamento. Para compor o T1 - utilizou-se apenas a ração moída peletizada. Para os demais tratamentos: T2 - ração moída (1.000 g) acrescentada de microcápsulas de leveduras (10⁷ UFC/g); T3 - ração moída (1.000 g) acrescentada de núcleo de AF (100 µg/kg); d) T4 - ração moída (1.000 g) acrescentada de microcápsulas de leveduras (10⁷ UFC/g) e núcleo de AF (100 µg/kg). Em seguida as formulações foram pesadas, homogeneizadas, umedecidas (±20% do volume preparado) e peletizadas em máquina de moer carne, e padronizadas quanto à

granulometria com auxílio de peneira granulométrica Bertel[®] (abertura de 4,75 mm). Após esse processamento, as rações foram secas em estufa de secagem e esterilização (FANEM[®], modelo 320 – SE) por 48 horas a 45°C, até atingir aproximadamente 3,0% de umidade. Posteriormente, 1,0 kg de ração de cada tratamento foram transferidos para depósitos plásticos com tampa para uso alimentar. Depois foram armazenadas em refrigeração (4,0°C) até o momento de utilização durante todo o período de preparação e realização do experimento (60 dias). No início e final do experimento as rações de T2 e de T4 foram analisadas, através da diluição decimal seriada com semeadura por espalhamento em superfície do ágar YPD suplementado com cloranfenicol, para garantir a contagem total de 10^7 UFC/g células viáveis de levedura.

Para o teste *in vivo* foram adquiridos 400 alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) proveniente da Associação de Piscicultores de Nazária, Piauí, revertidos sexualmente para macho. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em tanques de cimento de 1000L e permaneceram por uma semana para adaptação às condições ambientais de água e temperatura. Durante esse período foram alimentados com a ração T1 (sem níveis detectáveis de AFB₁) duas vezes ao dia à vontade.

Após esse período, para povoamento das caixas realizou-se a biometria dos peixes selecionando-se 160 animais com peso médio de $17,6 \pm 0,4$ g, que foram distribuídos em 16 caixas d'águas na densidade de 10 alevinos por caixa, visando padronizar a distribuição conforme a biomassa por unidade experimental. Para tanto, os alevinos foram anestesiados utilizando-se a concentração de 50 mg/L de eugenol para promover sedação profunda permitindo a coleta dos dados das pesagens.

Durante a execução da fase experimental, semanalmente eram pesadas 400 g da ração por tratamento para serem distribuídas conforme a alimentação diária dos peixes. Estas rações eram estocadas em recipientes plásticos devidamente vedados identificados conforme o

tratamento, que eram conservados em recipiente isotérmico com gelo reciclável trocado a cada dois dias visando preservar a viabilidade das leveduras nas rações fornecidas aos peixes.

A alimentação era ministrada duas vezes ao dia (às 9h e 16 h), em quantidades que correspondiam a 10% do peso vivo dos animais por unidade experimental. Semanalmente era feita a limpeza das caixas, por sifonamento para retirada dos resíduos. Após o processo de sifonagem, completava-se o volume da água das unidades experimentais.

Semanalmente foram monitorados nas unidades experimentais os parâmetros de qualidade da água: pH, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito, utilizando o kit do produtor de água doce da Alfakit[®], seguindo as recomendações do manual do fabricante.

A fase experimental foi concluída após 32 dias e desta forma, os animais foram submetidos a 24 horas de jejum para esvaziamento do tubo gastrointestinal e, posteriormente, todos os alevinos foram anestesiados utilizando-se a concentração de 424 mg/L de eugenol para coleta das biometrias finais. Em seguida, os animais foram eutanasiados por hipotermia. Após constatação do óbito, de cada unidade experimental foram destinados três peixes para cada um das análises: histopatológicas, contagem de leveduras do intestino e detecção de resíduos de aflatoxina nos órgãos.

Para determinação dos parâmetros de desempenho zootécnico, os dados coletados foram utilizados nas seguintes equações:

a) Fórmula 1: Ganho de peso médio

$$\text{GPM} = \text{PMF} - \text{PMI}$$

Onde:

GPM = Ganho de peso médio

PMF = Peso médio final

PMI= Peso médio inicial

b) Fórmula 2: Taxa de crescimento específico

$$TCE = [(Ln Pmf - Ln Pmi) \times 100] / T$$

Onde:

TCE = Taxa de crescimento específico

Ln Pmf = Logaritmo neperiano do peso médio final

Ln Pmi = Logaritmo neperiano do peso médio inicial

T = Período experimental

c) Fórmula 3: Consumo médio de ração

$$CMR = CTR / N$$

Onde:

CMR = Consumo médio de ração

CTR = consumo total de ração

QPV = quantidade de peixes vivos no final do período experimental

N = nº de animais

d) Fórmula 4: Consumo diário de ração

$$CDR = CMR / T$$

Onde:

CDR = Consumo diário de ração

CMR = Consumo médio de ração

T = Período experimental

e) Fórmula 5: Conversão alimentar aparente

$$CAA = CDR / GPMD$$

Onde:

(CAA) = Conversão alimentar aparente

CDR = Consumo diário de ração

GPMD = Ganho de peso médio diário

f) Fórmula 6: Taxa de sobrevivência

$$TS = 100 \times (QPE - QPV) / QPE$$

Onde:

TS = Taxa de sobrevivência (%)

QPE = quantidade de peixes estocados

QPV = quantidade de peixes vivos no final do período experimental

Dos peixes selecionados para as análises histopatológicas foram retiradas amostras dos órgãos hematopoiéticos (baço e rim). As amostras foram transferidas para coletores de amostra biológica, fixadas em formol tamponado a 10% e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) para processamento histológico. Os tecidos fixados foram processados segundo técnicas rotineiras de inclusão em parafina, cortados em micrótomo (4,0 μm) e corados pela hematoxilina e eosina (H-E). Os cortes histológicos foram examinados no microscópio trinocular Nikon Eclipse E200[®] e fotografados em microscópio Leica Qwin D-1000[®], versão 4.1 com sistema de análise de imagem computadorizada com aumento de 100, 200 e 400 vezes.

Para a determinação da concentração de AFB₁ em órgãos hematopoiéticos (baço e rim) e músculo, realizou-se um *pool* individual das amostras de baço, rim e músculo, de cada tratamento. As amostras, de cada *pool*, foram fracionadas com auxílio de bisturi e

ressuspendidas em 100 mL da solução de acetonitrila e água (84:16 v/v) em um frasco tipo Erlenmeyer. Em seguida foram homogeneizadas em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab[®]) a 150 rpm por 30 minutos. Após a homogeneização, a mistura foi filtrada em papel Whatman n° 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, E.U.A.).

Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 8,0 mL do filtrado para um tubo de ensaio com capacidade para 10 mL para purificação utilizando colunas Multifuncional Mycosep 228[®] (Romer Labs Inc., MO., E.U.A), seguindo as instruções do fabricante. Após essa purificação, foi transferida uma alíquota de 4,0 mL do extrato purificado para outro frasco tipo Erlenmeyer com capacidade para 25 mL para evaporação em banho-maria a 70°C até secar, aproximadamente 120 minutos. Decorrido este tempo, o extrato seco para detecção foi ressuspendido em 4,0 mL de acetonitrila, e seguiu-se para derivatização utilizando 200 µL da amostra acrescido de 700 µL do derivatizante, composta por ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: água (20:10:70, v/v), onde permaneceu a 70°C por oito minutos. Na sequência, foi realizada a quantificação de AFB₁ conforme metodologia descrita por Trucksess et al. (1994), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no mesmo aparelho descrito na etapa de produção dos núcleos descrita anteriormente.

Para contagem e isolamento das leveduras presentes no intestino dos peixes eutanasiados removeu-se a porção muscular e óssea delimitada por incisões para obter a visualização anatômica das vísceras e das estruturas internas da cavidade celomática. O procedimento foi realizado conforme recomendações de Bossolan (2001) da seguinte forma: os peixes foram colocados em decúbito lateral esquerdo e realizaram-se assepticamente incisões com bisturi da seguinte forma: inicialmente um corte longitudinal próximo ao opérculo, seguida incisão transversal seguindo a linha lateral, depois outro corte longitudinal próximo inserção da nadadeira anal e finalmente outra incisão transversal na região ventral próxima a linha Alba.

Após visualização das estruturas internas, assepticamente o trato gastrointestinal foi removido completamente e transferido para a base de placas de Petri esterilizadas. Neste local, os intestinos foram abertos longitudinalmente para exposição das mucosas. Na sequência, o conteúdo intestinal foi raspado delicadamente com auxílio de um bisturi e o intestinos expostos eram transferidos para frascos de vidro esterilizado contendo 150 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) onde permaneceram por 48h em agitador orbital a 150 rpm em temperatura ambiente aproximada de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (ARMANDO et al., 2011; KELLER, 2012).

As leveduras foram isoladas por espalhamento em superfície através de diluições decimais seriadas. Para tanto, alíquotas de 1,0 mL dos frascos contendo caldo YPD enriquecido foram transferidas para tubos com 9,0 mL água peptonada a 0,1%, para preparo da diluição 10^{-1} , a partir destas foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} . Alíquotas de 0,1 mL das respectivas diluições foram semeadas em Ágar YPD incubadas a 37°C por 48 h em estufa microbiológica B.O.D (PITT; HOCKING, 2009). Após crescimento das leveduras, realizou-se a contagem das colônias totais viáveis expressas como UFC/g utilizando um contador de colônias do tipo Quebec.

Os dados quantitativos (parâmetros físico-químicos da água, desempenho zootécnico e contagens de leveduras do intestino) obtidos foram submetidos à análise de variância e o teste de comparação de médias de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade, seguindo os procedimentos do programa *software* livre R versão 3.4.1.

Resultados e discussões

Durante o desenvolvimento da pesquisa pode-se observar que os resultados relativos à qualidade da água (tabela 1) estavam de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional

de Meio Ambiente (CONAMA, 2005) para classe 2, relativo as águas destinadas à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de organismos aquáticos ao consumo humano. Dessa forma, infere-se que a qualidade da água não influenciou no desempenho dos alevinos, por não terem sido observadas diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos da água entre os tratamentos.

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água das caixas de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB₁ e *S. cerevisiae* microencapsulada no período de 32 dias.

Parâmetros	T1: 0,0 µg/kg de AFB ₁ e 0,0 UFC/g de levedura	T2: 0,0 µg/kg de AFB ₁ e 10 ⁷ UFC/g de levedura	T3: 100 µg/kg de AFB ₁ e 0,0 UFC/g de levedura	T4: 100 µg/kg de AFB ₁ e 10 ⁷ UFC/g de levedura
Temperatura da água (°C)	28,3 ^a ± 0,5	28,0 ^a ± 0,8	28,0 ^a ± 0,8	27,8 ^a ± 0,2
Oxigênio dissolvido mg/L	7,0 ^a ± 0,0	7,0 ^a ± 0,0	7,0 ^a ± 0,0	7,0 ^a ± 0,0
Amônia mg/L	1,4 ^a ± 0,8	1,0 ^a ± 0,8	1,4 ^a ± 0,9	1,4 ^a ± 0,9
Nitrito mg/L	0,2 ^a ± 0,2	0,2 ^a ± 0,2	0,2 ^a ± 0,2	0,2 ^a ± 0,2
pH	7,2 ^a ± 0,2	7,2 ^a ± 0,2	7,2 ^a ± 0,2	7,2 ^a ± 0,2

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) no peso médio inicial, peso médio final, ganho de peso médio, consumo médio de ração e taxa de sobrevivência dos alevinos no período experimental. Constatou-se efeito significativo ($P < 0,05$) na taxa de crescimento específico entre os tratamentos T2 (10⁷ UFC/g de levedura) e T3 (AFB₁), no consumo diário de ração entre T1 (controle), T2 e T4 (AFB₁ + 10⁷ UFC/g de Levedura), e na conversão alimentar aparente entre T1 e T3 (tabela 2).

Tabela 2. Desempenho de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB₁ e *S. cerevisiae* microencapsulada no período de 32 dias.

Parâmetros	T1: 0,0 µg/kg de AFB ₁ e 0,0 UFC/g de levedura	T2: 0,0 µg/kg de AFB ₁ e 10 ⁷ UFC/g de levedura	T3: 100 µg/kg de AFB ₁ e 0,0 UFC/g de levedura	T4: 100 µg/kg de AFB ₁ e 10 ⁷ UFC/g de levedura
Taxa de sobrevivência (%)	97,5 ^a ± 5	95 ^a ± 12,91	87,5 ^a ± 15	85 ^a ± 10
Peso médio inicial (g)	17,64 ^a ± 1,14	17,28 ^a ± 2,2	18,19 ^a ± 0,79	17,3 ^a ± 1,84
Peso médio final (g)	35,11 ^a ± 0,5	35,37 ^a ± 5,71	34,37 ^a ± 4,19	33,59 ^a ± 2,02
Ganho de peso médio (GPM)	17,46 ^a ± 1,55	18,09 ^a ± 5,02	16,18 ^a ± 3,74	16,29 ^a ± 0,62
Taxa de crescimento específico (TCE)	2,15 ^{ab} ± 0,24	2,23 ^a ± 0,45	1,52 ^b ± 0,26	1,56 ^{ab} ± 0,36
Consumo médio de ração (CMR)	25,22 ^a ± 1,76	26,91 ^a ± 3	27,34 ^a ± 2,16	25,0 ^a ± 2,68
Consumo diário de ração (CDR)	7,66 ^a ± 0,2	7,9 ^a ± 0,24	7,4 ^{ab} ± 0,75	6,58 ^b ± 0,32
Conversão alimentar aparente	1,5 ^b ± 0,12	1,65 ^{ab} ± 0,09	2,24 ^a ± 0,41	2,12 ^{ab} ± 0,5

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As espécies de tilápia são cultivadas em todo o mundo devido ao seu rápido crescimento, fácil adaptação a diferentes condições de cultivo e bom rendimento de carcaça (ZHOU et al., 2009). Provavelmente, fatores como a rusticidade dessa espécie a faz suportar condições adversas, como a intoxicação por aflatoxina B₁, pois no T3 (100 µg/kg de AFB₁ e 0,0 UFC/g de levedura) não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) para as variáveis: ganho de peso médio, consumo médio de ração, consumo diário de ração e a taxa de sobrevivência, houve diferença significativa apenas na taxa de crescimento específico e conversão alimentar aparente.

O parâmetro ganho de peso possui relevante importância para avaliação dos efeitos deletérios de AFB₁ no desenvolvimento de peixes. Deng et al. (2010) pesquisaram os efeitos de dietas contaminadas com AFB₁ em alevinos de tilápia, e observaram que o ganho de peso foi significativamente menor após 15 semanas de consumo de dieta com 1.641 µg AFB₁/kg. Anh Tuan et al. (2002) também pesquisaram os efeitos de dietas em diferentes concentrações de AFB₁ em alevinos de tilápia durante oito semanas, e puderam constatar que o ganho de peso foi menor em dietas que continham concentrações iguais ou superiores a 2.500 µg/kg. É possível inferir que o efeito tóxico da AFB₁ sobre o ganho de peso pode depender da dose de toxina ingerida e do tempo de duração da exposição.

No presente estudo, que utilizou rações contendo 100 µg de AFB₁/kg nos tratamentos T3 e T4 por quatro semanas, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos na taxa de sobrevivência dos alevinos de tilápia-do-Nilo (tabela 2). Anh Tuan et al. (2002) alimentaram alevinos de tilápia-do-Nilo por oito semanas com rações contendo diferentes níveis de AFB₁ e verificaram que valores até 10.000 µg de AFB₁/kg não interferiam na taxa de sobrevivência dos peixes, e que valores acima de 100.000 µg de AFB₁/kg ocorriam expressiva perda de peso com elevadas taxas de mortalidade. Deng et al. (2010) não encontraram diferenças na taxa de sobrevivência de alevinos de tilapias alimentadas com

ração contendo AFB₁ até 1.641 µg/kg por 20 semanas. A legislação brasileira, através da Portaria n°. 07, de 9 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988), estabelece como limite máximo 50 µg/kg de aflatoxinas para alimentos de consumo animal, matérias primas e rações. Apesar da concentração de AFB₁ utilizada neste experimento ter sido o dobro do recomendado pela legislação, observou-se até 15% de mortalidade das tilápias testadas em condições experimentais, somando-se todos os tratamentos, sendo considerada uma porcentagem aceitável. Este fato, provavelmente se deve a resistência desta espécie, que tem capacidade de suportar por maior período níveis mais elevados da toxina do que 100 µg de AFB₁/kg.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida pelo potencial promotor do crescimento e imunestimulante (ABU-ELALA et al., 2013), estas propriedades podem ter contribuído para a taxa de crescimento específico significativa observada no T2, no qual a ração foi suplementada pela levedura *S. cerevisiae* A8L3, em comparação ao T3, em que foi acrescentado AFB₁. Segundo Baldisserotto (2002) a taxa de crescimento específico é uma estimativa válida para peixes jovens e observados por um curto período de tempo, assim considera-se um parâmetro ideal para avaliar o crescimento relativo de alevinos em fase de crescimento. Selim et al. (2014) utilizaram 0,25% de *S. cerevisiae* para suplementar dieta de alevinos de tilápia-do-Nilo, e obtiveram aumento da taxa de crescimento específico. Sendo assim, a adição de *S. cerevisiae* A8L3 na ração de alevinos de tilapia-do-Nilo promoveu o crescimento, pois favoreceu o consumo de ração devido à suplementação da ração com as microcápsulas de levedura.

A eficiência do uso de agentes adsorventes físicos e biológicos de micotoxinas tem sido amplamente estudada e demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo* com uma capacidade elevada de adsorção (MALLMANN et al., 2006; JARD et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2011; KELLER et al., 2012). Nesse contexto, a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrou efeitos positivos na redução de aflatoxicoses em aves (PIZZOLITTO et

al., 2013), porém poucos estudos testaram a ação de adsorventes biológicos na aquicultura. Nesta pesquisa realizada com alevinos de tilápia-do-Nilo, a inclusão de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada no T2 e T4 favoreceu o desenvolvimento dos peixes como pode ser observado pela taxa de crescimento específico, pois mesmo com a redução do consumo diário de ração no T4 (tabela 2) a levedura foi eficiente e promoveu o crescimento dos peixes. Em pesquisa de Pinheiro (2016) a inclusão da cepa *Saccharomyces cerevisiae* em ração com 100 µg de AFB₁/kg promoveu redução no ganho de peso médio de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), sem ter influenciado a taxa de crescimento específico. Selim et al. (2014) observaram que a *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como adsorvente de AFB₁ na alimentação de alevinos de tilápia-do-Nilo não favoreceu a taxa de crescimento específico. A microencapsulação com maltodextrina pode ter protegido a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 durante a passagem pelo trato gastrointestinal, proporcionando um relevante efeito adsorvente de AFB₁ e incrementando o desempenho zootécnico das tilápias.

No início e no final do experimento foi realizada a contagem de leveduras nas rações dos tratamentos T2 e T4 que estavam em uso. No final do experimento, as rações contendo a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada permaneceram viáveis mesmo em condições de estocagem para uso diário em recipiente isotérmico com gelo reciclável, obtendo-se contagens semelhantes (tabela 3). Este fato sugere que a encapsulação e a temperatura de conservação foram eficientes para preservar a viabilidade das cepas nas rações durante o experimento. Também se constatou, através da contagem de leveduras no intestino, a capacidade de sobrevivência das leveduras à passagem pelo trato gastrointestinal dos alevinos alimentados com os tratamentos T2 e T4 (tabela 3). Iwashita et al. (2015) utilizaram probiótico comercial contendo 6,08 log UFC/g de *Sacharomyces cerevisiae* e também recuperaram as mesmas contagens da levedura no intestino de tilápia-do-Nilo. Meurer et al. (2007) também suplementaram a ração com probiótico comercial contendo 3,00 log UFC/g de *S. cerevisiae* e

recuperaram 3,76 log UFC/g no intestino dos alevinos de tilápia. Dentre todas as qualidades da *S. cerevisiae* como probiótico, ressalta-se a capacidade de colonização desta levedura no intestino dos peixes preservando a quantidade de células viáveis presentes nas rações.

Tabela 3. Contagem de leveduras da ração e do intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB₁ e *S. cerevisiae* microencapsulada no período de 32 dias.

Contagem (log UFC/g)	T1: 0,0 µg/kg de AFB ₁ e 0,0 log UFC/g de levedura	T2: 0,0 µg/kg de AFB ₁ e 7,0 log UFC/g de levedura	T3: 100 µg/kg de AFB ₁ e 0,0 log UFC/g de levedura	T4: 100 µg/kg de AFB ₁ e 7,0 log UFC/g de levedura
Ração início do experimento	--	7,70 ^a ± 0,02	--	7,60 ^a ± 0,15
Ração após o final do experimento (32 dias)	--	7,28 ^a ± 0,03	--	7,28 ^a ± 0,14
Intestino	--	7,93 ^a ± 0,24	--	7,84 ^a ± 0,10

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

(--) Não foram realizadas essas contagens

Não houve níveis detectáveis desta micotoxina de AFB₁ no baço, rim e músculos de alevinos de tilápia-do-Nilo nos tratamentos T3 e T4, talvez devido ao curto período de exposição à toxina, ou à ação adsorvente da *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada. Em trabalho de Selim et al. (2014) encontraram resíduo de AFB₁ na musculatura de *O. niloticus* em tratamentos com 200 µg de AFB₁/kg por dez semanas. Esta diferença de resultados pode ter ocorrido por ter sido utilizada quantidades maiores de toxina por maior período de exposição.

Uma vez que os peixes não possuem linfonodos e seus ossos geralmente não possuem

cavidade medular, o tecido hematopoiético está localizado no estroma do baço e no interstício do rim cranial (MUMFORD et al., 2007). Realizou-se a análise histológica dos órgãos hematopoiéticos do baço e rim de alevinos de tilápia-do-Nilo para verificar a toxicidade da AFB₁ em rações e o efeito protetor de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada. Não foram encontradas lesões nos baços dos alevinos que receberam tratamentos sem AFB₁ (T1 e T2). No T3 que continha 100 µg/kg de AFB₁ foi observado no baço aumento significativo de células da polpa vermelha e dos centros melanomacrofágos (CMM), e redução do tecido linfóide indicando que a toxina tem potencial efeito imunossupressor.

A propriedade imunossupressora das aflatoxinas em animais de produção foi relatada por Rocha et al., 2014 e também em peixes por Zychowski et al., 2013; Anater et al., 2016; Wang et al., 2016. Os CMM são acúmulos de células pigmentadas tipo macrófagos presentes no baço, rins e em menor quantidade em fígado. Têm função de armazenar ferro em forma de hemossiderina, catabolismo dos tecidos e armazenar produtos não metabolizados de origem endógena ou exógena, processar antígenos em resposta imune e eliminar da circulação substâncias particuladas e solúveis (GODOY, 2013). O significado patológico dos CMM pode ser caracterizado pela quantidade, composição e localização nos órgãos linfóides que pode ser observado na figura 1. Os materiais endógenos são obtidos pela fagocitose de células mortas, particularmente os eritrócitos. Quanto aos materiais exógenos existem evidências que substâncias naturais ou experimentais são coletadas dentro de CMM. Essas descobertas evidenciam a importância dos CMM na depuração de detritos e no armazenamento em longo prazo de materiais altamente indigestíveis e/ou tóxicos (STEINEL; BOLNICK, 2017). Deste modo, aflatoxina presente na ração pode ter sido metabolizada pelos macrófagos e depositada no baço em forma de CMM nos alevinos do T3.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém vários compostos imunoestimuladores, tais como β-glucanos, ácidos nucleicos e oligossacarídeos de manano, por este motivo, esta

espécie de levedura pode ser utilizada como um promotor do crescimento e estimulante imune (ABU-ELALA et al., 2013; SELIM et al., 2014). No tratamento T4 (AFB₁ e *S. cerevisiae*) é notável o aumento de células da polpa branca e um número menor de CMM, sugerindo que a levedura adsorveu parte da aflatoxina, reduzindo a absorção pelo intestino, e ainda propiciou a linfopoiese do baço (figura 1).

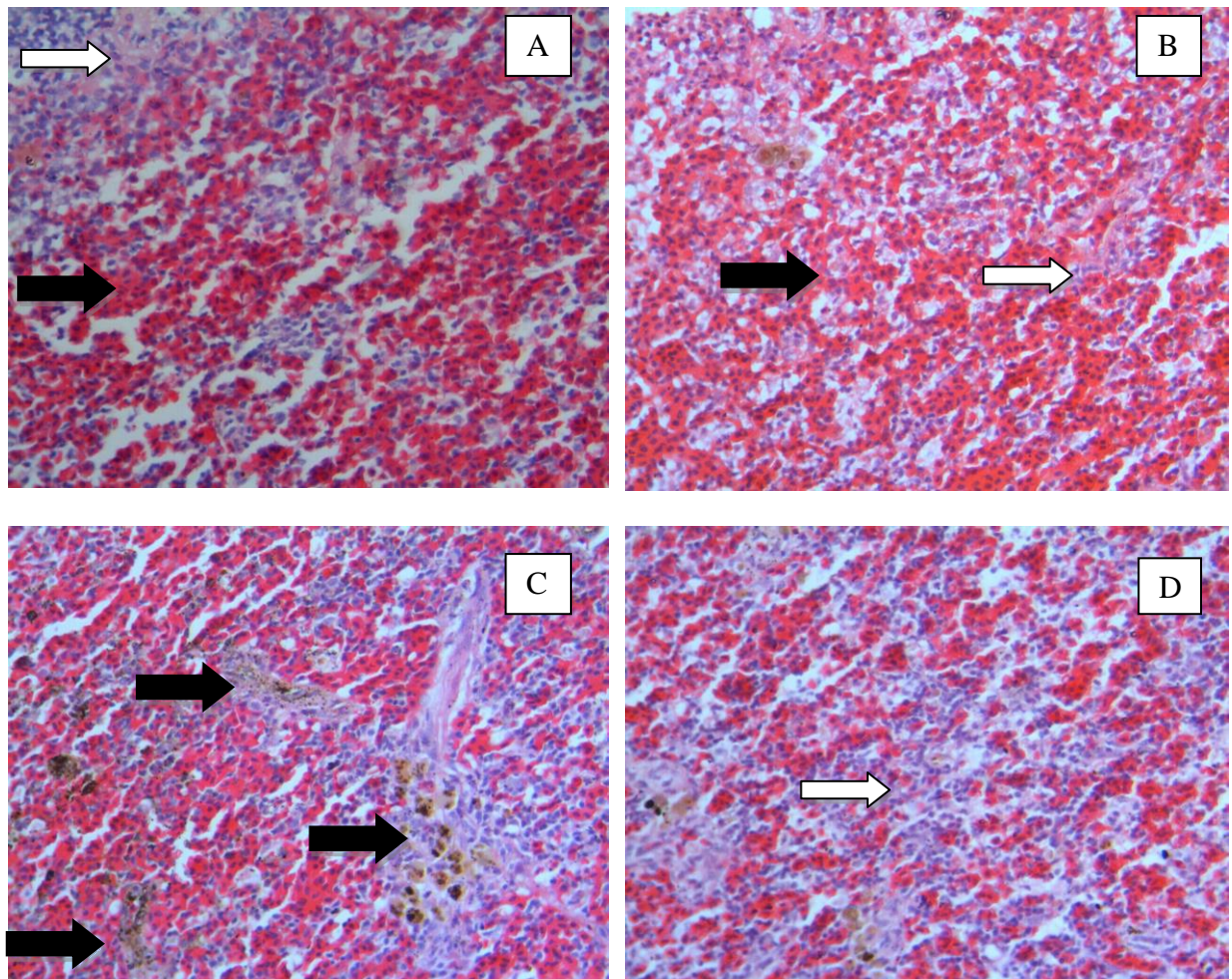
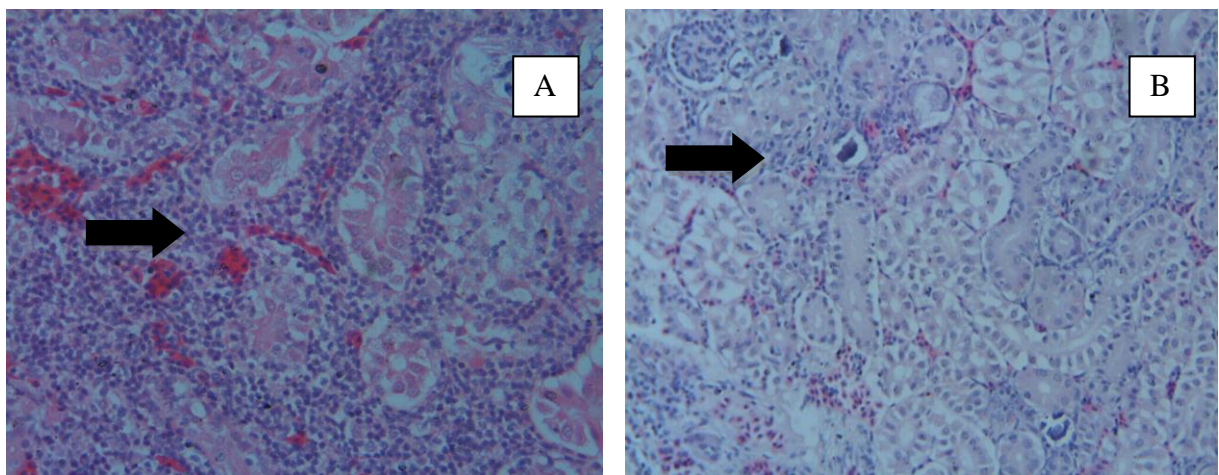


Figura 1. Estudo histológico de tecido esplênico em alevinos de tilapia-do-Nilo expostos a dietas contaminadas com AFB₁ durante 32 dias, coloração por H-E (aumento 40x). (A) T1 - Polpa vermelha (seta preta) e polpa branca (seta branca); (B) T2 - Polpa vermelha (seta preta) e polpa branca (seta branca); (C) T3 – Presença de centros melonomácrofagos (seta preta) e (D) T4 - Aumento do tecido linfoide da polpa branca.

A parte cranial dos rins dos peixes é quase exclusivamente hematopoiética, sendo considerada como o sítio primário para renovação celular, possui tecido hematopoiético que forma matriz de suporte para as néfrons da parte posterior (MUMFORD et al., 2007). El-Boshy et al. (2008) que constataram que o β -glucano foi capaz de neutralizar a imunossupressão induzida por AFB₁ em tilápia-do-Nilo. Com relação aos achados histológicos no rim, em todos os tratamentos ocorreu desprendimento da lâmina basal dos túbulos, porém em maior intensidade no T3, com moderada vacuolização das células epiteliais e pouca quantidade de tecido hematopoiético, sendo que essa redução poderia ser o resultado do efeito tóxico das aflatoxinas nos tecidos hematopoiéticos. Em T1 e T2 o tecido hematopoiético encontra-se preservado, porém em T2 há o predomínio de células da série linfóide. Já em T4, observou-se um aumento de células linfocitárias no tecido hematopoiético, indicando que a inclusão da levedura estimulou a imunidade dos peixes (figura 2).

A suplementação das rações com *Saccharomyces cerevisiae* microencapsulada influenciaram positivamente a taxa de crescimento específico e a imunidade dos alevinos de tilápia-do-Nilo. Entretanto é de extrema importância a continuidade de estudos que avaliem um tempo maior de exposição à AFB₁, principalmente nas fases aguda, subaguda e crônica da intoxicação, assim como a inclusão de níveis maiores da levedura nas dietas.



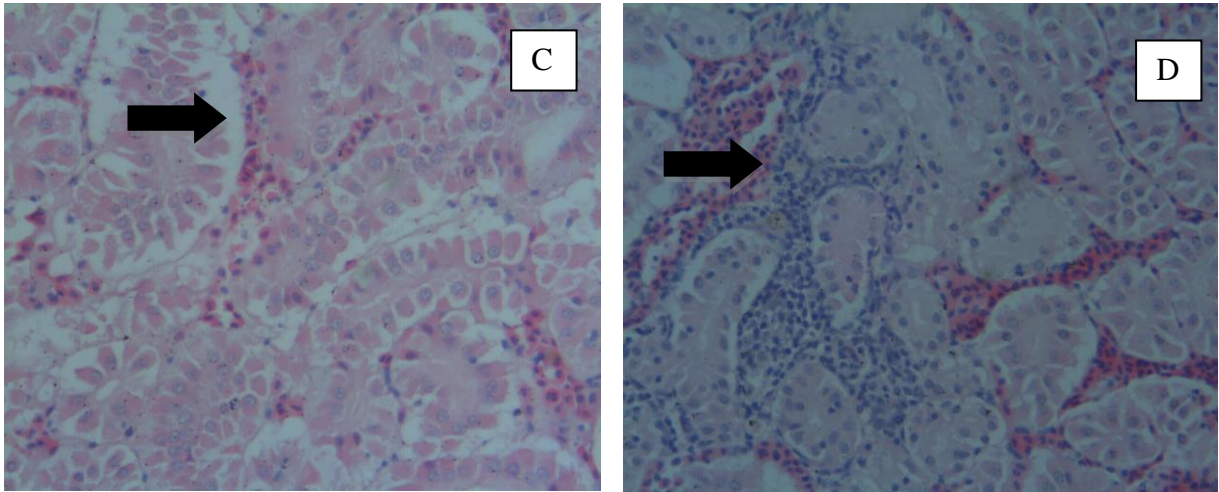


Figura 2. Estudo histológico de tecido renal em alevinos de tilapia-do-Nilo expostos a dietas contaminadas com AFB₁ durante 32 dias, coloração por H-E (aumento 40x). (A) T1- tecido hematopoiético; (B) T2- tecido hematopoiético com predomínio de linfócitos; (C) T3 - moderada vacuolização e (D) T4 – aumento de células linfoides.

A utilização da levedura encapsulada pode ter favorecido a imunidade dos animais, por isso faz-se necessário estudos dos mecanismos envolvidos nas respostas imunes não específicas relacionadas à intoxicação por AFB₁ e a relação da levedura na imunoestimulação do organismo. Dessa forma, é essencial dar prosseguimento a estas investigações em busca de resultados mais consistentes, que permitam conhecer formas de melhorar o desempenho e sanidade dos peixes.

Conclusões

1. A inclusão da cepa microencapsulada *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 em rações contaminadas com aflatoxina B₁ não exerceu influência negativa sobre os parâmetros zootécnicos de alevinos de tilapia-do-nilo.

2. A análise histológica de órgãos hematopoiéticos (baço e rim) mostrou que a

suplementação com a cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 apresentou efeito imunestimulante em alevinos alimentados com rações não contaminadas e contaminadas com AFB₁.

Referências

- ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 21–29, 2013.
- ANATER, A.; MANYES, L.; MECA, G.; et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 451, p. 1–10, 2016.
- ANH TUAN, N.; GRIZZLE, J. M.; LOVELL, R. T.; MANNING, B. B.; ROTTINGHAUS, G. E. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁. **Aquaculture**, v. 212, n. 1–4, p. 311–319, 2002.
- ARMANDO, M.; DOGI, C.; PIZZOLITTO, R.; et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin J.**, v. 4, n. 1, p. 59–68, 2011.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Ed. UFSM, 2002.
- BOSSOLAN, N. R. S. **Atlas de Dissecção de Vertebrados: aulas práticas**. IFSC-USP, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09 de novembro de 1988**. Fixa padrões de tolerância para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias primas e rações. D.O.U., Brasília, DF, 1988. Seção I, p. 21.968.
- BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–158, 2012.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 10 de março de 2005. **Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005**. Brasília, DF, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiab>>. Acesso em: 11 fev. 2018.
- DENG, S. X.; TIAN, L. X.; LIU, F. J.; et al. Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) during long-term dietary exposure. **Aquaculture**, v. 307, n. 3–4, p. 233–240, 2010.
- EL-BOSHY, M. . .; EL-ASHRAM, A. M. M.; EL-GHANY, 'NADIA A. A. Effect of Dietary Beta-1, 3 Glucan on Immunomodulation on Diseased *Oreochromis Niloticus* Experimentally

Infected With Aflatoxin B₁. **8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008**, p. 1109–1127, 2008.

FAO; WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. p. 1–11, 2002.

GARDINER, G. E.; BOUCHIER, P.; O’SULLIVAN, E.; et al. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 9, p. 749–756, 2002.

GODOY, M. **Centros de Melanomacrófagos en hígado de Salmón del Atlántico (Salmo salar) rezagados: Histopatología**. 2013. Disponível em: <http://www.marcosgodoy.com/index.php?option=com_content&view=article&id=312:centros-de-melanomacrofagos-en-higado-de-salmon-del-atlantico-salmo-salar-rezagados-histopatologia&catid=106:salmon-del-atlantico&Itemid=435&lang=es>. Acesso em: 28 mar. 2018.

IWASHITA, M. K. P.; NAKANDAKARE, I. B.; TERHUNE, J. S.; WOOD, T.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 1, p. 60–66, 2015.

JARD, G.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F.; GUYONVARCH, A.; LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 11, p. 1590–1609, 2011.

KELLER, K. M. **Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal**. 2012. 168 f. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2012.

KELLER, K. M.; OLIVEIRA, Á. A. DE; ALMEIDA, T. X. DE; et al. Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B₁. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 5800, p. 101–105, 2012.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. **Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213–224, 2006.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, n. August, p. 218–237, 2013.

MATEJOVA, I.; SVOBODOVA, Z.; VAKULA, J.; MARES, J.; MODRA, H. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186–200, 2017.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M. DA; FRECCIA, A.; MAUERWERK, M. T. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-nilo submetidos a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1219–1224, 2007.

- MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; et al. **Fish Histology and Histopathology**. 2007.
- PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 805–818, 2015.
- PINHEIRO, R. E. E. **Potencial de aplicação de leveduras como adsorvente de aflatoxina B1 e probióticos em piscicultura**. 2016. 91 f. Universidade Federal do Piauí. 2016.
- PINHEIRO, R. E. E.; RODRIGUES, A. M. D.; RIBEIRO, M. N.; et al. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, n. 5, p. 4268–4279, 2015.
- PINPIMAI, K.; RODKHUM, C.; CHANSUE, N.; et al. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 103–111, 2015.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2009. 3 ed. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 524p.
- PIZZOLITTO, R. P.; ARMANDO, M. R.; COMBINA, M.; et al. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. **J. Environ. Sci. Health B.**, v. 47, n. 10, p. 933–941, 2012.
- PIZZOLITTO, R. P.; ARMANDO, M. R.; SALVANO, M. A.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs. **Poultry Science**, v. 92, n. 6, p. 1655–1663, 2013.
- PIZZOLITTO, R. P.; BUENO, D. J.; ARMANDO, M. R.; et al. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: A useful model to determine the most efficient microorganism. **Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, p.323–346, 2011.
- ROCHA, M. E. B. DA; FREIRE, F. DA C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159–165, 2014.
- SELIM, K. M.; EL-HOFY, H.; KHALIL, R. H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B₁-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 523–540, 2014.
- STEINEL, N. C.; BOLNICK, D. I. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–8, 2017.
- 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, n. 6, p. 1512–1521, 1994.

WANG, X.; WANG, Y.; LI, Y.; et al. Response of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) to different dietary concentrations of aflatoxin B₁ and evaluation of an aflatoxin binder in offsetting its negative effects. **Ciencias Marinas**, v. 42, n. 1, p. 15–29, 2016.

ZHOU, Z. G.; HE, S.; LIU, Y.; et al. The effects of dietary yeast culture or short-chain fructo-oligosaccharides on the intestinal autochthonous bacterial communities in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*♀ × *Oreochromis aureus*♂. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 4, p. 450–459, 2009.

ZYCHOWSKI, K. E.; POHLENZ, C.; MAYS, T.; et al. The effect of NovaSil dietary supplementation on the growth and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-B₁ contaminated feed. **Aquaculture**, v. 376–379, p. 117–123, 2013.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento e identificação das leveduras do ambiente de viveiros de piscicultura permitiu o conhecimento da diversidade microbiana desses *habitats*. Ainda assim, se fazem necessários estudos que caracterizem a microbiota dos ambientes de aquicultura, pois a busca por leveduras probióticas e adsorventes de micotoxinas deve estar pautada na utilização de cepas nativas do trato gastrointestinal dos peixes ou que estejam presentes na população microbiana do ambiente aquático. Com base nos resultados desta pesquisa, foram isoladas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de viveiros de piscicultura que possuem capacidade probiótica e adsorvente de micotoxinas.

A microencapsulação de probióticos é uma tecnologia que visa preservar as propriedades benéficas de um micro-organismo. Nesse contexto, a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada por *Spray-dryer* apresentou viabilidade e capacidade de adsorção preservada, sendo ideal para a inclusão desta cepa em rações para estudos *in vivo*.

A suplementação das rações com *Saccharomyces cerevisiae* microencapsulada não exerceu efeitos negativos nos parâmetros zootécnicos dos alevinos de tilápia-do-Nilo, além disso, influenciou positivamente a imunidade dos mesmos. Diante do exposto, é de extrema importância a continuidade de estudos que avaliem os mecanismos envolvidos nas respostas imunes não específicas relacionadas à intoxicação por AFB₁ e a relação da levedura na imunoestimulação do organismo.

Nos últimos anos houve um avanço substancial nos estudos de micro-organismos probióticos com habilidade de descontaminação de micotoxinas em alimentos e rações, porém mais pesquisas se fazem necessárias para o entendimento dos mecanismos de adsorção de micotoxinas e das propriedades benéficas de outras leveduras e bactérias probióticas.

7 LITERATURA CITADA

- ANATER, A.; MANYES, L.; MECA, G.; et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 451, p. 1–10, 2016.
- ARMANDO, M.; DOGI, C.; PIZZOLITTO, R.; et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin J.**, v. 4, n. 1, p. 59–68, 2011.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 66–77, 2017.
- BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; FISK, I. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology**, v. 31, n. 11, p. 1274–1283, 2013.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
- BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. DE. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **UNOPAR Cient.**, v. 12, n. 2, p. 15–21, 2010.
- BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. S.; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta Fish. Aquat. Res.**, v. 4, n. 2357–8068, p. 50–58, 2016.
- BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–158, 2012.
- CAST. **Mycotoxins : Risks in Plant , Animal , and Human Systems Council for Agricultural Science and Technology**. Task Force Report 139; Niyo K, editor. Ames (IA): Council for Agricultural Science and Technology. p. 199. 2003.
- D’MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v. 69, n. 97, p. 155–166, 1997.
- DAKOVIC, A.; MATIJASEVIC, S.; ROTTINGHAUS, G. E.; et al. Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 20–25, 2008.
- DENG, S. X.; TIAN, L. X.; LIU, F. J.; et al. Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) during long-term dietary exposure. **Aquaculture**, v. 307, n. 3–4, p. 233–240, 2010.
- DESHENG, Q.; FAN, L.; YANHU, Y.; NIYA, Z. Adsorption of aflatoxin B₁ on montmorillonite. **Poultry science**, v. 84, n. 6, p. 959–961, 2005.
- DIAZ, D. E.; HAGLER, W. M. J.; BLACKWELDER, J. T.; et al. Aflatoxin binders II:

reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, n. 2, p. 233–241, 2004.

EFSA. European Food Safety Authority. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 3: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2015. **EFSA Journal**, 2015, v. 13, n.12, p.4331, 2015.

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

FAO; WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, p. 1–11, 2002.

FDA. Food and Drug Administration. **Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients>> Acesso em: 20 jan. 2018.

GONÇALVES-NUNES, E. M. C. et al. Screening of aflatoxin B₁ and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaíso, v. 43, n. 3, p.595-600, jul. 2015.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. DEC, p. 1–12, 2012.

HOJNIK, N.; CVELBAR, U.; TAVČAR-KALCHER, G.; WALSH, J. L.; KRŽAJ, I. Mycotoxin decontamination of food: cold atmospheric pressure plasma versus “classic” decontamination. **Toxins**, v. 9, n. 5, 2017.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. v. 44. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. 51 p.

JANSEN VAN RENSBURG, C.; RENSBURG, C. E. J. VAN; RYSSSEN, J. B. J. VAN; CASEY, N. H.; ROTTINGHAUS, G. E. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. **Poultry science**, v. 85, n. 9, p. 1576–1583, 2006.

JARD, G.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F.; GUYONVARCH, A.; LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 11, p. 1590–1609, 2011.

JI, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 127–133, 2016.

KUBITZA, Fernando. Manejo na produção de peixes. **Panorama da Aquicultura**, São Paulo, v. 19, n. 111, p.14-27, Jan-Fev, 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Chapter 1 - Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts BT - **The Yeasts** (Fifth Edition). p.3–5, 2011.

MAGNOLI, A. P. et al.. Sodium bentonite and monensin under chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult. Sci.** February 2011, vol. 90 n. 2, p. 352-357.

MAGNOLI, C. et al. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, p. 27–32, 1998.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. **Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213–224, 2006.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, n. August, p. 218–237, 2013.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, 2015.

MATEJOVA, I.; SVOBODOVA, Z.; VAKULA, J.; MARES, J.; MODRA, H. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186–200, 2017.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

MURATORI, M. C. S.; PEREIRA, M. M. G.; COSTA, A. P. R.; et al. Contaminação fúngica em rações para camarões cultivados. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 85–90, 2013.

NAVARRETE, P.; TOVAR-RAMREZ, D. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. **Sustainable Aquaculture Techniques**, 2014.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A. H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, n. July, p. 1–11, 2014.

OGUZ, H.; PARLAT, S. S. Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 34, n. 3, p. 144–148, 2004.

OZÓRIO, R. O. A.; PORTZ, L.; BORGHESI, R.; CYRINO, J. E. P. Effects of dietary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation in practical diets of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animals**, v. 2, n. 1, p. 16–24, 2012.

PANDIYAN, P.; BALARAMAN, D.; THIRUNAVUKKARASU, R.; et al. Probiotics in

aquaculture. **Drug Invention Today**, v. 5, n. 1, p. 55–59, 2013.

PEREYRA, C. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M. Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 1–7, 2010.

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

PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 805–818, 2015.

PHAM-HOANG, B. N.; ROMERO-GUIDO, C.; PHAN-THI, H.; WACHÉ, Y. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6635–6645, 2013.

PINHEIRO, R. E. E.; RODRIGUES, A. M. D.; RIBEIRO, M. N.; et al. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, n. 5, p. 4268–4279, 2015.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2009. 3 ed. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 524p.

PIZZOLITTO, R. P.; ARMANDO, M. R.; COMBINA, M.; et al. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. **J. Environ. Sci. Health B.**, v. 47, n. 10, p. 933–941, 2012.

PIZZOLITTO, R. P.; ARMANDO, M. R.; SALVANO, M. A.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs. **Poultry Science**, v. 92, n. 6, p. 1655–1663, 2013.

PIZZOLITTO, R. P.; BUENO, D. J.; ARMANDO, M. R.; et al. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, p.323–346, 2011.

POLONI, V.; DOGI, C.; PEREYRA, C. M.; et al. Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B₁. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 6, p. 970–976, 2015.

POLONI, V.; SALVATO, L.; PEREYRA, C.; et al. Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces cerevisiae* strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 630–636, 2017.

RAHAIE, S. et al. Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1647–1653. 2012.

- RAJU, M. V. L. N.; DEVEGOWDA, G. Esterified-Glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (in vitro) and efficacy as immunomodulator. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 15, n. 7, p. 1051–1056, 2002.
- ROCHA, M. E. B. DA; FREIRE, F. DA C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159–165, 2014.
- SANTACROCE, M. P.; CONVERSANO, M. C.; CASALINO, E.; et al. Aflatoxins in aquatic species: Metabolism, toxicity and perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 18, n. 1, p. 99–130, 2008.
- SELIM, K. M.; EL-HOFY, H.; KHALIL, R. H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B₁-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 523–540, 2014.
- SILVA, P. T. DA; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. DE B.; et al. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, p. 1342–1347, 2015.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.
- VARGA, J.; KOCINFÉ, S.; PÉTERI, Z.; VÁGVÖLGYI, C.; TÓTH, B. Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1718–1750, 2010.
- YIANNIKOURIS, A.; ANDRE, G.; POUGHON, L.; et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1147–1155, 2006.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011.
- ZAKI, M. M.; EL-MIDANY, S. A.; SHAHEEN, H. M.; RIZZI, L. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 4, n. 1, p. 13–28, 2012.