

JOÃO FARIAS DE SOUSA JÚNIOR

**EFEITO DOS PROCESSOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* E  
POR EXTRUSÃO SOBRE *Saccharomyces cerevisiae* RELATIVO À VIABILIDADE,  
CAPACIDADE PROBIÓTICA E POTENCIAL ADSORVENTE *IN VITRO* DE  
AFLATOXINA B1 E OCRATOXINA A**

TERESINA - PI

2019

**EFEITO DOS PROCESSOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* E  
POR EXTRUSÃO SOBRE *Saccharomyces cerevisiae* RELATIVO À VIABILIDADE,  
CAPACIDADE PROBIÓTICA E POTENCIAL ADSORVENTE *IN VITRO* DE  
AFLATOXINA B1 E OCRATOXINA A**

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

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

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Serviço de Processamento Técnico

S725e Sousa Júnior, João Farias de.  
Efeito dos processos de microencapsulação por *Spray Druing* e por extrusão sobre *Saccharomyces cerevisiae* relativo à viabilidade, capacidade probiótica e potencial adsorvente *in vitro* de Aflatoxina B1 e Ocratoxina A. / João Farias deSousa Júnior. – 2019.  
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Sanidade e Reprodução Animal, Teresina-Pi, 2019.  
Orientação: “Prof.ª Dra.Maria Christina Sanches Muratori”.

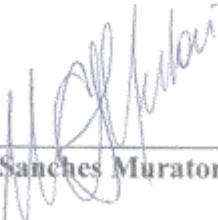
1. Alginato de sódio. 2. Levedura. 3. Maltodextrina.  
4. Micotoxinas. Título I.

CDD 636.089

**EFEITO DOS PROCESSOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* E  
POR EXTRUSÃO SOBRE *Saccharomyces cerevisiae* RELATIVO À VIABILIDADE,  
CAPACIDADE PROBIÓTICA E POTENCIAL ADSORVENTE *IN VITRO* DE  
AFLATOXINA B1 E OCRATOXINA A**


Dissertação aprovada em: 28/02/2019

Banca examinadora:



---

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



---

Prof. Dr. Márcio dos Santos Rocha (Interno) / LGO/CCS/UFPI



---

Pesquisador. Dr. Francisco das Chagas Cardoso Filho (Externo) / ADAGRI/CE

*“Guardo no coração as tuas  
palavras, para não pecar contra  
ti.”*

*(Salmos 119:11)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre estar me abençoando com conquistas, à Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, Araly e João Farias, meu irmão João Victor, e aos demais familiares por sempre me apoiarem, mesmo nas dificuldades e contratempos da vida.

À querida Professora Dra. Maria Christina Sanches Muratori, pela orientação, pelos ensinamentos que me guiaram a trilhar esse caminho e pelo carinho e confiança depositada em mim.

À minha querida amiga Aline Dourado, pela paciência, companheirismo e ensinamentos, tornando-se uma das figuras mais importantes para a realização deste trabalho, e Márcio e Francisco Cardoso pelas orientações desde a ideia do trabalho, passando por seu desenvolvimento até a conclusão.

Ao trio Letícia, Leniza e Leidiane e a família NUEPPA, pela ajuda, amizade, companheirismo e momentos vividos juntos, que tornaram menos árduo a trilha de tal caminho.

À todos, muito obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3 Capítulo I: Interferência da microencapsulação por <i>spray drying</i> e por extrusão sobre o rendimento, a eficiência e viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos.....	25
Resultados e discussão.....	30
Conclusões.....	36
Agradecimentos.....	36
Referências.....	36
4 Capítulo II: Interferência da microencapsulação por <i>spray drying</i> e por extrusão sobre a capacidade probiótica e potencial adsorvente de micotoxinas da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
Resumo.....	43
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Materiale métodos.....	46
Resultados e discussão.....	55
Conclusão.....	60
Referências.....	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....	64

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Eficiência, rendimento e redução de células viáveis após os métodos de microencapsulamento por <i>spray drying</i> e extrusão.....	30
<b>Tabela 2.</b> Valores médios e desvio padrão de umidade e da atividade de água da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8L2 microencapsulada por <i>spray drying</i> e por extrusão, em diferentes temperaturas, após 60 dias de armazenamento.....	32
<b>Tabela 3.</b> Viabilidade da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8L2 microencapsulada por <i>spray drying</i> e por extrusão, em diferentes temperaturas, durante 60 dias de armazenamento.....	33

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Valores médios e desvio padrão da atividade antimicrobiana da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A8L2), microencapsulada por <i>spray drying</i> e por extrusão, armazenadas por 60 dias às temperaturas: 4,0°C; ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C.....	55
<b>Tabela 2.</b> Médias e desvio padrão da capacidade de auto-agregação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A8L2), microencapsulada por <i>spray drying</i> e extrusão, advinda do armazenamento nas temperaturas 4,0°C, ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C.....	56
<b>Tabela 3.</b> Médias e desvio padrão da capacidade de co-agregação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A8L2), microencapsulada por <i>spray drying</i> e extrusão, advinda do armazenamento nas temperaturas 4,0°C, ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C.....	57
<b>Tabela 4.</b> Médias e desvio padrão da adsorção de AFB <sub>1</sub> e OTA da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A8L2), microencapsulada por <i>spray drying</i> e extrusão, advinda do armazenamento nas temperaturas 4,0°C, ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C.....	59



**EFEITO DOS PROCESSOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* E POR EXTRUSÃO SOBRE *Saccharomyces cerevisiae* RELATIVO À VIABILIDADE, CAPACIDADE PROBIÓTICA E POTENCIAL ADSORVENTE *IN VITRO* DE AFLATOXINA B1 E OCRATOXINA A**

**RESUMO**

A utilização de probióticos, a base de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que quando acrescentadas a alimentos contaminados apresentem potencial de adsorção de micotoxinas, apresenta-se como alternativa para minimizar o impacto negativo destes contaminantes na sanidade animal. A grande utilização de meios artificiais de cultivo de micro-organismos fez crescer a preocupação com a manutenção de culturas viáveis, visto que culturas microbiológicas são sensíveis às condições ambientais, podendo haver perda de sua viabilidade. A implementação de métodos eficientes de preservação de espécies microbianas, como a microencapsulação, busca manter essa viabilidade e a estabilidade a longo prazo, promovendo proteção contra condições adversas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo testar a interferência dos processos de microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a viabilidade da *S. cerevisiae* A8L2, isolada de viveiros de piscicultura, armazenada sob diferentes temperaturas (4,0°C, ambiente [entre 18 e 30°C] e 35°C), referente a capacidade probiótica e potencial adsorvente, *in vitro*, de Aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>) e Ocratoxina A (OTA). Após 60 dias, a levedura microencapsulada por ambos os métodos, apresentou contagem de células viáveis acima do mínimo recomendado para o emprego como agente probiótico em alimentos, de 10<sup>6</sup> UFC/g, nas três temperaturas de armazenamento, propiciando subsídios para a realização dos testes probióticos e adsorventes. Na temperatura de 35°C observou-se que as contagens de células sofreram maiores reduções e apresentaram menores valores ao final de 60 dias, indicando ser uma condição de armazenamento mais agressiva à levedura, sendo a menos indicada entre as três condições analisadas. As leveduras microencapsuladas foram submetidas aos seguintes testes para avaliação da capacidade probiótica: inibição de micro-organismos patogênicos, auto-agregação e capacidade de co-agregação, bem como aos testes de adsorção *in vitro* de AFB<sub>1</sub> e OTA. Constatou-se que a *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada através dos métodos *spray drying* e extrusão, utilizando como agentes encapsulantes a maltodextrina e o alginato de sódio, respectivamente, apresentou resultados satisfatórios para capacidade probiótica e adsorção *in vitro* de AFB<sub>1</sub> e OTA, nas condições de armazenamento especificadas, mantendo as propriedades após os processamentos tecnológicos, fornecendo subsídios para que as duas técnicas possam ser utilizadas na conservação de micro-organismos, potencializando o uso da levedura como agente probiótico e adsorvente de micotoxinas em posteriores testes *in vivo*, mesmo quando armazenadas em diferentes condições de temperatura.

Palavras-chave: Alginato de sódio; Armazenamento; Levedura; Maltodextrina; Micotoxinas.

**EFFECT OF SPRAY DRYING AND BY EXTRUSION MICROENCAPSULATION  
PROCESSES ON *Saccharomyces cerevisiae* CONCERNING THE VIABILITY,  
PROBIOTIC CAPACITY AND ADSORBENT POTENTIAL *IN VITRO* OF  
AFLATOXIN B<sub>1</sub> AND OCHRATOXIN A**

**ABSTRACT**

The use of yeast based probiotics, such as *Saccharomyces cerevisiae*, which, when added to contaminated foods, has potential for adsorption of mycotoxins, is an alternative to minimize the negative impact of these contaminants on animal health. The great use of artificial means of cultivating microorganisms has grown the concern with the maintenance of viable cultures, since microbiological cultures are sensitive to the environmental conditions, and their viability may be lost. The implementation of efficient methods of preservation of microbial species, such as microencapsulation, seeks to maintain this viability and long-term stability, promoting protection against adverse conditions. The objective of this work was to test the interference of microencapsulation by spray drying and extrusion on the viability of *S. cerevisiae* A8L2, isolated from fish farms, stored under different temperatures (4.0°C, ambient [18 and 30°C] and 35°C), concerning probiotic and adsorptive capacity in vitro of Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and Ochratoxin A (OTA). After 60 days, the yeast microencapsulated by both methods had a viable cell count above the minimum recommended for use as a probiotic agent in foods of 10<sup>6</sup> CFU/g at the three storage temperatures, providing subsidies for the probiotic tests and adsorbents. At 35°C it was observed that the cell counts suffered greater reductions and presented lower values at the end of 60 days, indicating to be a more aggressive storage condition to yeast, being the least indicated among the three conditions analyzed. The microencapsulated yeasts were submitted to the following probiotic tests: inhibition of pathogenic microorganisms, self-aggregation and co-aggregation capacity, as well as the in vitro adsorption tests of AFB<sub>1</sub> and OTA. *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulated through the spray drying and extrusion methods using maltodextrin and sodium alginate as the encapsulating agents was found to have satisfactory results for probiotic capacity and *in vitro* adsorption of AFB<sub>1</sub> and OTA under storage conditions the properties of the microorganisms, and the potential for the use of yeast as a probiotic agent and mycotoxin adsorbent in later *in vivo* tests, even when stored in different temperature conditions.

Keywords: Maltodextrin; Mycotoxins; Sodium alginate; Storage; Yeast.

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos encontram-se amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo contaminantes frequentes dos alimentos, como cereais e grãos utilizados na formulação de rações. A presença desses micro-organismos na alimentação animal tem representado grandes perdas econômicas, pois estes podem causar diversos quadros inconvenientes relacionados a redução de nutrientes, da palatabilidade e em condições favoráveis algumas espécies são produtoras de metabólitos secundários, denominadas micotoxinas, que quando ingeridas podem desencadear uma série de sinais clínicos adversos nos animais, como a exacerbada redução na produção, desempenho e reprodução animal.

Para minimizar ou evitar os efeitos deste grande problema são utilizadas estratégias como o uso de micro-organismos probióticos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura que quando adicionada a alimentação pode causar diversos efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor, e além disso, quando adicionada a ração, possui a capacidade de atuar como agente adsorvente de micotoxinas. Entretanto, as leveduras são micro-organismos que podem sofrer uma série de danos se armazenadas em condições ambientais inadequadas, como a perda de resistência contra diversos fatores, como o calor e processamentos empregados pela indústria alimentícia, contra condições físicas e químicas do trato digestivo dos animais, além de redução da vida útil do produto, com viabilidade e estabilidade com prazo diminuído.

Na busca pela potencialização da eficiência na utilização desses micro-organismos como agentes probióticos e adsorventes de micotoxinas, são utilizadas diversas estratégias que buscam a conservação dessas propriedades benéficas das leveduras, entre elas destaca-se a microencapsulação, uma técnica de preservação de micro-organismos que consiste no envolvimento do agente de interesse por matrizes encapsulantes, como maltodextrina, alginato de sódio, entre outros, formando uma camada protetora contra intempéries do ambiente e condições intrínsecas dos animais, promovendo a viabilidade e estabilidade dos micro-organismos por um maior período de tempo, aumentando a vida útil do produto.

De acordo com estes fatos formulou-se a seguinte hipótese: os processos de microencapsulação por *spray drying* e por extrusão mantêm a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* preservando sua capacidade probiótica e seu potencial adsorvente *in vitro* de Aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>) e Ocratoxina A (OTA). Para testar a hipótese, o objetivo geral do presente trabalho foi: testar a interferência dos processos de microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* referente a capacidade

probiótica e potencial adsorvente *in vitro* de Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e Ocratoxina A (OTA).

O trabalho foi dividido estruturalmente em dois capítulos, apresentados na forma de artigos científicos: Capítulo I: “Interferência da microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre o rendimento, a eficiência e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*”; Capítulo II: “Interferência da microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a capacidade probiótica e potencial adsorvente de micotoxinas da *Saccharomyces cerevisiae*”. Os artigos foram elaborados respectivamente de acordo com as normas das revistas: Food and Bioproducts Processing e Pesquisa Agropecuária Brasileira, às quais serão submetidos para publicação.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### Fungos

Os fungos são microrganismos eucariontes, apresentando uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo, heterotróficos, aproveitando a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes, possuem uma parede celular quitinosa, citoplasma, mitocôndrias e núcleo, são ubíquos, estando naturalmente presentes no ambiente, constituindo parte da biomassa do solo, atuando na decomposição de materiais orgânicos, mineralizando nutrientes, estabelecendo relações simbióticas, controlando pragas e algumas doenças. Podem ser divididos em leveduras e fungos filamentosos. As leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, são fungos que apresentam forma predominantemente unicelular, suas células podem apresentar variados formatos conforme o gênero e espécie, de ovoides a algumas espécies apresentarem células tão alongadas que formam filamentos semelhantes a hifas, com a multiplicação de suas células ocorrendo por brotamento multilateral ou através da formação de pseudomicélios (FRANCO; LANDGRAF, 2008; RAJEEV BHAT et al., 2010; MONTEIRO, 2012; MEIRELLES, 2016; SILVA; MALTA, 2016).

Os fungos filamentosos ou bolores são microrganismos pluricelulares, possuem sua estrutura constituída basicamente de hifas, que em conjunto formam o micélio, podendo ser classificados em fungos do campo, como o *Fusarium*, que infectam o produto ainda no campo, e fungos de armazenamento, que invadem o produto pouco antes ou durante o armazenamento, como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses três gêneros são os mais frequentemente encontrados em alimentos e também, os maiores produtores de micotoxinas (MARCIA; LAZZARI, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2008; SKRBIC et al., 2011; TORTORA; CASE; FUNKE, 2012).

O gênero *Aspergillus* apresenta como características ser filamentoso e facilmente encontrado na natureza, como no solo, restos de plantas em decomposição e ambientes fechados, sendo capaz de crescer e produzir metabólitos mesmo em baixas atividade de água e altas temperaturas, com sua importância relacionada à capacidade de causar impactos negativos à economia devido a produção de micotoxinas e deterioração dos alimentos. As principais micotoxinas produzidas pelo gênero *Aspergillus* são as aflatoxinas e as ocratoxinas, destacando-se por serem metabólitos bastante tóxico para a maioria dos animais, especialmente os monogástricos, sendo responsáveis por desencadear efeitos teratogênicos,

hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (KLICH, 2007; KELLER, 2009; PITT; HOCKING, 2009; PINHEIRO, 2013).

O gênero *Penicillium* é geralmente encontrado no solo, alimentos, ambientes secos e sementes, possuem colônias de crescimento rápido, compostas por uma grande presença de conidióforos. Possuem a textura variando de aveludada, algodonosa, funicular ou fasciculada e simnemata e são fungos produtores de pigmentos solúveis e/ou exudatos. É importante no que se refere à contaminação alimentar, além de ser causador de severas micotoxicoses e alergias, porém também com destaque para sua utilização como modelo em estudos básicos, como muitas pesquisas aplicadas demonstrando seu enorme potencial biotecnológico, com espécies sendo utilizadas no biocontrole, micoparasitismo, fontes de enzimas de interesse industrial e novos fármacos para a indústria farmacêutica (SAMSON; FRISVAD, 2004; KELLER, 2009; CARDOSO FILHO et al., 2011; MONTEIRO, 2012; GARVIL; BORGES; GALVÃO, 2014).

Dentro do gênero *Penicillium* há espécies que produzem uma grande variedade de micotoxinas, sendo algumas delas a citrinina, a ocratoxina A e a patulina (CARDOSO FILHO et al., 2011; GARVIL; BORGES; GALVÃO, 2014).

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* apresentam crescimento rápido e são largamente distribuídas no solo, principalmente nos cultivados, estando presente na decomposição da celulose de algumas plantas, representando a maior causa de deterioração em frutos, vegetais e cereais, além de também serem produtores de micotoxinas, como as fumonisinas (SANTOS, 2012; PINHEIRO, 2013).

## **Micotoxinas**

Micotoxinas são agentes químicos produzidos durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos tóxicos que podem contaminar os alimentos ainda no campo, no transporte e durante o armazenamento. Tais substâncias podem se desenvolver naturalmente nos produtos alimentícios que são destinados para o consumo animal ou humano, e quando ingeridas podem produzir efeitos agudos ou crônicos (micotoxicoses) (MÍDIO; MARTINS, 2000; MAZIERO; BERSOT, 2010; PEREYRA et al., 2010; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

A presença dos fungos na alimentação animal tem representado grandes perdas econômicas, por estes estarem associados a redução de nutrientes, palatabilidade e em condições favoráveis algumas espécies são produtoras de metabólitos secundários. As rações,

quando armazenadas em ambientes que ofereçam condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, representam substratos ideais para o crescimento destes e produção de seus metabólitos, as micotoxinas, consideradas contaminantes de difícil controle, devido sua resistência a métodos químicos e físicos, que quando ingerida, apresenta ação tóxica para humanos e animais (DANTIGNY et al., 2005; PEREIRA, 2005; IAMANAKA et al., 2010; GABRIEL, 2013).

Uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina, e diversas espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina. Além disso, os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas ou com doenças, principalmente imunossupressoras (RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

Os fungos produtores de micotoxinas pertencem principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e mesmo que o fungo seja inativado ou destruído e não esteja mais presente no alimento, estes metabólitos podem ainda estar presentes e viáveis, por serem resistentes tanto a métodos químicos quanto físicos. As principais micotoxinas encontradas em alimentos são: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1 e M2), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), ocratoxina A, patulina, citrinina, zearalenona, tricotecenos e esterigmatocistina (YOSHISAWA, 2001; PITT; HOCKING, 2009; MAZIERO; BERSOT, 2010; PIETSCH et al., 2013; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015; SILVA et al., 2015).

#### Aflatoxina B<sub>1</sub>

As aflatoxinas são cumarinas altamente substituídas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, porém, mais recentemente, as espécies *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus* também tem se mostrado aflatoxigênicas. As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B1, B2, G1 e G2, com base nas suas fluorescências sob luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada, com a aflatoxina B<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 e carcinogênicos, em que a ingestão de grandes doses de aflatoxina resulta em uma doença chamada aflatoxicose, que costuma ser letal (FREIRE et al., 2007; KLICH, 2007; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; CARDOSO FILHO; MURATORI, 2011; BRYDEN, 2012; ROCHA et al., 2014; MATEJOVA et al., 2017).

Alimentos contaminados com aflatoxinas são responsáveis por causar danos em várias espécies cultivadas em ambiente aquático, gerando desequilíbrios fisiológicos, redução do crescimento, alterações histológicas, morfológicas, principalmente no fígado e conseqüentemente oferecem riscos à saúde do consumidor, pela presença da toxina na musculatura de peixes (BOONYARATPALIN et al., 2001; GOPINATH et al., 2012).

#### Ocratoxina A

As ocratoxinas foram descobertas em 1965, produzidas por fungos da espécie *Aspergillus ochraceus*, mas também podem ser produzidas por outras espécies como *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus alutaceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus meleus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium viridicatum* e *Penicillium verrucosum*. São relatadas no mínimo sete tipos de ocratoxinas, com a ocratoxina A sendo a mais conhecida e tóxica (MAGNOLI et al., 2004; FREIRE et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

A Ocratoxina A (OTA) pode estar presente numa grande variedade de alimentos, como vinho, sucos, uvas, cerejas, aveia, cevada, centeio, trigo, grãos de café, castanhas do Brasil, presunto curado e em outros produtos para consumo humano e animal (FREIRE et al., 2007; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; PEREIRA; SANTOS, 2011).

A OTA é uma isocoumarina ligada a uma molécula de fenilalanina, que afetam enzimas envolvidas no metabolismo da fenilalanina, e também enzimas que a utilizam como substrato. Tem a propriedade de se ligar a proteínas plasmáticas, o que faz a micotoxina permanecer no sangue, retardando sua eliminação. No ser humano, essa substância tem a mais longa meia-vida para sua eliminação e, na Europa, uma considerável parte da população apresenta concentração de ocratoxina A no sangue, podendo ser tóxica ao organismo (JECFA, 2001; FREIRE et al., 2007; FAZIO, 2009; PEREIRA; SANTOS, 2011).

Possui diversas propriedades tóxicas, principalmente nefrotóxicas, além de propriedades hepatotóxicas, citotóxicas, teratogênicas, imunossupressoras e carcinogênicas. Esta micotoxina foi associada à nefropatia endêmica dos Balcãs, doença caracterizada por progressiva redução das funções renais em humanos, e a um grande número de casos de câncer no trato urinário, relacionando a carcinogênese a OTA (JECFA, 2001; FREIRE et al., 2007; RINALDI et al., 2007; CARDOSO FILHO; MURATORI, 2011; PEREIRA; SANTOS, 2011; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).



A ocratoxina A é classificada como carcinógeno do grupo 2B - Suspeito Carcinógeno Humano pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer* – IARC) (FREIRE et al., 2007; PEREIRA; SANTOS, 2011).

A Resolução RDC n.º. 7, de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamenta os limites máximos tolerados (LMT) de algumas micotoxinas, como a ocratoxina A, destacando-se o limite para vinho e seus derivados, suco de uva e polpa de uva (2 µg/kg), e cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada (20 µg/kg) (BRASIL, 2011).

### **Estratégias para controle de micotoxinas**

Os impactos proporcionados pelas micotoxinas, substâncias produzidas por fungos filamentosos e prejudiciais à saúde humana e animal, levaram ao desenvolvimento de estratégias que possam impedir o crescimento de fungos, prevenir a formação de toxinas, inativar ou reduzir sua biodisponibilidade em produtos contaminados (PINHEIRO, 2013; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

Devido ao perigo que a ingestão das micotoxinas representam, faz-se necessário o uso de medidas de controle como prevenção da contaminação e do crescimento fúngico, a descontaminação de alimentos, a inibição ou adsorção no trato gastrointestinal de micotoxinas presentes no alimento consumido, a inativação das toxinas, a diluição de partidas contaminadas, a separação física dos contaminantes, a irradiação, a amonização e degradação por ozônio (GIL; LIMA, 1996; MALLMANN et al., 2006; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

Dentre os métodos físicos, a secagem eficiente e a conservação sem umidade dos produtos impede o crescimento de fungos e a formação de micotoxinas, o beneficiamento de grãos tem demonstrado ser capaz de reduzir tanto os fungos presentes nos cereais como também as micotoxinas presentes nos alimentos. A moagem tem demonstrado sucesso no controle da deoxinivalenol, a separação por densidade pode reduzir níveis de tricotecenos e zearalenona, o carvão ativo tem se mostrado parcialmente efetivo na redução dos efeitos do consumo de toxina T-2, tratamentos térmicos também são empregados e tem obtidos resultados de diminuição dos teores de aflatoxina, e o uso de irradiação, quer seja solar, raios gama ou UV, pode diminuir o número de unidades formadoras de colônia e destruir parte da micotoxina (AQUINO et al., 2005; HWANG; LEE, 2006; MALLMANN et al., 2006; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; CARÃO, 2014).

A detoxificação química consiste no uso de ácidos, bases, aldeídos e agentes oxidantes, empregando técnicas como a amonização, a ozonização e a acidificação, que induzem modificações químicas irreversíveis, tornando a micotoxina não prejudicial aos seres vivos, no entanto são métodos pouco práticos, que podem ser ineficazes, comprometer a palatabilidade do alimento e seus valores nutricionais (NORRED, 1993; CARÃO, 2014).

Busca-se para o controle fúngico uma alternativa para os agentes inorgânicos comumente utilizados, haja visto que estes têm efeitos negativos na saúde humana, animal e no ecossistema, além de aumentarem a resistência aos antimicrobianos. Os métodos biológicos de controle têm ganhado espaço, representando uma promissora estratégia, como o uso de probióticos, leveduras ou bactérias, que atuam como inibidores do crescimento fúngico e que quando acrescentados a alimentos contaminados, apresentem potencial de adsorção das micotoxinas, e além disso, a ação fermentativa desses microrganismos adicionados possibilita que o alimento não tenha seu valor nutricional afetado de maneira significativa e a palatabilidade não seja comprometida, como também evita o uso de produtos químicos perigosos, como acetonas, amônia, etanol, entre outros. Dentro deste contexto as leveduras são micro-organismos antagônicos inócuos, que são isentos de substâncias tóxicas, tendo sido testadas como aditivos na dieta dos animais domésticos e com efeitos comprovados contra a toxicidade das micotoxinas (LAVELL, 1993; BATA; LÁSZTITY, 1999; SUGAR; SPOTTS, 1999; SANTIN et al., 2003; MALLMANN et al., 2006; PIZZOLITTO et al., 2011; RAHAIE et al., 2012).

#### Leveduras como agentes probióticos e adsorventes

Os probióticos são micro-organismos vivos, fornecidos por meio de alimentos e suplementos alimentares que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos a saúde do consumidor, como a melhoria da microbiota intestinal, prevenção de doenças e melhoria de desempenho de animais, produzindo substâncias com atividade antimicrobiana, modificando o metabolismo microbiano, por meio do aumento ou da diminuição da atividade enzimática e estimulando a imunidade do hospedeiro pelo aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos (COPPOLA; TURNES, 2004; MEURER, et al., 2008; BURGAIN et al., 2011; CORONA-HERNANDEZ et al., 2013; SILVA, 2015; PINHEIRO, 2016).

Dentre as condições necessárias para seleção de cepas com capacidade probiótica destacam-se apresentar tolerância e viabilidade no trato gastrointestinal, não serem

considerados organismos patogênicos, habilidade de sobreviver aos processos tecnológicos, devem permanecer viáveis durante a vida útil do produto, possuindo o máximo de características positivas, além de poderem ser utilizadas juntamente com outras espécies, com efeito sinérgico, proporcionando efeitos benéficos ao hospedeiro de forma complementar sobre seu desempenho e saúde (SILVA, 2015; PINHEIRO, 2016).

Cepas probióticas devem possuir certificação de segurança alimentar, emitidos por órgãos de relevância mundial, como a Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos e a Autoridade de Segurança Alimentar Européia (EFSA), da União Européia, para poderem ser inseridas na alimentação sem representar riscos à saúde, e a *Saccharomyces cerevisiae* encontra-se entre os micro-organismos probióticos de segurança comprovada, podendo ser utilizada como probiótico com primazia (LAURENTI; GARCIA, 2013; PINHEIRO, 2016).

Segundo a ANVISA (2008), a recomendação para alimentos probióticos é de no mínimo  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC)/dia, baseada na quantidade de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos diariamente para que possam ocorrer os efeitos funcionais.

Para atenuar o efeito das micotoxinas tem se utilizado materiais específicos que reduzam a absorção de micotoxinas pelo trato gastrointestinal. A detoxificação ou adsorção através do uso de produtos de origem biológica mostra-se como um crescente método, que são adicionados aos alimentos durante o processo de formulação destes (GIL; LIMA, 1996; PINHEIRO et al., 2015; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

Os adsorventes não destroem as micotoxinas, ligam-se a elas, que passam através do trato gastrointestinal sem serem absorvidas, sequestrando as toxinas no trato, reduzindo a sua biodisponibilidade e ação tóxica sobre o organismo. Adsorventes inorgânicos e orgânicos, como os silicatos minerais, carvão ativado, polímeros, produtos de clorofila e produtos derivados de bactérias ácido lácticas leveduras têm sido utilizados no controle da biodisponibilidade das micotoxinas, destacando-se a substituição gradativa dos agentes inorgânicos, visto que possuem efeitos deletérios a saúde humana e ao meio ambiente (BATA; LÁSZTITY, 1999; SUGAR; SPOTTS, 1999; PINHEIRO, 2013; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015; PINHEIRO, 2016).

Um adsorvente ideal deve ser efetivo contra várias micotoxinas, pois geralmente os alimentos estão contaminados por mais de um tipo, também devem apresentar preços acessíveis, não devem ocupar uma grande parcela da dieta, não devem ter sabor, odor e

impurezas, devem gerar produtos atóxicos e não alterar as propriedades nutricionais dos alimentos (RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015; PINHEIRO, 2016).

As leveduras possuem alta velocidade de crescimento, dificilmente são tóxicas ou causadoras de doenças, têm a capacidade de assimilar grande variedade de substratos, facilidade na extração de sua biomassa e resistem *in vitro* às condições químicas e físicas do trato digestivo dos animais (PERRY, 1995; ICIDCA, 1999; ARMANDO et al., 2011; KELLER, 2013; PINHEIRO, 2013; PINHEIRO, 2016).

Dentre os microrganismos utilizados nas técnicas de detoxificação biológica destacam-se as leveduras devido ao seu potencial de adsorver as micotoxinas, como a *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada durante anos pela indústria na fabricação de bolos e pães, fermentação alcoólica de bebidas, produção de etanol. Atualmente, ela também está sendo utilizada como probiótico na piscicultura e avicultura, demonstrando propriedades benéficas e potencial de adsorção sobre alguns grupos de micotoxinas, como a ocratoxina A, devido aos complexos carboidratos que se encontram em sua parede celular (MEURER, 2005; MALLMANN et al., 2006; ROSSI et al., 2010; PINHEIRO, et al., 2015).

Testes *in vitro* de um adsorvente são importantes para determinar a capacidade de adsorção das micotoxinas presentes em um meio líquido, tornando-as indisponíveis, oferecendo assim, suporte para a realização de testes *in vivo* (MALLMANN et al., 2006; PINHEIRO, et al., 2015; PINHEIRO, 2016).

### **Métodos de preservação de micro-organismos**

O advento dos meios artificiais de cultivo de micro-organismos fez crescer a preocupação com a manutenção de culturas viáveis, visto que culturas microbiológicas são sensíveis às condições ambientais, podendo ser facilmente contaminadas, sofrendo mutações ou perda de viabilidade celular (ALCARDE; BASSO, 1997; SILVA et al., 2014).

A implementação de métodos eficientes de preservação de espécies microbianas buscam manter a viabilidade e a estabilidade genética dos organismos, visto que os processos de isolamento, identificação, conservação e a utilização de microrganismos vem sendo bastante utilizados para o desenvolvimento de pesquisas e obtenção de produtos de interesse econômico, conservando seu estado inicial, evitando mutações indesejáveis e garantindo ao máximo a vitalidade das células e a quantidade de células viáveis (ALCARDE; BASSO, 1997; SOLA et al., 2012; SILVA et al., 2014).

A microencapsulação é uma técnica consiste no revestimento de compostos de interesse, como microrganismos, por uma matriz encapsulante, possibilitando a utilização destes em ampla variedade de produtos, protegendo-os de agressões físicas do ambiente ou do meio que estão incorporados, como pH, oxidação, luz, temperatura, minimizando problemas de instabilidade e inviabilidade de probióticos, preservando a substância ativa e reduzir as possibilidades de contaminação (OLIVEIRA, 2011; CÂMARA JÚNIOR, 2014; SIMEONI et al., 2014).

Na técnica de microencapsulamento, é fundamental a escolha de um agente encapsulante adequado, como o alginato de sódio, ciclodextrina, albumina, maltodextrina, amido, gomas, entre outros, que forme uma matriz altamente versátil, resistente ao trato gastrointestinal, que apresente baixa higroscopicidade, seja biocompatível, não tóxico e de baixo custo, conferindo proteção aos microrganismos probióticos (OLIVEIRA, 2011; SIMEONI et al., 2014; SILVA et al., 2015).

### 3 Capítulo I

**Interferência da microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre o rendimento,  
a eficiência e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae***

---

**Interference of microencapsulation by spray drying and extrusion on yield, efficiency  
and viability of *Saccharomyces cerevisiae***

João Farias de Sousa Júnior<sup>a\*</sup>, Aline Maria Dourado Rodrigues<sup>a</sup>, Leidiane Sousa Santos<sup>a</sup>,  
Leniza Luiza Oliveira Nascimento<sup>a</sup>, Márcio dos Santos Rocha<sup>b</sup>, Oskar Almeida Silva<sup>c</sup>, Mirian  
Lima dos Santos<sup>c</sup>, José Lindenberg Rocha Sarmiento<sup>d</sup>, Maria Christina Sanches Muratori<sup>a</sup>

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

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

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

<sup>d</sup> Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento  
de Zootecnia (DZO), Campus Socopo, CEP: 64055-350, Teresina, Piauí, Brasil

\*Autor correspondente

João Farias de Sousa Júnior, Pós-graduação em Ciência Animal

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

j.f.s.j@hotmail.com

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o rendimento dos métodos de microencapsulamento por *spray drying* e por extrusão, a eficiência de microencapsulação de *Saccharomyces cerevisiae* por ambas as técnicas e a viabilidade das células encapsuladas, armazenadas em diferentes temperaturas. Para o processo de microencapsulação por *spray drying* foram preparadas suspensões com 2,5% de células de levedura, 2,5% de agente encapsulante (maltodextrina) e 95% de água destilada, utilizando no processo um aparelho mini *spray dryer* B-290 co-corrente (Buchi®), de escala laboratorial, com temperatura de entrada de 105°C. Para o processo de microencapsulação por extrusão foram preparadas suspensões com 2,0% de células de levedura, 49% de agente encapsulante (alginato de sódio) e 49% de água destilada, sendo dispersas por gotejamento, através de seringas, em béqueres contendo solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  0,15M). Após o término da realização das técnicas, as microcápsulas foram coletadas e transferidas para três frascos esterilizados hermeticamente vedados com Parafilm®. Cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente: 4,0°C; 35°C (incubados em estufa B.O.D) e temperatura ambiente na bancada do laboratório (entre 18 e 30°C), por 60 dias. Os métodos apresentaram a formação de microcápsulas com recuperação de material recuperado acima de 37%, eficiência da microencapsulação superior a 80% e redução de células viáveis inferior a 2,00 UFC/g em log 10, com umidade e atividade de água estáveis entre as temperaturas, e contagem de células viáveis superiores a 6,00 UFC/g em log 10, após 60 dias, nas três diferentes condições de estocagem. Os métodos de microencapsulamento por *spray drying* e por extrusão apresentam bom rendimento e eficiência para microencapsulação de células de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, e são capazes de preservar a viabilidade probiótica das células, mesmo em diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.

Palavras-chave: *Spray dryer*, Alginato de sódio, Probióticos, Maltodextrina, Microcápsulas.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of the microencapsulation methods by spray drying and extrusion, the microencapsulation efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* by both techniques and the viability of the encapsulated cells stored at different temperatures. For the spray drying microencapsulation process, suspensions were prepared with 2.5% yeast cells, 2.5% encapsulating agent (maltodextrin) and 95% distilled water, using in the process a B-290 mini spray dryer apparatus current (Buchi®), laboratory scale, with input temperature of 105°C. For the microencapsulation process by extrusion, suspensions were prepared with 2.0% yeast cells, 49% encapsulating agent (sodium alginate) and 49% distilled water, being dispersed by dripping through syringes into beakers containing solution of calcium chloride (0.15M CaCl<sub>2</sub>). After completion of the techniques, the microcapsules were collected and transferred to three sterile vials sealed tightly with Parafilm®. Each vial was stored at a different temperature: 4.0°C; 35°C (incubated in oven B.O.D) and room temperature on the laboratory bench (between 18 and 30°C) for 60 days. The methods showed the formation of microcapsules with recovery of recovered material above 37%, microencapsulation efficiency greater than 80% and viable cell reduction of less than 2.00 CFU/g in log 10 with stable moisture and water activity between temperatures, and counts of viable cells greater than 6.00 CFU/g in log 10, after 60 days, in the three different storage conditions. Spray drying and extrusion microencapsulation methods exhibit good yield and efficiency for microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 cells, and are capable of preserving the probiotic viability of cells, even at different temperatures and storage periods.

Key words: Spray dryer, Sodium alginate, Probiotics, Maltodextrin, Microcapsules.

## 1. Introdução

A microencapsulação é uma técnica consiste no revestimento de compostos de interesse, como micro-organismos, enquadrando bactérias e leveduras probióticas, por uma matriz encapsulante, no intuito de preservar as propriedades benéficas, conferindo a proteção de compostos biologicamente ativos ou células de agressões físicas do ambiente ou do meio que estão incorporados, possibilitando a utilização destes em ampla variedade de produtos (Anal; Singh, 2007; Doherty et al., 2011; Simeoni et al., 2014).

Na técnica de microencapsulamento, é fundamental a escolha de um agente encapsulante adequado, como a maltodextrina, alginato de sódio, entre outros, que forme uma matriz altamente versátil, resistente ao trato gastrointestinal, que apresente baixa higroscopicidade, seja biocompatível, não tóxico e de baixo custo, conferindo proteção aos microrganismos probióticos (Simeoni et al., 2014; Silva et al., 2015).

A preservação de micro-organismos por diferentes métodos tem sido utilizada há décadas, e entre esses métodos destaca-se a microencapsulação e secagem por atomização ou *spray drying* (SD), considerada uma técnica econômica e flexível, possuindo vantagens como a alta taxa de produção de uma maneira relativamente barata, rápida e adequada para aplicações industriais, com produtos secos, homogêneos, que podem ser transportados a baixo custo, podendo ser armazenados por longos períodos (Golowczyc et al., 2010; Burgain et al., 2011; Silva et al., 2015; Aponte et al., 2016).

O método *spray drying* envolve a transformação de um material em estado fluido em partículas sólidas por atomização de uma emulsão ou de uma suspensão de probióticos e agentes de encapsulação em uma câmara de secagem por ar quente, resultando na rápida evaporação de água, com a atomização, a secagem e a coleta do produto final em pó sendo realizada por em um único equipamento, reduzindo a possibilidade de contaminação e tornando o processo menos demorado, atentando a alguns parâmetros que podem melhorar o rendimento do processo como a temperatura da entrada de ar, a concentração do material, entre outros (Martín et al., 2015; Silva et al., 2015).

Dentre os métodos de microencapsulação por extrusão com utilização de polímeros, o alginato de sódio, um polímero solúvel em água, e que na presença de íons divalentes como o cálcio sofre um processo denominado gelificação ionotrópica, que consiste em incorporar o material a encapsular numa solução de alginato de sódio, para que a mistura sofra extrusão gota a gota, através de uma seringa, para uma solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>). Esta técnica em ganhado cada vez mais destaque devido à sua fácil execução, não toxicidade,

baixo custo e biocompatibilidade, possuindo uma capacidade de absorção de água que propicia a rápida formação do gel, possibilitando a inclusão de moléculas bioativas e que funciona como camada protetora ao microrganismo probiótico, além de possuir estabilidade em soluções de baixo pH, ponto de interesse para a sua utilização em locais como trato gastrointestinal de animais, e sendo possível recobrir as cápsulas com outros compostos poliméricos, a fim de garantir um maior efeito protetor aos micro-organismos (Chávarri et al., 2010; Lu-e. Shi et. al., 2013; Nayak et al., 2013; Lima et al., 2014; Simeoni et al., 2014; Albadran et al., 2015; Etchepare et al., 2015; Lodeiro et. al., 2016).

Os probióticos são micro-organismos vivos, fornecidos por meio de alimentos e suplementos alimentares que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos a saúde do consumidor, melhoria da microbiota intestinal, prevenção de doenças e melhoria de desempenho de animais. Dentre os micro-organismos probióticos de segurança comprovada, as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são adsorventes *in vitro* de micotoxinas em alimentos e são certificadas como seguras pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Autoridade de Segurança Alimentar Européia (EFSA) (Meurer et al., 2008; Armando et al., 2011; Burgain et al., 2011; Corona-Hernandez et al., 2013; Pizzolitto et al., 2012; Laurenti; Garcia, 2013).

Para a aplicação de um micro-organismo vivo com potencial probiótico e adsorvente na alimentação é necessário que possua habilidade de sobreviver aos processos tecnológicos, devendo permanecer com células viáveis durante a vida útil do produto, em número suficiente para sua atuação nos possíveis locais de ação (Pinpimai et al., 2015; Pinheiro, 2016). Pelo exposto, objetivou-se com o presente estudo: avaliar o rendimento dos métodos de microencapsulamento por *spray drying* e por extrusão, a eficiência de microencapsulação de *Saccharomyces cerevisiae* por ambas as técnicas e a viabilidade das células encapsuladas, armazenadas em diferentes temperaturas.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Preparação da cepa e encapsulação**

*Saccharomyces cerevisiae* A8L2 foi isolada por Rodrigues (2018) de água dos viveiros de piscicultura da cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Esta cepa foi identificada por técnicas moleculares, PCR-*fingerprinting* e sequenciamento da região ITS-5.8S, e sua capacidade probiótica e adsorvente de AFB<sub>1</sub> foi testada por Rodrigues (2018), desde então, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Controle Microbiológico do Núcleo de

Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí.

Para a microencapsulação por *spray drying* e extrusão a levedura foi cultivada em 200 e 10 mL, respectivamente, de caldo extrato de levedura peptona dextrose - YPD (5,0 g de extrato de levedura; 5,0 g de peptona; 40 g de glicose; 0,03 g de cloreto de sódio e água destilada q.s.p. para 1000 mL) e incubada sob agitação (150 rpm) em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab<sup>®</sup>), a 30°C durante 48 horas. Após incubação, as células foram centrifugadas (3500 rpm por 10 min) e lavadas duas vezes com água destilada esterilizada, resultando num concentrado médio de 9,00 UFC/g em log 10 de células de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 (*pellets*).

Para o processo de encapsulamento por *spray drying*, foi estabelecido que a solução encapsulante deveria conter 5,0% de sólidos, composto por: 2,5% dos *pellets*; 2,5% do agente encapsulante (maltodextrina) e 95% de água destilada. Inicialmente pesaram-se os *pellets* para utilização da mesma quantidade de maltodextrina (Pryme Foods<sup>®</sup>), para composição da solução.

Para o preparo da solução de encapsulamento, primeiramente a maltodextrina foi ressuspendida em água destilada e posteriormente esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriar, os *pellets* foram acrescentados asépticamente à solução de encapsulamento.

Para a execução da técnica micro encapsulamento por *spray drying* foi utilizado um aparelho mini *spray dryer* B-290 co-corrente, de escala laboratorial (Buchi<sup>®</sup>). Utilizou-se 105°C como temperatura de entrada. A solução de encapsulamento foi mantida em agitador magnético à temperatura ambiente e conduzida para a câmara de secagem por bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 3,0 mL/min, fluxo do ar de secagem de 35 m<sup>3</sup>/h e pressão do compressor de ar de 0,7 MPa. As microcápsulas foram coletadas da base do ciclone e transferidas para três frascos esterilizados hermeticamente vedados com Parafilm<sup>®</sup>. Cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente: 4,0°C; 35°C (incubados em estufa B.O.D) e temperatura ambiente na bancada do laboratório (entre 18 e 30°C) por 60 dias.

Para o processo de encapsulamento por extrusão, foi estabelecido que a solução de encapsulamento deveria conter 51% de sólidos, composto por 2,0% dos *pellets*, 49% do agente encapsulante (emulsão de alginato de sódio 7,5%) e 49% de água destilada. Inicialmente pesaram-se os *pellets*, em seguida acrescentou-se a respectiva quantidade de alginato de sódio 7,5% (Isofar<sup>®</sup>), para composição da solução acrescentou-se a água destilada.

Para o preparo da solução encapsulante, primeiramente foi formulada uma emulsão de alginato de sódio a 7,5% que foi esterilizada em autoclave a 105°C por 15 minutos. Após resfriar, a emulsão foi transferida para tubos tipo Falcon contendo os *pellets*. A solução encapsulante foi transferida por gotejamento utilizando seringas estéreis descartáveis Luer Slip (Procare®) e agulhas hipodérmicas esterilizadas 18G x 1½ (Wiltex®) para frascos tipo béqueres contendo solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub> 0,15M). Durante a transferência da solução os frascos foram mantidos em agitador magnético, e no final do processo permaneceram por 10 minutos aproximadamente em agitação até que houvesse precipitação da emulsão e formação das microcápsulas.

Em seguida, em condições assépticas, a solução encapsulante foi peneirada utilizando uma peneira doméstica de nylon (Plasvale®) com granulometria de 10 mesh (2,0mm). As microcápsulas retidas na peneira foram transferidas para três frascos esterilizados utilizando uma espátula esterilizada, em seguida adicionou-se 40 mL de água destilada esterilizada. Os frascos foram vedados com Parafilm®. Cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente: 4,0°C; 35°C (incubados em estufa B.O.D) e temperatura ambiente na bancada do laboratório (entre 18 e 30°C) por 60 dias.

## 2.2 Rendimento do processo encapsulante

A taxa de recuperação do produto ou o rendimento do processo encapsulante seguiu a recomendação de Souza (2003) e Souza et al. (2015). Os valores do rendimento (fórmula 1) foram obtidos pelo percentual entre a quantidade de microcápsulas total coletada por grama (massa experimental) e a quantidade de sólidos utilizada na solução encapsulante por grama (massa teórica).

$$\text{Fórmula 1: Rendimento (\%)} = (\text{massa experimental/massa teórica}) \times 100$$

## 2.3 Contagem de leveduras na solução de encapsulamento antes e depois da utilização das técnicas de microencapsulação por *spray dryer* e extrusão

O efeito do encapsulamento na viabilidade das leveduras probióticas foi avaliado por contagem do número de leveduras viáveis, em unidades formadoras de colônias por grama em números logaritmos (UFC/g em log 10), antes e depois dos processos de microencapsulação e seguiu metodologia adaptada de Aponte et al. (2016).

Foi utilizado o método de semeadura por espalhamento em superfície no ágar extrato de levedura peptona dextrose (YPD) com a seguinte formulação: 6,0 g de peptona; 6,0 g de

glicose; 3,0 g de extrato de levedura; 0,05g de clorafenicol; 4,5 g de ágar e água destilada q.s.p. para 300 mL.

Para que fosse possível dissolver as microcápsulas advindas da técnica de extrusão (1,0g) que estavam armazenadas em diferentes temperaturas, foram transferidas assepticamente para tubos de ensaio contendo 9,0 mL de citrato de sódio 0,1M (0,294g) e depois submetidas a agitação em vórtex QL901 (Vertex®) em cinco ciclos de um minuto com intervalos de um minuto entre ciclos, para posterior análise. Desta forma, realizou-se a diluição  $10^{-1}$ , para preparar as dissoluções decimais seriadas até  $10^{-6}$  foram utilizados tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução peptonada a 0,1% esterilizada. Em seguida, semeou-se em superfície 0,1 mL das dissoluções  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para placas de Petri contendo ágar YPD, as placas foram incubadas a 25°C por três dias em estufa B.O.D. Em seguida realizou-se a contagem (UFC/g em log 10) de células viáveis utilizando o contador de colônias do tipo Quebec.

As microcápsulas advindas da técnica de *spray dryer* não precisaram ser dissolvidas em citrato de sódio por já serem solúveis em água peptonada. Para contagem das leveduras oriundas da técnica de *spray dryer*, 1,0 g de microcápsulas foram dissolvidas em 9,0 mL de solução peptonada a 0,1% esterilizada e assim sucessivamente para formar dissoluções decimais seriadas até  $10^{-6}$ . Em seguida, semeou-se em superfície 0,1 mL das dissoluções  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para placas de Petri contendo ágar YPD, as placas foram incubadas a 25°C por três dias em estufa B.O.D. Em seguida realizou-se a contagem (UFC/g em log 10) de células viáveis utilizando o contador de colônias do tipo Quebec.

## 2.4 Eficiência da microencapsulação

A partir do resultado de contagem das leveduras viáveis antes (solução de encapsulação) e após (microcápsulas obtidas) a realização das duas técnicas de encapsulamento, foi avaliada a eficiência de microencapsulação de ambas, conforme a metodologia proposta por Castro-Cislaghi et al. (2012) e Rivaldi (2012), por meio da fórmula 2:

Fórmula 2:

$$\text{Eficiência (\%)} = (N/\text{No}) \times 100$$

Onde:

N: Número em log UFC/g em log 10 de células viáveis das microcápsulas obtidas;

No: Número em log UFC/g em log 10 de células viáveis da solução de encapsulação.

## 2.5 Viabilidade da *Sacharomyces cerevisiae* durante armazenamento

A viabilidade em quatro tempos diferentes: inicial (zero), após 15, 30 e 60 dias de armazenamento das *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsuladas estocadas em três temperaturas distintas foi avaliada pela contagem das células viáveis em ágar YPD, como previamente detalhado no item 2.3.

## 2.6 Determinação da atividade de água e umidade das microcápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2

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

## 2.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para as análises de eficiência, rendimento e umidade os resultados foram expressos em percentual (%), para a atividade de água na unidade de medida específica (Aa) e para a redução de células viáveis e viabilidade durante 60 dias, foram transformados em escala logarítmica  $\log_{10}$  e expressos em  $\log$  UFC/g.

Para os parâmetros: eficiência e rendimento de método de microencapsulamento e redução de células viáveis após aplicação dos métodos foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (métodos de microencapsulamento) e doze repetições (eficiência, rendimento e redução de células viáveis, respectivamente), com as análises feitas independentemente.

Para os parâmetros umidade e atividade de água da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial (3 x 2 x 8), com três níveis de temperatura (4,0°C; ambiente [18 a 30°C] e 35°C), dois níveis de técnicas de encapsulamento (*spray drying* e extrusão) e oito repetições (umidade e Aa), com as análises feitas independentemente.

Para o parâmetro de viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada

durante 60 dias foram realizadas análises independentes para cada combinação método de microencapsulamento com temperatura, utilizando delineamentos inteiramente casualizados com quatro tratamentos (tempo em dias) e cinco repetições (contagens). A análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando o procedimento PROC GLM, do *software SAS® University Edition*. A comparação de médias na análise de todos os parâmetros foi realizada utilizando o teste de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de  $P < 0,01$ .

### 3. Resultados e discussão

Tanto a utilização do método de microencapsulação por *spray drying* quanto por extrusão podem ser considerados promissores para o encapsulamento de leveduras probióticas. Para tanto é necessário avaliar parâmetros como a taxa de recuperação de produto utilizando agentes encapsulantes (rendimento %) e contagens das células viáveis de leveduras após o encapsulamento em relação à contagem antes do processo em percentual (eficiência de microencapsulação %) e log UFC/g (redução de células viáveis). Na Tabela 1, observa-se que houve diferença ( $p < 0,01$ ) entre os rendimentos, eficiência e redução de células viáveis entre os métodos de microencapsulamento.

**Tabela 1.** Eficiência, rendimento e redução de células viáveis após os métodos de microencapsulamento por *spray drying* e extrusão

Método de microencapsulamento	Parâmetros		
	Redução de células viáveis (UFC/g log10) ( $\bar{X} \pm DP$ )	Eficiência (%) ( $\bar{X} \pm DP$ )	Rendimento (%) ( $\bar{X} \pm DP$ )
Microencapsulamento por <i>spray drying</i>	0,4 <sup>b</sup> ± 0,1	95,6 <sup>a</sup> ± 2,8	37,5 <sup>b</sup> ± 4,1
Microencapsulamento por extrusão	1,9 <sup>a</sup> ± 0,2	80,6 <sup>b</sup> ± 2,2	165,6 <sup>a</sup> ± 16,0

$\bar{X}$ : média, DP: desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ). UFC/g log10 = unidades formadoras de colônias por grama em logaritmos da base dez.

Redução de células viáveis e eficiência de microencapsulação são parâmetros que correlacionam-se e apresentando uma relação inversamente proporcionais entre os resultados. No encapsulamento de células bacterianas, a extrusão é um processo que causa menores danos as células, conferindo maior viabilidade dos micro-organismos encapsulados em comparação ao método de *spray drying* (Simeoni et al., 2014), entretanto aspectos diferentes como a característica morfológica entre leveduras e bactérias é um fato que pode ter relação



com os resultados observados, visto que a técnica por *spray drying* é considerada apropriada para conservação das leveduras, constituindo um processo ajustável para preservação das estruturas celulares dos micro-organismos e dos produtos, mantendo a viabilidade dos probióticos (Luna-Solano et al., 2005; Behboudi- Jobbehdar et al., 2013). Sacchetin et al. (2010) obtiveram eficiência de 98% na incorporação do agente vacinal *Flavobacterium columnare* em solução de alginato. Sosa et al. (2016) utilizaram maltodextrina adicionada a galacto-oligossacarídeos comerciais (GOS) em encapsulação por *spray drying*, e apresentaram eficiência de 93% para *Lactobacillus plantarum*. Aponte et al. (2016), utilizando a técnica de microencapsulação por *spray drying* obtiveram uma redução de 0,8 log UFC/g na viabilidade de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de vinho e crescidas previamente em meio sintético, aplicando temperaturas de entrada a 110°C e saída de 55 °C, evidenciando subsídios para a utilização de ambas as técnicas para a eficiente microencapsulação de probióticos, além do controle de parâmetros como temperaturas de entrada e saída no *spray dryer*. Quanto à eficiência e redução de células viáveis, ambas as técnicas apresentaram resultados favoráveis, acima de 80% e abaixo de 2,00 UFC/g em log 10, respectivamente, porém o microencapsulamento por *spray drying* apresentou melhores resultados comparados a técnica de extrusão.

Em relação ao rendimento, o encapsulamento por *spray drying* (Tabela 1) apresentou resultado satisfatório equiparando-se ao de Abadias et al. (2005), que usando 10% de *skim milk* como encapsulante para *Candida sake* alcançaram 34% de porcentagem de recuperação do produto após secagem. Na preparação da solução de encapsulação por SD do presente estudo, obteve-se o peso úmido do total de leveduras recuperadas após centrifugação, representando o concentrado de células e a água, que não pode ser retirada da massa celular, e adicionou-se a este peso úmido a mesma quantidade de maltodextrina, portanto, a concentração de sólidos da solução encapsulante pode ter sido menor, podendo ter relação com o rendimento observado, uma vez que o *spray dryer* tem a função de evaporar a água da mistura. Ou seja, quanto maior o teor de sólidos na solução, maior será o rendimento produtivo.

O rendimento superior do encapsulamento por extrusão (Tabela 1) apresenta relação direta com características da técnica como a menor retenção de material encapsulante durante o processo, a precipitação gota a gota do polímero encapsulante, a possibilidade de obter diversas cápsulas de diâmetro reduzido e grande capacidade do alginato absorver água, que potencializa o peso das microcápsulas, e por consequência o rendimento do método (Simeoni et al., 2014). Ambas as técnicas apresentaram rendimento satisfatório, com taxa de

recuperação do material encapsulado acima de 37%, um ponto primordial para a utilização das técnicas para a conservação de leveduras probióticas, visto que um satisfatório rendimento diminui a quantidade de processamentos necessários para a produção de uma quantidade adequada de microcápsulas, evidenciando uma potencial redução de custos na utilização do produto.

Umidade e atividade de água representam importantes parâmetros para a avaliação da estabilidade das leveduras durante o armazenamento, determinação da vida útil do produto e possibilidade de ocorrência de contaminação por micro-organismos, cujos resultados estão expressos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão de umidade e da atividade de água da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada por *spray drying* e por extrusão, em diferentes temperaturas, após 60 dias de armazenamento

Temperatura (°C)	Método de microencapsulamento	Parâmetros	
		Umidade (%) ( $\bar{X} \pm DP$ )	Atividade de água ( $\bar{X} \pm DP$ )
4,0	<i>Spray drying</i>	3,5 <sup>b</sup> ± 0,5	0,34 <sup>b</sup> ± 0,04
	Extrusão	95,6 <sup>a</sup> ± 0,6	0,95 <sup>a</sup> ± 0,00
Ambiente (18 a 30)	<i>Spray drying</i>	4,2 <sup>b</sup> ± 0,9	0,36 <sup>b</sup> ± 0,01
	Extrusão	95,9 <sup>a</sup> ± 1,2	0,96 <sup>a</sup> ± 0,01
35	<i>Spray drying</i>	3,1 <sup>b</sup> ± 0,8	0,33 <sup>b</sup> ± 0,01
	Extrusão	95,5 <sup>a</sup> ± 1,1	0,95 <sup>a</sup> ± 0,00

$\bar{X}$ : 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).

Para o armazenamento prolongado de probióticos encapsulados é indicado que a umidade residual seja na faixa de 4,0% ou menos e a atividade de água inferior a 0,25 (Gardiner et al., 2000; Meng et al., 2008; Golowczyc et al., 2010; Vesterlund; Salminen; Salminen, 2012), entretanto valores de atividade de água abaixo de 0,60 inibem a multiplicação microbiana no produto (Ferreira Neto; Figueirêdo; Queiroz, 2005).

Luna-Solano et al. (2000) observaram que a umidade para armazenamento de levedura de cervejaria variou de 5,1 a 10,1% e para atividade de água obteve-se 0,55 a 0,65; valores superiores a este estudo com método de microencapsulamento por *Spray drying*, porém pelo método de extrusão obteve-se valores superiores aos encontrados pelos autores (tabela 2). As microcápsulas de maltodextrina contendo *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 apresentaram umidade e atividade de água aceitáveis para o impedimento do crescimento microbiológico, apesar de um pouco acima em relação a Aa para probióticos, não diferindo entre as temperaturas de armazenamento.

No método de extrusão as microcápsulas preparadas com alginato de sódio contendo *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 apresentaram teor de umidade acima de 95%, não diferindo entre as temperaturas de armazenamento. Belščak-Cvitanović et al. (2015) obtiveram um teor de umidade 95%, resultados semelhantes a este estudo. Microcápsulas produzidas com polissacarídeos formadores de géis, apresentam grande capacidade de retenção de água, por serem formadas por um polímero altamente higroscópico (Cano-Chauca et al., 2005), o que aponta para os resultados obtidos em ambos os parâmetros.

Deste modo, as microcápsulas advindas da técnica *spray drying* apresentavam-se desidratadas, por conta da evaporação da água ocorrida no processo, enquanto que na técnica de extrusão eram formadas microcápsulas úmidas, relacionadas à absorção de água proporcionada pelo agente encapsulante, evidenciando a diferença significativa entre umidade e atividade de água das microcápsulas advindas das duas técnicas. Os resultados mostraram-se favoráveis ao método *spray drying*, entretanto as duas técnicas foram eficientes para manter ambos os parâmetros independentemente da temperatura de armazenamento utilizada, desde que corretamente as microcápsulas sejam estocadas.

A manutenção de células viáveis, em concentrações adequadas é um fator primordial para a utilização de técnicas de preservação de micro-organismos, como o microencapsulamento, oferecendo subsídios para o posterior uso de leveduras encapsuladas como agentes probióticos. A avaliação da viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada por *spray drying* e por extrusão durante 60 dias de armazenamento, variou conforme a técnica e o tempo de exposição as diferentes temperaturas, de um modo geral, até 30 dias foi possível manter a quantidade satisfatória de células viáveis (Tabela 3).

**Tabela 3.** Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada por *spray drying* e por extrusão, em diferentes temperaturas, durante 60 dias de armazenamento

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Método de microencapsulamento	
		Spray drying (UFC/g log10) ( $\bar{X} \pm DP$ )	Extrusão (UFC/g log10) ( $\bar{X} \pm DP$ )
4,0	0	9,15 <sup>a</sup> ± 0,2	7,77 <sup>a</sup> ± 0,2
	15	9,06 <sup>ab</sup> ± 0,2	7,67 <sup>a</sup> ± 0,2
	30	8,78 <sup>ab</sup> ± 0,4	7,61 <sup>a</sup> ± 0,1
	60	8,47 <sup>b</sup> ± 0,3	7,49 <sup>a</sup> ± 0,1

<b>Ambiente (18 a 30)</b>	0	9,08 <sup>a</sup> ± 0,1	7,86 <sup>a</sup> ± 0,2
	15	8,93 <sup>ab</sup> ± 0,2	7,61 <sup>ab</sup> ± 0,2
	30	8,79 <sup>ab</sup> ± 0,1	7,43 <sup>b</sup> ± 0,2
	60	8,40 <sup>b</sup> ± 0,3	7,33 <sup>b</sup> ± 0,1
<b>35</b>	0	8,28 <sup>a</sup> ± 0,1	7,81 <sup>a</sup> ± 0,3
	15	7,60 <sup>b</sup> ± 0,6	7,66 <sup>ab</sup> ± 0,3
	30	6,65 <sup>c</sup> ± 0,4	7,35 <sup>ab</sup> ± 0,4
	60	6,01 <sup>d</sup> ± 0,2	6,93 <sup>b</sup> ± 0,4

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

O microencapsulamento de leveduras probióticas apresenta-se como uma alternativa importante para manutenção da sobrevivência desses micro-organismos ao processamento térmico na indústria de alimentos, e no prolongamento da vida útil do produto (Golowczyc et al., 2010; Thomas et al., 2014; Silva, et al., 2014; Etchepare et al., 2015) preservando as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsuladas viáveis (Tabela 1) mesmo quando estocadas por 60 dias em diferentes condições de armazenamento (Tabela 3).

A concentração recomendada é aproximadamente 6,00 UFC/g em log 10 de probiótico nos alimentos (Simon, 2005). Luna-Solano et al. (2000) testaram a viabilidade de três tratamentos com amido e dois com maltodextrina para encapsulamento de *Saccharomyces cerevisiae* e não observaram diminuição da viabilidade das células (7,00 UFC/g em log 10) armazenadas a 5,0°C por 110 dias. Silva et al. (2015) avaliaram a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* por 120 dias, a 4,0°C e 25°C, e observaram contagens superiores a 6,00 UFC/g em log 10 ao final do estudo.

Aponte et al. (2016) analisaram a sobrevivência da cepa *Saccharomyces cerevisiae* LM52 cultivada previamente em meio à base de melaço, microencapsulada por *spray dryer* e armazenada por seis meses à -18°C e a 4,0°C, obtendo contagem de células viáveis de 10,4 UFC/g em log10, que não apresentou alteração significativa ao longo do armazenamento em ambas temperaturas. Chávarri et al. (2010) encapsularam *Lactobacillus gasserii* em cápsulas de alginato-quitosana e após 28 dias de armazenamento, observaram contagens de células viáveis de 7,00 UFC/g em log 10.

Na visão geral da análise, ambos os métodos de microencapsulamento são capazes de manter a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, em concentração adequada para a utilização da levedura como agente probiótico, durante 60 dias de armazenamento, em diferentes condições de estocagem. O binômio tempo/temperatura é essencial no armazenamento das microcápsulas, havendo uma redução gradual de células viáveis ao decorrer dos 60 dias para ambas as técnicas, em que as temperaturas de 4,0 e 35°C apresentam-se como a mais e menos eficiente, respectivamente, na manutenção das células, e a temperatura ambiente apresenta resultados satisfatórios, representando um fator facilitador para a utilização de tais microcápsulas como agentes probióticos, possibilitando uma maior flexibilidade no armazenamento dos produtos, com um controle menos rígido da temperatura de estocagem.

A *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada pelos métodos de microencapsulamento por *spray drying* e por extrusão apresentou resultados satisfatórios tanto para a taxa de recuperação de produto, como para contagens das células viáveis de leveduras após o encapsulamento, tanto em relação a eficiência quanto a redução de células viáveis, além de viabilidade durante 60 dias, nas condições de armazenamento especificadas (entre 4°C e 35°C), fornecendo subsídios para que as duas técnicas e ambos agentes encapsulantes possam ser utilizados como potencializadores da levedura como agente probiótico e adsorvente de micotoxinas.

Entretanto, na temperatura de 35°C observou-se que houve redução nas contagens das células e com os menores valores ao final de 60 dias, indicando ser uma condição de armazenamento mais agressiva à levedura, sendo a menos indicada entre as três condições analisadas. Ambos os métodos apresentaram diversos pontos favoráveis e desfavoráveis, com o método por extrusão constituindo-se numa técnica simples, barata e de rápida realização, com a necessidade da utilização de menor quantidade de leveduras e agente encapsulante para obtenção de uma quantidade satisfatória de microcápsulas, que apresentem padrões probióticos, porém a avaliação de viabilidade torna-se dificultada por conta da necessidade da dissolução das microcápsulas em citrato de sódio, com vários ciclos de homogeneização, tornando a análise mais demorada, além da necessidade do armazenamento das microcápsulas imersas em água, que necessita de troca semanal.

O método *spray drying* deu origem a um produto de fácil e rápida dissolução em diferentes meios, apresentando uma praticidade de menor tempo para a realização das análises de viabilidade, e que necessita de um controle menos rígido no armazenamento das microcápsulas, por apresentarem características como a baixa umidade e Aa, fatores que

dificultam o crescimento de micro-organismos contaminantes, porém constitui-se em um método que necessita de um aparelho para a realização da técnica, tornando o processo mais oneroso.

#### 4. Conclusões

Os métodos de microencapsulamento por *spray drying* e por extrusão apresentam bom rendimento e eficiência para microencapsulação de células de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, e são capazes de preservar a viabilidade probiótica das células, mesmo em diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que concedeu bolsa de mestrado ao primeiro autor deste trabalho e ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela parceria científica na utilização do *spray dryer*.

#### Referências

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C., Viñas, I., 2005. Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray drying. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 835–846. doi:10.1080/09583150500187041
- Albadran, H.A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V.V., Charalampopoulos, D., 2015. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International.* 74, 208–216. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.016
- Anal, A.K., Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 240–251. doi: 10.1016/j.tifs.2007.01.004
- Aponte, M., Troianiello, G.D., Di Capua, M., Romano, R., Blaiotta, G., 2016. Impact of different spray-drying conditions on the viability of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–9. doi:10.1007/s11274-015-1956-5
- Armando, M., Dogi, C., Pizzolitto, R., Escobar, F., Peirano, M., Salvano, M., Sabini, L., Combina, M., Dalcerro, A., Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B1 binding ability and anti-pathogenic

- bacterial influence. *World Mycotoxin J.* 4, 59–68. doi:10.3920/WMJ2010.1208
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official methods of analysis of the association analytical chemists*. 18. ed. Gaithersburg, MD, 2005. 1526p.
- Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I., 2013. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Dry. Technol.* 31, 1274–1283. doi:10.1080/07373937.2013.788509
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Karlović, S., Djaković, S., Spoljarić, I., Mršić, G., Ježek, D., 2015. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food Chemistry*. 167, 378–386. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.011
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J., 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, p. 467–483. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J., 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Oxford, v. 5, n. 4, p. 420–428. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Castro-Cislaghi, F.P. de, Fritzen-Freire, C.B., Sant’Anna, E.S., 2012. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por *spray drying*: comparação com goma arábica. *Ciência Rural* 42, 1694–1700. doi:10.1590/S0103-84782012005000067
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., Villarán, M.C., 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 142, p. 185–189. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022
- Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A.R., Rosa, L.A., Wall-Medrano, A., 2013. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12. doi: 10.1111/1541-4337.12030
- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodtkorb, A., 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocoll.* 25, 1604–1617. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.12.012
- Etchepare, M.A., Menezes, M.F.S.C., Barreto, A.R., Cavalheiro, C.P., Menezes, C.R., 2015.

- Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletroelásticas. *Ciência e Natura*, Santa Maria, v. 37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 75-86.
- Ferreira Neto, C.J., Figueirêdo, R.M.F., Queiroz, A.J.M., 2005. Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 4, p. 795-802.
- Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P., Stanton, C., 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2605–2612.
- Golowczyc, M.A., Silva, J., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., Teixeira, P., 2010. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 7–12. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02759.x
- Laurenti, E., Garcia, S., 2013. Eficiência de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberação controlada de probiótico encapsulado. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 16, n. 2, p. 107-115
- Lima, J.R., Locatelli, G.O., Finkler, L., Luna-Finkler, C.L., 2014. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. *Revista Ciência & Saúde*, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 27-34. doi: 10.15448/1983-652X.2014.1.15639
- Lodeiro, P., Achterberg, E.P., Pampín J., Affatati A., El-Shahawi M.S., 2016. Silver nanoparticles coated with natural polysaccharides as models to study AgNP aggregation kinetics using UV-Visible spectrophotometry upon discharge in complex environments. *Science of the Total Environment*, 539, 7–16. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.115
- Lu-E Shi., Zhen-Hua Li., Dan-Ting Li., Min Xua., Huai-Yu Chen., Zhi-Liang Zhang., Zhen-Xing Tang., 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering* 117, 99–104. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M. A., Garcia-Alvarado, M. A., Rodriguez-Jimenes, G., 2000. Improved Viability of Spray Dried Brewer'S Yeast By Using Starch (Grits) and Maltodextrin As Processing Aids. *J. Food Process Eng.* 23, 453–462. doi:10.1111/j.1745-4530.2000.tb00526.x
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M.A., Rodríguez-Jimenes, G.C., García-Alvarado, M.A., 2005. Optimization of brewer's yeast spray drying process. *J. Food Eng.* 68, 9–18. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.019



- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 15–25. doi:10.1016/j.ifset.2014.09.010
- Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P., 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* 106, 1406–1416. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076
- Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M.M., Mascioli, A.S., Colpini, L.M.S., Freccia, A., 2008. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 9, n. 4, p. 804-812
- Nayak, A.K., Pal, D., Santra, K., 2013. *Plantago ovata* F. Mucilage-Alginate Mucoadhesive Beads for Controlled Release of Glibenclamide: Development, Optimization, and *In Vitro-In Vivo* Evaluation. *Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1155/2013/151035
- Pinheiro, R.E.E., 2016. Potencial de aplicação de leveduras como adsorvente de aflatoxina B<sub>1</sub> e probióticos em piscicultura. Universidade Federal do Piauí.
- Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M., Pirarat, N., 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Res. Vet. Sci.* 102, 103–111. doi:10.1016/j.rvsc.2015.07.021
- Pizzolitto, R.P., Armando, M.R., Combina, M., Cavaglieri, L.R., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A., 2012. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J. Environ. Sci. Heal. B.* 47, 933–941. doi:10.1080/03601234.2012.706558
- Rivaldi, J.D., 2012. Crescimento e caracterização enzimática de bactérias probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento em matriz polimérica natural. Universidade de São Paulo.
- Rodrigues, A.M.D., 2018. Capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B<sub>1</sub> por leveduras isoladas de viveiros de piscicultura. Universidade Federal do Piauí.
- Sacchetin, P.S.C.; Moraes, A.M.; Leal, C.A.G.; Figueiredo, H.C.P., 2010. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. *Química Nova*, v. 33, p. 263-268. doi: 10.1590/S0100-40422010000200006
- SAS® University Edition - Statistical Analyses System - SAS/University Edition, © 39 SAS Institute Inc.
- Silva, A.L., 2014. Suplementação para equinos – Revisão. *Revista Eletrônica Nutritime*.

Artigo 284, v. 11, n. 06, p. 3810– 3819

- Silva, P.T., Fries, L.L.M., Menezes, C.R., Silva, C.B., Soriani, H.H., Bastos, J.O., Motta, M.H., Ribeiro, R.F., 2015. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 45, n. 7, p. 1342-1347. doi: 10.1590/0103-8478cr20140211
- Simeoni, C.P., Etchepare, M.A., Menezes, C.R., Fries, L.M., Menezes, M.F.C., Stefanello, F.S., 2014. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. *REGET*, Santa Maria, v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 66-75. doi: 10.5902/2236117013020
- Simon, O., 2005. Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Adv. Pork Prod.* 16, 161–167.
- Sosa, N., Gerbino, E., Golowczyc, M.A., Schebor, C., Gómez-Zavaglia, A., Tymczyszyn, E.E., 2016. Effect of galacto-oligosaccharides: Maltodextrin matrices on the recovery of *Lactobacillus plantarum* after spray-drying. *Front. Microbiol.* 7, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2016.00584
- Souza, C.R.F. de, 2003. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e leito de jorro. Universidade de São Paulo.
- Souza, C.R.F., Fernandes, L.P., Bott, R.F., Oliveira, W.P., 2015. Influência do processo de secagem e condição de armazenamento de extratos secos de *Bauhinia forficata* e *Passiflora alata* sobre seu perfil de dissolução. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 67–75. doi:10.1590/1983-084X/11\_137
- Thomas, M.B., Vaidyanathana, M., Radhakrishnana, K., Raichur, A.M., 2014. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. *Journal of Food Engineering.* 136, 1–8. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.03.015
- Vesterlund, S., Salminen, K., Salminen, S., 2012. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology.* 157, 319–321. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.016

#### 4 Capítulo II

**Interferência da microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a capacidade  
probiótica e potencial adsorvente de micotoxinas da *Saccharomyces cerevisiae***

---

**Interferência da microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a capacidade  
probiótica e potencial adsorvente de micotoxinas da *Saccharomyces cerevisiae***

**Interference of spray drying and extrusion microencapsulation on the probiotic and  
adsorptive potential of mycotoxins of *Saccharomyces cerevisiae***

João Farias de Sousa Júnior<sup>(1)</sup>, Aline Maria Dourado Rodrigues<sup>(1)</sup>, Leidiane Sousa Santos<sup>(1)</sup>,  
Leniza Luiza Oliveira Nascimento<sup>(1)</sup>, Márcio dos Santos Rocha<sup>(2)</sup>, José Lindemberg Rocha  
Sarmiento<sup>(3)</sup>, Maria Christina Sanches Muratori<sup>(1)</sup>

(1) Universidade Federal do Piauí (UFPI), Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias, Campus Socopo, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil. E-mail: j.f.s.j@hotmail.com, alinemary2@yahoo.com.br, leidiane.vet@gmail.com, leniza4321@gmail.com, chrismuratori@uol.com.br

(2) Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências da Natureza (CCN), Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: msrocha@ufpi.edu.br

(3) Universidade Federal do Piauí (UFPI), Departamento de Zootecnia (DZO), Centro de Ciências Agrárias, Campus Socopo, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil. E-mail: sarmiento@ufpi.edu.br

**Resumo** - Objetivou-se neste estudo avaliar a interferência dos métodos de microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a capacidade probiótica e o

potencial adsorvente *in vitro* de micotoxinas da *Saccharomyces cerevisiae*. Após o término da realização das técnicas, as microcápsulas formadas foram coletadas e transferidas para três frascos esterilizados hermeticamente vedados com Parafilm®. Cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente: 4,0°C; 35°C (incubados em estufa B.O.D) e temperatura ambiente na bancada do laboratório (entre 18 e 30°C), por 60 dias. Após o período de armazenamento, foi realizada a contagem do número de leveduras, para avaliação da manutenção das culturas com quantidade de células viáveis necessárias para serem empregadas como agentes probióticos, de 10<sup>6</sup> UFC/g. As leveduras microencapsuladas foram submetidas aos seguintes testes para avaliação da capacidade probiótica: inibição de microorganismos patogênicos, auto-agregação e capacidade de co-agregação, e testes adsorventes *in vitro* de AFB<sub>1</sub> e OTA. A *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulada por *spray drying* e por extrusão apresentou resultados satisfatórios para capacidade probiótica e adsorção *in vitro* de AFB<sub>1</sub> e OTA, indicando que ambos os métodos de microencapsulamento mantêm tais propriedades da levedura, mesmo em diferentes temperaturas de armazenamento.

Termos para indexação: Maltodextrina, Aflatoxina B<sub>1</sub>, Ocratoxina A, alginato de sódio, *in vitro*.

Abstract - The objective of this study was to evaluate the interference of spray drying and extrusion microencapsulation methods on probiotic capacity and the *in vitro* adsorbent potential of *Saccharomyces cerevisiae* mycotoxins. After the completion of the techniques, the microcapsules formed were collected and transferred to three sterile vials sealed tightly with Parafilm®. Each vial was stored at a different temperature: 4.0°C; 35°C (incubated in oven B.O.D) and room temperature on the laboratory bench (between 18 and 30°C) for 60 days. After the storage period, the number of yeasts was counted, to evaluate the maintenance

of cultures with the number of viable cells needed to be used as probiotic agents, of  $10^6$  CFU/g. The microencapsulated yeasts were submitted to the following probiotic capacity tests: inhibition of pathogenic microorganisms, self-aggregation and co-aggregation capacity, and *in vitro* adsorbent assays of AFB<sub>1</sub> and OTA. *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 microencapsulated by spray drying and extrusion showed satisfactory results for probiotic capacity and *in vitro* adsorption of AFB<sub>1</sub> and OTA, indicating that both microencapsulation methods maintain such yeast properties, even at different storage temperatures.

Index terms: Maltodextrin, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, sodium alginate, *in vitro*.

### **Introdução**

A habilidade de sobreviver aos processos tecnológicos da *Sacharomyces cerevisiae*, permanecendo com células viáveis durante a vida útil do produto e sua efetividade contra micotoxinas propicia a utilização de métodos de preservação deste micro-organismo, como a microencapsulação. Esta técnica consiste no revestimento de compostos de interesse, por uma matriz encapsulante no intuito de preservar as propriedades benéficas, conferindo a proteção de compostos biologicamente ativos ou células de agressões físicas do ambiente ou do meio que estão incorporados, possibilitando a utilização destes em ampla variedade de produtos, por diversos métodos, como a microencapsulação por *spray drying* e o microencapsulamento por extrusão (ANAL; SINGH, 2007; DOHERTY et al., 2011; SIMEONI et al., 2014; PINPIMAI et al., 2015; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015; PINHEIRO, 2016).

Os probióticos são micro-organismos vivos, fornecidos nos alimentos e suplementos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos a saúde do consumidor, como a melhoria da microbiota intestinal e melhoria de desempenho de animais.

Entre esses micro-organismos enquadram-se leveduras, como a *Sacharomyces cerevisiae*, que possuem vantagens como não serem afetadas por substâncias antibacterianas, conter vários compostos imunoestimulantes, facilidade na extração de sua biomassa, capacidade de assimilar grande variedade de substratos e atuarem como agentes descontaminantes de micotoxinas (ARMANDO et al., 2011; PIZZOLITTO et al., 2012; KELLER, 2013; PINHEIRO, 2013; CARUFFO et al., 2015; PFLIEGLER; PUSZTAHELYI; PÓCSI, 2015; PINHEIRO, 2016).

As micotoxinas são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* que podem se constituir em perigo saúde humana e animal quando consumidas. Elas são estáveis a temperaturas elevadas (>150°C) utilizadas durante o processamento de alimentos como de cereais e rações, e também quando submetidas a valores de pH ácidos próximos aos encontrados no suco gástrico de diversos animais. Quando presentes nos alimentos representam um risco potencial para a sanidade pela toxidade elevada, que quando ingeridas em doses tóxicas podem produzir efeitos agudos ou crônicos (micotoxicoses), além de 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; PUSZTAHELYI; PÓCSI, 2015; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015; MATEJOVA et al., 2017).

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; BARRETO; HANNAS, 2015).

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, destacando-se os tipos B1, B2, G1 e G2, 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., 2017).

As ocratoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus ochraceus*, com a ocratoxina A (OTA) sendo a mais conhecida e tóxica, possuindo diversas propriedades tóxicas, principalmente nefrotóxicas, além de propriedades hepatotóxicas, citotóxicas, teratogênicas, imunossupressoras e carcinogênicas, podendo estar presente numa grande variedade de alimentos para consumo animal (MAGNOLI et al., 2004; FREIRE et al., 2007; RINALDI et al., 2007; CARDOSO FILHO; MURATORI, 2011; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015). Pelo exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar a interferência dos métodos de microencapsulação por *spray drying* e por extrusão sobre a capacidade probiótica e o potencial adsorvente *in vitro* de micotoxinas da *Saccharomyces cerevisiae*.

## **Material e métodos**



Para preparo das microcápsulas foi utilizada a cepa de *Sacharomyces cerevisiae* A8L2 isolada por Rodrigues (2018) de água dos viveiros de piscicultura da cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Esta cepa foi identificada por técnicas moleculares, PCR-*fingerprinting* e sequenciamento da região ITS-5.8S, e sua capacidade probiótica e adsorvente *in vitro* de AFB1 foi testada por Rodrigues (2018), desde então, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Controle Microbiológico do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí.

Para a microencapsulação por *spray drying* e extrusão a levedura foi cultivada em 200 e 10 mL, respectivamente, de caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) preparado com 5,0 g de extrato de levedura; 5,0 g de peptona; 40 g de glicose; 0,03 g de cloreto de sódio e água destilada q.s.p. para 1000 mL, incubada sob agitação (150 rpm) em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab<sup>®</sup>), a 30°C durante 48 horas. Após incubação, as células foram centrifugadas (3500 rpm por 10 min) e lavadas duas vezes com água destilada esterilizada, resultando num concentrado de células de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2 (*pellets*).

Para o processo de encapsulamento por *spray drying*, foi estabelecido que a solução encapsulante deveria conter 5,0% de sólidos, composto por: 2,5% dos *pellets*; 2,5% do agente encapsulante (maltodextrina) e 95% de água destilada. Inicialmente pesaram-se os *pellets* para utilização da mesma quantidade de maltodextrina (Pryme Foods<sup>®</sup>), para composição da solução.

Para o preparo da solução de encapsulamento, primeiramente a maltodextrina foi ressuspendida em água destilada e posteriormente esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriar, os *pellets* foram acrescentados asépticamente à solução de encapsulamento.

Para a execução da técnica micro encapsulamento por *spray drying* foi utilizado um aparelho mini *spray dryer* B-290 co-corrente, de escala laboratorial (Buchi<sup>®</sup>). Utilizou-se

105°C como temperatura de entrada. A solução de encapsulamento foi mantida em agitador magnético à temperatura ambiente e conduzida para a câmara de secagem por bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 3,0 mL/min, fluxo do ar de secagem de 35 m<sup>3</sup>/h e pressão do compressor de ar de 0,7 MPa. As microcápsulas foram coletadas da base do ciclone e transferidas para três frascos esterilizados hermeticamente vedados com Parafilm®. Cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente: 4,0°C; 35°C (incubados em estufa B.O.D) e temperatura ambiente na bancada do laboratório (entre 18 e 30°C) por 60 dias.

Para o processo de encapsulamento por extrusão, foi estabelecido que a solução de encapsulamento deveria conter 51% de sólidos, composto por 2,0% dos *pellets*, 49% do agente encapsulante (emulsão de alginato de sódio 7,5%) e 49% de água destilada. Inicialmente pesaram-se os *pellets*, em seguida acrescentou-se a respectiva quantidade de alginato de sódio 7,5% (Isofar®), para composição da solução acrescentou-se a água destilada.

Para o preparo da solução encapsulante, primeiramente foi formulada uma emulsão de alginato de sódio a 7,5% que foi esterilizada em autoclave a 105°C por 15 minutos. Após resfriar, a emulsão foi transferida para tubos tipo Falcon contendo os *pellets*. A solução encapsulante foi transferida por gotejamento utilizando seringas estéreis descartáveis Luer Slip (Procare®) e agulhas hipodérmicas esterilizadas 18G x 1½ (Wiltex®) para frascos tipo béqueres contendo solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub> 0,15M). Durante a transferência da solução os frascos foram mantidos em agitador magnético, e no final do processo permaneceram por 10 minutos aproximadamente em agitação até que houvesse precipitação da emulsão e formação das microcápsulas.

Em seguida, em condições assépticas, a solução encapsulante foi peneirada utilizando uma peneira doméstica de nylon (Plasvale®) com granulometria de 10 mesh (2,0mm). As microcápsulas retidas na peneira foram transferidas para três frascos esterilizados utilizando

uma espátula esterilizada, em seguida adicionou-se 40 mL de água destilada esterilizada. Os frascos foram vedados com Parafilm®. Cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente: 4,0°C; 35°C (incubados em estufa B.O.D) e temperatura ambiente na bancada do laboratório (entre 18 e 30°C) por 60 dias.

Após 60 dias dos processos de encapsulamento foi realizada a avaliação da manutenção das culturas com quantidade de células viáveis mínimas para serem empregadas como agentes probióticos, na faixa de  $10^6$  UFC/g (SIMON, 2005), utilizando o método de semeadura por espalhamento em superfície no ágar extrato de levedura peptona dextrose (YPD) com a seguinte formulação: 6,0 g de peptona; 6,0 g de glicose; 3,0 g de extrato de levedura; 0,05g de clorafenicol; 4,5 g de ágar e água destilada q.s.p. para 300 mL.

As leveduras microencapsuladas foram submetidas aos seguintes testes para avaliação da capacidade probiótica: inibição de micro-organismos patogênicos, autoagregação e co-agregação das leveduras, de acordo com a metodologia proposta por Armando et al. (2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2) microencapsulada foi testada para a produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas utilizando o método *agar slab* no meio YPD de acordo com metodologia proposta por Strus (1998). Neste ensaio foram avaliadas as seguintes bactérias: *Aeromonas hydrophila* INCQS 00318 (IOC/FDA 110-36), *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) e *Streptococcus agalactiae* INCQS 00128 (ATCC 27853), advindas da coleção de micro-organismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz.

As bactérias patogênicas foram semeadas em ágar Nutriente a 37°C por 24 horas em estufa B.O.D. Posteriormente, foi ressuspendido um inóculo de cada bactéria em solução salina (0,9%) e ajustadas as suspensões bacterianas ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Após ajuste do inóculo, com auxílio de *swab* esterilizado (Cral®), as bactérias foram semeadas em estrias por toda a superfície de placas de Petri com ágar Nutriente. Em seguida, discos de ágar

YPD de 14 mm contendo as leveduras semeadas previamente a 25°C por 48 horas, foram cortados assepticamente e adicionados às placas com ágar Nutriente que foram semeadas anteriormente com as bactérias patogênicas, em duplicata. Após 24 horas de incubação a 37°C, mediram-se os diâmetros das zonas de inibição do crescimento em torno das placas de ágar, com os resultados sendo descritos em milímetros (mm), subtraindo-se o diâmetro do disco de ágar de YPD.

Para determinar a propriedade de adesão célula-célula das leveduras pelos ensaios de autoagregação e co-agregação foi utilizada a metodologia descrita por Kos et al. (2003). Os inóculos de cada cepa foram cultivados em caldo YPD e incubados em estufa microbiológica a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos em microcentrífuga Hermle (modelo Z216MK), em temperatura ambiente, lavadas duas vezes com água esterilizada, ressuspensas em 4,0 mL de tampão fosfato salino (PBS - pH 7,2) e homogeneizadas em vórtex QL901 (Vertex®). Em ambos os ensaios, as suspensões de células foram padronizadas para uma densidade ótica  $(DO_{\text{inicial}})_{600 \text{ nm}} = 0,5$ . Os tubos com as suspensões foram incubados a 37°C por duas horas sem agitação. Em seguida, os valores de absorvância da camada superior foram medidos a 600 nm  $(DO_{\text{final}})$  em espectrofotômetro (Biospectro®). Para determinação da porcentagem de autoagregação das leveduras encapsuladas foi aplicada a fórmula 1:

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

Onde:

$DO_{\text{final}}$  = Densidade ótica final

$DO_{\text{inicial}}$  = Densidade ótica inicial

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

foi realizada como descrito por Pizzolitto et al. (2012). Foram utilizados neste ensaio patógenos intestinais comuns de peixes: *Aeromonas hydrophila* INCQS 00318 (IOC/FDA 110-36) e *Streptococcus agalactiae* INCQS 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 ressuspendeu-se as células em PBS (pH 7,2). Foram realizadas diluições com a mesma solução tampão para ajustar a concentração final tanto de leveduras quanto de bactérias a  $DO_{600\text{ nm}} = 0,5$ . 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 ( $DO_{\text{mix}}$ ) e dos tubos controle com suspensões de leveduras ( $DO_{\text{levedura}}$ ) e bactérias ( $DO_{\text{patógeno}}$ ) tiveram a absorbância medida a 600 nm. Para determinação da porcentagem de co-agregação foi aplicada a fórmula 2:

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

Onde:

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

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

$DO_{\text{levedura}}$  = Densidade ótica da levedura

O ensaio de adsorção de AFB<sub>1</sub> e OTA foi realizado de acordo com Pizzolitto et al. (2011); Poloni et al. (2015). A solução inicial de AFB<sub>1</sub> e OTA utilizada no ensaio foi extraída de um núcleo produzido com a cepa padrão de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (USDA, 149 Agricultural Research Service, Peoria, IL) e *Aspergillus ochraceus*, pertencente à micoteca do NUEPPA, em concentração de AFB<sub>1</sub> 2,67 µg/mL e OTA 593 µg/mL. A

metodologia adotada neste ensaio avalia a capacidade de adsorção simulando as condições gastrointestinais de tilápia-do-Nilo (Rotta, 2003).

A concentração para o ensaio foi padronizada em  $10^7$  células/mL. Foram preparadas em microtubos soluções de trabalho de AFB<sub>1</sub> (15 e 45 ng/mL) e OTA (140 ng/mL) em PBS (pH 7,0). A seguir, para simular a acidez do estômago de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), adicionou-se 1,0 mL da solução de PBS (pH 2,0) aos microtubos, que, a seguir foram incubados a 30°C por 60 minutos em agitação constante (150 rpm) em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab<sup>®</sup>). Logo após, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga Hermle (modelo Z216MK). Desprezou-se o sobrenadante e aos concentrados de células resultantes, adicionou-se 1,0 mL de PBS em pH 7,0, contendo AFB<sub>1</sub> e OTA, nas concentrações testadas (15 e 45 ng/mL) e (140 ng/mL), respectivamente. Os mesmos microtubos foram incubados por 60 minutos a 30°C e submetidos à agitação constante em mesa agitadora.

Após este período, os microtubos foram novamente centrifugados a 5.000 rpm durante 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo micotoxinas não adsorvidas foi transferido para outros microtubos esterilizados e armazenados para análise do percentual de adsorção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em paralelo, também foi realizado o controle positivo para ambas micotoxinas, em meio PBS.

A detecção e a quantificação da AFB<sub>1</sub> e OTA foram realizadas utilizando um cromatógrafo SHIMADZU<sup>®</sup>, modelo PROMINENCE com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al. (1994) e Scudamore e Macdonald (1998). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6mm id., 5,0µm de tamanho de partículas, VARIAN, Inc. Palo Alto, EUA). Para análise de AFB<sub>1</sub>, utilizou-se uma alíquota de 200 µL da amostra, que foi acrescida de 700 µL de solução derivatizante, composta por ácido

trifluoroacético: ácido acético glacial: água (20:10:70, v/v). Como fase móvel, utilizou-se acetonitrila: metanol: água (17:17:66 v/v) a uma vazão de 1,5 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. O limite de detecção do método analítico para aflatoxina foi de 0,4 ng.g<sup>-1</sup> e o limite de quantificação foi estabelecido como sendo três vezes o limite de detecção (1,2 ng.g<sup>-1</sup>).

Para análise de OTA, a fase móvel utilizada foi acetonitrila: água: ácido acético (57:41:2 v/v/v) a uma vazão de 1,0 mL/min. A fluorescência de derivados de ocratoxina foi gravada em comprimentos de onda de excitação e emissão de  $\lambda$  300 nm e 460 nm  $\lambda$ , respectivamente. O volume de injeção foi de 20 µL. O limite de detecção do método analítico foi de 0,02 ng.g<sup>-1</sup> e o limite de quantificação foi estabelecido como sendo três vezes o limite de detecção (0,06 ng.g<sup>-1</sup>).

As curvas de quantificação das toxinas foram realizadas por medição das áreas e sua interpolação a uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de padrão de AFB<sub>1</sub> e OTA, respectivamente, de onde foram extraídos os limites de detecção e quantificação das técnicas. As quantificações de micotoxinas adsorvidas foram estabelecidas por meio da correlação entre as áreas dos picos das amostras e da curva padrão. As porcentagens de adsorção de AFB<sub>1</sub> e OTA foram realizadas pela fórmula 3:

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

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para as análises da capacidade probiótica (atividade antimicrobiana, auto-agregação e co-agregação) os resultados foram expressos em percentual (%) e para os testes de adsorção de AFB<sub>1</sub> e OTA, foram expressos em quantidade de micotoxina adsorvida (ng mL<sup>-1</sup>) e percentual de micotoxina adsorvida, nas respectivas concentrações.

Para a avaliação de atividade antimicrobiana foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial (6 x 3 x 2), com seis níveis de temperatura/método de encapsulamento (4,0°; ambiente [18 a 30°] e 35°C, combinadas a *spray drying* e extrusão, separadamente), três níveis de bactérias patogênicas (*Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*) e duas repetições (halo de inibição em mm). Para a avaliação da capacidade de auto-agregação foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (temperatura/método de encapsulamento, com 4,0°; ambiente [18 a 30°] e 35°C, combinadas a *spray drying* e extrusão, separadamente) e quatro repetições (percentual de autoagregação).

Para a avaliação da capacidade de co-agregação foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial (6 x 2 x 2), com seis níveis de temperatura/método de encapsulamento (4,0°; ambiente [18 a 30°] e 35°C, combinadas a *spray drying* e extrusão, separadamente), dois níveis de bactérias patogênicas (*Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*) e duas repetições (percentual de co-agregação).

Para o teste de adsorção de AFB<sub>1</sub> foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial (6 x 2 x 2), com seis níveis de temperatura/método de encapsulamento (4,0°; ambiente [18 a 30°] e 35°C, combinadas a *spray drying* e extrusão, separadamente), dois níveis de concentrações de micotoxinas (15 ng mL<sup>-1</sup> e 45 ng mL<sup>-1</sup>) e duas repetições (quantidade adsorvida e percentual de adsorção, realizadas separadamente). Para o teste de adsorção de OTA foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (temperatura/método de encapsulamento, com 4,0°; ambiente [18 a 30°] e 35°C, combinadas a *spray drying* e extrusão, separadamente) e quatro repetições (quantidade adsorvida e percentual de adsorção, realizadas separadamente).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando o procedimento PROC GLM, do *software SAS® University Edition*. A comparação de médias na análise dos



parâmetros foi realizada utilizando o teste de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de  $p < 0,01$ .

### Resultados e discussões

A *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2) microencapsulada tanto pelo método *spray drying* quanto pela técnica de extrusão, apresentou contagem de células viáveis acima de  $10^6$  UFC/g que é o valor mínimo recomendado por Simon (2005) para o emprego como agente probiótico em alimentos nas três temperaturas de armazenamento ( $4^\circ\text{C}$ , ambiente [ $18$  a  $30^\circ\text{C}$ ] e  $35^\circ\text{C}$ ), embasando a realização dos testes probióticos e adsorventes.

Todas as leveduras microencapsuladas, advindas das três distintas condições de armazenamento inibiram o crescimento dos patógenos utilizados no ensaio, com zonas de inibição superiores a 10 mm, demonstrando uma satisfatória atividade antagonista, com resultados expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores médios e desvio padrão da atividade antimicrobiana da *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2), microencapsulada por *spray drying* e por extrusão, armazenadas por 60 dias às temperaturas:  $4,0^\circ\text{C}$ ; ambiente (entre  $18$  e  $30^\circ\text{C}$ ) e  $35^\circ\text{C}$

Método de microencapsulação/temperatura	Halo de inibição (mm) <sup>1</sup>		
	<i>Aeromonas hydrophyla</i> ( $\bar{X} \pm \text{DP}$ )	<i>Streptococcus agalactie</i> ( $\bar{X} \pm \text{DP}$ )	<i>Staphylococcus aureus</i> ( $\bar{X} \pm \text{DP}$ )
<i>Spray drying</i> / $4^\circ\text{C}$	$18,5^a \pm 2,1$	$19,0^a \pm 0,0$	$18,5^a \pm 0,7$
<i>Spray drying</i> / ambiente	$19,5^a \pm 0,7$	$21,0^a \pm 0,0$	$20,0^a \pm 1,4$
<i>Spray drying</i> / $35^\circ\text{C}$	$20,5^a \pm 0,7$	$21,5^a \pm 0,7$	$21,0^a \pm 0,0$
Extrusão/ $4^\circ\text{C}$	$18,0^a \pm 2,8$	$20,0^a \pm 0,0$	$18,0^a \pm 1,4$
Extrusão/ ambiente	$19,5^a \pm 2,1$	$19,5^a \pm 0,7$	$20,0^a \pm 0,0$
Extrusão/ $35^\circ\text{C}$	$21,0^a \pm 0,0$	$20,5^a \pm 0,7$	$19,5^a \pm 0,7$

$\bar{X}$ : média, DP: desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ). <sup>1</sup> - = zona de inibição  $\leq 3$  mm; + = zona de inibição  $\geq 3$  mm a  $\leq 9$  mm; ++ = zona de inibição  $\geq 10$  mm a  $\leq 15$  mm; +++ = zona de inibição  $> 15$  mm.

A atividade antagonista de leveduras em relação a alguns micro-organismos pode ser baseada em alguns pontos como a competição por nutrientes e a liberação de micocinas, substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos, como as bactérias (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012). Armando et al. (2011) utilizando as cepas RC008 e RC016 da espécie *S. cerevisiae*, isoladas do ambiente de suínos, obtiveram resultados de atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *Salmonella entérica* e *Enterobacter cloacae*. No presente estudo foi possível observar que a *S. cerevisiae* A8L2 apresentou efeito inibitório contra *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, mostrando que as técnicas de microencapsulamento utilizadas mantêm a atividade antimicrobiana da levedura.

Os resultados de auto-agregação das leveduras microencapsuladas, advindas das três distintas condições de armazenamento, estão expressos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão da capacidade de auto-agregação da *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2), microencapsulada por *spray drying* e extrusão, advinda do armazenamento nas temperaturas 4,0°C, ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C

Método de microencapsulação/temperatura	Auto-agregação (%) ( $\bar{X} \pm DP$ )	Escore de Agregação <sup>1</sup>
<i>Spray drying</i> / 4°C	77,5 <sup>cd</sup> ± 0,1	+
<i>Spray drying</i> / ambiente	76,1 <sup>d</sup> ± 0,4	+
<i>Spray drying</i> / 35°C	63,4 <sup>e</sup> ± 0,2	+
Extrusão/ 4°C	92,9 <sup>a</sup> ± 0,1	++
Extrusão/ ambiente	85,2 <sup>b</sup> ± 0,4	++
Extrusão/ 35°C	78,4 <sup>c</sup> ± 0,0	+

$\bar{X}$ : 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). <sup>1</sup>(-): agregação ≤ 60, (+): agregação > 60 e < 80, (++) : agregação ≥ 80.

A característica de auto-agregação está relacionada a capacidade da levedura aderir-se às células epiteliais da mucosa gastrointestinal (NEWAJ-FYZUL; AL-HARBI; AUSTIN, 2014). A capacidade de auto-agregação da cepa *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2) que foi microencapsulada por *spray dryer* e por extrusão foi ≥ 60% (Tabela 2), semelhante ao obtido com cepas da mesma espécie que não foram microencapsuladas (ARMANDO et al. 2011; Pizzolitto et al. 2012; RODRIGUES, 2018), em todas as condições de temperatura testadas,

mostrando que o uso das técnicas de microencapsulamento, principalmente a de extrusão, mantém a capacidade de aderir-se às células epiteliais da mucosa gastrointestinal, sendo favoráveis para a utilização da levedura na formulação de um produto probiótico comercial para piscicultura.

A co-agregação é uma propriedade inerente aos micro-organismos probióticos que auxilia na prevenção da invasão de agentes patogênicos ao organismo do hospedeiro, por forma barreira protetora contra a colonização e remoção de bactérias patogênicas do lúmen intestinal (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008; BINETTI et al., 2013; ABBASILIASI et al., 2017). Esta capacidade foi confirmada em *Saccharomyces cerevisiae* não encapsuladas contra *Salmonella Enteritidis* (BINETTI et al. 2013); *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enterica* (Rodrigues 2018) e *E. coli* (BINETTI et al. 2013; RODRIGUES 2018). A *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2) microencapsulada por *spray dryer* e por extrusão apresentou capacidade de co-agregação (> 12%) nas diversas condições de armazenamento e estocagem contra *A. hydrophila* e *S. agalactiae* (Tabela 3). Tais resultados mostram que o uso das técnicas de microencapsulamento utilizadas preservam a capacidade de co-agregação da levedura, fornecendo indícios de que leveduras microencapsuladas podem ser utilizadas na prevenção da invasão de agentes patogênicos ao organismo do hospedeiro.

**Tabela 3.** Médias e desvio padrão da capacidade de co-agregação da *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2), microencapsulada por *spray drying* e extrusão, advinda do armazenamento nas temperaturas 4,0°C, ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C

Método de microencapsulação/temperatura	<i>Aeromonas hydrophila</i> ( $\bar{X} \pm DP$ )	<i>Streptococcus agalactiae</i> ( $\bar{X} \pm DP$ )
<i>Spray drying</i> / 4°C	31,8 <sup>a</sup> ± 0,1	28,1 <sup>b</sup> ± 1,1
<i>Spray drying</i> / ambiente	13,5 <sup>d</sup> ± 0,9	30,6 <sup>ab</sup> ± 0,3
<i>Spray drying</i> / 35°C	25,1 <sup>bc</sup> ± 0,1	28,3 <sup>b</sup> ± 2,1
Extrusão/ 4°C	28,4 <sup>b</sup> ± 0,1	26,5 <sup>b</sup> ± 1,0
Extrusão/ ambiente	29,6 <sup>ab</sup> ± 2,1	33,8 <sup>a</sup> ± 0,9
Extrusão/ 35°C	23,1 <sup>c</sup> ± 0,7	18,1 <sup>c</sup> ± 0,1

$\bar{X}$ : 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 triagem de um bom probiótico requer testes *in vitro* e *in vivo* direcionados para o modo de ação do micro-organismo conforme sua finalidade e fisiologia do organismo será beneficiado. Baseada nos parâmetros digestivos da tilápia que é um peixe onívoro, ficou evidenciada a eficácia *in vitro* das cepas *S. cerevisiae* A8L2 microencapsulada pelos dois métodos testados (Tabelas 1, 2 e 3).

Micro-organismos com capacidade probiótica e que apresentem eficiência na adsorção de diversas micotoxinas são os mais desejáveis por reduzir o impacto das micotoxinas sobre o desempenho dos animais (PIZZOLITTO et al., 2011; RIBEIRO; BARRETO; HANNAS, 2015).

Cepas viáveis de *S. cerevisiae* não encapsuladas podem ter capacidade para adsorver AFB<sub>1</sub> (PIZZOLITTO et al. 2012; PINHEIRO et al. 2017; RODRIGUES, 2018) e OTA (PINHEIRO et al. 2015), em concentrações variáveis. A *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2) microencapsulada por *spray drying* e por extrusão apresentou capacidade para adsorção de 45 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 140 ng mL<sup>-1</sup> de OTA (Tabela 4), em diferentes temperaturas, após 60 dias de armazenamento.

**Tabela 4.** Médias e desvio padrão da adsorção de AFB<sub>1</sub> e OTA da *Saccharomyces cerevisiae* (A8L2), microencapsulada por *spray drying* e extrusão, advinda do armazenamento nas temperaturas 4,0°C, ambiente (entre 18 e 30°C) e 35°C

Método de microencapsulação/ temperatura	AFB1 Adsorvida (ng mL <sup>-1</sup> )		% de AFB1 Adsorvida (ng mL <sup>-1</sup> )		OTA Adsorvida (ng mL <sup>-1</sup> )	% de OTA Adsorvida (ng mL <sup>-1</sup> )
	15 ng mL <sup>-1</sup> ( $\bar{X} \pm DP$ )	45 ng mL <sup>-1</sup> ( $\bar{X} \pm DP$ )	15 ng mL <sup>-1</sup> ( $\bar{X} \pm DP$ )	45 ng mL <sup>-1</sup> ( $\bar{X} \pm DP$ )	140 ng mL <sup>-1</sup> ( $\bar{X} \pm DP$ )	140 ng mL <sup>-1</sup> ( $\bar{X} \pm DP$ )
<i>Spray drying</i> / 4°C	2,95 <sup>a</sup> ± 0,4	10,53 <sup>a</sup> ± 6,2	19,7 <sup>a</sup> ± 2,5	24,4 <sup>a</sup> ± 14,7	113,46 <sup>a</sup> ± 2,7	80,2 <sup>a</sup> ± 1,9
<i>Spray drying</i> / ambiente	2,65 <sup>a</sup> ± 0,4	8,37 <sup>a</sup> ± 1,2	17,5 <sup>a</sup> ± 2,5	19,5 <sup>a</sup> ± 2,9	120,39 <sup>a</sup> ± 21,4	85,1 <sup>a</sup> ± 15,1
<i>Spray drying</i> / 35°C	4,35 <sup>a</sup> ± 1,2	9,86 <sup>a</sup> ± 1,0	29,2 <sup>a</sup> ± 7,8	22,9 <sup>a</sup> ± 2,3	121,49 <sup>a</sup> ± 9,2	85,9 <sup>a</sup> ± 6,5
Extrusão/ 4°C	3,00 <sup>a</sup> ± 0,9	5,08 <sup>a</sup> ± 2,1	20,2 <sup>a</sup> ± 5,6	11,8 <sup>a</sup> ± 4,9	83,18 <sup>ab</sup> ± 4,0	63,8 <sup>ab</sup> ± 3,2
Extrusão/ ambiente	1,00 <sup>a</sup> ± 0,9	6,65 <sup>a</sup> ± 4,5	6,5 <sup>a</sup> ± 5,8	15,5 <sup>a</sup> ± 10,4	90,22 <sup>ab</sup> ± 0,2	58,8 <sup>ab</sup> ± 7,9
Extrusão/ 35°C	2,05 <sup>a</sup> ± 1,5	6,21 <sup>a</sup> ± 0,1	13,8 <sup>a</sup> ± 10,2	14,4 <sup>a</sup> ± 0,2	41,36 <sup>b</sup> ± 1,6	29,2 <sup>b</sup> ± 8,3

$\bar{X}$ : 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).

Deste modo, a microencapsulação mantém a capacidade de adsorção de micotoxinas da levedura, e a potencializa como um agente adsorvente ideal, sendo efetiva contra vários destes metabólitos, representando uma característica essencial, visto que geralmente os alimentos estão contaminados por mais de um tipo de micotoxina.

### Conclusão

Os métodos de microencapsulamento por *spray drying* e por extrusão mantém a capacidade probiótica e de adsorção *in vitro* de AFB<sub>1</sub> e OTA da *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, mesmo em diferentes temperaturas de armazenamento.

### Referências

- ABBASILIASI, S. et al. *In vitro* assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. **BMC Microbiol.** 17, 121, 2017.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Science Technology**, 18, 240–251, 2007.
- ANATER, A. et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 451, p. 1–10, 2016.
- ARMANDO, M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin J.**, v. 4, n. 1, p. 59–68, 2011.
- BINETTI, A. et al. Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. **J. Appl. Microbiol.** 115, 434–444, 2013.
- BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **Int. J. Food Microbiol.** 119, 140–146, 2007.
- CARDOSO FILHO, F. C.; MURATORI, M. C. S. Ração, fungos e micotoxinas – Revisão. **Nutritime**, v. 8, n. 06, p. 1619-1623, nov/dez, 2011.
- CARUFFO, M. et al. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. **Front. Microbiol.** 6, 1–9, 2015.

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.

DOHERTY, S. B. et al. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocoll**, 25, 1604–1617, 2011.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110).

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. **Front. Microbiol.** 3, 1–12, 2012.

KELLER, K. M. **Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal**. 2013. 168p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias e Sanidade Animal) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.** 94, 981–987, 2003.

MAGNOLI, C. et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 326–334, 2004.

MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. **Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213–224, 2006.

MATEJOVA, I. et al. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186–200, 2017.

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

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

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

PEREYRA, C. M. et al. Fungi and mycotoxins in feed Intended for Sows at different reproductive stages in Argentina. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

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

PINHEIRO, R. E. E. **Eficiência antimicotoxina de composto à base de leveduras secas de cervejaria e de probióticos comerciais para adsorção *in vitro* de aflatoxina b1**. 2013. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

PINHEIRO, R. E. E. et al. Adsorção “*in vitro*” de ochratoxina a por probióticos utilizados na aquicultura. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 9, n. 1, p. 59-64, 2015.

PINHEIRO, R. E. E. et al. Avaliação *in vitro* da adsorção de aflatoxina B<sub>1</sub> por produtos comerciais utilizados na alimentação animal. *Arq. Inst. Biol.*, v. 84, p. 1-6, 2017.

PINHEIRO, R. E. E. **Potencial de aplicação de leveduras como adsorvente de aflatoxina b1 e probióticos em piscicultura.** 2016. 94p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

PINPIMAI, K. et al. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 103–111, 2015.

PIZZOLITTO, R. P. et al. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, p.323–346, 2011.

PIZZOLITTO, R. P. et al. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption ability for use in poultry feedstuffs. **J. Environ. Sci. Health B.**, v. 47, n. 10, p. 933–941, 2012.

POLONI, V. et al. Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food Addit. Contam. Part A** 32, 970–976, 2015.

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

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, jan/fev, 2015.

RINALDI, G. et al. Effect of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 204-210, 2007.

ROCHA, M. E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159–165, 2014.

RODRIGUES, A. M. D. **Capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B<sub>1</sub> por leveduras isoladas de viveiros de piscicultura.** 2018. 106p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura.** Embrapa Pantanal, Corumbá, 2003.



SAS® UNIVERSITY EDITION - Statistical Analyses System - **SAS/University Edition**, © 39 SAS Institute Inc.

SCUDAMORE, K; MACDONALD, S. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. **Food Additives and Contaminants**. v. 15, p. 401-410, 1998.

SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **REGET**, Santa Maria, v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 66-75.

SIMON, O. Micro-organisms as feed additives-probiotics. **Adv. Pork Prod.** 16, 161–167, 2005.

STRUS, M. A new method for testing antagonistic activity of lactic acid bacteria (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria. **Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia**, v. 50, p. 123–130, 1998.

TRUCKSESS, M. W. et al. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in corn, almonds, brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 6, p. 1512–1521, 1994.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O microencapsulamento de probióticos é uma tecnologia que tem o intuito de preservar as propriedades benéficas de um micro-organismo. Desta forma, os métodos de microencapsulação por *spray drying* e por extrusão mantiveram a viabilidade, a capacidade probiótica e de adsorção *in vitro* de micotoxinas da *S. cerevisiae* A8L2 preservada, em diferentes condições de armazenamento, o que propicia subsídios para a sua inclusão em rações de piscicultura, para posteriores estudos *in vivo*. O resultado favorável apresentado pelos métodos de microencapsulamento também propicia a sua utilização em relação a outras espécies animais, através da realização de adequados testes probióticos e adsorventes de micotoxinas, *in vitro* e *in vivo*, na busca pela ampliação do uso de tais processos tecnológicos.

O estudo de micro-organismos com capacidade probiótica e descontaminante de micotoxinas em alimentos, assim como sua utilização, vem intensificando-se, e o entendimento de processos tecnológicos de conservação destes agentes torna-se necessário, visto que representa uma maneira de potencializar satisfatórios resultados, na busca de estar sempre otimizando parâmetros de sanidade e produção animal.

## REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, 1997.
- ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- AQUINO, S. et al. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated sample of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 352-356, 2005.
- ARMANDO, M. R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environmental with aflatoxin B1 detoxification ability and anti-pathogenic bacteria influence in vitro. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, p. 59-68, 2011.
- BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxincontaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.
- BOONYARATPALIN, M. et al. 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, p. 388-398, 2001.

BRASIL. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. 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.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial Applications. **Journal of Food Engineering**, 104, p. 467–483, 2011.

CÂMARA JÚNIOR, A. A. **Microencapsulação de Fisetina em Células de Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Através de Choque Osmótico**. 2014. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

CARÃO, A. C. P. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, 2014.

CARDOSO FILHO, F. C. et al. Ocorrência De *Aspergillus* Spp., *Penicillium* Spp. E Aflatoxinas Em Amostras De Farinha De Milho Utilizadas No Consumo Humano, Piauí, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 3, p. 443-447, 2011.

CARDOSO FILHO, F. C.; MURATORI, M. C. S. Ração, fungos e micotoxinas – Revisão. **Nutritime**, v. 8, n. 06, p. 1619-1623, nov/dez, 2011.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, 2013.

DANTIGNY, P. et al. Basis of Productive Mycology. **International Journal of Food Microbiology**. v. 100, p. 187-196, 2005.

FAZIO, M. L. S. **Caráter “killer” e antagonismo de leveduras aplicadas no biocontrole de fitopatógenos micotoxigênicos em fruta**. 2009. 105 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. As Micotoxinas. **Food Ingredients Brasil**. n. 7, 2009.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110).

GABRIEL, J. S. **Síntese, caracterização e atividade antifúngica de derivados anfifílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2013. 102 p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

GARVIL, M. P.; BORGES, R.; GALVÃO, R. D. V. Impactos da presença do fungo *Penicillium sp.* na indústria. **Revista Eletrônica da Reunião Anual de Ciência – E - RAC**. Centro Universitário do Triângulo – UNITRI. v. 4, n. 1. 2014.

GIL, L. H. V. G.; LIMA, G. J. M. M. Micotoxinas: o perigo oculto das rações. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 9, n. 3, p. 51-55, 1996.

GOPINATH, R. et al. Ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B1 diets. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 32–43, 2012.

HWANG, J. H.; LEE, K. G. Reduction of aflatoxin B1 contamination on wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 71-75, 2006.

IAMANAKA, B. T. et al. Micotoxinas em Alimentos. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS, 7., 2010, Recife. **Anais...Recife: UFRPE**, 2010. p. 138-161, 2010. Disponível em: <<http://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/download/128/117>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

ICIDCA. Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia**. Brasília: ABIPTI, 1999. p. 49-301.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluations on certain mycotoxins in food 2001**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

KELLER, K. M. **Estudo sobre a contaminação com espécies toxígenas, potencialmente produtoras de micotoxinas, em rações destinadas a alimentação de equinos**. 2009. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias e Sanidades Animal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

KELLER, K. M. **Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal**. 2013. 168p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias e Sanidade Animal) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 713-722, 2007.

LAURENTI, E.; GARCIA, S. Eficiência de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberação controlada de probiótico encapsulado. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 107-115, 2013.

- LAVELL, S. Biological control of molds expected to greatly reduce chemicals residues. **Good Fruit Grower**, v. 16, n. 6, 1993.
- MAGNOLI, C. et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 326–334, 2004.
- MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. **Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213–224, 2006.
- MÁRCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grãos, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.
- MATEJOVA, I. et al. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186–200, 2017.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89-99, 2010.
- MEIRELLES, A. A. D. **O papel da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na estabilização de emulsões envolvendo hexadecano e uma fase aquosa**. 2016. 137 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- MEURER, F. et al. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 804-812, out/dez, 2008.
- MEURER, F. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como probiótico para as fases iniciais do cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 88 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.
- MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295p.
- MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- NORRED, W. P. Fumonisin – mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology, Environment and Health**, v. 38, n. 3, p.309-328, 1993.
- OLIVEIRA, I. R. N. **Antocianinas extraídas de capim-gordura (*Melinis minutiflora*): Atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. 2011. 152p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Campo Grande, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011.

- PEREIRA, M. M. G. Aflatoxinas em Alimentos Destinados a Bovinos e em Amostras de Leite da Região de Lavras, Minas Gerais. **Brasil, Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PEREYRA, C. M. et al. Fungi and mycotoxins in feed Intended for Sows at different reproductive stages in Argentina. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 1-7, 2010.
- PERRY, F. G. Biotechnology in animal feeds and feeding, an overview. In: WALLACE, R. J.; CHESSON, A. **Biotechnology in animal feeds and feeding**. New York: VCH, 1995. p. 1-15.
- PIETSCH, C. et al. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: an initial study. **Toxins**, v. 5, p. 184-192, 2013.
- PINHEIRO, R. E. E. et al. Adsorção “*in vitro*” de ochratoxina a por probióticos utilizados na aquicultura. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 1, p. 59-64, 2015.
- PINHEIRO, R. E. E. et al. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 12, n. 5, p. 4268-4279, 2015.
- PINHEIRO, R. E. E. **Eficiência antimicotóxina de composto à base de leveduras secas de cervejaria e de probióticos comerciais para adsorção *in vitro* de aflatoxina b1**. 2013. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
- PINHEIRO, R. E. E. **Potencial de aplicação de leveduras como adsorvente de aflatoxina b1 e probióticos em piscicultura**. 2016. 94p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and spoliage**. 2. ed. London: Blackie academic and Professional, 2009.
- PIZZOLITTO, R. P. et al. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, p.323–346, 2011.
- RAHAIE, S. et al. Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1647–1653, 2012.
- RAJEEV BHAT, R. R. V. et al. Mycotoxins in food and feed – Present status and future concerns. **Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 51-81, 2010.
- 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, jan/fev, 2015.
- RINALDI, G. et al. Effect of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 204-210, 2007.

ROCHA, M. E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159–165, 2014.

ROSSI, P. et. al. Efeito do absorvente a base de glucomanano esterificado no desempenho e caracterização visceral de frangos de corte. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 16, n. 1-4, p. 91-100, 2010.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. **Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites**. Utrecht, Netherlands: Centralbureau voor Schimmel cultures 49, p. 201-241, 2004.

SANTIN, E. et al. Evaluation of the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **International Journal Poultry Sciences**, v. 2, p. 241–244, 2003.

SANTOS, T. A. O. **Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying***. 2012. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SILVA, A. L. et al. Suplementação para equinos – Revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**. Artigo 284, v. 11, n. 06, p. 3810– 3819, nov/dez, 2014.

SILVA, A. T. A. **Cultivo de kefir em soro de leite e avaliação da viabilidade celular por liofilização**. 2015. 49p. Monografia (Bacharelado em Nutrição) – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2015.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**, Recife, v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA, D. D. et al. **Micotoxinas em Cadeias Produtivas do Milho: Riscos à Saúde Animal e Humana**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 29 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 193).

SILVA, P. T. et al. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 7, p. 1342-1347, 2015.

SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **REGET**, Santa Maria, v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 66-75.

SKRBIC, Z. et al. The effects of stocking density on individual broiler welfare parameters 2. Different broiler stocking densities. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 1, p. 17-25, 2011.

SOLA, M. C. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. **Plant Disease**, v. 83, n. 2, p. 155-158, 1999.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª Ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2567-2575, 2009.

YOSHISAWA, T. **Mycotoxins analyses for federative republic of Brazil**. Japan: Training Course, 2001.