



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**JULIET TEIXEIRA DE OLIVEIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B1  
E PROBIÓTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO CAMARÃO BRANCO DO  
PACÍFICO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)**

**Teresina**

**2020**

**JULLIET TEIXEIRA DE OLIVEIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B1  
E PROBIÓTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO CAMARÃO BRANCO DO  
PACÍFICO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Christina Sanches  
Muratori.

**Teresina**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

Serviço de Processamento Técnico

S237a Santos, Julliet Teixeira de Oliveira

Avaliação *in vitro* da capacidade de adsorção de aflatoxina B1 e probiótica de leveduras isoladas do camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*)/ Julliet Teixeira de Oliveira Santos. - 2020.

74f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina – PI, 2020.

“Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dra. Maria Christina Sanches Muratori

1. Aquicultura. 2. Ciência Animal. 3. Camarão. I. Título.

CDD 639.8

Bibliotecária: Milane Batista da Silva – CRB-3/1005

**JULLIET TEIXEIRA DE OLIVEIRA SANTOS****AValiação *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B1  
E PROBIÓTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO CAMARÃO BRANCO DO  
PACÍFICO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal - PPGCA da Universidade Federal do  
Piauí - UFPI, como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Linha de Pesquisa: Qualidade de produtos de origem  
animal

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Christina Sanches  
Muratori.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Christina Sanches Muratori (UFPI)

Orientadora

*Raizza Eveline Escórcio Pinheiro*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raizza Eveline Escórcio Pinheiro (UFPI)

Examinadora externa ao programa

*Márcio dos Santos Rocha*

---

Dr. Márcio dos Santos Rocha (UFPI/LAGO)

Examinador externo ao programa

*Rodrigo Maciel Calvet*

---

Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (IFMA)

Examinador externo a instituição

*Carina Maricel Pereyra*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carina Maricel Pereyra (UNRC/CONICET)

Examinadora externa a instituição

Dedico

A Deus, minha fonte de fé e força.

Ao meu eterno amor Diego Leonardo pelo companheirismo, amizade, conselhos, respeito, compreensão, e imenso amor em todos os momentos desse percurso.

A minha vidinha, meu eterno amorzinho, minha filha Júlia Arielle, quero ser um exemplo na sua vida e dizer que nosso colo será sempre seu abrigo, sou uma mulher e mãe realizada por ter vocês, um do outro e os três de Deus para sempre!

Aos meus pais Edna e Reginaldo por seu amor incondicional, apoio, exemplo e esforços desprendidos.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, o autor da minha vida. Senhor muito obrigada por ter me conduzido, sustentado e ensinado durante toda essa jornada. “Mas os que esperam no Senhor renovarão as sua forças; subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; andarão, e não se fatigarão” Isaías 40:31.

Ao meu grande e eterno amor Diego Leonardo da Rocha Santo, por acreditar, confiar, incentivar, aconselhar, pelo companheirismo, amizade, respeito e imenso amor que sempre me deram força e ânimo para perseverar até o fim. Agradeço a Deus pelo presente que é tê-lo ao meu lado e pela nossa herança do Senhor, nossa filha Júlia Arielle de Oliveira Santos, nossa vidinha. Deus foi maravilhoso em nos dar você para cuidar, amar e exercemos o dom da paternidade e somos realizados com você. Que Deus continue te conservando amável, sorridente, sempre feliz e quando estiver triste, saiba que estaremos sempre ao seu lado para lhe dar colo, para lhe mostrar como temos um Deus em que tudo podemos. Amo vocês. Um do outro e os três de Deus para sempre.

Aos meus Pais Reginaldo Soares de Oliveira e Edna Maria Alves Teixeira de Oliveira, pela dedicação e todo amor depositado, por me ensinarem o caminho certo, que é uma vida com Deus, e, além disso, mostraram que um dos grandes valores que uma pessoa pode ter, é o “saber”, a busca pelo conhecimento e esse jamais perderemos. “Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho” C. S. Lewis.

Aos meus irmãos Leonardo Teixeira de Oliveira e Elaine Teixeira de Oliveira, a minha sobrinha Maitê de Oliveira Costa, a minha Avó Maria Carmelita Lima Soares de Oliveira *in memoriam* e a todos os meus familiares pelo apoio e por acreditarem no meu sucesso.

Aos meus irmãos em Cristo, por suas orações, cuidado, força e por sempre acreditarem no meu sucesso amo todos vocês da Segunda Igreja Batista em Altos e da Igreja Batista da Restauração.

À minha amada orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Christina Sanches Muratori, pelos ensinamentos, incentivos, dedicação e amor que me deram todo suporte para conquistar essa vitória. Obrigada por tudo!

As minhas amigas “Nuecat’s”, pelos ensinamentos, carinhos e ótimos momentos vividos, a vocês: Juliana de Abreu Costa, Raizza Eveline Escórcio Pinheiro, Josyanne Araújo Neves, Cristiane Evangelista Lima, Verbena Carvalho Alves e Aline Maria Dourado Rodrigues, Sinto-me

abençoada por ter a preciosa e imprescindível amizade de todas!!!

A toda família NUEPPA (Núcleo de Pesquisas Estudos e Processamento de Alimentos. Em especial ao João Farias de Sousa Júnior, José Humberto Santos Filho, Juliana de Abreu Costa por toda ajuda e amizade durante as análises desse projeto. E também aos Técnicos e funcionários em especial ao George Emanuel Pereira da Silva e ao seu Aminthas Floriano Filho.

As minhas amigas “Vet’s e Cat’s pelo companheirismo, ensino, carinho, apoio, loucuras, desesperos e ótimos momentos vividos: Juliana de Abreu Costa, Camila Ernanda Sousa de Carvalho, Emanuela Ribeiro Moura e Elis Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva. As de sempre e para sempre!

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, em especial a coordenação do mestrado pelo trabalho que executam.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Poucas tarefas são tão agradáveis como o reconhecimento de minha gratidão a todos que colaboraram neste trabalho de formas tão diferentes e tornaram essa etapa menos árdua.

*“Tudo tem o seu tempo determinado e há tempo para todo o propósito debaixo do céu” Ec3:1*

*“Nunca tenha medo de confiar em um futuro desconhecido para um Deus conhecido”*

*Corrie tem Boom*



**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>RESUMO</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
<b>3 CAPITULO I</b>	21
Resumo	22
Abstract	23
Introdução	23
Material e Métodos	24
Resultados e Discussão	27
Conclusão	31
Referências	31
<b>4 CAPÍTULO II</b>	37
Resumo	38
Abstract	38
Introdução	39
Material e Métodos	40
Resultados e Discussão	47
Conclusão	54
Referências	55
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	63
<b>REFERÊNCIAS</b>	64

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

Tabela 1. Espécies de levedura isoladas do intestino de camarão branco do Pacífico ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	29
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Interpretação dos resultados de autoagregação.....	42
Tabela 2. Escores para interpretação qualitativa dos resultados de coagregação das bactérias pelo teste visual proposto por Cisar et al. (1979) .....	43
Tabela 3. Percentual da capacidade auto-agregativas das cepas de <i>S. cerevisiae</i> isoladas da microbiota intestinal de <i>L. vannamei</i> .....	48
Tabela 4. Resultados de coagregação bacteriana e do percentual da capacidade coagregativa entre as cepas <i>S. cerevisiae</i> isoladas da microbiota intestinal de <i>L. vannamei</i> e as cepas de bactérias patogênicas testadas.....	49
Tabela 5. Atividade antimicrobiana (Índice Pz) das cepas <i>S. cerevisiae</i> isoladas da microbiota intestinal de <i>L. vannamei</i> sobre as cepas de bactérias patogênicas testadas.....	50
Tabela 6. Teste da viabilidade das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas da microbiota intestinal de <i>Litopenaeus vannamei</i> quanto ao pH e presença de sais biliares.....	51
Tabela 7. Adsorção de AFB <sub>1</sub> pelas cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas da microbiota intestinal de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	52
Tabela 8. Resultados dos testes de adsorção de aflatoxina B <sub>1</sub> realizados com cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de ambientes diversos por outros autores.....	53

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Estruturas químicas de micotoxinas encontradas em alimentos.....15

Figura 2. Mecanismos de ação dos probióticos no camarão e no meio ambiente.....19

### CAPITULO I

Figura 1. Perfil de bandas obtido com a reação de PCR utilizando o iniciador ITS1 e ITS4. Da direita para a esquerda: (Pd) padrão de peso molecular, (cn) controle negativo e as cepas de leveduras C5 a C17 isolados do intestino de camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) .....28

### CAPÍTULO II

Figura 1. Cromatograma referente a adsorção de AFB<sub>1</sub> das três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* (A - Controle aflatoxina B<sub>1</sub>; B - cepa C2B; C - cepa C2D; D - cepa C9).....52

## RESUMO

A pesquisa de bioinsumos que visam reduzir os danos econômicos causado pelas micotoxinas vem sendo uma alternativa importante para o desenvolvimento tecnológico, econômico e para a sanidade da aquicultura. Objetivou-se isolar e identificar leveduras presentes na microbiota intestinal da espécie de camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados em estuário tropical, e testar *in vitro*, a capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas. Para tanto, foram adquiridos 40 camarões da espécie *L. vannamei* com 12 g em média, em uma fazenda carcinicultura piauiense. Foram removidos assepticamente os intestinos para isolamento das leveduras que foram identificadas por sequenciamento molecular usando um par de *primers* complementares ITS (ITS1 e ITS4) par 5.8S rDNA, onde o segmento ITS é amplificado. Depois de identificadas, foram escolhidas três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (C2B, C2D e C9), para avaliar o potencial probiótico *in vitro*, e realizado os seguintes testes: inibição homóloga, autoagregação, coagregação, atividade antibacteriana, viabilidade às condições gastrointestinais, e também foi realizada a análise de adsorção de AFB<sub>1</sub>. Dos 40 intestinos utilizados de *Litopenaeus vannamei*, foram isoladas 15 cepas de leveduras e identificadas como *Candida* spp., *C. tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces cerevisiae*. As cepas de *S. cerevisiae* isoladas apresentam atividade antibacteriana e são viáveis em condições de pH simulados do trato gastrointestinal de *L. vannamei*. A cepa C9 apresentou melhor desempenho nos testes de atividade antimicrobiana, viabilidade em pH e na adsorção da AFB<sub>1</sub> do que as demais. Concluiu-se que é possível isolar *Candida* spp., *C. tropicalis*, *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces cerevisiae* e demonstrou pela primeira vez que a *Lodderomyces elongisporus* pode estar presente no intestino de *L. vannamei* em viveiros. As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB<sub>1</sub> em testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Candida* spp., *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

The research of bio-inputs that aim to reduce the economic damage caused by mycotoxins has been an important alternative for the technological, economic and health development of aquaculture. The objective was to isolate and identify yeasts present in the intestinal microbiota of the shrimp species *Litopenaeus vannamei* cultivated in tropical estuary, and to test in vitro the probiotic and adsorbent capacity of aflatoxin B1 (AFB<sub>1</sub>) by isolated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose, 40 shrimps of the species *L. vannamei*, weighing 12 g on average, were purchased from a shrimp farm in Piauí. Intestines were aseptically removed for isolation of yeasts that were identified by molecular sequencing using a pair of complementary ITS primers (ITS1 and ITS4) paired with 5.8S rDNA, where the ITS segment is amplified. Once identified, three strains of *Saccharomyces cerevisiae* (C2B, C2D and C9) were chosen to assess their probiotic potential in vitro, and the following tests were performed: homologous inhibition, self-aggregation, coaggregation, antibacterial activity, viability to gastrointestinal conditions, and also AFB<sub>1</sub> adsorption analysis was performed. Of the 40 intestines of *Litopenaeus vannamei* used, 15 yeast strains were isolated and identified as *Candida* spp., *C. tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. The isolated *S. cerevisiae* strains have antibacterial activity and are viable under simulated pH conditions of the *L. vannamei* gastrointestinal tract. The C9 strain performed better in tests of antimicrobial activity, pH viability and AFB<sub>1</sub> adsorption than the others. It is concluded that it is possible to isolate *Candida* spp., *C. tropicalis*, *Rhodotorula* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* and demonstrated for the first time that *Lodderomyces elongisporus* can be present in the intestine of *L. vannamei* in nurseries. *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* have probiotic and AFB<sub>1</sub> adsorbent potential in in vitro tests.

**Keywords:** *Candida* spp., *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1 INTRODUÇÃO

A mudança no hábito alimentar da população e a constante busca por produtos de qualidade nutricional favoreceram o aumento do consumo de pescados (SIDONIO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2015). A carcinicultura vem se destacando por ser uma das áreas do agronegócio que mais se desenvolve no mundo, fornecendo anualmente cerca de 7,9 milhões de toneladas de crustáceos, sendo responsável por aproximadamente 46,8% do total produzido em 2016 (FAO, 2018). Em 2018 a produção de crustáceos no Brasil foi de 45,760 toneladas, sendo o Nordeste o responsável por cerca de 99,38% do total produzido. O Piauí ocupa a quinta posição no *ranking* nacional e a sua produção em 2018 chegou a 2.318 toneladas de camarões correspondendo a 5,07% (IBGE, 2018).

Uma das grandes preocupações desse setor é a contaminação por fungos nos alimentos fornecidos, pois esses micro-organismos são capazes de produzir micotoxinas em situações favoráveis ao seu crescimento durante o armazenamento inadequado de produtos alimentícios, esses metabólitos podem afetar a sanidade dos animais, causando problemas inestimáveis a saúde pública (PEREYRA et al., 2010).

Dentre as micotoxinas de risco significativo para saúde, destaca-se a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), produzida pelo gênero *Aspergillus*. Os constantes danos causados à saúde humana e animal, faz a necessidade do desenvolvimento de métodos que visem a redução desses contaminantes (KHOURY; ATOUI, 2010). Os métodos de redução biológica das micotoxinas vem sendo uma alternativa viável, e consistem na aplicação de micro-organismos capazes de gerar a transformação ou degradação da toxina, produzindo metabólitos com menor ou nenhuma toxicidade. Além disso, as características dos alimentos seriam preservadas, através da utilização de condições brandas de processo sem o uso de substâncias químicas nocivas (BATA; LÁSZTITY, 1999; MUSSATTO et al., 2007).

Assim, diante do cenário científico e da procura por novas substâncias para atuarem na redução da contaminação de alimentos por micotoxinas e potencializar a sanidade, faz-se necessário a busca por novas cepas que tenham potencial descontaminante e que sejam seguras.

O trabalho foi dividido em dois capítulos, apresentados na forma de artigo científico, capítulo I: “Isolamento e identificação molecular de leveduras do intestino do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em estuário tropical”. Capítulo II: “Potencial probiótico e adsorvente de aflatoxina B<sub>1</sub> de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal do *Litopenaeus vannamei*”.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Litopenaeus vannamei*

A carcinicultura atingiu 46,8% da produção mundial de crustáceos no ano de 2016, com 7,9 milhões de toneladas produzidas (FAO, 2018). A produção brasileira teve seu ápice em 2015, porém apresentou um declínio entre 2016 e 2017, mas em 2018 iniciou recuperação atingindo 45.760 mil toneladas, na qual concentra a maior parte da produção nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, sendo esses responsáveis por cerca de 71,7% do total produzido em 2018. O Piauí ocupa a quinta posição no *ranking* nacional e a sua produção em 2018 chegou a 2.318 mil toneladas de camarões (IBGE, 2018).

Das espécies de camarões mais cultivadas, o *Litopenaeus vannamei* representa 75% da produção mundial de crustáceos devido a sua maior viabilidade e adaptabilidade as condições de cultivo intensivo (FAO, 2018; VILASBOA et al., 2020)

A carcinicultura brasileira é uma realidade consolidada na produção de alimentos. Essa atividade é uma alternativa dentro da área pesqueira, com características positivas na geração de emprego e renda (WASIELESKY et al., 2013). Entretanto, mesmo sendo um empreendimento lucrativo, seu potencial econômico é desafiado por várias questões e preocupações que prejudicam o crescimento sustentável. Pois, as infecções causadas pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), uso excessivo de antibióticos, desenvolvimento de resistência as drogas, distúrbios ambientais responsáveis pelas contaminações do cultivo através de resíduos agrotóxicos, esgoto doméstico e industrial, prejudicam de forma significativa o meio ambiente (ROCHA, 2007; SUSSEL et al., 2010; FREIJÓ et al., 2013; MOHAPATRA et al., 2013; LAZADO et al., 2015).

Agentes biológicos como vírus, bactérias, fungos e parasitas interferem na produção de camarão, mas agentes químicos, como as micotoxinas, presentes na ração que têm recebido destaques como um fator prejudicial no desenvolvimento da produção e na sanidade desses animais (SANTOS et al., 2010). Essas micotoxinas podem causar redução no crescimento, distúrbios fisiológicos, histológico e alterações que resultam na redução da produtividade (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

Calvet et al. (2015) constataram que rações para camarões (*L. vannamei*) estão contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Tapia-Salazar et al. (2012) demonstraram em seu estudo que camarões (*L. vannamei*) alimentados com rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) em ensaios com concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/Kg durante 24 dias de cultivo,

tiveram seu desempenho comprometido, interferindo no ganho de peso. Os camarões aparentavam saudáveis, ativos, com apetite e movimentos preservados, entretanto, a sobrevivência foi significativamente reduzida após 21 dias e, ao final do experimento, os camarões alimentados com as dietas suplementadas com 1000 e 2000 apresentaram mortalidade de 72% e 62%, respectivamente. Em relação ao controle (camarão sem AFB<sub>1</sub>) e o contaminado e com 500 (94% e 88%). Entretanto no ensaio dois com concentrações 10, 20, 40, 60 e 120 µg AFB<sub>1</sub> em 64 dias de cultivo, os camarões alimentados com dietas contendo 10 µg kg<sup>-1</sup> aumentaram significativamente o consumo de ração (17% em comparação aos fornecidos com a dieta controle), enquanto os de 120 µg kg<sup>-1</sup> apresentaram o menor consumo alimentar. Menos ganho de peso foi observado nos camarões, com as dietas de 60 e 120 µg kg<sup>-1</sup>. A sobrevivência não foi afetada pelos baixos níveis de inclusão de aflatoxina e no final do experimento, estava entre 70% e 85%. Deng et al. (2017) utilizaram menores concentrações de aflatoxina B<sub>1</sub> (0,5; 1,2; 2,4; 4,8 e 12,2 µg/kg) do que as testadas por Tapia-Salazar et al. (2012) e observaram que ocorriam alterações histológicas no hepatopâncreas conforme o aumento da quantidade de toxina utilizada.

Pesquisas de micro-organismos que possam ser utilizados como probióticos estão sendo considerados como uma alternativa na adsorção de micotoxinas em camarões, visando a melhoria da sanidade dos animais e o bem-estar na aquicultura (LAZADO et al., 2015). Esses probióticos podem ser usados em todas as fases durante o cultivo e são especialmente úteis nas fases larvais e iniciais de desenvolvimento, quando as vacinas não podem ser administradas (IBRAHEM, 2013).

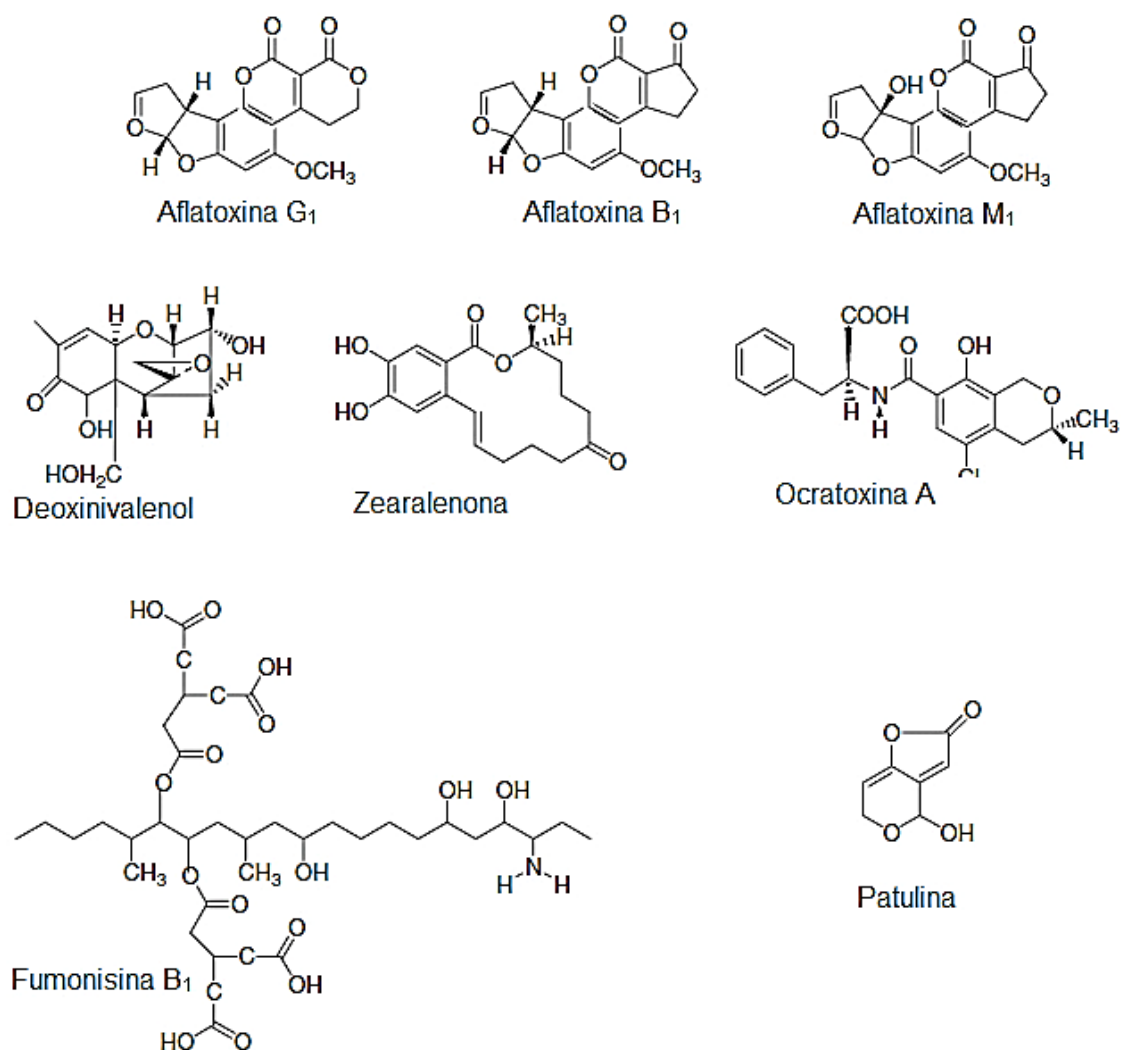
## 2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias tóxicas de baixo peso molecular, produzidas pelo metabolismo secundário dos fungos filamentosos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; KÖPPEN et al., 2010). Em geral, as micotoxinas contaminam elevada parte dos produtos agrícolas e alimentos produzidos em qualquer etapa da cadeia produtiva, provocando sérios danos à produção de alimentos e a saúde humana e animal (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

A contaminação de micotoxinas em seres humanos ocorre através da ingestão de grãos, frutas, e produtos derivados dessas matérias-primas, tais como vinho, cerveja, frutas secas, dentre outros (ALGÜL; KARA, 2014; IMPERATO et al., 2011; KUMAR et al., 2012;



LASRAM et al., 2012; MAJEED et al., 2013; WASKIEWICZ et al., 2013). Dentre as micotoxinas com importância agroeconômica e saúde pública, estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos e fumonisinas (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011), representadas na figura 1.



Fonte: Murphy et al. (2006).

**Figura 1.** Estruturas químicas de micotoxinas encontradas em alimentos.

A legislação brasileira estabelece limites máximos toleráveis para as micotoxinas em diversos alimentos. Muitos ingredientes podem ser utilizados como matérias primas na produção de rações destinadas ao consumo animal e ser meio de contaminação. As principais micotoxinas com limites estabelecidos são: aflatoxinas, ocratoxina A, deoxivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona (BRASIL, 1988; 2011).

### 2.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por linhagens de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, as quais podem se desenvolver naturalmente em alimentos. Essas micotoxinas têm sido detectadas em sementes de culturas com importância mundial, como: milho, amendoim, feijão, arroz, trigo, algodão, sorgo e frutas (FACCA; DALZOTO, 2010).

As aflatoxinas possuem elevada toxicidade aguda e crônica, devido à capacidade de ligar-se a ácidos nucleicos e nucleoproteínas celulares, resultando em efeitos deletérios sobre a síntese de proteína celular. Todas as aflatoxinas produzem efeitos adversos e a aflatoxina B<sub>1</sub> exprime maior toxicidade, seguida pelas aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>. A Ingestão de AFB<sub>1</sub> por humanos e animais pode causar hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão, carcinoma hepático e consequente morte (NAKAK et al., 2008; IDRIS et al., 2010; ZORZETE et al., 2011).

A contaminação de micotoxinas em espécies aquáticas se dá principalmente através da ingestão de rações contaminadas, visto que o aumento de uso de vegetais como ingredientes de ração proporciona o aparecimento destas substâncias tóxicas (EL-SAYED et al., 2009). Após a ingestão de alimentos tóxicos, os animais apresentam anormalidades como crescimento deficiente, desequilíbrios fisiológicos e histológicos. Essas alterações resultam na redução da produtividade e rentabilidade de cultivo (BOONYARATPALI et al., 2001; GOPINATH et al., 2012).

Embora seja impossível eliminar totalmente a presença de substâncias indesejáveis como as micotoxinas, o seu monitoramento é uma importante forma de reduzir o teor na alimentação humana e animal. O conhecimento e controle da contaminação por micotoxinas e sua distribuição é objetivo mundial de produtores, fabricantes e órgãos investigadores e regulamentadores, devido ao impacto econômico e à necessidade de se elevar a segurança alimentar e a saúde humana (CHELI et al., 2008). Além disso, são necessárias medidas que unifiquem os limites máximos permitidos e também que sejam estudados métodos de degradação desses metabólitos.

### 2.3 Leveduras

As leveduras podem ser definidas como fungos unicelulares com reprodução predominantemente assexuada, fissão ou brotamento, não formando corpos de frutificação (KURTZMAN et al., 2011). São imóveis e heterotróficas, apresentando uma grande diversidade fisiológica e bioquímica. Em geral necessitam de quantidades significativas de carbono orgânico como fonte de energia e minerais para compor a maioria dos constituintes celulares (LACHANCE; STARMER, 1998). Além disso, são micro-organismos ubíquos que são facilmente disseminados pelo ar, água e animais e, podem crescer em ambientes com substratos orgânicos variados (GATESOUBE et al., 2007).

O tamanho reduzido das células de leveduras resulta numa alta relação de superfície/volume, o que favorece uma rápida aquisição de nutrientes essenciais pelas leveduras. Além disso, as leveduras podem tolerar amplas faixas de pH e muitas vezes são encontradas em substratos muito ácidos, onde a maioria das bactérias não são capazes de competir (STARMER; LACHANCE, 2011). As leveduras podem desenvolver-se até mesmo em superfícies lisas e inertes, sendo capazes de formar pseudo-hifas ou hifas que penetram e colonizam a superfície do substrato, formando biofilmes (LACHANCE; STARMER, 1998).

As leveduras crescem em temperaturas que variam de 18°C e 45°C (KURTZMAN; FELL, 1998). São raras as leveduras capazes de crescer acima desta faixa de temperatura, como a espécie *Candida thermophila*, isolada de amostras de solo na Coreia, capaz de crescer a 50°C a 51°C (SHIN et al., 2001). Poucas espécies de leveduras como *Leucosporidium scottii* e *Mrakia frigida*, podem ser consideradas psicrófilas, tendo uma temperatura mínima de crescimento entre -1,0°C a 4,0°C e uma temperatura máxima de 20°C (DEAK, 2006).

As leveduras participam de diversos processos nos ecossistemas, sendo primariamente decompositores de matéria orgânica, participando também da colonização primária de substratos ricos em nutrientes. Além do papel desempenhado na decomposição, as leveduras podem formar diversas relações ecológicas com outros organismos, podendo ser mutualistas, competidoras, parasitas ou patógenos (STARMER; LACHANCE, 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais comumente utilizada em aplicações biotecnológicas e mais dominante em pesquisas por ter uma boa adaptação e ampla variedade de condições químicas e nutricionais (ŠILLEROVÁ et al., 2011), uma utilização dessa levedura é preparação de células suplementadas ricas em microelemento (cobre e selênio) (POLAKOVA et al., 2011) ou são fonte de substâncias antioxidantes (LAVOVÁ; URMINSKÁ, 2013).

## 2.4 Probióticos

O termo probiótico é derivado do grego *pro* (para) e *biótico* (vida) significa, portanto, “para a vida ou pró-vida”. Pode ser definido como micro-organismo vivo suplementado aos alimentos e que afetam benéficamente o animal hospedeiro pela melhora no balanço intestinal (FULLER, 1989), equilibrando e desempenhando funções na prevenção, tratamento de enfermidades, manutenção da saúde e melhoria da qualidade do ambiente de cultivo (SOCCOL et al., 2010; VERSCHUERE et al., 2000).

Os probióticos destinados a aquicultura têm uma relação muito mais próxima com o ambiente externo, pois patógenos potenciais são capazes de manter-se na água e proliferarem independentemente do hospedeiro. Além disso, esses patógenos podem estar constantemente associados aos peixes pelos processos de regulação osmótica e alimentação (KESARCODI-WATSON et al., 2008). A utilização de probióticos para organismos aquáticos tem ação profilática no controle do aparecimento de doenças bacterianas, por isso, cepas de espécies variadas são testadas nos mais diversos sistemas e fases de cultivos para utilização em aquicultura (QI et al., 2009).

De um modo geral, as bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) são frequentemente utilizadas como probióticos, principalmente as dos gêneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*. Também são utilizadas cepas de *Bacillus* e leveduras do gênero *Saccharomyces* (SOCCOL et al., 2010).

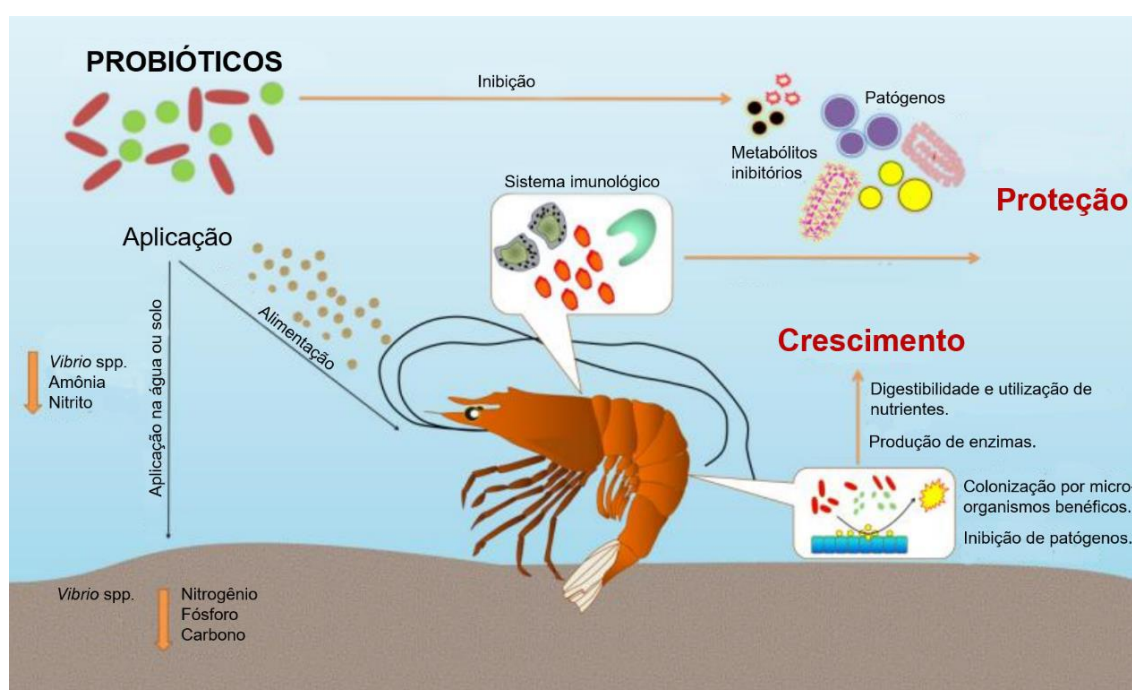
Estudos científicos com a utilização de probióticos tem despertado para desenvolvimento de produtos com interesse comercial, sendo utilizados para formular alimentos e rações, suplementar crescimento e preparos de formulações terapêuticas e profiláticas na prevenção de doenças transmitidas por alimentos (NAYAK et al., 2010).

Na aquicultura, os probióticos foram empregados inicialmente para melhorar o desempenho e a resistência a doenças, porém, eles podem favorecer a decomposição da matéria orgânica promovendo a redução dos níveis de nitrogênio, fósforo e de amônia (NAYAK et al., 2010). A espécie *Saccharomyces cerevisiae* melhora o desempenho produtivo e os aspectos imunológicos dos peixes por conter compostos imunoestimulantes, dentre eles: b-glucano, ácidos nucléicos, mananoligossacarídeo e quitina (GOPALAKANNAN; ARUL, 2010).

Os micro-organismos probióticos atuam modificando a composição das comunidades microbianas nos ambientes onde são inseridos. O efeito da aplicação de probióticos não está

relacionado a um único mecanismo. Os benéficos estão relacionados a vários processos inter-relacionados ou dependentes. Entre os principais mecanismos de ação descritos para probióticos utilizados na aquicultura, estão incluídos os seguintes: a capacidade de colonizar e aderir ao trato intestinal, modulação do sistema imunológico, produção de compostos benéficos, a produção de substâncias antagônicas aos patógenos e à melhoria da qualidade do ambiente aquático (TOLEDO et al., 2018).

Nesse contexto, a ação dos probióticos pode ocorrer diretamente no hospedeiro ou de forma indireta, através da melhoria da qualidade ambiental (Figura 2).



Fonte: Lazado et al. (2015).

**Figura 2.** Mecanismos de ação dos probióticos no camarão e no meio ambiente.

A colonização e adesão dos micro-organismos probióticos ao trato gastrointestinal nos camarões está relacionada a sua sobrevivência no muco entérico, sendo decisivo o estabelecimento da microbiota intestinal. Essa capacidade de aderir é realizada tanto por bactérias probióticas, quanto por patógenos. No caso dos probióticos, é uma característica decisiva para sua seleção e aplicação na aquicultura (LAMARI et al., 2014; VIEIRA et al., 2016), enquanto para patógenos a capacidade aderir está relacionado à virulência e é considerado o primeiro passo para uma infecção (DEFOIRDT, 2014).

Na aquicultura, os micro-organismos isolados de animais cultivados ou do ambiente têm maior capacidade de aderir ao muco gastrointestinal e tecidos. Por esse motivo, a ação de muitos probióticos são geralmente transitórios e precisam ser administrados de maneira contínua, como suplemento alimentar ou através da água para manter seu efeito biológico, a menos que sejam desenvolvidos a partir de cepas isoladas do próprio ecossistema aquático (NIMRAT et al., 2011) no entanto, o isolamento desses micro-organismos devem ser avaliados, pois podem colonizar outras espécies cultivadas, o que indica falta de especificidade para a colonização do trato digestivo (SÁNCHEZ-ORTIZ et al., 2016).

## 2.5 Estratégias para controle biológico de micotoxinas

O controle dos fatores que favorecem o crescimento fúngico é considerado a melhor alternativa para impedir os efeitos nocivos das micotoxinas na saúde animal e humana, quando ocorre o crescimento fúngico e a produção das micotoxinas, diferentes estratégias podem ser utilizadas para reduzir o seu impacto sanitário, dentre estas estratégias existem os métodos físicos, químicos e biológicos (KUPSKI et al., 2013). Os métodos biológicos consistem no uso de micro-organismos para promover a biotransformação em metabólitos menos tóxicos (AMÉZQUETA et al., 2009), sendo utilizadas leveduras, bactérias e fungos não toxigênicos capazes de inibir as micotoxinas (KUPSKI et al., 2013), pois uma vez que as micotoxinas estejam presentes nos alimentos, essas tornam-se estáveis (BRYDEN, 2012).

A espécie *Aspergillus parasiticus* possui a capacidade de deslocar a biossíntese da aflatoxina B<sub>1</sub> para a aflatoxina G<sub>1</sub> ou vice-versa, conforme a variação da atividade de água e da temperatura do meio em que se encontra, demonstrando, assim, a influência dos fatores ambientais na síntese das micotoxinas (SCHMIDT-HEYDT et al., 2012).

A detoxificação biológica por levedura é uma alternativa promissora para descontaminação de alimentos por micotoxinas. Espécies de levedura, especialmente *S. cerevisiae*, têm sido utilizadas em rações para animais na forma de culturas ou liofilizadas. Isto se deve ao fato de que micro-organismos que têm ação probiótica, capacidade para adsorver micotoxinas e inibir o crescimento de fungos toxigênicos. Neste sentido, pesquisadores demonstraram os efeitos benéficos da ingestão destes micro-organismos, e estudos têm avaliado a capacidade de adsorver as micotoxinas (HERÁNDEZ-MENDOZA et al., 2009; GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2009; RAHAIE et al., 2010; PINHEIRO et al., 2017).

### **3 CAPÍTULO I**

**Isolamento e identificação molecular de leveduras do intestino do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em estuário tropical**

**Isolamento e identificação molecular de leveduras do intestino do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em estuário tropical**

Julliet Teixeira de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Juliana de Abreu Costa<sup>1</sup>; José Humberto Santos Filho; João Farias Sousa, Felipe Oliveira, Raizza Eveline Escórcio Pinheiro<sup>1</sup>; Amilton Paulo Raposo Costa, Maria Christina Sanches Muratori<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Piauí, Campus da Socopo, Ininga, CEP 64049-550 Teresina, PI. e-mail: jullietteixeira@hotmail.com, juliana.abreu04@hotmail.com, raizza\_eveline@hotmail.com, amilfox@uol.com.br, chrismuratori@uol.com.br.

**RESUMO**

O conhecimento das leveduras provenientes da microbiota intestinal de camarões auxilia a compreender sua participação na patogênese e saúde desses animais em seus ambientes de cultivo, que pode resultar em melhorias nas condições sanitárias e no desempenho da produção dos mesmos. Esse trabalho objetivou isolar e identificar as leveduras da microbiota intestinal do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivados em ambiente de estuário tropical. Para tanto, foram adquiridos 40 camarões, em seguida, os intestinos foram individualizados. Foi realizado o isolamento das leveduras no Ágar Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YPD) e a identificação molecular foi feita por um sistema de reação utilizando um par de primers complementares à sequência ITS (ITS1 e ITS4) par 5.8S rDNA, onde o segmento ITS é amplificado. Os resultados mostraram que é possível isolar *Candida* spp., *Candida tropicalis*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e demonstrou pela primeira vez que a *Lodderomyces elongisporus* pode estar presente no intestino de *L. vannamei* em viveiros. Conclui-se que a microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* cultivado em ambientes de estuário tropical é composta pelas espécies *Lodderomyces elongisporus* e *Saccharomyces cerevisiae*, em maior proporção que *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp.

**Palavras-chave:** *Candida* spp., *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae*.



## ABSTRACT

The knowledge of yeasts from the intestinal microbiota of shrimp helps to understand their participation in the pathogenesis and health of these animals in their cultivation environments, which can result in improvements in sanitary conditions and in their production performance. This work aimed to isolate and identify yeasts from the intestinal microbiota of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivated in a tropical estuary. For this, 40 shrimp were purchased, then the intestines were individualized. Yeast isolation was performed on Peptone Dextrose Yeast Extract Agar (YPD) and molecular identification was performed by a reaction system using a pair of primers complementary to the ITS sequence (ITS1 and ITS4) pair 5.8S rDNA, where the ITS segment is amplified. The results showed that it is possible to isolate *Candida* spp., *Candida tropicalis*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae* and demonstrated for the first time that *Lodderomyces elongisporus* can be present in the intestine of *L. vannamei* in nurseries. It is concluded that the intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* cultivated in tropical estuary environments is composed of the species *Lodderomyces elongisporus* and *Saccharomyces cerevisiae*, in greater proportion than *Candida* sp. and *Rhodotorula* sp.

**Keywords:** *Candida* spp., *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores de produção animal que mais cresce no mundo, fornecendo meios de subsistência e boa segurança alimentar (Garlock et al., 2020). Em 2016 a carcinicultura atingiu 46,8% da produção mundial de crustáceos representando 7,9 milhões de toneladas no ano (FAO, 2018). A produção brasileira teve seu ápice em 2015, porém apresentou um declínio entre 2016 e 2017, mas em 2018 iniciou recuperação atingindo 45.760 toneladas, na qual concentra a maior parte da produção nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, sendo esses responsáveis por cerca de 71,7% do total produzido em 2018. O Piauí ocupa a quinta posição no *ranking* nacional e a sua produção em 2018 chegou a 2.318 toneladas de camarões (IBGE, 2018).

A produção brasileira de camarões marinhos cultivados foi de 112.00 t no ano de 2020, com crescimento expressivo de 24% em relação ao ano de 2019 (90.000 t) (ABCC, 2020). Esse

resultado deve-se a sua capacidade de sobrevivência e adaptação aos ambientes marinhos e desempenho zootécnico (TZUC et al., 2014; LI et al., 2019; LANFEN; LI, 2019).

A manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal influencia na digestão dos alimentos, na absorção de nutrientes, na imunidade e na sanidade do camarão (OMAR et al., 2012; CHEN et al., 2015; FAN et al., 2019).

Embora a microbiota intestinal do *L. vannamei* tenha sido amplamente pesquisada (TZUC et al., 2014; LI et al., 2019; FAN et al., 2019), ainda se necessita de mais estudos sobre as espécies de leveduras presentes no intestino, suas interações com a fisiologia e o desempenho produtivo do camarão.

Por serem micro-organismos eucarióticos e apresentarem parede celular rígida as leveduras têm sido utilizadas com frequência na indústria alimentar, biotecnológica e produção de biomassa na obtenção de micro-organismos com ação probiótica, tornando-se organismos modelo nas técnicas de manipulação genética, pesquisa molecular e biológica (NAYAK et al., 2010) a fim de melhorar a saúde dos animais durante a produção intensiva (OMAR et al., 2012).

Portanto, assim como em outros animais, as leveduras podem ser encontradas na microbiota intestinal de animais invertebrados marinhos. Nesse sentido, objetivou-se isolar e identificar leveduras da microbiota intestinal do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em ambientes de estuário tropical

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Declaração de ética**

Uma declaração de ética não foi necessária para este trabalho. Não foram imprescindíveis permissões específicas para os estudos de campo descritos, pois a espécie não é ameaçada ou protegida.

### **Coleta das amostras**

Para realizar o isolamento e a identificação de leveduras com capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1, foram utilizados 40 camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* com peso médio de 12 g obtidos despescados em uma fazenda carcinicultora localizada em Luís Correia, PI (2°56'52.5"S; 41°26'42.1"W).

Após a despesca, os animais foram insensibilizados e o abate feito por choque térmico, em seguida os camarões foram coletados randomicamente, colocados em sacos plásticos

individuais e transferidos para caixa isotérmica com gelo para transporte. Posteriormente os camarões foram transportados para as instalações do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, PI (5°02'32.3"S 42°47'04.3"W).

### **Isolamento e caracterização das cepas de leveduras**

No Laboratório de Microbiologia do NUEPPA, foi removido assepticamente o cefalotórax em câmara de fluxo laminar. Em seguida, o exoesqueleto da porção abdominal, feita uma incisão longitudinal no músculo flexor abdominal para exposição e remoção completa do intestino.

Na sequência, após remoção, o intestino foi cortado longitudinalmente para expor a mucosa e posteriormente foi transferido para frasco contendo 150 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) que foi incubado em estufa B.O.D a 37°C por 48h para enriquecimento (YANG et al., 2011).

Após o enriquecimento, o isolamento das leveduras foi realizado pelo método de diluição decimal seriada com semeadura por espalhamento em superfície. Diluições decimais seriadas foram realizadas em tubos com caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) até 10<sup>-5</sup>. Para o isolamento seletivo de leveduras alíquotas com 0,1 mL das respectivas diluições foram semeadas em agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e agar YPD. Todas as placas foram incubadas em estufas B.O.D a 37°C por 48 h (PITT; HOCKING, 2009). Para a obtenção de cultivos puros, cada colônia de levedura isolada foi repicada em placas de YPD pelo método de esgotamento por estrias e logo após os cultivos semeados em agar Extrato de Malte (MEA) para posterior identificação das espécies (KURTZMAN; FELL, 1998; PITT; HOCKING, 2009).

### **Identificação molecular e seleção das cepas**

#### **Extração de DNA**

As cepas isoladas foram ressuspendidas em 100 µL de tampão de lise, incubadas em banho-maria a 65°C por 35 minutos. No protocolo de extração, foi utilizado: 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), 70 µL de isopropanol, 200 µL de etanol a 70%. Os tubos contendo os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente para secagem “*overnight*”, sendo o *pellet* depois eluído em 50 µL Buffer TE (TRIS-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0),

incubados em estufa a 37°C. A seguir, o DNA obtido foi dosado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000; 220 a 750nm) da Thermo Scientific e diluído até atingir a concentração aproximada de 200 ng/ µL.

### **Purificação dos produtos de PCR e reações de sequenciamento**

Todos os perfis moleculares obtidos foram selecionados e submetidos a um sistema de reação usando um par de *primers* complementares à sequência ITS, par ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') par 5.8S rDNA, onde o segmento ITS é amplificado. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5,0 µL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (MBI Fermentas), 1,0 µL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1,0 µL do primer NL1 10 pmol (Invitrogen, USA), 1,0 µL do primer NL4 10 pmol (Invitrogen USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1,0 µL de DNA. O volume da reação foi ajustado com a adição de água deionizada.

Para a reação, foi utilizado um termociclador PCR Express (Valpo protect - Eppendorf) e ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os *amplicons* foram separados em gel de agarose (Pronadisa Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5% a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat França).

Os *amplicons* gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 45 µL, foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto. Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 13.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 µL de etanol 70% e realizado homogeneização por inversão. Após centrifugação (Microcentrífuga de bancada, Nova Instruments) a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 20 minutos a 37°C. O DNA então foi ressuspendido em 10 µL de água deionizada estéril q.s.p. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de primer específico e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL.

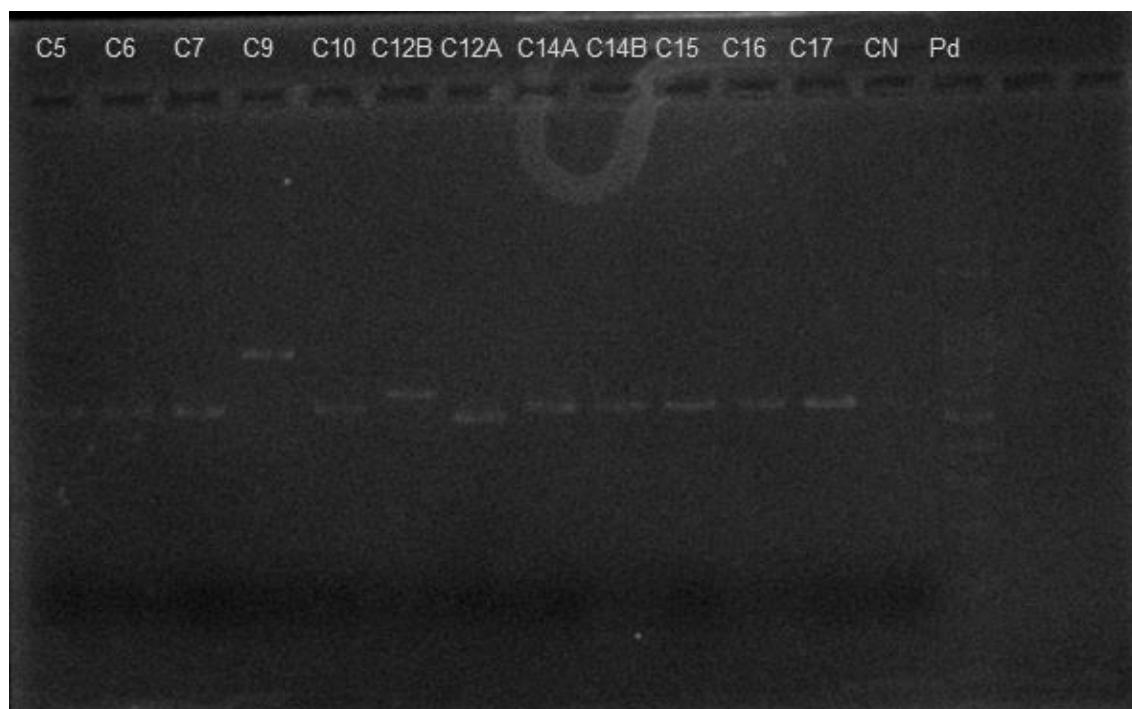
As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cyler com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por três minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por cinco segundos e 60 °C por quatro minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por cinco minutos, resfriados em gelo por cinco minutos e eletroinjetados no sequenciador automático.

Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 3 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500\_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC-3500SR\_Seq\_FASTA.saz”. Os arquivos resultantes do Data Collection (ab1; eletroferogramas) foram convertidos em arquivos FASTA (seq; texto) pelo *Sequence Analysis Software* v. 6 (Applied Biosystems).

As sequências e comparações de rDNA 5.8S ITS foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local 562 Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), sendo comparadas com outras depositadas no GenBank.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na Figura 1 pode ser observado o gel correspondente a reação de PCR com iniciador ITS1 e ITS4 utilizado para identificação das espécies por sequenciamento.



**Figura 1.** Perfil de bandas obtidas com a reação de PCR utilizando o iniciador ITS1 e ITS4. Da direita para a esquerda: (Pd) padrão de peso molecular, (cn) controle negativo e as cepas de leveduras C5 a C17 isolados do intestino de camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

Dos 40 intestinos utilizados de *Litopenaeus vannamei*, foram isoladas 15 cepas de leveduras e após o sequenciamento, as cepas foram identificadas como *Candida* spp., *C. tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de levedura isoladas do intestino de camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

Leveduras	Código da cepa	Isoladas	Frequência (%)
<i>Candida</i> spp.	C12B	1	6,7
<i>Candida tropicalis</i>	C2E	1	6,7
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	C5, C6, C7, C10, C14A, C14B, C15, C16 e C17	9	60,0
<i>Rhodotorula</i> sp.	C12 A	1	6,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C2B, C2D e C9	3	20,0
<b>Total</b>		15	100,0

O presente estudo mostrou a prevalência de *Lodderomyces elongisporus* no intestino de *L. vannamei* (tabela 1). Essa espécie ainda não havia sido descrita em trato intestinal de camarões, porém a sua presença já foi relatada em intestino de insetos (JI et al., 2009), em ração para peixes no Piauí (PINHEIRO et al., 2018); em amostras de areia da praia e água do mar no Rio de Janeiro e no Paraná (MACIEL et al., 2019), associada a infecções da corrente sanguínea em pacientes imunodeprimidos (AHMAD et al., 2013; AL-OBAID et al., 2018; LOCKHART et al., 2008; DÖĞEN et al., 2017; LEE et al., 2018) e como agente etiológico de endocardites (DAVESON et al., 2012; AL-OBAID et al., 2018). Essa espécie de levedura já foi reconhecida como agente etiológico capaz de causar infecção grave em seres humanos, entretanto, foi pouco descrita quanto aos seus fatores de virulência. Também não foram encontradas citações de ocorrência em enfermidades nos animais de produção e sobre seu nicho ambiental.

A *Saccharomyces cerevisiae* foi outra espécie isolada no intestino do *L. vannamei* (tabela 1). Esse gênero também foi isolado no hepatopâncreas e no intestino de *L. vannamei* em Maoming, China (LI et al., 2019) e nas amostras de camarão comercializado em mercado público na Tailândia (CHALAD et al., 2018). A *S. cerevisiae* é uma levedura unicelular considerada segura (GRAS), utilizada em indústrias de bebidas e panificação. Tem sido pesquisada para aplicação em estudos genéticos, biotecnológicos e probióticos (BRANDUARDI et al., 2008; NAYAK, 2011; FAKRUDDIN et al., 2017; PUPPALA et al.,

2019). Já teve sua eficiência testada como adsorvente de aflatoxina B1 (PINHEIRO et al., 2017; POLONI et al., 2017) e zearalenona (KELLER et al., 2015), e para hidrolisar a fitase (PUPPALA et al., 2019).

*Candida* sp. e *C. tropicalis* foram cepas isoladas com menor frequência nessa pesquisa (tabela 1). Também foram isoladas no trato digestivo de camarão da Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) (GATESOUBE, 2007; BRILHANTE et al., 2011; ROCHA et al., 2014). Esse gênero foi isolado em camarões destinados ao consumo (CHALAD et al., 2018) e nos intestinos de *L. vannamei* enfermos provenientes da carcinicultura (LI et al., 2019). Por ser considerada um patógeno oportunista, a *Candida* spp. pode causar infecções nos camarões cultivados expostos a condições de estresse.

No intestino de *L. vannamei* foi isolada uma cepa de *Rhodotorula* sp. (tabela 1). Yang et al. (2011) isolaram sete espécies de *Rhodotorula* nas amostras de intestinos, brânquias e estômagos do *L. vannamei*. Xie et al. (2015) pesquisaram leveduras no intestino de *Litopenaeus vannamei* e seu ambiente de cultivo, os autores isolaram *Rhodotorula mucilaginosa* apenas nas amostras de lama dos viveiros. Yang et al. (2015) adicionaram *Rhodotorula* sp. na alimentação de pepinos marinhos (*Apostichopus japonicus*), essa levedura foi capaz de colonizar o intestino deles, melhorando o desempenho e a resistência a doença infecção causada por *Vibrio splendidus*. Considerando-se que essa bactéria também pode infectar e causar enfermidades nos camarões cultivados (JAYASREE et al., 2006).

Dessa forma, a identificação de leveduras presentes na microbiota intestinal de *L. vannamei* pode favorecer a compreensão da fisiologia digestiva e de aspectos profiláticos para enfermidades. Essa pesquisa demonstrou pela primeira vez que a *Lodderomyces elongisporus* pode estar presente no intestino de *L. vannamei* em viveiros. Também foram isoladas cepas de *Candida* sp. e *C. tropicalis* que são potencialmente patogênicas. Dessa forma, devido ao potencial patogênico dessas leveduras, é necessário pesquisar suas prováveis interferências na sanidade dos *L. vannamei* cultivados.

*Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces cerevisiae* que também foram isoladas, podem possuir características de proteção para enfermidades dos *L. vannamei* cultivados, por esse motivo, devem ser pesquisadas quanto ao desempenho produtivo, a capacidade probiótica e adsorvente de toxinas presentes na ração e as de origem ambiental.



## CONCLUSÃO

Conclui-se que a microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* cultivado em ambientes de estuário tropical é composta pelas espécies *Lodderomyces elongisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* em maior proporção que *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos e CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

ABCC - Associação Brasileira dos Criadores de Camarão. 2020. Produção Brasileira de Camarão Marinho Cultivado por Estado: Dados reais de 2015 a 2019 e Declínio, Evolução e Expectativa da Produção de Camarão Marinho Cultivado do Brasil. Disponível em: < <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2020/10/Producao-de-Camarao-2020.pdf> > Acesso em: 05 fev. 2021.

AHMAD, S.; KHAN, Z.U.; JOHNY, M.; ASHOUR, N.M.; AL-TOURAH, W.H. JOSEPH, L. CHANDY, R. Isolation of *Lodderomyces elongisporus* from the Catheter Tip of a Fungemia Patient in the Middle East. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, e560406, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/560406>. Acesso em: 18 nov. 2019.

AL-OBAID, K.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, Z. *Lodderomyces elongisporus*: a bloodstream pathogen of greater clinical significance. **New Microbes New Infections**, v. 26, p. 20-24, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.07.004>. Acessado em: 18 nov. 2019.

BRANDUARDI, P.; SMERALDI, C.; PORRO, D. Metabolically engineered yeasts: ‘Potential’ industrial applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. v. 15, p. 31–40, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000111990>. Acesso em: 03 fev. 2019.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIVA, M.A.N., SAMPAIO, C.M.S.; TEIXEIRA, C.E.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; LEITE J.J.G.; MOREIRA, C.A.; SILVA, L.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 268–277, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01050.x>. Acesso 05 fev. 2019.

CHALAD, C.; KONGRUENG, J.; VONGKAMJAN, K.; ROBINS, W.P.; VUDDHAKUL, V.; MEKALANOS, J.J. Modification of an agar well diffusion technique to isolate yeasts that inhibit *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 12, p. 3838-3844, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.13850>. Acesso em: 12 dez. 2019.

CHEN, L.; FENG, L.; JIANG, W.; JIANG, J.; WU, P.; ZHAO, J.; KUANG, S.; TANG, L.; TANG, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.; LIU, Y. Dietary riboflavin deficiency decreases immunity and antioxidant capacity, and changes tight junction proteins and related signaling molecules mRNA expression in the gills of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n.2, p. 307-320, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.004>, Acesso em: 12 jan. 2019.

DAVESON, K.L.; WOODS, M.L. *Lodderomyces elongisporus* endocarditis in an intravenous drug user: a new entity in fungal endocarditis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1338–1340, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.047548-0>. Acesso em 18 dez. 2019.

DÖĞEN, A.; METIN, B.; ILKIT, M.; HOOG, G.S.; HEITMAN, J. MTL genotypes, phenotypic switching, and susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species group compared to *Lodderomyces elongisporus*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182653>. Acesso em: 18 dez. 2019.

FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, M.N.; AHMED, M.M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 64, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1591-9>. Acesso em: 08 dez. 2019.

FAN, J.; CHEN, L.; MAI, G.; ZHANG, H.; YANG, J.; DENG, D.; MA, Y. Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. **Scientific Reports**, v. 9, n. 734, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37042-3>. Acesso em 12 jan. 2020.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome: Sustainability in Action.

GARLOCK, T.; ASCHE, F.; ANDERSON, J.; BJØRNDAL, T.; KUMAR, G.; LORENZEN, K.; ROPICKI, A.; SMITH, M. D.; TVETERÅS, R. A global blue revolution: Aquaculture growth across regions, species, and countries. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 28, n. 1, p. 107–116, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1678111>. Acesso em 24 jan. 2021.

GATESOUBE, F.J. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. **Aquaculture**, v. 267, p. 20-30, 2007. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005>. Acesso em: 05 fev. 2019.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática-SIDRA. Banco de tabelas estatísticas. Produção da aquicultura por tipo de produto. 2018. Disponível em < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>> Acesso em: 05 fev. 2019.

JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **Journal of The World Aquaculture Society**, v.37, n. 4, p. 523-532, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x>. Acesso em: 03 fev. 2019.

JI, Z.; JIA, J.; BAI, F. Four novel *Candida* species in the *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade isolated from the gut of flower beetles. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 95, n. 23, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9282-7>. Acesso em: 12 fev. 2019.

KELLER, L.; ABRUNHOSA, L., KELLER, K.; ROSA, C.A.; CAVAGLIERI, L.; VENÂNCIO, A. Zearalenone and Its Derivatives  $\alpha$ -Zearalenol and  $\beta$ -Zearalenol Decontamination by *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. **Toxins**, v. 7, p. 3297-3308, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins7083297>. Acesso em: 12 fev. 2019.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. The Yeasts, a taxonomic study. 4th Ed. Amsterdam: **Elsevier Science B.V**, 1998.

LANFEN, F.; LI, Q.X. Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment. **Aquaculture**, v. 505, p. 450-461, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.075>. Acesso em: 07 fev. 2020.

LEE, H.; KIM, S.J.; KIM, D.; JANG, J.; SUNG, H.; KIM, M.; CHOI, C. Catheter-related Bloodstream Infection due to *Lodderomyces elongisporus* in a Patient with Lung Cancer.

**Annals of Laboratory Medicine**, v. 38, p. 182–184, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.182>. Acesso em: 04 nov. 2019.

LI, J.; JIANG, H.; LI, L.; ZHANG, X.; CHEN, J. The Effect of Disease and Season to Hepatopancreas and Intestinal Mycobiota of *Litopenaeus vannamei*. **Frontiers in**

**Microbiology**, v.10, n. 889, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00889>. Acesso em: 15 dez. 2019.

LOCKHART, S.R.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections.

**Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 374-376, 2008. DOI:

<https://doi.org/10.1128/JCM.01790-07>. Acesso em: 04 nov. 2019.

MACIEL, N.O.P.; JOHANN, S.; BRANDÃO, L.R.; KUCHARÍKOVÁ, S.; MORAIS C.G.; OLIVEIRA, A.P.; FREITAS, G.J.C.; BORELLI, B.M.; PELLIZZARI, F.M.; SANTOS, D.A.; VAN DIJCK, P.; ROSA, C.A. Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, e180566, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180566>. Acesso em: 04 jan. 2020.

NAYAK, S.K. Biology of eukaryotic probiotics. In: Liang M-T, ed. Probiotics. **Microbiology Monographs**. Springer, Berlin, Heidelberg, v.21., p. 29–55, 2011.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553-1573, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>. Acesso em: 04 dez. 2019.

OMAR, S.S.; MERRIFIELD, D.L.; KÜHLWEIN, H.; WILLIAMS, P.E.V.; DAVIES, S.J. Biofuel derived yeast protein concentrate (YPC) as a novel feed ingredient in carp diets.

**Aquaculture**, v. 330–333, p. 54–62, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.004>. Acesso em: 24 mar. 2019.

PINHEIRO, R.E.E.; PEREYRA, C.M.; NEVES, J.A.; CALVET, R.M.; SANTOS, J.T. O.; LIMA, C.E.; ALVES, V.C.; PEREIRA, M.M.G.; MURATORI, M.C.S. Avaliação *in vitro* da

adsorção de aflatoxina B1 por produtos comerciais utilizados na alimentação animal.

**Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, e0072015, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000072015>. Acesso em: 21 nov. 2019.

PINHEIRO, R.E.; RODRIGUES, A.M.D.; SANTOS, J.T.O.; COSTA J.A.; PEREYRA, C.M.; TORRES, A.M.; ROSA, C.A.; SANTOS, A.R.O.; MURATORI, M.C.S. Occurrence and diversity of yeast species isolated from fish feed and tambatinga gut. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 4, p. 837-842, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-22>. Acesso em: 21 nov. 2019.

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

POLONI, V.; SALVATO, L.; PEREYRA, C.; OLIVEIRA, A.; ROSA, C.; CAVAGLIERI, L.; KELLER, K.M. 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, 630e636631, p. 630-636, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.040>. Acesso em: 12 fev. 2019.

PUPPALA, K.R.; KUMAR, V.R.; KHIRE, J.; DHARNE, M. Dephytinizing and Probiotic Potentials of *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3662) Strain for Amelioration of Nutritional Quality of Functional Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 604–617, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9394-y>. Acesso em: 12 fev. 2020.

ROCHA, M.F.G.; ALENCAR, L.P.; BRILHANTE, R.S.N.; SALES, J.A.; PONTE, Y.B.; RODRIGUES, P.H.A.; SAMPAIO, C.M.S.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; OLIVEIRA, F.C.; BARBOSA, F.G.; TEIXEIRA, C.E.C.; PAIVA, M.A.N.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MOREIRA, J.L.B.; SIDRIM, J.J.C. *Moringa oleífera* inhibits growth of *Candida* spp. And *Hortaea werneckii* isolated from *Macrobrachium amazonicum* prawn farming with a wide margin of safety. **Ciência Rural**, v. 44, n.12, p. 2197-2203, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140266>. Acesso em: 05 fev. 2019.

TZUC, J.T.; ESCALANTE, D.R.; HERRERA, R.R.; CORTÉS, G.G.; ORTIZ, M.L.A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Springer Plus**, v. 3, n. 280, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-280>. Acesso em: 05 dez. 2019.

XIE, F.; ZHANG, F.; ZHOU, K.; ZHAO, Y.; SUN, H.; WANG, Y. Isolation, screening and identification of yeast for aquaculture water purification [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 55, n. 5, p. 635 -642, 2015.

YANG, S.; WU, Z.; JIAN, J. Distribution of Marine Red Yeasts in Shrimps and the Environments of Shrimp Culture Shi-Ping. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1638-1642, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9910-8>. Acesso em: 05 dez. 2019.

YANG, Z.; SUN, J.; XU, Z. Beneficial effects of *Rhodotorula* sp. C11 on growth and disease resistance of juvenile Japanese spiky sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 27, n. 2, p.71-76, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.993483>.. Acesso em: 05 jan. 2019.

## **4 CAPÍTULO II**

**Potencial probiótico e adsorvente de aflatoxina B1 de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*  
isoladas da microbiota intestinal do *Litopenaeus vannamei***

**Potencial probiótico e adsorvente de aflatoxina B1 de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal do *Litopenaeus vannamei***

Julliet Teixeira de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Juliana de Abreu Costa<sup>1</sup>; João Farias de Sousa Júnior<sup>1</sup>; Raizza Eveline Escórcio Pinheiro<sup>1</sup>; Amilton Paulo Raposo Costa<sup>1</sup>, Maria Christina Sanches Muratori<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Piauí, Campus da Socopo, Ininga, CEP 64049-550 Teresina, PI. e-mail: jullietteixeira@hotmail.com, juliana.abreu04@hotmail.com, raizza\_eveline@hotmail.com, , chrismuratori@uol.com.br.

**RESUMO**

Objetivou-se nesta pesquisa realizar o teste *in vitro* da capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>) de três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do microbiota intestinal do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). As cepas foram submetidas aos testes probióticos *in vitro*: autoagregação, coagregação, atividade antibacteriana, inibição homóloga, tolerância ao pH 2,0 e 7,0, tolerância aos sais biliares em pH 7,0 e adsorção de AFB<sub>1</sub>. Todas as cepas apresentaram habilidade de autoagregação e coagregação com bactérias patogênicas testadas (*Aeromonas hydrophyla*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus agalactie*) e foram capazes de inibir a multiplicação delas. No ensaio de inibição homóloga não houve inibição entre as cepas. Todas foram tolerantes ao pH 2,0 durante 12 horas de incubação sem afetar a viabilidade das células ao final do teste. Na presença de sais biliares, apresentaram células viáveis após 12h de ensaio. Os resultados demonstraram que todas as cepas de *S. cerevisiae* isoladas do microbiota intestinal do *L. vannamei* possuem potencial probiótico e adsorvente, com destaque para a cepa C9, que demonstrou melhor capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>.

**Palavras-chave:** *Aeromonas hydrophyla*, atividade antibacteriana, *Escherichia coli*, *Litopenaeus vannamei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactie*.

**ABSTRACT**

The objective of this research was to perform the *in vitro* test of the probiotic and adsorbent capacity of aflatoxin B1 (AFB<sub>1</sub>) of three strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from the intestinal microbiota of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The strains were



submitted to in vitro probiotic tests: self-aggregation, coaggregation, antibacterial activity, homologous inhibition, tolerance to pH 2.0 and 7.0, tolerance to bile salts at pH 7.0 and adsorption of AFB<sub>1</sub>. All strains showed ability to self-aggregate and coaggregate with tested pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophyla*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus agalactiae*) and were able to inhibit their multiplication. In the homologous inhibition assay, there was no inhibition between strains. All were tolerant to pH 2.0 during 12 hours of incubation without affecting cell viability at the end of the test. In the presence of bile salts, they showed viable cells after 12 hours of testing. The results showed that all strains of *S. cerevisiae* isolated from the intestinal microbiota of *L. vannamei* have probiotic and adsorbent potential, with emphasis on the C9 strain, which showed better adsorption capacity for AFB<sub>1</sub>.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophyla*, antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Litopenaeus vannamei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura no Brasil vem crescendo a cada ano e se tornando uma importante fonte de produção de alimento de origem animal, gerando renda, emprego, com segurança alimentar e sustentabilidade (SILVA et al., 2021). A utilização de aditivos probióticos em rações vem se tornando uma estratégia importante para esse crescimento, pois fornece melhor desempenho e crescimento dos animais, e conseqüentemente menos gastos com insumos e maior retorno econômico aos produtores (SILVA, 2020).

Algumas leveduras, tais como a *Saccharomyces cerevisiae*, destacam-se como microorganismos probióticos devido as seguintes características principais: possuem capacidade antibacteriana, contém compostos imunoestimulantes (ARMANDO et al., 2011; CARUFFO et al., 2015) e atuam como agentes descontaminantes de micotoxinas (ARMANDO et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2012; KELLER et al., 2015; PFLIEGLER et al., 2015; POLONI et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017; PINHEIRO et al., 2020).

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Elas são estáveis a temperaturas superiores a 100°C utilizadas durante o processamento de alimentos e a valores de pH ácido do suco gástrico dos animais. Quando presentes nos alimentos podem representar risco para a sanidade, causando micotoxicoses agudas e crônicas. Por esse motivo, podem causar perdas econômicas

consideráveis pela redução dos parâmetros de eficiência na produção animal (MÍDIO; MARTINS, 2000; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; MAZIERO; BERSOT, 2010; PEREYRA et al., 2010; PFLIEGLER et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015; MATEJOVA et al., 2016).

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, destacando-se os tipos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, com a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) sendo a mais prevalente e biologicamente ativa dentre as aflatoxinas, considerada o metabólito mais tóxico para maioria dos animais, responsável por desencadear efeitos teratogênicos, hepatotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e imunossupressivos (CARDOSO FILHO; MURATORI, 2011; ROCHA et al., 2014; ANATER et al., 2016; MATEJOVA et al., 2016).

Por esse motivo, faz-se necessário o uso de medidas de controle tais como: prevenção da contaminação e multiplicação dos fungos nos alimentos; a descontaminação de alimentos contaminados por micotoxinas; adsorção e inativação das micotoxinas no trato gastrointestinal. Dentre as medidas de controle de micotoxinas, destaca-se o uso de técnicas biológicas, como a detoxificação realizada por leveduras que possuam capacidade probiótica. Essa técnica representa uma promissora estratégia, visto que estes micro-organismos quando adicionados aos alimentos contaminados são capazes de adsorver micotoxinas, propiciando a redução da quantidade destes agentes tóxicos, além de sua ação fermentativa possibilitar que o alimento não tenha seu valor nutricional afetado de maneira significativa e a palatabilidade não seja comprometida (MALLMANN et al., 2006; PIZZOLITTO et al., 2012; RAHAIE et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015)

Pelo exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar a capacidade probiótica e o potencial adsorvente *in vitro* de aflatoxina B<sub>1</sub> por *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do microbiota intestinal do camarão Branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Cepas de leveduras**

Foram utilizadas três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (C2B, C2D e C9) isoladas de intestinos do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivados no litoral piauiense. Essas cepas foram isoladas e identificadas por sequenciamento e fazem parte da Micoteca do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

As cepas de *S. cerevisiae* foram submetidas aos testes *in vitro* para avaliação de seu potencial probiótico: inibição homóloga, autoagregação, coagregação, atividade antimicrobiana. Posteriormente, as leveduras foram submetidas ao teste de adsorção de AFB<sub>1</sub>. Os ensaios de viabilidade às condições gastrointestinais foram realizados simulando artificialmente as condições de pH e o tempo de passagem do alimento utilizado para os camarões.

## **Avaliação do potencial probiótico**

### **Inibição homóloga**

Para este ensaio, as três cepas de Leveduras foram enfrentadas entre si utilizando o método de estrias cruzadas descrito por Muzzolón (2010). A partir de tubos de MEA previamente semeados, com cada um dos isolados de leveduras, foram realizadas suspensões de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>, a padronização feita a câmara de Neubauer. Cada cepa foi semeada em uma linha reta da borda superior da placa até a borda inferior, de forma centralizada, nas placas de Petri contendo ágar extrato de levedura peptona dextrose (YPD), sendo posteriormente incubadas a 37°C por 48 h. Em seguida, após crescimento da estria central de cada placa, estas foram inativadas por exposição a vapores de clorofórmio durante 10 minutos. Posteriormente, as diferentes cepas foram semeadas por estrias cruzadas até a borda da estria central. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. Transcorrido o tempo proposto, as placas foram analisadas, sendo consideradas positivas quando havia a presença de halos de inibição de crescimento ( $\geq 5$  mm) ao redor da estria central, e negativas quando se detectava ausência de halo ou inibição ( $< 5$  mm).

### **Capacidade de autoagregação**

A capacidade de autoagregação foi realizada segundo a metodologia descrita por Kos et al. (2003). Previamente realizou-se a contagem de células de leveduras utilizando uma câmara de Neubauer dupla espelhada (Herka®) para padronização inicial do inóculo em escala de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>. As cepas de leveduras foram incubadas durante 24h a 37°C em 4,0 mL de caldo YPD. Após o período de incubação foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS) com pH 7,2. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 4,0 mL do mesmo PBS e submetidos a homogeneização em agitador tipo vórtex.

Para avaliar a capacidade de autoagregação, o conteúdo foi incubado sem agitação por duas horas a 37°C em estufa de cultura modelo 002CB (Fanem LTDA®) com controle de temperatura. Em seguida, foram coletados 2,0 mL da parte superior da solução para medição da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Biospectro Modelo SP-220) a 600nm. A DO inicial foi padronizada para aproximadamente 0,5. A porcentagem de autoagregação foi expressa pela seguinte fórmula:

$$\text{Capacidade de autoagregação\%} = [1 - (\text{DO}_{\text{final}}/\text{DO}_{\text{inicial}})] \times 100$$

Onde:

DO<sub>final</sub>= Densidade ótica final

DO<sub>inicial</sub>= Densidade ótica inicial

**Tabela 1.** Interpretação dos resultados de autoagregação

Resultado	Agregação (%)
(-)	≤ 60
(+)	< 80 >60
(++)	≥ 80

Fonte: Kos et al. (2003).

### Capacidade de coagregação

A preparação das suspensões de leveduras para coagregação foi a mesma utilizada para o ensaio de autoagregação e a metodologia deste teste foi realizada como descrito por Handley et al. (1987). Foram utilizados quatro micro-organismos patogênicos cedidos pela coleção de referência da Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ: As cepas utilizadas foram: *Aeromonas hydrophila* INQS 00318 (IOC/FDA 110-36); *Escherichia coli* INQS 00033 (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* INQS 00015 (ATCC 25923); *Streptococcus agalactiae* INQS 00128 (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 as células foram ressuspensas em PBS (pH 7,2).

O teste de coagregação foi realizado em duas etapas: teste visual e teste de coagregação espectrofotométrica.

No ensaio visual de coagregação as cepas testadas foram cultivadas 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 as células foram ressuspensas em PBS (pH 7,2). Amostras (0,2 ml) de cada suspensão bacteriana foram misturadas em tubo Falcon, homogeneizada em vórtex, depois permaneceram em temperatura ambiente.

Os escores de coagregação foram lidos após duas horas, agitando as suspensões em vórtex, depois os tubos foram agitados suavemente seis vezes para maximizar a floculação causada pela agregação interbacteriana (coagregação). Foi atribuído às suspensões bacterianas o escore de coagregação de 0 a 4+ proposto por Cisar et al. (1979) demonstrada na tabela 2. Os tubos de controle consistiram em 0,2 mL de cada suspensão bacteriana mais 0,2 mL de tampão com CaCl<sub>2</sub>, para verificar a autoagregação. As experiências foram repetidas para confirmar as pontuações.

**Tabela 2.** Escores para interpretação qualitativa dos resultados de coagregação das bactérias pelo teste visual proposto por Cisar et al. (1979)

<b>Escore</b>	<b>Interpretação dos coagregados</b>
<b>0</b>	Ausência de coagregado visível em suspensão
<b>+</b>	Coagregados uniformes muito pequenos em suspensão, geralmente visíveis apenas em lupa
<b>++</b>	Coagregados definidos de fácil visualização, com suspensão turva sem sedimentação
<b>+++</b>	Coagregados grandes formados com pouca sedimentação
<b>++++</b>	Coagregados grandes que se formam rapidamente, deixando um sobrenadante definido

Para quantificar a extensão da coagregação foram realizadas diluições com a mesma solução tampão para ajustar a concentração final tanto de leveduras quanto de bactérias a DO<sub>600 nm</sub> = 0,5. Posteriormente, volumes iguais (2,0 mL) de leveduras e bactérias patogênicas foram misturados em tubos estéreis, homogeneizados em vórtex QL901 (Vertex®) 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 ( $DO_{patógeno}$ ) tiveram a absorbância medida a 600 nm. Para determinação da porcentagem de coagregação foi aplicada a fórmula proposta por Handley et al. (1987)

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

Onde:

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

$DO_{Patógeno}$  = Densidade ótica do patógeno

$DO_{levedura}$  = Densidade ótica da levedura

### Atividade antimicrobiana

As cepas de leveduras foram testadas para a produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas realizada pelo método *Slab test* no ágar YPD de acordo com a metodologia de Strus (1998). As cepas de bactérias patogênicas utilizadas neste ensaio foram: *Aeromonas hydrophila* INQS 00318 (IOC/FDA 110-36); *Escherichia coli* INQS 00033 (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* INQS 00015 (ATCC 25923); *Streptococcus agalactiae* INQS 00128 (ATCC 27853). Padronizou-se a suspensão de bactérias com auxílio de espectrofotômetro (Biospectro Espectrofotômetro Sp-220) a 600nm para uma densidade ótica de 0,7. Após padronização, as bactérias foram semeadas em placas de ágar nutriente incubadas a 37°C por 48 h. Em seguida, semeou-se as bactérias testadas com *swab* na superfície da placa de Petri com 150 x 15 mm com ágar Mueller-Hinton.

Em condições assépticas foram removidos discos com 14 mm de diâmetro do ágar YPD com as leveduras cultivadas. Esses discos foram distribuídos sobre a superfície da placa de Petri com 150 x 15 mm com ágar Mueller-Hinton previamente semeada com as bactérias teste, sendo a seguir incubadas a 37°C por 24 horas. Cada tratamento foi realizado em duplicata. A interpretação dos resultados foi realizada após incubação, pelo surgimento ou não de halos de inibição, indicando o efeito inibitório de um micro-organismo sobre o outro. Os diâmetros de zonas de inibição do crescimento em torno das placas de ágar foram medidos e para interpretação dos resultados foi utilizado o valor  $P_z$  (a/b) que é expresso pela razão entre o diâmetro do poço (a) e o diâmetro do poço mais o diâmetro do halo de precipitação em torno da área de proteólise (b). Essa atividade foi classificada em quatro categorias:  $P_z = 1,000$  não houve atividade antimicrobiana;  $P_z$  entre 0,999 a 0,7000 baixa atividade antimicrobiana;  $P_z$

entre 0,699 a 0,400 atividade moderada e Pz entre 0,399 a 0,100 atividade antimicrobiana elevada (RAMOS et al., 2015).

### **Tolerância a pH ácido e aos sais biliares**

Para a determinação da viabilidade e tolerância das cepas de leveduras as condições do intestino de *L. vannamei* que tem valores de pH 7,0 (ALEXANDRE et al., 2014). Realizou-se o teste com valores de pH variáveis (2,0; 7,0 e 7,0 com sais biliares).

Foram realizadas suspensões de cada uma das cepas isoladas (C2B, C2D e C9) em água peptonada para obter a concentração de  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  utilizando uma câmara de Neubauer, seguindo a proposta de Van Der et al. (2005), com algumas modificações. Logo em seguida, 100  $\mu\text{L}$  desta solução foram adicionados a 900  $\mu\text{L}$  de caldo YPD ajustado a pH 2,0 pela adição de ácido clorídrico PA. As soluções contendo os inóculos foram submetidas a agitação constante de 150 rpm em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab®) com temperatura da sala mantida em torno de  $\pm 30^\circ\text{C}$ . Os cultivos foram recolhidos nos tempos: zero (controle), quatro, oito e 12 horas para retirada de alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  e contagem de células viáveis pela diluição decimal e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 24h a  $37^\circ\text{C}$  e o ensaio foi realizado em duplicata.

O caldo YPD suplementado com bile de boi a 0,5% (Sigma – Aldrich®) foi ajustado para pH 7,0 (pela adição de solução de hidróxido de sódio 1M). Ao final dos diferentes tempos de incubação: zero (controle) quatro, oito e 12 horas, foram retiradas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  para a contagem de células viáveis pela diluição decimal e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 24h a  $37^\circ\text{C}$  e o ensaio foi realizado em duplicata.

Controles do teste de tolerância a pH foram realizados submetendo-se cada cepa ao mesmo procedimento descrito anteriormente, porém com inoculação em caldo YPD com pH 7,0 e sem acréscimo da bile de boi.

### **Ensaio de adsorção de AFB<sub>1</sub>**

O ensaio de adsorção de AFB<sub>1</sub> foi realizado de acordo com Bueno et al. (2007) e Poloni et al. (2015), com modificações. A solução inicial de AFB<sub>1</sub> utilizada no ensaio foi ressuspensa em acetonitrila a partir de um extrato seco do núcleo de AFB<sub>1</sub>. Soluções estoques de AFB<sub>1</sub> (25 e 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram preparados em PBS (pH 2,0 e 7,0). As leveduras utilizadas no ensaio foram

previamente preparadas em caldo YPD e logo após 48 horas, o seu crescimento foram padronizadas com o auxílio da câmara de Neubauer em  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Em seguida, alíquotas de 1,0 mL desta solução foram transferidas para microtubos, submetidos a centrifugação durante 15 min a 5000 rpm à temperatura ambiente. Logo após, foram lavados com água destilada e submetidos novamente a centrifugação. Foram adicionados 1,0 mL da solução de PBS pH 2,0 contendo AFB<sub>1</sub>, e incubados a 30°C por 30 minutos e agitados manualmente. Em seguida, foram centrifugados e os *pellets* adicionados à 1,0 mL de PBS em pH 7,0 contendo AFB<sub>1</sub> nas concentrações testadas (25 e 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Os microtubos foram incubados 30°C por 60 minutos por e submetidos a agitação manual a cada cinco minutos. Após este período, as células foram sedimentadas por centrifugação durante 15 min a 5000 rpm à temperatura ambiente, e o sobrenadante contendo micotoxinas não ligadas foi recolhido e armazenado para análise do percentual de adsorção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os controles positivos (somente AFB<sub>1</sub>) e controles negativos (somente PBS) foram incluídos no ensaio. O experimento foi conduzido em duplicata.

Para a detecção e quantificação de AFB<sub>1</sub>, utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Detector de fluorescência RF-10AXL-SHIMADZU), com excitação e emissão de  $\lambda$  360 nm e 440 nm, respectivamente e com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  (TRUCKSESS et al., 1994), equipado com coluna de fase reversa de sílica gel C18 (coluna SHIM-PACK VP-ODS 150 x 4,6 mm com tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ ). Para análise, utilizou-se uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra, que foi acrescida de 350  $\mu\text{L}$  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  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A curva analítica da aflatoxina foi realizada por medição das áreas e sua interpolação a uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de padrão de AFB<sub>1</sub>, dissolvida em acetonitrila, de onde foram extraídos os limites de detecção a 0,4  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  e limite de quantificação a 1,2  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  da técnica. As quantificações de AFB<sub>1</sub> adsorvidas foram estabelecidas por meio da correlação entre as áreas dos picos das amostras e da curva padrão. Para o cálculo dos percentuais de adsorção, utilizou-se a seguinte fórmula:

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



## Análise Estatística

Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (três cepas de leveduras; quatro tempos de viabilidade/quatro cepas de bactérias patogênicas) com duas repetições por tratamento, para os testes de viabilidade, coagregação e atividade antimicrobiana. Para o teste de adsorção foi utilizado um esquema fatorial 3x2 (três cepas de leveduras; duas concentrações de AFB<sub>1</sub>), com duas repetições por tratamento. As contagens de colônias obtidas no teste de viabilidade às condições gastrointestinais 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 (coagregação, viabilidade e adsorção de AFB<sub>1</sub>) foram analisados segundo os procedimentos do software SAS® University Edition, e submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento PROC GLM e comparação de médias na análise dos parâmetros foi realizada utilizando o teste de comparação de médias de Tukey considerando-se um nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição homóloga permite que cepas diferentes possam ser utilizadas em conjunto para atuarem como probióticas (DE ANGELIS et al., 2006). Esse ensaio com as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *L. vannamei*, demonstrou que elas se desenvolveram naturalmente entre as estrias nas placas sem inibição entre elas. Outras cepas de *S. cerevisiae* isoladas em ambiente de piscicultura cultivadas *in vitro* (PINHEIRO et al., 2020) também tiveram comportamento semelhante de inibição homóloga. Dessa forma, cepas de *S. cerevisiae* podem ser utilizadas individualmente ou em conjunto quando não apresentarem inibição entre si.

O atributo autoagregação refere-se à capacidade que a levedura tem para aderir às células epiteliais da mucosa gastrointestinal (NEWAJ-FYZUL et al., 2014), representando uma característica desejável para espécies probióticas (MUZZOLÓN, 2010). Os resultados da autoagregação das cepas de *S. cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *L. vannamei* estão expressos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Percentual da capacidade auto-agregativas das cepas de *S. cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *L. vannamei*

Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Autoagregação (%)	Escore de Agregação <sup>1</sup>	CV (%)
<b>C2B</b>	70,4 <sup>a</sup> ± 5,8	+	8,19
<b>C2D</b>	70,3 <sup>a</sup> ± 8,4	+	11,93
<b>C9</b>	50,4 <sup>b</sup> ± 0,2	-	0,36

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>(-): agregação  $\leq 60$ , (+): agregação  $> 60$  e  $< 80$ , (++): agregação  $\geq 80$ . Dados da autoagregação expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Observa-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as cepas de *S. cerevisiae* quanto a capacidade de autoagregação (tabela 3), com destaque para as cepas C2B e C2D. Essa capacidade pode variar conforme a cepa e o local em que foram isoladas, por exemplo: cepas de levedura seca de cervejaria e de ambiente de piscicultura com valores entre 76,0% e 87,1% (PINHEIRO et al., 2020); silagem de milho e de intestino de suínos 85,3% a 97,9% (ARMANDO et al., 2011), alimentos para frangos entre 68,4 e 84,7% (PIZZOLITTO et al., 2012) e alimentos fermentados entre 81,2 e 91,9% (OGUNREMI et al., 2015). Dessa forma, os percentuais de autoagregação obtidos (tabela 1) indicam que nem todas as cepas de *S. cerevisiae* possuem capacidade de autoagregação.

A capacidade dos micro-organismos probióticos em coagregarem com bactérias patogênicas favorece a prevenção de enfermidades principalmente pela formação de uma barreira que dificulta a adesão das células microbianas patogênicas no lúmen intestinal (COLLADO et al., 2008; BINETTI et al., 2013; ABBASILIASI et al., 2017). Os resultados obtidos para avaliação da capacidade coagregativa das cepas de *S. cerevisiae* estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados de coagregação bacteriana e do percentual da capacidade coagregativa entre as cepas *S. cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *L. vannamei* e as cepas de bactérias patogênicas testadas

bactérias testadas	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	C2B	C2D	C9
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	24,1 <sup>bA</sup> ± 4,5	34,2 <sup>aA</sup> ± 2,2	34,0 <sup>aA</sup> ± 0,1
<i>Streptococcus agalactie</i>	35,8 <sup>abA</sup> ± 4,5	40,2 <sup>aA</sup> ± 2,3	32,1 <sup>aA</sup> ± 0,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	50,7 <sup>aA</sup> ± 4,5	40,8 <sup>aA</sup> ± 4,7	37,2 <sup>aA</sup> ± 0,1
<i>Escherichia coli</i>	40,0 <sup>abA</sup> ± 3,6	23,0 <sup>aA</sup> ± 2,8	38,9 <sup>aA</sup> ± 0,3
Escore	+++	++	++

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (P = 0,019). Dados expressos em média ± desvio padrão.

Todas as cepas de *Saccharomyces* isoladas da microbiota intestinal de *L. vannamei* apresentaram 3+ como escore qualitativo de coagregação com as bactérias patogênicas testadas, e percentuais de coagregação superiores a 23%. De um modo geral, as cepas testadas tiveram resultados coagregativos semelhantes (P<0,05) com bactérias patogênicas, entretanto pode-se verificar que a cepa C2B não teve boa capacidade de agregação para *Aeromonas hydrophyla*, quanto foi para o *Staphylococcus aureus*. Pinheiro et al. (2020) também observaram que cepas de *Saccharomyces cerevisiae* possuíam capacidades de coagregação diferentes com os seguintes percentuais: 45,7% *Escherichia coli*, 42,0% *Staphylococcus aureus* e 59,5% *Pseudomonas* spp. Pizzolito et al. (2012) em pesquisa com cepas de *S. cerevisiae* obtiveram 1,2% a 14,9% para *Escherichia coli* e 25,3 a 36,0% para *Staphylococcus aureus*. Estes resultados sugerem que a habilidade para coagregar das leveduras está relacionada com a sua competência para estabelecer ligações com micro-organismos, por esse motivo, a capacidade coagregativa da *Saccharomyces cerevisiae* pode variar conforme suas características individuais, espécie bacteriana testada e linhagem.

Pode-se observar na tabela 5, que as cepas de *Saccharomyces* testadas demonstraram capacidade semelhante (P = 0,667) para inibir o crescimento dos patógenos utilizados no ensaio. Entretanto, o índice Pz demonstrou que a atividade antagonista foi diferente conforme a cepa de *Saccharomyces* utilizada e o patógeno testado. Sendo a C9 a única que apresentou atividade antimicrobiana moderada para todas as bactérias testadas (Tabela 5). A cepa de *S. cerevisiae*

*var. boulardii* testada por Rajkowska et al. (2012) só apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. No entanto, essa mesma espécie demonstrou efeito inibitório quando foi testada contra *Salmonella* spp. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. (PINHEIRO et al., 2020) e *Escherichia coli* (ARMANDO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2020) *Salmonella* entérica e *Enterobacter cloacae* (ARMANDO et al., 2011). O antagonismo observado nas cepas *S. cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal do *L. vannamei* demonstra a capacidade de inibição dos patógenos testados.

**Tabela 5.** Atividade antimicrobiana (Índice Pz) das cepas *S. cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *L. vannamei* sobre as cepas de bactérias patogênicas testadas

Bactérias testadas	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	C2B	C2D	C9
<i>E. Aeromonas hydrophyla</i>	0,413 <sup>a</sup>	0,412 <sup>a</sup>	0,384 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,368 <sup>a</sup>	0,379 <sup>a</sup>	0,373 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,417 <sup>a</sup>	0,413 <sup>a</sup>	0,373 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	0,384 <sup>a</sup>	0,384 <sup>a</sup>	0,395 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (P = 0,667). Interpretação do índice Pz: = 1,000 não houve atividade antimicrobiana; de 0,999 a 0,7000 baixa atividade antimicrobiana; de 0,699 a 0,400 atividade moderada e de 0,399 a 0,100 atividade antimicrobiana elevada.

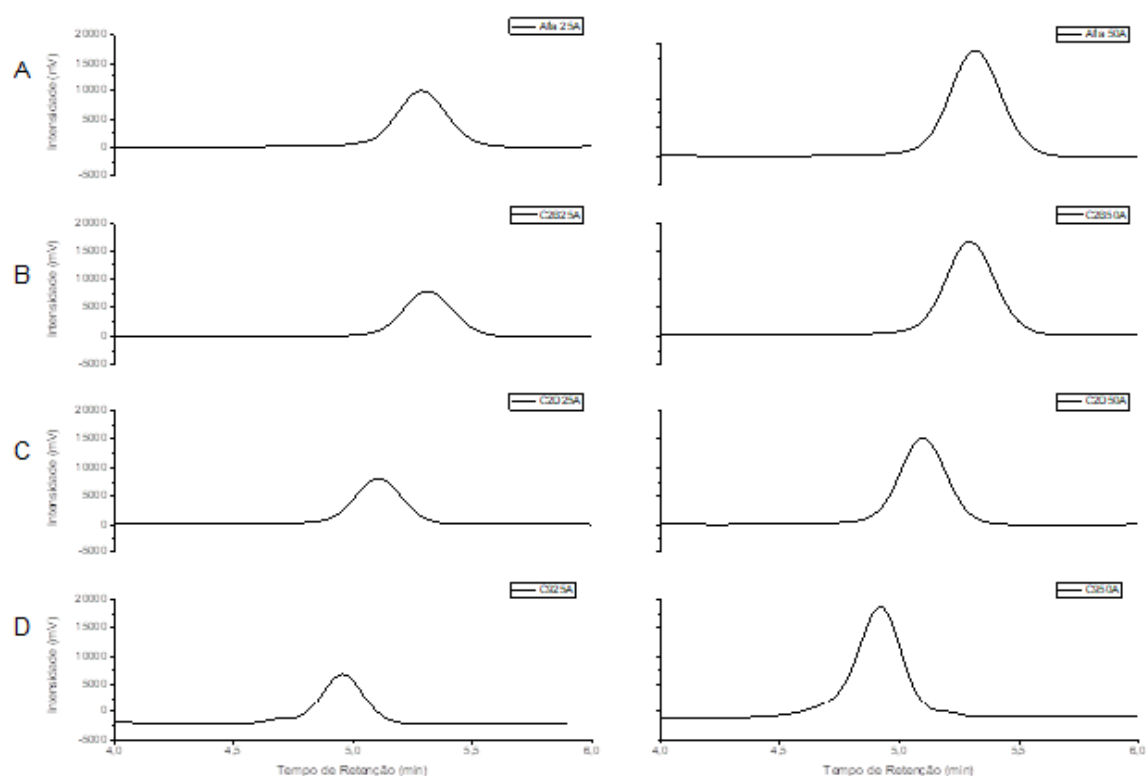
Para que um micro-organismo seja considerado probiótico deve ser capaz de suportar diferentes valores de pH, enzimas digestivas e sais biliares durante a passagem pelo trato gastrointestinal (BANERJEE; RAY, 2017; GUEIMONDE; SALMINEN, 2006), sendo capaz de se estabelecer, multiplicar-se e colonizar o epitélio de revestimento do intestino do hospedeiro (NAYAK, 2010). Dessa forma, a *Saccharomyces cerevisiae* tem sido largamente empregada como probiótico por conseguir sobreviver em testes simulados *in vitro* (ARMANDO et al., 2011; DOGI et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2012; POLONI et al., 2017; PINHEIRO et al., 2020). No teste *in vitro*, as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de permanecer viáveis em pH 7,0 que é semelhante ao do trato gastrointestinal do *L. vannamei* conforme indica Alexandre et al. (2014). Após 12 horas de incubação em pH 7,0 (controle) todas as cepas aumentaram significativamente a contagem (TABELA 6), o aumento inicial ocorreu a partir de quatro horas de incubação. A presença da bile em pH testados teve desempenho semelhante com as incubadas no controle. Com pH 2,0 as cepas permaneceram viáveis durante o tempo de cultivo.

**Tabela 6.** Teste da viabilidade das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* quanto ao pH e presença de sais biliares

Cepas de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	pH	Tempo (Horas)			
		(UFC.mL em log)			
		0	4	8	12
<b>C2B</b>	7,0 (Controle)	7,39 <sup>b</sup> ± 0,13	8,33 <sup>ab</sup> ± 0,04	8,63 <sup>ab</sup> ± 0,12	8,84 <sup>a</sup> ± 0,02
<b>C2D</b>		7,22 <sup>b</sup> ± 0,32	9,54 <sup>a</sup> ± 0,51	8,77 <sup>a</sup> ± 0,04	8,92 <sup>a</sup> ± 0,09
<b>C9</b>		7,35 <sup>b</sup> ± 0,76	8,11 <sup>ab</sup> ± 0,02	8,72 <sup>ab</sup> ± 0,08	8,98 <sup>a</sup> ± 0,13
<b>C2B</b>	7,0 (Bile)	7,67 <sup>a</sup> ± 0,10	8,52 <sup>a</sup> ± 0,08	8,81 <sup>a</sup> ± 0,13	8,80 <sup>a</sup> ± 0,01
<b>C2D</b>		7,11 <sup>b</sup> ± 0,59	7,94 <sup>ab</sup> ± 0,05	8,99 <sup>a</sup> ± 0,03	8,87 <sup>a</sup> ± 0,10
<b>C9</b>		7,73 <sup>b</sup> ± 0,27	8,00 <sup>ab</sup> ± 0,13	8,61 <sup>ab</sup> ± 0,22	8,94 <sup>a</sup> ± 0,11
<b>C2B</b>	2,0	7,99 <sup>a</sup> ± 0,58	7,39 <sup>a</sup> ± 0,01	7,64 <sup>a</sup> ± 0,90	7,46 <sup>a</sup> ± 0,08
<b>C2D</b>		7,57 <sup>a</sup> ± 0,03	7,61 <sup>a</sup> ± 0,13	7,33 <sup>a</sup> ± 0,09	7,86 <sup>a</sup> ± 0,13
<b>C9</b>		7,74 <sup>a</sup> ± 0,05	7,43 <sup>a</sup> ± 0,04	7,75 <sup>a</sup> ± 0,01	7,80 <sup>a</sup> ± 0,01

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Contagens de células viáveis (UFC/mL em log). Dados expressos em média ± desvio padrão.

As cepas de *S. cerevisiae* testadas foram capazes de adsorver 25 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> de formas semelhantes. Porém, a cepa C9 teve adsorção com concentração de 25 ng mL<sup>-1</sup> de aflatoxina AFB<sub>1</sub> testada (figura 1 e tabela 7).



**Figura 1.** Cromatograma referente a adsorção de AFB<sub>1</sub> das três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* (A - Controle aflatoxina B<sub>1</sub>; B - cepa C2B; C - cepa C2D; D - cepa C9).

**Tabela 7.** Adsorção de AFB<sub>1</sub> pelas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei*

Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AFB <sub>1</sub> Adsorvida <sup>1</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )			
	25 ng mL <sup>-1</sup>		50 ng mL <sup>-1</sup>	
	( $\bar{X} \pm DP$ )	%	( $\bar{X} \pm DP$ )	%
<b>C2B</b>	2,08 <sup>a</sup> ± 0,94	28,59	3,11 <sup>a</sup> ± 3,58	24,08
<b>C2D</b>	4,85 <sup>a</sup> ± 2,17	39,76	9,54 <sup>a</sup> ± 1,31	35,79
<b>C9</b>	12,50 <sup>a</sup> ± 0,30	70,61	11,87 <sup>a</sup> ± 0,51	40,04

$\bar{X}$ : média, DP: desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (p<0,01).

A escolha de micro-organismos probióticos para incluir na dieta será mais eficiente se eles também tiverem capacidade para adsorver aflatoxina B<sub>1</sub>. Desse modo, favorecerão a redução do impacto das micotoxinas presentes na ração sobre o desempenho dos animais (PIZZOLITTO et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015).

Na tabela 8 estão resumidos os resultados de autores que também utilizaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de várias origens para o teste de adsorção de aflatoxina B<sub>1</sub> com 25 e 50 ng.mL<sup>-1</sup>. Pode-se verificar que o percentual de adsorção pode variar conforme a origem da cepa e a concentração de aflatoxina utilizada. Essas variações observadas nos relatos dos autores citados também foram verificadas nas cepas isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* (tabela 7).

**Tabela 8.** Resultados dos testes de adsorção de aflatoxina B<sub>1</sub> realizados com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de ambientes diversos por outros autores

<b>Autores</b>	<b>Origem da <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>Cepa</b>	<b>AFB1 (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Adsorção de AFB<sub>1</sub> (%)</b>
Pinheiro et al. (2020)	Levedura de cervejaria	RC1	25	4,7
		RC3	25	15,2
	Ambiente de piscicultura	A8L2	25	19,8
Pizzolitto et al. (2012)	Fezes de granjas avícolas:	01	50	38,6
		03	50	46,6
		05	50	33,4%
		08	50	46,4
Armando et al. (2011)	Ração	RC008	50	67,6
		RC009	50	16,4
		RC0012	50	29,6
	Intestino de suíno	RC0016	50	82,0

Apesar dessas cepas testadas terem sido isoladas de camarões que habitavam o mesmo viveiro, elas apresentaram desempenho variado para adsorver AFB<sub>1</sub>, conforme as concentrações utilizadas. Entretanto, isso pode ter ocorrido devido a composição da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* que consiste principalmente de proteínas, lipídios e polissacarídeos, glucanos e mananos. (VILA-DONAT et al., 2018). Essa parede celular permite diferentes mecanismos de ligação (de hidrogênio, interações iônicas ou hidrofóbicas e pode

exibir uma grande variedade de locais de adsorção de micotoxinas (RINGOT et al., 2007). A adsorção ocorre graças a reações enzimáticas de hidroxilação, de epoxilação ou de acetilação. Os produtos à base de parede de leveduras, mesmo possuindo constituição básica semelhante, são diferentes e podem variar quanto à capacidade de adsorção, por isso devem ser testados individualmente (MALLMANN et al., 2006).

A parede celular da *S. cerevisiae* também demonstrou uma capacidade de adsorção frente a uma ampla variedade de micotoxinas, como: aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona, isso ocorre por possuírem glucomananas esterificadas, que são eficazes na neutralização dos efeitos tóxicos e capazes de ligar-se eficientemente a diferentes micotoxinas (ARAVIND et al., 2003; SANTIN et al., 2003; AVANTAGGIATO et al., 2005; SHETTY; PRATHA; JESPERSEN, 2006; LI et al., 2012; MOHAGHEGH et al., 2017). A parede celular da *S. cerevisiae* pode esclarecer o fato de que apesar de possuírem as mesmas características da espécie, e tenham sido isoladas do mesmo ambiente de cultivo, elas comportaram de forma diferente em relação a adsorção de AFB<sub>1</sub> nas concentrações de 25 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup>.

Sendo assim, de acordo com os resultados observou-se que as cepas de *S. cerevisiae* testadas possuem características desejáveis para atuarem como probióticos quanto a capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>. Entretanto, a cepa C9 apresentou melhor desempenho nos testes de atividade antimicrobiana, viabilidade em pH e na adsorção da AFB<sub>1</sub> do que as demais, porém não teve a melhor eficiência quanto à capacidade autoagregativa. Desse modo, das três cepas testadas foi a que teria melhor desempenho como probiótico em rações para camarões. A inclusão dessa cepa em dietas para camarões pode reduzir a quantidade de AFB<sub>1</sub> em rações, além de provavelmente melhorar a sanidade e redução da quantidade de AFB<sub>1</sub> por adsorção. No entanto, estudos *in vivo* com estas leveduras devem ser conduzidos para uma melhor avaliação do seu uso na carcinicultura.

## CONCLUSÃO

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB<sub>1</sub> em testes *in vitro*.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos.



## REFERÊNCIAS

- ABBASILIASI, S.; TAN, J.S.; BASHOKOUH, F.; IBRAHIM, T.A.T.; MUSTAFA, S.; VAKHSHITEH, F.; SIVASAMBOO, S.; ARIFF, A.B. In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 121, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1000-z>. Acesso em: 05 abr. 2019.
- ALEXANDRE, D.; OZÓRIO, R.A.; DERNERC, R.B.; FRACALOSSIC, D.M.; OLIVEIRA, G.B. SAMUELS, R.I.; TERRA, W.R.; SILVA, C.P. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 172–173, n. 90–95, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.04.010>. Acesso em: 21 fev. 2029
- ANATER, A.; MANYES, L.; MECA, G.; FERRER, E.; LUCIANO, F.B.; PIMPÃO, C.T.; FONT, G. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 451, p. 1–10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.022>. Acesso em: 05 out. 2019.
- ARAVIND, K.L.; PATIL, V.S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE S.P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 571–576, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.571>. Acesso em: 05 abr. 2019.
- ARMANDO, M.; DOGI, C.; PIZZOLITTO, R.; ESCOBAR, F.; PEIRANO, M.; SALVANO, M.; SABINI, L.; COMBINA, M.; DALCERO, A.; CAVAGLIERI, L. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin Journal**. v. 4, n.1, p. 59–68, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1208>. Acesso em: 05 abr. 2019.
- AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Addit Contam**, v. 22, n. 4, p. 379–388, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500058312>. Acesso em: 08 dez. 2019.

- BANERJEE, G.; RAY, A.K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Review Article. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 66-77, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>. Acesso em: 08 dez. 2019.
- BINETTI, A.; CARRASCO, M.; REINHEIMER, J.; SUÁREZ, V. Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 434–444, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12228>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- BUENO, D.J.; CASALE, C.H.; PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2148-2154, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.9.2148>. Acesso em: 06 mar. 2019.
- BULLERMAN L.B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 140–146, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>. Acesso em: 06 fev. 2019.
- CARDOSO FILHO, F.C.; MURATORI, M.C.S. Ração, fungos e micotoxinas – Revisão. **Nutritime**, v. 8, n. 6, p.1619-1623, 2011.
- CARUFFO, M.; NAVARRETE, N., SALGADO, O.; DÍAZ, A.; LÓPEZ, P.; GARCÍA, K.; FEIJÓO, C.G.; NAVARRETE, P. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. **Frontiers Microbiology**, v. 6, n. 1093, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093>. Acesso em: 06 fev. 2019.
- CISAR, J.O.; KOLENBRANDER, P.E.; MCINTIRE, F.C. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. **Infection and Immunity**, v. 24, p. 742-752, 1979.
- COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065–1073, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093>. Acesso em: 15 fev. 2019.
- DE ANGELIS, M.; SIRACUSA, S.; BERLOCO, M.; CAPUTO, L.; SETTANNI, L.; ALFONSO, G.; AMERIO, M.; GRANDE, A.; RAGNI, A.; GOBBETTI, M. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding.

**Research in Microbiology**, v. 157, n. 8, p. 792–801, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.05.003>. Acesso em: 15 fev. 2019.

DOGI, C.A.; ARMANDO, R.; LUDUEÑA, R.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A.; CAVAGLIERI, L. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 28, n. 12, p.1705–1711, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.605771>.

Acesso em: 15 fev. 2019.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. New method for selecting and evaluating probiotics.

**Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. 242–247, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60003-6) Acesso em: 15 fev. 2019.

HANDLEY, P.S.; HARTY, D.W.S.; WYATT, J.E.; BROWN, C.R.; DORAN, J.P.; GIBBS, A.C.C. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. **The Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 3207–3217, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-133-11-3207>. Acesso em: 15 fev. 2019.

KELLER, L.; ABRUNHOSA, L.; KELLER, K.; ROSA, C.A.; CAVAGLIERI, L.;

VENÂNCIO, A. Zearalenone and Its Derivatives  $\alpha$ -Zearalenol and  $\beta$ -Zearalenol

Decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. **Toxins**, v. 7, p. 3297-3308, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins7083297>. Acesso em: 12 fev. 2019.

KOS, B.; SUSKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIĆ, S.

Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981–987, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>. Acesso em: 12 fev. 2019.

LI, Z.; YANG, Z.B.; YANG, W.R.; WANG, S.J.; JIANG, S.Z.; WU, Y.B. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins with or without yeast cell wall adsorbent on organ weight, serum biochemistry, and immunological parameters of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, n.10, p. 2487–2495, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02437>. Acesso em: 12 fev. 2019.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.Z.; RAUBER, R.H. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Santos. **Anais... Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213–224, 2006.

MATEJOVA, I.; SVOBODOVA, Z.; VAKULA, J.; MAREŠ, J.; MODRÁ, H. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186–200, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jwas.12371>. Acesso em: 12 fev. 2019.

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

MÍDIO, A.F.; MARTINS, D.I. Toxicologia de alimentos. São Paulo: **Varela**, 295 p., 2000.

MOHAGHEGH, A.; CHAMANI, M.; SHIVAZAD, M.; SADEGHI, A.A.; AFZALI, N. Effect of esterified glucomannan on broilers exposed to natural mycotoxin-contaminated diets. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 285-291, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1174122>. Acesso em: 21 mar. 2019.

MUZZOLÓN, J. **Uso de bacterias lácticas y/o levaduras en la prevención de aflatoxicosis en animales de compañía**. Trabajo final para optar al título de Microbióloga (2010). Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Rio Cuarto. 2010.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, ed. 11, p. 1553-1573, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>. Acesso em: 04 jul. 2019.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A.H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 1–11, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>. Acesso em: 21 nov. 2019.

OGUNREMI, O.R.; SANNI, A.I.; AGRAWAL, R. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 797-808, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12875>. Acesso em: 21 nov. 2019.

PEREYRA, C.M.; CAVAGLIERIL, 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. DOI:

<https://doi.org/10.4061/2010/569108>. Acesso em: 21 nov 2019.

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.

DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201400833>. Acesso em: 12 fev 2019.

PINHEIRO, R.E.E.; RODRIGUES, A.M.D.; LIMA, C.E.; SANTOS, J.T.O.; PEREYRA, C.M.; TORRES, A.M.; CAVAGLIERIL, R.; LOPES, J.B.; MURATORI M.C.S.

*Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic and a possible aflatoxina B1 adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11280>. Acesso em: 21 fev. 2021.

PINHEIRO, R.E.E.; PEREYRA, C.M.; NEVES, J.A.; CALVET, R.M.; SANTOS, J.T.O.; LIMA, C.E.; ALVES, V.C.; PEREIRA, M.M.G.; MURATORI, M.C.S. Avaliação *in vitro* da adsorção de aflatoxina B1 por produtos comerciais utilizados na alimentação animal.

**Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, e0072015, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000072015>. Acesso em: 21 nov. 2019.

PIZZOLITTO, R.P.; ARMANDO, M.R.; COMBINA, M.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; SALVANO, M.A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 47, p. 933–941, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1080/03601234.2012.706558>. Acesso em 12 fev. 2019.

PIZZOLITTO, R.P.; BUENO, D.J.; ARMANDO, M.R.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; SALVANO, M.A. Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. In: GUEVARA-GONZALEZ, R. G. **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**, p. 323-346, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5772/23717>. Acesso em: 12 fev. 2019.

POLONI, V.; DOGI, C.; PEREYRA, C.M.; JURI, M.G.F.; KOHLER, P.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. 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 Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 32, n. 6, p. 970-976, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1024761>. Acesso em: 06 fev. 2019.

POLONI, V.; SALVATO, L.; PEREYRA, C.; OLIVEIRA, A.; ROSA, C.; CAVAGLIERI, L.; KELLER, K. M. Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces cerevisiae* strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibioticresistance properties for use in animal production. **Food and Chemical Toxicology**, n. 107, 630e636631, p. 630-636, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.040>. Acesso em: 06 fev. 2019.

RAHAIE, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; RAZAVI, S.H.; MAZAHERI, M. 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, n. 8, p. 1647–1653, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03015.x>. Acesso em: 06 fev. 2019.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; RYGALA, A. Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* against human pathogens. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 230-236, 2012.

RAMOS, L.S.; BARBEDO, L.S.; BRAGA-SILVA, L.A.; SANTOS, A.L.S.; PINTO, M.R.; SGARBI D.B.G. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n.2, p. 122-5, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.003>. Acesso em: 06 fev. 2019.

RIBEIRO, C.L.N.; BARRETO, S.L.T.; HANNAS M.I. Micotoxinas encontradas em rações e alimentos utilizados na produção comercial de aves no Brasil. **Nutritime**, v. 12, n. 1, p. 3910–3924, 2015.

RINGOT, D.; LERZY, B.; CAPELÃO, K.; BONHOURE, J.P.; AUCLAIR, E.; LARONDELLE, Y. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. **Bioresource Technology**, v. 98, p.1812-1821, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.015>. Acesso em: 06 fev. 2019.

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>. Acesso em: 06 fev. 2019.

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

SHETTY, H.; PRATHAP, K.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 48-55, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.004>. Acesso em: 06 fev. 2019.

SILVA, A.F.C.; FONSECA, J.R.S.; CARVALHO, K.V.; VIEIRA, R.A.R.; FREITAS, K.F.S.; CASTRO, V.S.; SIGNOR, A.A.; SIGNOR, A.; FEIDEN, A. Inclusion of probiotic additives in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effects on performance, hematological, hepatic and intestinal parameters. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e38210817568, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17568> . Acesso em: 18 out. 2021.

SILVA, V.V. **Influência do probiótico em aspectos do crescimento de camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879)**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura e Pesca) Instituto de Pesca. São Paulo Julho, p. 48. 2020.

STRUS, M. Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB) na wybrane, chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe [A new method for evaluation of the antagonistic action of bacterial lactic acid (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria]. **Medycyna doświadczeniowa i mikrobiologia**, v. 50, n. 1-2, p. 123–130, 1998.

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.

VAN DER, A.A.; KUHLE, A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n.

1, p. 29-39, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039>. Acesso em: 06 fev. 2019

VILA-DONAT, P.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 246–259, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>. Acesso em: 06 fev. 2019.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aquicultura atualmente desenvolve-se focada em um gerenciamento de cultivo mais proativo. Nesse contexto, o uso de probióticos e seus benefícios têm se demonstrado como uma promissora ferramenta profilática para a gestão da saúde dos animais, qualidade ambiental e da sustentabilidade da atividade econômica. Porém, ainda existem poucos relatos sobre a diversidade microbiana nos ambientes aquícolas, necessitando de pesquisas que permitam a caracterização de micro-organismos do seu habitat e que possuam ação probiótica para a utilização destes como aditivos naturais na sua alimentação.

Portanto, a aplicação de probióticos na alimentação pode modular o sistema imune de animais aquáticos. Os estudos sobre leveduras com ação probiótica dependem de uma coleta de informações, que vão desde o isolamento, seleção de cepas, das características fisiológicas, das propriedades probióticas, da capacidade de inibição de patógenos e da ausência de patogenicidade. Os micro-organismos devem ser de linhagens puras, corretamente identificadas, seguras e não patogênicas à aquicultura e ao homem, não resistentes a antibióticos e estarem em concentrações adequadas para atingir os resultados almejados.

Sendo assim, a utilização de cepas de leveduras provenientes de animais aquáticos, que possuam a capacidade de detoxificação biológica é alternativa significativa para a redução dos níveis de micotoxinas na aquicultura. Desde modo, a atuação desses compostos que sequestram as toxinas no trato gastrointestinal e reduzem a biodisponibilidade destas, podem propiciar melhorias no cultivo.

Com base nos resultados dos testes *in vitro* desta pesquisa, constatou-se que as cepas de leveduras testadas possuem características desejáveis para atuarem como probióticos e capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>. Nesse sentido, ressalta-se que as avaliações *in vitro* simulando as condições presentes nos animais não inibem a necessidade de corroborar sua efetividade *in vivo*. É importante dar continuidade a esse tipo de investigação em busca de resultados mais eficazes que permitam melhorias no desempenho e sanidade dos animais aquáticos. Estudos desenvolvidos nesta temática são cada vez mais necessários para complementar e apoiar de forma significativa os avanços na nutrição animal e melhorar nossa compreensão do papel benéfico das leveduras na descontaminação de micotoxinas em alimentos.

## REFERÊNCIAS

- ALGÜL, I.; KARA, D. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey. **Food Chemistry**, v. 157, p. 70-76, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.004>. Acesso em 06 dez. 2019.
- AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 326-333, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.017>. Acesso em 06 dez. 2019.
- BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin- contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00050-3). Acesso em 06 dez. 2019.
- BOONYARATPALI, M.; SUPAMATTAYA, K.;VERAKUNPIRIYA, V.; SUPRASERT, D. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Aquaculture Research**, v. 32, n. 1, p. 388-398. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00046.x>. Acesso em 01 mar. 2019.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09/11/88. Fixa padrões de tolerância para Aflatoxinas em alimentos para o consumo animal: matérias primas e rações, 1988. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, p.21.968, 09 nov. 1988. Seção I.
- BRASIL. Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Seção 1, p. 72.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>. Acesso em 01 mar. 2019.
- BULLERMAN, L.B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n. 1-2, p. 140-146, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>. Acesso em 01 mar. 2019.
- CALVET, R.M.; PEREIRA, M.M.G.; COSTA, A.P.R.; TORRES, A.M.; MURATORI, M.C.S. Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p.

1021-1026, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140583>. Acesso em: 01 mar. 2019.

CHELI, F.; PINOTTI, L.; CAMPAGNOLI, A.; FUSI, E.; REBUCCI, R.; BALDI, A. Mycotoxin analysis, mycotoxin-producing fungi assays and mycotoxin toxicity bioassays in food mycotoxin monitoring and surveillance. **Italian Journal of Food Science**, v. 20, n. 4, p. 447-462, 2008.

DEAK, T. Environmental factors influencing yeasts. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Germany: **Springer Berlin Heidelberg**, p. 155-174, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3\\_8](https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8). Acesso em: 12 nov. 2019.

DEFOIRD, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to Antibiotics for the Control of Bacterial Disease in Aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 51-58, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>. Acesso em: 01 mar. 2019.

DENG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, X.; SUN, L.; WU, C.; SHI, Q.; WANG, R. Effects of T-2 Toxin on Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, and Antioxidant Defenses and Capacity and Histopathology in the Hepatopancreas **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 29, p. 15–25, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/08997659.2016.1249577>. Acesso em: 01 mar. 2019.

EL-SAYED, Y.S.; KHALIL, R.H.; SAAD, T.T. Acute toxicity of ochratoxin-A in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 878-882, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.049>. Acesso em: 01 mar. 2019.

FACCA, M.C.L.; DALZOTO P.R. Aflatoxinas: um perfil da situação do amendoim e derivados no cenário brasileiro. **Biológico**, v. 72, n. 1, p. 25-29, 2010.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<https://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>> Acessado em: 01 mar. 2019.

FEIJÓ, R.G.; KAMIMURA, M.T.; OLIVEIRA-NETO, J.M.; VILA-NOVA, C.M.V.M.; GOMES, A.C.S.; COELHO, M.G.L.; VASCONCELOS, R.F.; GESTEIRA, T.C.V.; MARINS, L.F.; MAGGIONI, R. Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**,

v. 380–383, p. 1-5, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.026>. Acesso em: 12 fev. 2019.

FULLER, R. Probiotics in man and animal. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GATESOUBE, F.J.; AUBIN, J.; QUENTEL, C.; LABBÉ, L. Ofimer probiotic study on rainbow trout. IV. The settlement of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry submitted to probiotic treatment. In: HENDRY, C.I.; VAN STAPPEN, G.; WILLE, M.; SORGELOOS, P. (Eds.), Larvi 2005, 4th Fish and Shellfish Larviculture Symposium, 5–8 September 2005, Ghent University, Gent, Belgium. EAS Special Publication, **European Aquaculture Society**, v. 36, Oostende, Belgium, p. 180–183, 2005.

GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; MAGNOLI, C.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO A.M. Fungal and mycotoxin contamination of baled corn silage and isolation of AFB1 binding *S. cerevisiae* strains. **VI Congreso Argentino de Microbiología General**. Villa Carlos Paz, 921 Córdoba, Argentina, 2009.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of b-glucan and whole cell yeast. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 6, p. 884-892, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02368.x> Acesso em: 12 fev. 2019.

GOPINATH, R.; RAJ, R.P.; GEORGE, K.C.; SANIL, N.K. Ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B1 diets. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 1, p. 32–43, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02798.x>. Acesso em: 12 fev. 2019.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G.L.; SCAGLIONI, P.T.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L.A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJFSX11.009>. Acesso em: 12 fev. 2019.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p.1064-1068, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.042>. Acesso em: 12 fev. 2019.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática-SIDRA. Banco de tabelas estatísticas. Produção da aquicultura por tipo de produto. 2018. Disponível em < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

IBRAHEM, M.; FATHI, M.; IBRAHIM, M.; IBRAHIM, A. The Role of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) in Growth and Immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Its Resistance to Bacterial Infection. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v5n6p109>. Acesso em: 12 mar. 2019.

IDRIS, Y.M.A.; MARIOD, A.A.; ELNOUR, I.A.; MOHAMED, A.A. Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2539-2541, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.021>. Acesso em: 12 mar. 2019.

IMPERATO, R.; CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.L.; VENEZIANO, A.; RASTRELLI, L. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1905-1910, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.002>. Acesso em: 12 mar. 2019.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquiculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, p.1-14, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>. Acesso em: 12 mar. 2019.

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>. Acesso em: 12 mar. 2019.

KÖPPEN, R.; KOCH, M.; SIEGEL, D.; MERKEL, S.; MAUL, R.; NEHLS, I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1595-1612, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2535-1>. Acesso em: 12 mar. 2019.

KUMAR, R.; ANSARI, K.M.; SAXENA, N.; DWIVEDI, P.D.; JAIN, S.K.; DAS, M. Detection of Ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control**, v.

26, n. 1, p. 63-67, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.004>. Acesso em: 12 mar. 2019.

KUPSKI, L.; ALVES, C.L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase from *rhizopus* on ochratoxin A degradation. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 30-36, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5433/2316-5200.2013v2n4p30>. Acesso em: 12 mar.2019.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for the isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The Yeasts – a Taxonomic Study*, 5th edn, pp. 87–110. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout. **Amsterdam**: Elsevier, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0> Acesso em: 12 mar.2019.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. The Yeasts, a taxonomic study. 4th Ed. **Amsterdam**: Elsevier Science B.V., 1998.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. The Yeasts, a taxonomic study. 4th Ed. **Amsterdam**: Elsevier Science B.V. p. 21-30, 1998.

LAMARI, F.; SADOK, K.; BAKHROUF, A.; GATESOUBE, F.J. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemia nauplii*. **Aquaculture International**, v. 22, p. 699–709, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9699-5> Acesso em: 12 mar.2019.

LASRAM, S.; OUESLATI, S.; MLIKI, A.; GHORBEL, A.; SILAR, P.; CHEBIL, S. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, v. 25, n.1, p. 75-80, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.006> Acesso em: 12 mar. 2019.

LAVOVÁ, B.; URMINSKÁ, D. Total antioxidant activity of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 2. n. 1, p. 1927-1933, 2013.

LAZADO, C.C.; LACSAMANA, J.I.; CAIPANG, C.M.A. Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. **Research Signpost**, p. 89-114. 2015.

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M.R.; IQBAL, S.Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 3, p. 446-450, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.09.007>. Acesso em: 12 mar. 2019.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; KUMAR, V.; DEBOECK, G.; MOHANTA K.N. Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 405-430, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>. Acesso em: 12 mar. 2019.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x>. Acesso em: 12 mar. 2019.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, v. 41, n.242, p. 28-33. 2007.

NASCIMENTO, G.C.C.; CÓRDULA, E.B.L.; BENÍCIO, D.A.; OLIVEIRA, P.A.; SILVA, M.C.B.C. Recursos Pesqueiros no Brasil: Apropriação Tecnológica para o desenvolvimento sustentável. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 19, n. 3, p. 735-743, 2015. DOI: <https://doi.org/105902/2236117018122> Acesso em: 12 mar. 2019.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553-1573, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>. Acesso em: 21 mar. 2019.

NIMRAT, S.; TANUTPONGPALIN, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. Enhancement of Growth Performance, Digestive Enzyme Activities and Disease Resistance in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Postlarvae by Potential Probiotics. **Aquaculture International**, v. 21, n. 1, p. 655-666, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9600-y>. Acesso em: 21 mar. 2019.

PEREYRA, C.M.; CAVAGLIERIL, 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. DOI:

<https://doi.org/10.4061/2010/569108>. Acesso em: 21 mar. 2019.

PINHEIRO, R.E.E.; PEREYRA, C.M.; NEVES, J.A.; CALVET, R.M.; SANTOS, J.T.O.; LIMA, C.E.; ALVES, V.C.; PEREIRA, M.M.G.; Muratori, M.C.S. Avaliação in vitro da adsorção de aflatoxina B1 por produtos comerciais utilizados na alimentação animal.

**Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, e0072015, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000072015>. Acesso em: 21 mar. 2019.

POLÁKOVÁ, A.; ŠILLEROVÁ, S.; LAVOVÁ, B.; URMINSKÁ, D.; SZABOVÁ, E.

Copper, selenium supplemented yeast biomass - a source of microelements. **Chemické listy**, v.105, p. 1024, 2011.

QI, Z.; ZHANG, X.; BOON, N.; BOSSIER, P. Probiotics in aquaculture of China — Current state, problems and prospect. **Aquaculture**, v. 290, n. 1-2, p.15–21, 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.012>. Acesso em: 18 nov. 2019.

RAHAIE, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; RAZAVI, S.H.; MAZAHERI, M. 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, n. 8, p. 1647–1653, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03015.x> Acesso em: 18 nov. 2019.

ROCHA, I.P. Panorama da Carcinicultura: Desempenho, desafios e oportunidades.

**Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 17, n. 104, p. 26-31, 2007.

SÁNCHEZ-ORTIZ, A.C; ÂNGULO, C.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; ÁLVAREZ-RUIZ, P.; MAZÓN-SUÁSTEGUI, J.M.; CAMPA-CÓRDOVA, Á.I. Effect of mixed-*Bacillus* spp isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 59, p. 95–102, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.022>. Acesso em: 18 nov. 2019.

SANTOS, G.A.; RODRIGUES, I.; STARKL, V.; NAEHRER, K.; HOFSTETTER, U.;

ENCARNAÇÃO, P. Mycotoxins in aquaculture: Occurrence in feeds components and impact



on animal performance. *Avances en Nutrición Acuicola*, [S. l.], 2010. Disponível em: <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/118>. Acesso em: 19 dez. 2020.

SCHMIDT-HEYDT, M.; GRAF, E.; STOLL, D.; GEISEN, R. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 233-241, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.003>. Acesso em: 18 nov. 2019.

SHIN, K.S.; SHIN, Y.K.; YOON, J.H.; PARK, Y.H. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2167-2170, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2167>. Acesso em: 18 nov. 2019.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v. 35, p.421-463, 2012.

ŠILLEROVÁ, S.; URMINSKÁ, D.; POLÁKOVÁ, A.; LAVOVÁ, B.; SZABOVÁ, E. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a source of biogenic substances. **Chemické listy**, v. 105, p. 1029. 2011.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SPIER, M.R.; MEDEIROS, A.B.P.; YAMAGUISHI, C.T.; LINDNER, J.D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413–434, 2010.

STARMER, W.T.; LACHANCE, M.A. Yeast Ecology. **In: The Yeasts, a taxonomic study**. 5th Ed. Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. Elsevier: **Amsterdam** p. 65- 86, 2011.

SUSSEL, F. R.; VIEGAS, E.M.M.; PARISI, G. Acquacultura in Brasile. **Rev. II Pesce**, v. 2, p. 49-55, 2010.

TAPIA-SALAZAR, M.; GARCÍA-PÉREZ, O.D.; VELÁSQUEZ-SOTO, RA.; NIETO-LÓPEZ, MG.; VILLARREAL-CAVAZOS, D.; RICQUE-MARIE, D.; CRUZ-SUÁREZ, LE. Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin. **Ciencias**

**Marinas**, v. 38, n. 3, p. 491-504, 2012. DOI: <https://doi.org/10.7773/cm.v38i3.2094>. Acesso em: 18 nov. 2019.

TOLEDO, A.; CASTILLO, N.M.; CARRILLO, O.; ARENAL, A. Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. **Revista de Producción Animal**, v. 30, n. 2, p.57-71, 2018.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655–671, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1128/mubr.64.4.655-671.2000>. Acesso em: 18 nov. 2019.

VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J.L.P.; BUGLIONE, NETO, C.C.; SILVA, J.S.; SEIFFERT, W.Q.; SOARES, M.E.; VINATEA L.A. Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 203-207, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000500001>. Acesso em: 07 nov. 2019.

VILASBOA, A.; ALENCAR, A.S.; DUARTE, A.V.B.; TAVARES, C.; GUSMÃO, J. Haplotype-specific single-locus multiplex PCR assay for identification of Pacific and Atlantic white shrimps, exotic *Litopenaeus vannamei* and native *Litopenaeus schmitti*, along the coast of Brazil. **Conservation Genetics Resources**, v.12, p. 93–98, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1068-2>. Acesso em: 02 fev. 2021.

WASIELESKY, W.; KRUMMENAUER, D.; LARA, G.; FÓES, G.; POERSCH, L.; Cultivo de camarões em sistema de bioflocos: realidades e perspectivas. **Revista ABCC**, v.15, n. 2, 2013.

WASKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; BOCIANOWSKI, J.; GOLINSKI, P. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC – MS/MS method. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 426-431, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.006>. Acesso em: 01 mar. 2019.

ZORZETE, P.; REIS, T.A.; FELÍCIO, J.D.; BAQUIÃO, A.C.; MAKIMOTO, P.; CORRÊA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 957–964, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.053>. Acesso em: 01 mar. 2019.