



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL

**ADSORÇÃO *IN VITRO* DE AFLATOXINA B₁ PELA PAREDE CELULAR DA CEPA
DE *Saccharomyces cerevisiae* A8L3**

Mestranda:

Naira Soares e Silva

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Christina Sanches Murtori

Teresina

2023

NAIRA SOARES E SILVA

**ADSORÇÃO *IN VITRO* DE AFLATOXINA B₁ PELA PAREDE CELULAR DA CEPA
DE *Saccharomyces cerevisiae* A8L3**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Zootecnia tropical – PPGZT da Universidade Federal do Piauí – UFPI, na área de concentração de Produção Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori

**Teresina
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

S586a Silva, Naira Soares e.
Adsorção in vitro de aflatoxina b1 pela parede celular da cepa de
Saccharomyces cerevisiae A8131 / Naira Soares e Silva. -- 2023.
40 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Tropical, 2024.

“Orientadora: Profa. Dra. “Maria Christina Sanches Muratori.”

1. CLAE. 2. Levedura probiótica. 3. Mananoligossacarídeos
(MOS), 4. β -glucanos. I. Muratori, Maria Christina Sanches. II.
Título.

CDD 636.084

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**ADSORÇÃO IN VITRO DE AFLATOXINA B1 PELA PAREDE CELULAR DA
CEPA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A8L3**

NAIRA SOARES E SILVA

Dissertação aprovada em: 28/08/2023

Banca Examinadora:



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



Profa. Dra. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro (Interna) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Externo) / IFMA

RESUMO

A contaminação fúngica em ração animal pode provocar diversos efeitos adversos para a saúde humana e animal, causados por efeitos micotóxicos, como a perda da produção animal e patologias a curto e longo prazo, alternativas adicionais na alimentação animal estão sendo fornecidas para reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas e os seus efeitos tóxicos. O estudo teve como objetivo testar a capacidade da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 de adsorver aflatoxina B₁ *in vitro*. A cepa estudada pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Controle Microbiológico do NUEPPA/CCA/UFPI. No laboratório foram realizadas as seguintes etapas: a) Teste de viabilidade *in vitro* da cepa *S. cerevisiae* A8L3 às condições similares ao pH do trato gastrointestinal da tilápia, nos pH 2,0 e 7,0; b) Teste de adsorção de aflatoxina B₁ pela cepa *S. cerevisiae* A8L3 *in vitro* nas concentrações 0,0; 25,0; 50,0 e 75,0 ng/ mL de AFB₁; c) Extração da parede celular da *S. cerevisiae* A8L3 e capacidade de adsorção aflatoxina B₁ nas concentrações de 0,0; 25,0; 50,0 e 75,0 ng/mL de AFB₁. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) onde o teste de viabilidade às condições de pH gastrointestinais com esquema fatorial 3 x 4 (três tipos de pH em quatro tempos distintos), e no teste de adsorção o esquema fatorial foi de 2 x 4 (dois fatores e quatro concentrações diferentes de aflatoxina). Os resultados mostraram que a cepa A8L3 sobreviveu e multiplicou-se nas condições similares ao pH do trato gastrointestinal de tilápia, e ambas, tanto a cepa A8L3 como sua parede celular possuem potencial de adsorção até os 75,0 ng/mL de aflatoxina B₁, onde a parede celular apresenta melhor adsorção de aflatoxina B₁ na concentração de 25,0 ng/ml, com valor de 64,5%.

Palavras-chave: CLAE, levedura probiótica, mananoligossacarídeos (MOS), β -glucanos.

ABSTRACT

Fungal contamination in animal feed can cause several adverse effects on human and animal health caused by mycotoxic effects, such as loss of animal production and short- and long-term pathologies. Additional alternatives in animal feed are being provided to reduce the bioavailability of mycotoxins and their toxic effects. The present study aimed to test the ability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 to adsorb aflatoxin B1 in vitro. The strain of this study belongs to the microorganism's collection in the Microbiological Control Laboratory of NUEPPA/CCA/UFPI. The following steps were performed in the laboratory: a) In vitro viability test of the strain *S. cerevisiae* A8L3 to conditions similar to the pH of the tilapia gastrointestinal tract, at pH 2.0 and 7.0; b) Aflatoxin B1 adsorption test by strain *S. cerevisiae* A8L3 in vitro at concentrations 0.0; 25.0; 50.0 and 75.0 ng/mL of AFB1; c) Cell wall extraction of *S. cerevisiae* A8L3 and adsorption capacity aflatoxin B10 at 0.0; 25.0; 50.0 and 75.0 ng/mL concentrations of AFB1. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD), where the viability test was conducted at gastrointestinal pH conditions with a factorial scheme 3 x 4 (three types of pH at four different times), and in the adsorption test the factorial scheme was 2 x 4 (two factors and four different concentrations of aflatoxin). The results showed that the strain A8L3 survived and multiplied under conditions similar to the pH of the tilapia gastrointestinal tract, and both strain A8L3 and its cell wall have adsorption potential up to 75.0 ng/mL aflatoxin B1, where the cell wall presents better adsorption of aflatoxin B1 at a concentration of 25.0 ng/ml, with a value of 64.5%.

Keywords: HPLC, probiotic yeast, mananoligosaccharides (MOS), β -glucans

Lista de Figuras

Figura 01. Estruturas Furano e Cumarina	13
Figura 02. Tipos de Aflatoxinas	14
Figura 03. Estrutura da parede celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , importante fonte de extração da molécula β -1,3/1,6-glucano.....	18
Figura 04. Curva de calibração por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com AFB1 nas concentrações (10,0; 25,0;50,0; 75,0;100,0 ng/mL)	30
Figura 05. Leitura realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do tratamento parede celular 25ng de AFB1	31

Lista de Tabelas

- Tabela 01.** Média e desvio padrão das contagens da *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isoladas em ambientes de piscicultura, Teresina, PI, submetidas a testes com pH e presença de sais biliares 29
- Tabela 02.** Média e desvio padrão da quantidade e do percentual adsorção de aflatoxina B1 em diferentes concentrações pela *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 e pela sua parede celular 32

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Peixe Tilápia	12
2.2	Aflatoxina B1	13
2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.4	Adsorção da aflatoxina	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Teste de viabilidade <i>in vitro</i> da cepa A8L3 de <i>S. cerevisiae</i> às condições de pH do trato gastrointestinal de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	23
a)	Tolerância ao ácido clorídrico em pH 2,0	23
b)	Tolerância aos sais biliares (pH 7,0)	23
3.2	Adsorção de AFB1 pela cepa <i>S. cerevisiae</i> A8L3 sob condições simuladas do trato gastrointestinal de tilápia <i>in vitro</i>	25
3.3	Obtenção de biomassa e Extração da parede celular da cepa <i>S. Cerevisiae</i> A8L3	27
3.3.1	Adsorção de AFB1 pela parede celular da cepa <i>S. cerevisiae</i> A8L3	27
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1	Teste de tolerância e viabilidade <i>in vitro</i> da cepa <i>S. cerevisiae</i> A8L3 aos pH semelhantes do trato gastrointestinal de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	29
5.2	Avaliação da adsorção de aflatoxina B1 pela cepa <i>S. cerevisiae</i> A8L3 e sua parede celular <i>in vitro</i>	30
6.	CONCLUSÕES	35
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
8.	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de peixe de cultivo em 2022 foi de 860.355 toneladas, a aquicultura foi o setor de produção de alimentos mais expandiu nos últimos 50 anos, com desenvolvimento médio de 5,3% ao ano, desde o ano de 2000. Estima-se que a produção mundial de peixes em 2030 deve aumentar 15% em relação a 2018, podendo atingir 204 milhões de toneladas. Nesse cenário os peixes continuam em destaque sendo os organismos aquáticos mais cultivados, totalizando uma produção de 54,4 milhões de toneladas entre espécies de água doce e marinha. O Brasil ocupa a 12º lugar em piscicultura, sendo o oitavo maior para produção de peixes cultivados em água doce. (FAO, 2020).

Com os efeitos da pandemia no mercado internacional de pescado, as exportações da piscicultura brasileira apresentaram aumento de 15 % em dólar e queda de -13% em toneladas no ano de 2022 em comparação com o ano anterior, passando 9.806t para 8.492t (PEIXE BR, 2023).

Devido a demanda por pescado de melhor qualidade, a piscicultura vem buscando aperfeiçoar seu cultivo com a intenção de expandir a produção. Junto a essa expansão da atividade, enfermidades associadas a alimentação dos peixes podem reduzir o ganho de peso, aumento da mortalidade e do tempo de cultivo. Dentre as enfermidades mais frequentes, destacam-se as de origem nutricional causadas pelo oferecimento de ração com baixa qualidade, ao armazenamento e estocagem que favoreça o desenvolvimento fúngico. Dependendo da espécie e das condições de armazenamento da ração, esses micro-organismos podem produzir micotoxinas prejudiciais à saúde animal.

As micotoxinas são compostos tóxicos resultantes do metabolismo secundário de fungos vários tipos de substratos. Esses metabólitos em alimentos representam potencial risco à saúde humana e animal (MARQUIS, 2014). Os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicilium* são os mais frequentemente encontrados em rações e os maiores produtores de micotoxinas (SKRBIC et al., 2011; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2020). A contaminação por fungos micotoxigênicos pode ocorrer em qualquer momento, durante a produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento de grãos (BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010). Os principais fatores que propiciam desenvolvimento dos fungos toxigênicos são as condições de umidade e temperatura relacionados à armazenagem (ASTORECA et al. 2009; ATAYDE et al. 2014).

As aflatoxinas são os metabólitos fúngicos mais conhecidos e pesquisados, produzidas principalmente pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Essas toxinas têm caráter mutagênico, teratogênico e cancerígeno. Em seres humanos ocorre relação entre a ingestão de aflatoxina e o carcinoma hepatocelular (OLIVEIRA et al., 2010; PINHEIRO et al. 2017; BEDOYA-SERNA et al. 2018). Esses fungos e suas toxinas podem estar presentes nas rações para animais pela utilização de grãos contaminados para sua formulação (SANTOS et al. 2014; BALDISSERA et al. 2018).

Devido à natureza tóxica das micotoxinas, estratégias de controle têm sido desenvolvidas, tais como: prevenção da contaminação e do crescimento fúngico, descontaminação de alimentos que contenham micotoxinas e ainda, inibição ou a adsorção no trato gastrointestinal de micotoxinas presentes no alimento consumido (MALLMANN et al., 2006). Dentre estas, o controle mais assertivo contra as micotoxinas seria no armazenamento adequado da ração, diminuindo as condições de contaminação fúngica, oferecendo assim um alimento de melhor qualidade. Havendo a ineficiência do controle adequado, podem ser utilizados procedimentos que possibilitem a redução de contaminantes tóxicos nos alimentos, sendo eles físicos, químicos e biológicos (RAHAIE et al., 2012). Dentre as alternativas, o controle biológico destaca-se por ser uma alternativa bastante promissora, na utilização de bactérias e leveduras adicionadas a ração como ação de detoxificação, para o controle de micotoxinas liberadas pelos fungos.

Entre os agentes biológicos que podem ser utilizados para adsorção de micotoxinas, as leveduras secas ou desidratadas são uma das formas mais utilizadas, sendo obtida, em grande parte, dos resíduos de processamento em fábricas de cervejarias, resultando assim, em um composto mais concentrado, sendo também uma alternativa para o descarte desse produto (PINHEIRO et al., 2015). Especificamente, extratos de parede celular de leveduras possuem alto conteúdo de polissacarídeos não amiláceos (glucanos e mananos), com propriedades que beneficiam o sistema imune e interferem positivamente na microbiota intestinal de peixes (HISANO et al., 2008), com isso a importância de se estudar a parede celular das leveduras está relacionada com a sua capacidade de adsorção de micotoxinas (YIANNIKOURIS et al., 2006), assim trazendo um impacto econômico significativo na produção animal uma vez que esses micro-organismos, ou apenas sua parede celular, podem ser utilizados como aditivos em alimentos para animais e reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas e os seus efeitos tóxicos.

Nesse contexto, tanto as leveduras, como a sua parede celular são produtos promissores à serem utilizadas para fins biotecnológicos, especialmente na área de aditivo alimentar na

produção de peixes. Com isso, nesse trabalho objetivou-se avaliar se a *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 permanece viável em condições de pH semelhantes às do trato gastrointestinal da tilápia, bem como a cepa e sua parede celular têm capacidade para adsorver aflatoxina B₁ *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peixe Tilápia

A Tilápia (*Oreochromis sp*) é um peixe africano pouco exigente e facilmente adaptável a diferentes ambientes. Graças a essas características, seu cultivo ocorre em diversos continentes. A produção mundial de tilápia atingiu 4,4 milhões de toneladas, representando 9% do total de pescado produzido no mundo, sendo o pescado produzido em maior quantidade em vários países (FAO, 2020). O crescimento acentuado da Tilapicultura dentro da aquicultura mundial é a terceira maior espécie em crescimento, no ano de 2020.

Trata-se de peixe que tem hábito alimentar preferencialmente herbívoro pelo consumo de plantas aquáticas e de fitoplâncton. Possui trato gastrointestinal completo composto por boca, faringe, esôfago, estômago, intestino longos e ânus. O trato gastrointestinal (GI) é formado por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (PHROMPANYA; SAENPHET; SAENPHET, 2019). A secreção das células da camada mucosa lubrifica o lúmen intestinal para facilitar o transporte e adsorção de macromoléculas, onde é no sistema (GI) que contém quantidade substanciais de tecidos linfóides organizados com grandes populações de células imunes efectoras inatas e adaptativas (RAWLING *et al.*, 2023).

No sistema imunológico dos peixes teleósteos, a maioria das funções imunes inatas são semelhantes às dos mamíferos, existem algumas diferenças na estrutura das células imunes do tecido linfóide associado ao intestino (LICKWAR *et al.*, 2017, GOMES *et al.*, 2020). Diferentes tipos de mucos podem ser encontrados no trato GI dos peixes e essa variação depende da espécie, do tipo de alimentação, idade e da porção do sistema GI. A eficiência digestiva depende de tipo de alimentação e hidrólise no trato GI, da temperatura e das enzimas digestivas (IZVEKOVA *et al.*, 2013).

No estômago da *Oreochromis sp* os valores de pH oscilam durante a digestão e após a alimentação. De um modo geral, durante a digestão das tilápias os alimentos permanecem por aproximadamente quatro horas no estômago em pH 1,5 e doze horas no intestino em pH 7,0 (GETACHEW, 1989; HLOPHE; MOYO; NCUBE, 2014).

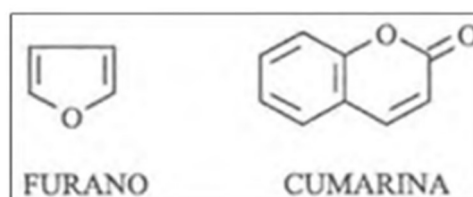
2.2 Aflatoxina B₁

As aflatoxinas são micotoxinas, que podem ocorrer naturalmente no ambiente, desde que o agente esteja em situação propícia e em condições ambientais adequadas para sua proliferação, seu nome aflatoxina, é derivado da combinação entre *Aspergillus, flavus* e micotoxina. A descoberta desta toxina aconteceu em 1960, na Inglaterra, devido à um surto, em perus, causado por uma doença desconhecida, denominada doença “X”. Tal doença foi causada pela ingestão de amendoim contaminado com *A. flavus*, o que levou a morte mais de 100 mil perus e outros animais envolvidos (PERAICA et al., 1999; BHAT et al., 2010).

A umidade e a temperatura são os fatores que mais influenciam sobre a multiplicação fúngica e a produção de aflatoxinas. Considera-se ótimo para essas finalidades umidade superior a 80% e temperatura entre 36,0 °C e 38,0 °C. Para produção de aflatoxina a temperatura ideal deve estar entre 25,0 °C a 27,0 °C (ABBAS, 2005; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Outros fatores também interferem na produção de aflatoxinas, dentre eles destacam-se: composição de substrato, valores de pH, teores de oxigênio e de dióxido de carbono, competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante, estresse da planta e uso de fertilizantes ou fungicidas (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MAGAN; OLSEN, 2006).

Todos os compostos pertencentes ao grupo possuem um núcleo, cumarina, associado ao furano e à lactona (Figura 1). As aflatoxinas do grupo B, G e M possuem estruturas químicas distintas, possuindo anel ciclopentenona, lactona insaturada e derivados hidroxilados de B1 e B2 respectivamente (ARAÚJO, 2012).

Figura 1. Estruturas Furano e Cumarina

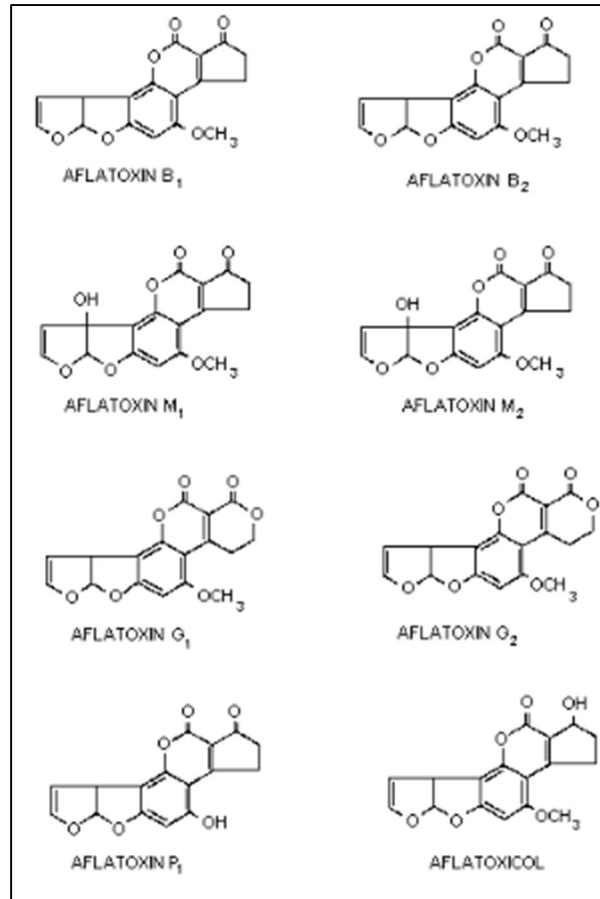


Fonte: Adaptado de ARAÚJO, J. M. A. Aflatoxinas. Química de alimentos: teoria e prática. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 340-352.

Dezoito diferentes tipos de aflatoxinas foram identificados (figura 2), as de maior interesse médico são denominadas aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2) (OLIVEIRA e GERMANO, 1997; BATH et al. 2010). Estas toxinas são resultantes do metabolismo fúngico, no entanto, aflatoxicol, AFM1, AFM2 e AFQ1 são produtos

resultantes da biotransformação hepática da AFB₁ (SPINOSA; GÓRNIAK; PALERMONETO, 2008).

Figura 2. Tipos de Aflatoxinas



Fonte: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ICHM. Environmental health criterial 11. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>>. Acesso em: 21 abril. 2023.

As aflatoxinas são um dos grandes problemas que o setor da aquicultura enfrenta atualmente em várias partes do mundo, o risco da contaminação do alimento por toxinas, dentre elas a aflatoxina B₁ (AFB₁), que são compostos tóxicos de baixo peso molecular, metabolitos secundários produzidos a partir de micélios ou esporos de fungos filamentosos, principalmente os fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* que são encontrados principalmente em regiões mais quentes e úmidas do mundo (HUSSAIN; MATEEN; GATLIN, 2017).

As micotoxicoses podem ser primárias, quando ocorre o consumo direto dos produtos contaminados, e secundárias, relacionada à ingestão de leite, carne, ovos ou derivados de

animais que ingeriram alimento contaminado (SANOU et al., 2021). Em ambos os casos, as micotoxinas podem causar distúrbios no organismo, interferindo no metabolismo, no desenvolvimento, além desencadear quadros de neoplasias, mutagênese, teratogênese e imunossupressão (MASSIMO; OSVALDO, 2012; THANUSHREE et al., 2019; LUO et al., 2021).

A AFB1 é uma das toxinas mais poderosas conhecida principalmente na questão de parâmetros zootécnicos, com redução do crescimento, ganho de peso e a saúde de animais aquáticos (GONÇALVES et al., 2018). Nos últimos anos vários trabalhos sobre os efeitos tóxicos da AFB1 têm sido bem avaliados em peixes e camarões (HUSSAIN et al., 2017; WANG et al., 2018; ZENG et al., 2019; TASA et al., 2020; GHAFARIFARSANI et al., 2021; HUANG et al., 2021).

O fígado é o principal órgão desintoxicante, com isso se torna alvo de toxinas ou carcinógenos (YOON et al., 2020), isso se deve aos efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressivos e hepatotóxicos, que são influenciados por fatores como espécie, idade, estado nutricional, dose e período de exposição do organismo à toxina (GONÇALVES, 2016). A presença desta toxina em alimentos causa sérios danos à saúde humana e animal (HERNANDEZ-MENDOZA; GARCIA; STEELE, 2009; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). Com isso a legislação brasileira permite limites máximos de 50 µg/kg de aflatoxinas em qualquer matéria-prima ou ração destinada para consumo animal no Brasil (BRASIL, 1988).

Para manifestar seus efeitos tóxicos a AFB1 precisa sofrer uma ativação metabólica (CHU, 1991), sua forma ativada é o composto denominado como 8,9-óxido de AFB1. Este composto é bastante eletrofílico, sendo capaz de reagir rapidamente com macromoléculas, a exemplo do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (LIN et al., 2006), podendo fazer assim alterações na formação inicial e multiplicação celular. A ligação AFB1 8,9-epóxido com o DNA origina os mecanismos básicos dos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos, pois a ligação covalente desse composto ao DNA resulta na formação do adulto aflatoxina-N7-guanina (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Segundo Hsieh e Atkison (1991) os adultos são responsáveis pela lesão bioquímica primária causada pelas aflatoxinas. A ligação química 8,9-óxido de AFB1 com o DNA modifica sua estrutura e como consequência, a sua atividade biológica, dando origem aos mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e de neoplasias ocasionadas pela AFB1

(OLIVEIRA E GERMANO., 1997 e LIN et al.,2006). A aflatoxina é tóxica para a maioria dos animais, com valores acima de 0,5 mg/ kg de peso de animais vivos (ARAÚJO et al., 2012)

A introdução de rações formuladas para alimentação em cultivo de organismos aquáticos favoreceu a presença de aflatoxinas no ambiente tropical e subtropical, por esse motivo, a tilápia também tem sido foco de estudos para investigar efeitos letais e várias propriedades fisiológicas (DENG et al., 2010).

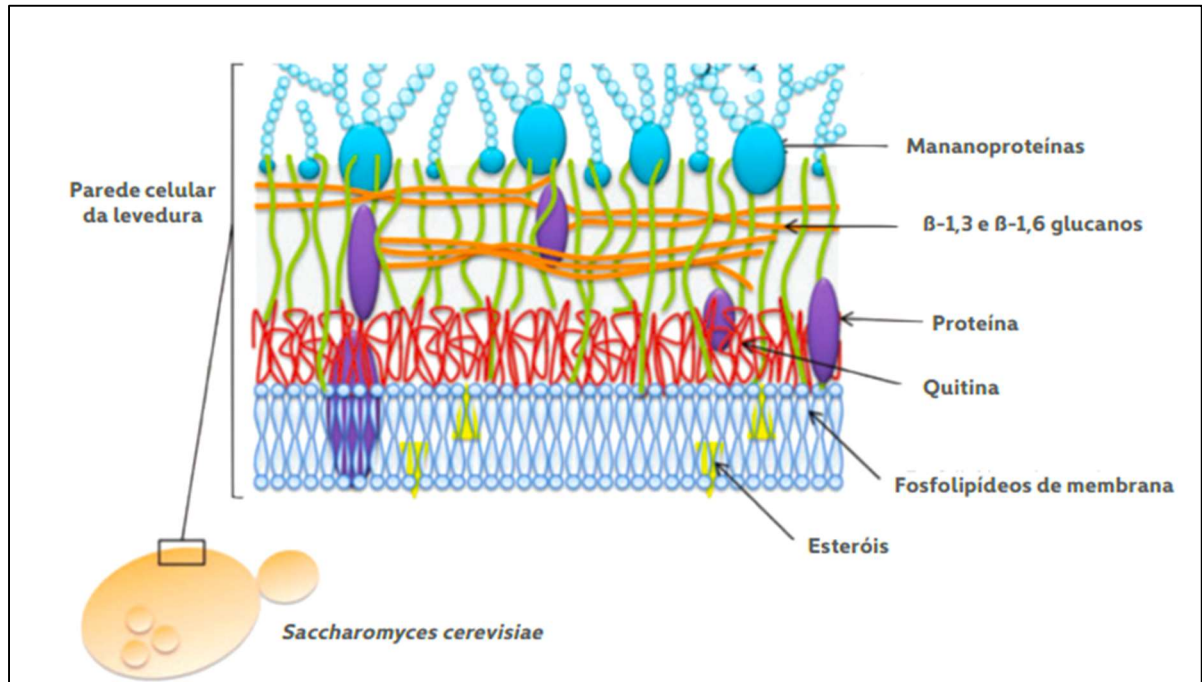
2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Os fungos são micro-organismos eucarióticos, multinucleados e heterotróficos podendo ser unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (fungos filamentosos) (TRABULSI et al., 1999; BAHT; RAI; KARIM, 2010). Os fungos podem se desenvolver em quase todas as condições climáticas e em qualquer tipo de suporte sólido ou líquido, entre 10 e 40°C, com pH ótimo para multiplicação entre 4,0 a 8,0 e atividade de água maior que 0,70 (DINIZ., 2002, BHAT et al., 2010).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras mais conhecidas pela importância comercial, sendo amplamente utilizada na indústria de bebidas alcólicas e de panificação. Além disso, possui capacidade para adsorção de AFB1 (El- NEMAZI et al., 2004; SHETTY; JESPERSEN, 2006 e SHETTY et al., 2007, PINHEIRO et al., 2020). As leveduras podem ser utilizadas como aditivos naturais na alimentação de animais de produção. Este tipo de suplementação tem gerado incremento nos parâmetros produtivos e na saúde dos animais (HOOGE, 2004; SHETY; JEPERSEN, 2006).

A parede celular das leveduras é uma estrutura resistente, responsável pela proteção física e de estabilidade osmótica da célula, que pela permeabilidade seletiva permite o transporte de nutrientes para o citoplasma (SMITH et al., 2000; KLIS et al., 2002). Essa estrutura corresponde entre 15,0 % e 30,0 % do peso seco total da célula. Os componentes da parede celular estão distribuídos em duas camadas principais, sendo a externa composta por mananoproteínas e a interna por glucanos e quitina, em estrutura interconectada por ligações covalentes (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). A parede celular da *S. cerevisiae* é composta por 55,0 % de glucanos, 22,0 % de mananoproteínas e 1,5 % de quitina (figura 3).

Figura 03. Estrutura da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Estrutura da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. TABANEZ.,2023 (Adaptado de Avantaggiato, et al., 2018).

O desenvolvimento dos fungos e divisão celular é sincronizado com o crescimento da parede (CID et al., 1995). As frações de polissacarídeos das paredes celulares de leveduras (PCL) como os β -glucanos e os mananos têm sido pesquisadas quanto aos efeitos benéficos tanto sobre a saúde de animais de produção como dos seres humanos (STIER; EBBESKOTTE; GRUENWALD, 2014; FULLER et al., 2017; LIU et al., 2021).

Amplamente distribuídas na natureza, as β -glucanas estão presentes em fungos, leveduras, algas, bactérias e plantas superiores apresentando diferentes estruturas (MIURA et al., 2003). Uma das principais fontes de β -glucanas está localizada na parede celular das *S. cerevisiae*, isto porque, é o componente presente em maior quantidade em sua parede celular constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3), com cadeias laterais de tamanhos variados, também de glicose, porém, unidas em β (1-6) (DIJKGRAAF; LI; BUSSEY, 2002)

Alguns polissacarídeos como as β -glucanas obtida de levedura, são denominadas a uma classe de substâncias conhecidas como modificadores de respostas biológicas (MRB), pois alteram a resposta no hospedeiro pelo estímulo do sistema imune, assim a estrutura tridimensional dos polissacarídeos que constituem a parede celular permite a adsorção de diferentes micotoxinas ou seus derivados metabólicos (HASSAN et al., 2021).

A atividade biológica das β -glucanas vem sendo muito estudada nos últimos anos, principalmente pela sua habilidade de ativar mecanismo de defesa no hospedeiro (YUN et al., 2003; KO; LIN, 2004; KIM et al., 2006). Tendo como ação outros efeitos, como antitumoral, anti-inflamatório, antimutagênico, hipocolesterolêmico, hiperglicêmico e proteção contra infecções vêm sendo avaliados e comprovados (KOGAN, 2000; LIN et al., 2004; BEHALL et al., 2006; KIM et al., 2006).

2.4 Adsorção de Aflatoxinas

Agentes detoxificantes são considerados como substâncias que podem suprimir ou reduzir a absorção; promover a excreção ou modificar o modo de ação de micotoxina (Regulação da Comunidade Europeia (EC, 386/2009). Esses agentes podem ser classificados como: a) adsorventes por serem capazes de reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas; b) biotransformadores por que degradam essas toxinas em metabólitos menos tóxicos e c) protetores pela finalidade de proteção contra danos a nível celular ocasionado pelo consumo destes agentes tóxicos (TAPIA-SALAZAR et al., 2010). Com isso existem alguns tipos de mecanismos de controles para a desintoxicação por aflatoxinas, dentre eles físicos, químicos e biológicos, onde o controle biológico bacteriano é uma alternativa promissora, assim como a utilização de alimentos funcionais contendo micro-organismos benéficos pode auxiliar no processo de descontaminação de micotoxinas (PEREYRA et al., 2015).

A utilização de micro-organismos para degradar aflatoxinas é uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação destas toxinas em alimentos e rações (ALBERTS et al., 2006), são agentes absorvedores compostos e de alto peso molecular, que se ligam às micotoxinas presentes em alimentos contaminados, limitando sua biodisponibilidade após a ingestão, onde podem apresentar diferentes tipos de interações: ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, atração ou repulsão eletrostática e coordenação títulos (DI GREGORIO et al., 2014 et al., 2021).

Esses micro-organismos detoxificantes podem ser denominados como probióticos, onde agem como reguladores do sistema digestório, pois proporcionam benefícios aos homens e aos animais por meio da inibição de patógenos; da atuação como antígenos, potencializando a resposta imune do hospedeiro; e da regulação da fisiologia digestiva, fornecendo vitaminas e fontes energéticas (SHANAHAN et al., 2012; DUNCAN; FLINT, 2013). Podem atuar no organismo por diferentes mecanismos de ação, como competição pelo sítio de adesão; produção de metabólitos com atividade antimicrobiana; neutralização dos compostos indesejáveis, a exemplo de enterotoxinas, amônia e aminas biogênicas tóxicas; alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; indução da imunidade pelo estímulo à atividade de linfócitos e macrófagos (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018).

Para um microrganismo ser considerada um probiótico alimentar deve atender à algumas características: sobreviver às condições ácidas e básicas do trato gastrointestinal; aderir às membranas mucosas; multiplicar nas condições intestinais, competindo com a

microbiota natural presente; ser viável em altas concentrações (10^6 a 10^8 UFC/mL); não estar associada a doença; possuir estabilidade genética durante o processamento e ausência de propriedades organolépticas indesejáveis nos alimentos (Fuller, 1989; D'Aimmo et al., 2007).

Os micro-organismos mais utilizados em preparações probióticas são bactérias *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Bacillus* sp., bactérias ácido-lácticas, bacteriófagos, algas unicelulares e leveduras, como as do gênero *Saccharomyces* (CHEN et al., 2020; KHADEMZADE et al., 2020).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada em alimentos funcionais, probióticos, como micro-organismos potenciais para descontaminação de micotoxinas, devido à sua capacidade de ligação a AFB1 (Pereyra et al., 2015; Armando et al., 2011; Pizzolitto et al., 2012), pode ser considerada como o micro-organismo probiótico de escolha na aquicultura, melhorando as taxas de sobrevivência em cultivos com baixa salinidade, auxiliando a resposta à múltiplos fatores causadores de estresse e atuando no sistema imunológico dos animais cultivados (MARTINEZ-ANTONIO et al., 2019)

O processo de adsorção de micotoxina pela levedura ocorre na parede celular, provavelmente pela presença de β -glucanos e pela sua capacidade de ligação seletiva com as micotoxinas polares e apolares, que são inativadas por forças intermoleculares (pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals). (CAMPAGNOLLO et al., 2020). A parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), conseguem atuar como adsorventes, podendo ligar-se a diversas micotoxinas como aflatoxina, fumonisina e zearalenona (CORASSIN et al., 2013).

Os componentes da parede celular têm suas limitações quanto ao número de polos de ligações para aflatoxinas e outras micotoxinas, podendo ficar limitado a inativação, devido a saturação de polos da parede celular (PIZZOLITTO et al., 2012), dessa forma quanto maior a quantidade de β -glucanos disponível, maior será a inativação da aflatoxina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o experimento foi utilizada a cepa *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 pertencente à coleção de micro-organismos do Laboratório de Controle Microbiológico, do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI). Essa cepa foi isolada da água de viveiros de piscicultura e estocada sob estas condições: tubo de ensaio contendo meio ágar extrato de malte (MEA) e armazenada em refrigeração (4,0 °C).

Para iniciar o experimento a cepa foi reativada da seguinte forma: com a alça de platina transferiu-se parte da cultura para três tubos de ensaio contendo 9,0 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD), que permaneceram em mesa agitadora à 150 rpm/min por 48 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 30,0°C). Em seguida, de cada tubo foram transferidas alíquotas com 1,0 mL para tubos de ensaio com 9,0 mL de água peptonada 0,1%, realizando-se diluições decimais consecutivas até 10^7 células/mL⁻¹. Para confirmar a quantidade de células de levedura por mL foi utilizada câmara de Neubauer com leitura em microscópio ótico com objetiva de 40x (adaptado de VAN DER AA KUHLE *et al.*, 2005).

A partir dessas diluições foram realizados os testes com a cepa *S. cerevisiae* A8L3: viabilidade *in vitro* às condições gastrointestinais de Tilápia (*Oreochromis niloticus*); avaliação da adsorção de aflatoxina B₁ da cepa *in vitro* e obtenção de biomassa, extração da parede celular da cepa e teste de adsorção de aflatoxina B₁ pela parede celular de aflatoxina B₁.

3.1 Teste de viabilidade *in vitro* da cepa de *S. cerevisiae* A8L3 às condições de pH do trato gastrointestinal da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

a) Tolerância ao ácido clorídrico em pH 2,0

Para simular às condições de acidez do estômago da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), foi realizado o teste de tolerância ao ácido clorídrico em pH 2,0 de acordo com PIZZOLITTO et al., 2012 com adaptações. Transferiu-se 100 µL da diluição previamente preparada com 10^7 células/mL⁻¹ para tubos contendo 900 µL de caldo (YPD), adicionou solução de ácido clorídrico para ajustar ao pH 2,0 medido em pHmetro de bancada (QUIMIS®). Essa operação foi realizada em triplicata.

Em seguida de cada triplicata foram transferidas alíquotas com 100 µL dos cultivos para a contagem das células viáveis da cepa *S. cerevisiae* A8L3 em câmara de Neubauer (semelhante ao descrito anteriormente) e outras alíquotas com 100 µL foram transferidas para semeadura em superfície de placas ágar YPD. Essa etapa foi realizada em duplicata. A contagem inicial foi considerada como o tempo 0,0 (controle).

Na sequência, as triplicatas dos tubos contendo caldo YPD foram levados para mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab®) com agitação constante (150 rpm) em temperatura ambiente (aproximadamente 30,0°C). Os tubos permaneceram em agitação por quatro horas até serem retirados para contagens e semeadura em placas, conforme realizada no tempo zero. Em seguida retornaram para a agitação e essa operação foi repetida as oito e as 12 horas de cultivo.

b) Tolerância aos sais biliares (pH 7,0)

Para simular às condições da porção anterior do intestino da tilápia do Nilo (*Oreochromis* sp) (ROTTA, 2003), foi realizado o teste de tolerância e de viabilidade da cepa *S. cerevisiae* A8L3. Essa testagem foi realizada de forma semelhante ao realizado no item 3.1a descrita anteriormente. Transferiu-se 100 µL da diluição previamente preparada com 10^7 células/mL⁻¹ para tubos contendo 900 µL de caldo YPD em triplicata.

Em seguida, o pH dos meios foram ajustados nos tubos de ensaio para 7,0 utilizando-se solução de hidróxido de sódio a 0,1 M/l medido em pHmetro de bancada (QUIMIS®). Essa operação foi realizada para obtenção do grupo de pH 7,0, e semeado em superfície ágar YPD nos mesmos tempos do item anterior 3.1a.

Para o teste de tolerância aos sais biliares, foi realizada de forma semelhante à descrita anteriormente. Transferiu-se 100 µL da diluição previamente preparada com 10^7 células/mL⁻¹

¹ para tubos contendo 900 μL de caldo YPD em triplicata. Com o pH ajustado para pH 7,0, foi adicionada solução de bile bovina a 0,5% (Sigma – Aldrich®), em seguida foram retiradas outras alíquotas com 100 μL onde foram transferidas para semeadura em superfície de placas ágar YPD e contagem, nos tempos determinados de acordo com o item 3.1^a. Essa operação foi realizada em triplicata.

3.2 Adsorção de AFB1 pela cepa *S. cerevisiae* A8L3 sob condições simuladas do trato gastrointestinal de tilápia *in vitro*

Para avaliação da capacidade da cepa *S. cerevisiae* A8L3 adsorver aflatoxina B1 (PEREYRA *et al.* 2017 com adaptações), transferiu-se 100,0 µL da diluição previamente preparada com 10^7 células/mL⁻¹ para dois tubos contendo 900,0 µL de caldo YPD. Transcorrido o tempo de incubação, de cada tubo foram transferidas alíquotas com 1,0 mL para quatro microtubos, que a seguir foram centrifugados por 10 minutos à 5000 rpm/min em microcentrífuga (SIGMA®). Após isso, o sobrenadante foi descartado para obtenção do sedimento, constituído pelas células das leveduras (*pellet*).

Em seguida, para eliminar o caldo YPD residual dos microtubos foi adicionada 1,0 mL de água destilada estéril e procedeu-se nova centrifugação por 10 minutos à 5000 rpm/min em microcentrífuga (SIGMA®), o procedimento foi realizado duas vezes. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado em cada microtubo 1,0 mL de solução Tampão Fosfato Salino (PBS) pH 2,0 ajustado com ácido clorídrico, para simular a acidez estomacal tilápia (*Oreochromis* sp). Os microtubos foram transferidos para mesa agitadora a 150 rpm/min por sessenta minutos e realizou-se nova centrifugação a 5000rpm/min em microcentrífuga por 10 minutos.

Após descarte do sobrenadante com PBS pH 2,0, adicionou-se aos microtubos 1,0 mL de solução (PBS) pH 7,0 adicionado solução de hidróxido de sódio para ajuste de pH, e contendo AFB1 conforme os tratamentos: 0,0 ng/mL (controle); 25,0 ng/mL; 50,0 ng/mL e 75,0 ng/mL. Os microtubos foram transferidos para mesa agitadora a 150 rpm/min por sessenta minutos, na sequência, os microtubos foram centrifugados a 5000 rpm/min e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo para leitura da toxina livre por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e determinar as taxas de adsorção. (PEREYRA *et al.*, 2017).

A solução AFB1 inicial usada no ensaio foi ressuspensa em 1000 µL de acetonitrila a partir de um extrato núcleo de concentração conhecida (761,58µg AFB1). A partir disso foi preparado a solução estoque de 10µg/mL e soluções de trabalho (25,0; 50,0; 75,0 ng/mL) AFB1, preparadas em Tampão Fosfato Salino (PBS), pH 7,0.

A detecção e quantificação de AFB1 foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Trucksess *et al.* (1994), utilizando um cromatógrafo SHIMADZU®, modelo PROMINENCE com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER. Uma alíquota de 200 µL do extrato da amostra foi derivatizada com 700 µl de ácido trifluoroacético: ácido

acético: água (20:10:70, v/v/v). As separações cromatográficas serão realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6mm id., 5,0 µm de tamanho de partículas, VARIAN, Inc. Palo Alto, EUA). A fase móvel utilizada será acetonitrila, metanol e água (17:17:66 v/v/v) a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A fluorescência de derivados de aflatoxina será gravada em comprimentos de onda de excitação e emissão de λ 360 nm e 460 nm λ, respectivamente. Esta toxina foi quantificada pela correlação das alturas dos picos do extrato da amostra com o da curva de calibração elaborada para estudos analíticos dos padrões de AFB1 (BRASIL, 2017), onde a curva padrão foi construída em diferentes níveis de AFB1. O limite de detecção do método analítico foi de 0,4ng. g⁻¹ e o limite de quantificação foi estabelecido como sendo três vezes o limite de detecção 1,2ng. g⁻¹.

Os resultados para os testes de adsorção de AFB1 foram expressos em quantidade de micotoxina adsorvida (ng/mL) e percentual de micotoxina adsorvida (%). O teste foi feito em quatro repetições duplicadas.

3.3 Obtenção de biomassa e extração da parede celular da cepa *S. cerevisiae* A8L3

A obtenção de biomassa foi realizada com o objetivo de extração da parede celular das cepas A8L3 de *S. cerevisiae*, segundo metodologia de Nguyen et al., (1998) com modificações.

Para a extração da parede celular, as culturas da cepa de *S. cerevisiae* A8L3 cultivadas em caldo YPD diluição previamente preparada com 10^7 células/mL⁻¹, foram transferidas para tubos cônicos, centrifugadas e lavadas com água destilada estéril para se obter um *pellet* de todas as células crescidas. O *pellet* foi lavado duas vezes com Solução Tampão Fosfato Salino (PBS). Em seguida, foi para a estufa de circulação de ar forçada a 35° C, durante 20 min para obtenção do *pellet* seco. Após a secagem, foi adicionado novamente solução PSB e pérolas de vidro (4,0mm) MYLABOR, agitando-se por 30 segundos para permitir a ruptura das células, esse procedimento se repetiu por cinco vezes. Em seguida as pérolas de vidro foram separadas por decantação, e a solução colocada em um tubo cônico e centrifugada para separar a parede celular. O conteúdo da parede foi seco em estufa de ar forçada a 35,0 ° C, durante 20 min para obtenção do *pellet* seco (NGUYEN et al.,1998).

3.3.1 Adsorção de AFB₁ pela parede celular da cepa *S. cerevisiae* A8L3

A adsorção de AFB₁ pela parede celular foi realizada de acordo com (PEREYRA et al., 2017) com adaptações nas concentrações de AFB₁. Foram realizadas suspensões de PBS pH 2,0 e PBS pH 7,0 com AFB₁ nas concentrações: 0,0; 25,0; 50,0 e 75,0 ng/mL de toxina. Os ensaios foram realizados da mesma maneira que o ensaio de adsorção usando a levedura inteira. A cada microtubo com o *pellet*, foi adicionado 1,0 mL de solução pH 2,0 e após o tempo de sessenta minutos e centrifugação com descarte do sobrenadante, foi adicionado 1,0 mL de solução com pH 7,0 com AFB₁, simulando as condições de pH do trato gastrointestinal de tilápia do Nilo (*Oreochromis* sp), após período de incubação, as suspensões de mistura da parede celular (*pellet*) e toxina foram centrifugadas a 100 rpm e o sobrenadante contendo a toxina livre transferido para outro microtubo, para detecção e quantificação da toxina livre (não adsorvida) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo a metodologia descrita por Trucksess *et al.* (1994). Todos os tratamentos foram realizados com quatro repetições. Os resultados para os testes de adsorção de AFB₁ foram expressos em quantidade de micotoxina adsorvida (ng/mL) e percentual de micotoxina adsorvida (%).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado para os ensaios de teste de viabilidade *in vitro* da cepa *S. cerevisiae* A8L3 às condições gastrointestinais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e ensaio de adsorção de AFB₁ pela cepa *S. cerevisiae* A8L3 e de sua parede celular foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 4, com três níveis de pH e quatro tempos distintos com três repetições, totalizando 36 unidades amostrais e esquema fatorial 2 x 4, duas formas de aplicação referem-se à levedura inteira e a parede celular da levedura *S. cerevisiae* A8L3 e quatro concentrações de AFB₁ (0; 25,0; 50,0 e 75,0 ng/mL), perfazendo um total de 8 tratamentos com quatro repetições, totalizando 32 unidades amostrais. As contagens de colônias obtidas no teste de viabilidade às condições gastrointestinais foram analisadas e o número de células de leveduras transformados em escala logarítmica $\log_{10}^{(x+1)}$.

Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento PROC GLM, do *software* SAS® University Edition. O teste de comparação de médias foi o Tukey a 5,0 % de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Teste de tolerância e viabilidade *in vitro* da cepa *S. cerevisiae* A8L3 ao pH do trato gastrointestinal de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)

Em testes realizados com a adição de *Saccharomyces cerevisiae* como probióticos nas dietas de peixes, foi possível observar que elas são capazes de sobreviver e de se multiplicar nas condições de pH gastrointestinais de peixes (PEREYRA et al., 2015, PINHEIRO et al., 2020). A cepa *S. cerevisiae* A8L3A, que foi isolada no sedimento de cultivo de peixes, foi tolerante aos valores de pH testados permanecendo viável nessas condições durante período experimental (tabela 01). Pode-se observar ainda, que as contagens de leveduras aumentaram após quatro horas de incubação com os maiores resultados após 12 horas de incubação ($P < 0,05$), mostrando potencial de colonização no trato gastrointestinal.

Tabela 01. Média e desvio padrão das contagens de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isoladas em ambientes de piscicultura, submetidas a testes com pH e presença de sais biliares

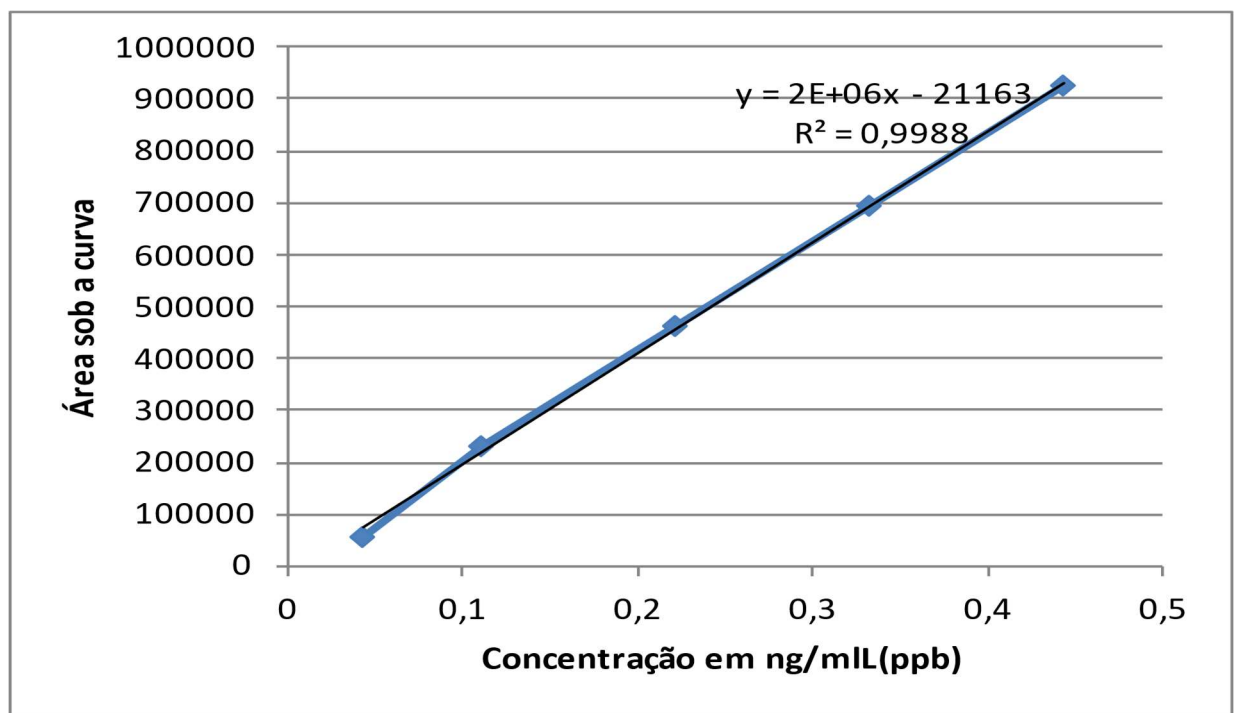
pH	Contagem (UFC/g em log ₁₀) / Tempo (Horas)			
	(X̄ ± DP)			
	0	4	8	12
2,0	7,21 ^{aC} ± 0,33	7,79 ^{aB} ± 0,14	8,02 ^{aB} ± 0,12	8,41 ^{aA} ± 0,08
7,0	7,33 ^{aC} ± 0,04	7,99 ^{aB} ± 0,13	8,24 ^{aAB} ± 0,09	8,47 ^{aA} ± 0,08
7,0 (Bile)	7,53 ^{aC} ± 0,01	8,06 ^{aB} ± 0,08	8,13 ^{aB} ± 0,14	8,73 ^{aA} ± 0,04

X̄: média, DP: desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Contagens de células viáveis (log UFC.mL⁻¹).

5.2 Avaliação da adsorção de aflatoxina B₁ pela cepa *S. cerevisiae* A8L3 e sua parede celular *in vitro*

As curvas de calibração elaboradas para padronizar os experimentos (figura 4), são utilizadas em estudos analíticos, onde representam uma relação entre a concentração de uma substância teste e a intensidade do sinal observado. Para a construção de uma curva de calibração um mínimo de cinco concentrações diferentes deve ser testado (em triplicata), uma equação da reta de regressão de y em x deve ser estimada pelo método dos mínimos quadrados e um gráfico de dispersão apresentado (BRASIL, 2017).

Figura 4. Curva de calibração por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com AFB1 nas concentrações (10,0; 25,0;50,0; 75,0;100,0 ng/mL).



A capacidade da cepa de *S. cerevisiae* A8L3 isolada de ambiente de cultivo e sua parede celular em adsorver AFB1 *in vitro*, nas três concentrações testadas foi descrita na tabela 02. Em todas as concentrações testadas, a parede celular de *S. cerevisiae* A8L3 adsorveu maior quantidade de AFB1 ($P < 0,05$) do que a levedura viável. Observou-se ainda que ambas adsorveram AFB1 satisfatoriamente em todas as concentrações, especialmente na maior (75,0 ng/mL) quando observamos os valores absolutos. A legislação vigente (BRASIL, 1988) admite que para rações possam conter até 50,0 ng/kg⁻¹. Fazendo-se uma estimativa, quando

utilizada a parede celular da *S. cerevisiae* A8L3, a quantidade provável de toxina remanescente no meio sobrenadante seria próxima ao estabelecido pela legislação.

Figura 05. Leitura realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do tratamento parede celular 25ng de AFB1.

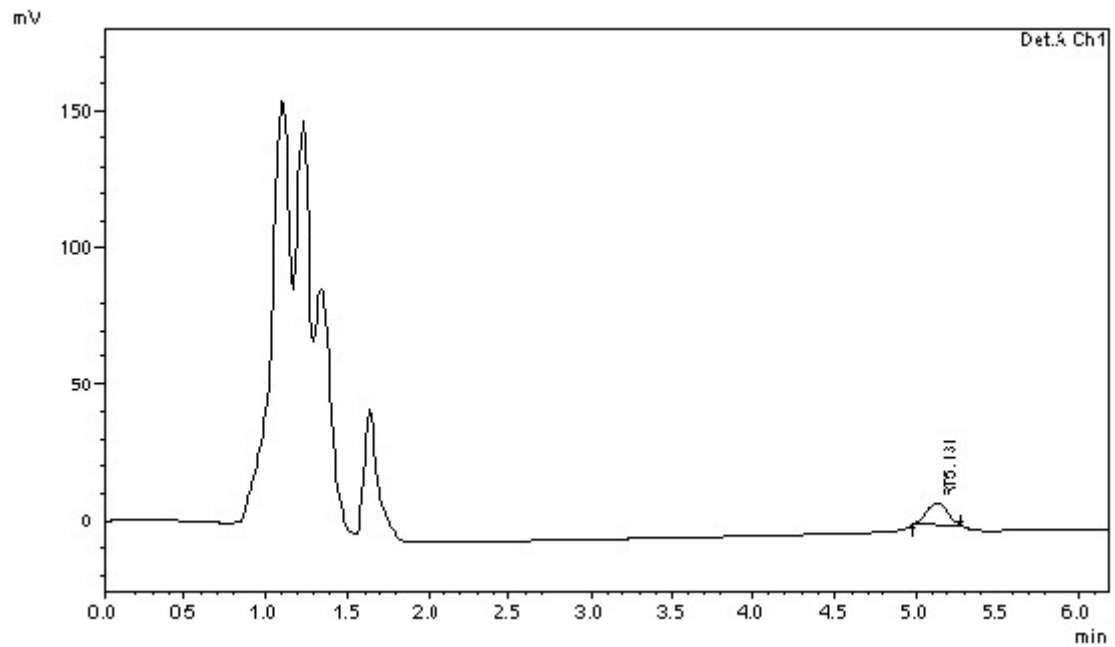


Tabela 02. Média e desvio padrão do valor absoluto e do percentual de adsorção de aflatoxina B₁ em diferentes concentrações pela *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 e pela sua parede celular.

Adsorção de AFB1	Concentração inicial de AFB1 (ng mL ⁻¹)	Aflatoxina B ₁ adsorvida em valor absoluto (ng/mL)			
		Quantidade adsorvida pela <i>S. cerevisiae</i> A8L3 (7,0 UFC/g em log 10) ($\bar{x} \pm DP$)	Quantidade provável de AFB1 remanescente (*)	Quantidade adsorvida pela Parede Celular (obtida de 7,0 UFC/g em log 10) ($\bar{x} \pm DP$)	Quantidade provável de AFB1 remanescente (**)
Quantidade adsorvida	25,0	9,70 ^{bb} ± 0,3	15,3	16,10 ^{ac} ± 1,0	8,9
	50,0	10,80 ^{bb} ± 0,3	39,2	20,20 ^{ab} ± 0,3	29,8
	75,0	15,50 ^{ba} ± 0,4	59,5	24,85 ^{aA} ± 1,0	50,15
Percentual de Aflatoxina B ₁ adsorvida (ng/mL)					
Adsorção de AFB1	Concentração de aflatoxina B1 (ng mL ⁻¹)	<i>S. cerevisiae</i> A8L3 (7,0 UFC/g em log 10) ($\bar{X} \pm DP$)	Percentual provável de AFB1 remanescente (*)	Parede celular da <i>S. cerevisiae</i> A8L3 (obtida de 7,0 UFC/g em log 10) ($\bar{X} \pm DP$)	Percentual provável de AFB1 remanescente (**)
% de adsorção	25,0	38,7 ^{ba} ± 1,6	61,3	64,5 ^{aA} ± 4,8	35,5
	50,0	21,5 ^{bb} ± 0,3	78,5	40,5 ^{ab} ± 0,3	59,5
	75,0	20,7 ^{bb} ± 0,5	79,3	33,1 ^{aC} ± 1,3	66,9

AFB1= aflatoxina B1

x: média, DP: desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05).

(*) = Concentração inicial de aflatoxina B1 menos a quantidade de aflatoxina B1 adsorvida pela *S. cerevisiae* A8L3

(**) = Concentração inicial da aflatoxina B1 menos a quantidade de aflatoxina B1 adsorvida pela parede celular de *S. cerevisiae* A8L3

Entre as concentrações de AFB1 testadas, foi observado uma melhor adsorção na concentração de 25,0 ng/ml⁻¹ de aflatoxina, chegando a 64,5% de adsorção com a parede celular (figura 05) e 38,7% na *S. cerevisiae* A8L3 (tabela 02). A adsorção de aflatoxinas *in vitro* depende da concentração testada, e o mecanismo de ação antimicotoxigêncica pode variar conforme a composição da parede celular das leveduras (LUO et al., 2020). Cepas de *S. cerevisiae* podem ter concentrações variadas de β -glucanos e mananos na constituição de suas paredes celulares (PEREYRA et al., 2013; PIOTROWSKA; MASEK, 2015). Esses fatores podem justificar a diferença entre resultados com *S. cerevisiae* testada por Pinheiro et al. (2020) que adsorveu 19,8 % de 25,0 ng/mL de AFB1 e as observadas com a *S. cerevisiae* A8L3.

Nas concentrações de 50,0 e 75,0 ng/ml⁻¹ a porcentagem de adsorção da *S. cerevisiae* A8L3 foram semelhantes, no entanto os testes com a parede celular houve diferença entre eles. Porém, o percentual de adsorção de AFB1 da parede celular foi superior à levedura testada. Em condições alcalinas a estrutura de organização tridimensional dos β -glucanos, favorecem estruturas de hélice simples e/ou espiral aleatória, onde usando a mecânica molecular, foi observado que o grupamento hidroxila, cetona, e os lactonas estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre aflatoxinas B1 e beta-D-glucanos, com isso as diferenças na capacidade de ligação das micotoxinas aos beta-D-glucanos devem-se às suas características físicas e químicas específicas (YIANNIKOURIS et al., 2006).

Motivo pelo qual foi observado no resultado da adsorção da levedura e sua parede celular, na concentração de 75,0ng de AFB1, foi adsorvida de 15,50ng e 24,85ng de AFB1 respectivamente e em outras concentrações menores (50ng e 25ng) ambas não conseguiram adsorver a quantidade encontrada na concentração de 75ng.

Verificou-se que existe uma tendência a maior porcentagem adsorção com relação aos diferentes estágios de crescimento da celular da cepa *S. cerevisiae*, quando a célula está em fase exponencial (maior atividade metabólica celular) as estruturas da superfície celular ficam mais acessíveis às ligações com a aflatoxina, já na fase estacionária a acessibilidade as ligações ficam consideravelmente reduzidas (SHETTY; HALD; JESPERSEN, 2007). O estágio de crescimento celular da levedura estudada não foi analisado para o experimento.

Então na adsorção podem ser encontradas mudanças que variam de acordo com os componentes da parede celular, a ligação durante a fase estacionária indica a possibilidade de redução quantitativa de moléculas constituindo os sítios de ligação ou mudanças estruturais

que levam ao acesso reduzido aos locais de ligação na parede celular para aflatoxina. Foi relatado anteriormente que a permeabilidade da parede célula diminui eficientemente durante a fase estacionária devido à acúmulo de manoproteínas na camada externa da parede celular.

Uma vantagem de produtos à base de parede celular de levedura, deve-se a sua capacidade de suportar temperaturas elevadas durante processos de peletização e extrusão das rações, bem como, à capacidade de resistir às condições químicas e físicas do trato gastrointestinal (PERRY, 1995). Fator determinante para alteração de adsorção e estrutura molecular de ligação das toxinas ao beta-D-glucanas, é a temperatura, onde testados o tempo de aquecimento entre 15,0 °C e 120,0 °C, as cepas foram capazes de adsorver 79% de AFB1 a 120°C.

Mesmo com todos os fatores determinantes que podem alterar o potencial de adsorção da parede celular, a parede celular continua apresentando *in vitro* melhor capacidade para adsorver AFB1 quando comparada com a levedura viável. A parede celular da *S. cerevisiae* A8L3 tem potencial para ser administrada as rações devido a capacidade para adsorver e reduzir a níveis aceitáveis para a sanidade animal a AFB1 presente em ração que tenham sido contaminadas com valores permitidos pela legislação.

A *S. cerevisiae* A8L3, por ter potencial para ser uma levedura probiótica, a mesma deve ser submetida a outros testes *in vitro* para ser determinada como probiótica no trato gastrointestinal de tilápias. Nos testes avaliados nesse trabalho, pelo crescimento de células *S. cerevisiae* A8L3 viáveis na mucosa intestinal, podemos melhorar o desempenho de adsorção de AFB1.

6. CONCLUSÕES

A cepa *S. cerevisiae* A8L3 permanece viável e se multiplica em condições de pH semelhantes do trato gastrointestinal da tilápia do Nilo (*Oreochromius* sp).

Na adsorção *in vitro* a *S. cerevisiae* A8L3 e sua parede celular adsorvem até 75,0 ng/mL de AFB1, sendo a parede celular da cepa com melhor adsorção obtida. Assim, a inclusão de aditivos a base de parede celular da cepa *S. cerevisiae* A8L3 em dietas de tilápia provavelmente podem melhorar as condições sanitárias, reduzir a quantidade de AFB1.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço de estudos a micro-organismos probióticos e adsorventes de aflatoxinas, se torna necessário estudos das leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas no ambiente de piscicultura, pertencente à coleção de micro-organismos do Laboratório de Controle Microbiológico, do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI). Dentre algumas cepas analisadas e testadas em trabalhos anteriores, a *S. cerevisiae* A8L3 tem resultados tanto *in vitro* como *in vivo*, promissores para se tornar um futuro probiótico alimentar na piscicultura.

Iniciando os estudos com a parede celular da *S. cerevisiae* A8L3 temos resultados prósperos, onde estudos derivados da parede celular devem ser realizados e testados, como a composição e espessura da parede celular na influência da adsorção de toxinas, melhorias nas técnicas de extração da parede celular, onde possivelmente determine melhor desempenho, desafiar à altas temperaturas cogitando um possível processo de extrusão quando adicionado a formulação de ração animal, assim como fazer todos os testes *in vivo* para uma possível formulação de aditivo alimentar na piscicultura.

8. REFERÊNCIAS

- ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 131-135, 2009.
- ASSIS, J. R. de; ASSIS, A. C. M. de; FERNANDES, G. A.; SILVA, E. B. da; SILVA, J. F. da; MORALES, R. L.; GALDOS-RIVEROS, A. C.; CRUZ, I. V. Mycotoxin absorbents in dairy cattle. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 11, 2021.
- BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–81, jan. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>>.
- BOVO, F. et al. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, p. 15-21, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> Acesso em: 05 ago. 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, 06 de novembro de 1988. Diário Oficial da União, Poder executivo, Brasília, DF, 09 de nov de 1988. Seção 1, p. 21.968.
- CAMPAGNOLLO, F. B.; MOUSAVI KHANEGHAH, A.; BORGES, L. L.; BONATO, M. A.; FAKHRI, Y.; BARBALHO, C. B.; BARBALHO, R. L. C.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. In vitro and in vivo capacity of yeast-based products to bind to aflatoxins B1 and M1 in media and foodstuffs: A systematic review and meta-analysis. **Food Research International**, v. 137, p. 109505, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920305305>>.
- DENG, Y.; VELÁZQUEZ, A. L. B.; BILLES, F.; DIXON, J. B. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. **Applied Clay Science**, v. 50, n. 1, p. 92–98, set. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169131710002127>>.
- DI GREGORIO, M. C.; DE NEEFF, D. V.; JAGER, A. V.; CORASSIN, C. H.; DE PINHO CARÃO, A. C.; DE ALBUQUERQUE, R.; DE AZEVEDO, A. C.; FERNANDES OLIVEIRA, C. A. Mineral adsorbent for prevention mycotoxins in animal feed. *Toxin Rev.*, 33, 125–135, 2014
- GETACHEW, T. Stomach pH, feeding rhythm and ingestion rate in *Oreochromis niloticus* L. (Pisces: Cichlidae) in Lake Awasa, Ethiopia. **Hydrobiologia**, v. 174, n. 1, p. 43–48, abr. 1989. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00006056>>.

- GONÇALVES, B. L. **Uso de Fontes de *Saccharomyces cerevisiae* na Redução da excreção de Aflatoxina M1 no leite de vacas leiteiras.** 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- GOMES MC, MOSTOWY S. O caso para modelagem de infecção humana em peixe-zebra. *Trends Microbiol* (2020) 28(1): 10-8. doi: 10.1016/j.tim.2019.08.005.
- HISANO, H. et al. Digestibilidade aparente de rações contendo levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular pela tilápia do Nilo. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, p. 281-287, 2008.
- HLOPHE, S. N.; MOYO, N. A. G.; NCUBE, I. Postprandial changes in pH and enzyme activity from the stomach and intestines of *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897), *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 30, n. 1, p. 35–41, fev. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jai.12290>>.
- HUSSAIN, D.; MATEEN, A.; GATLIN, D. M. Alleviation of aflatoxin B 1 (AFB 1) toxicity by calcium bentonite clay: Effects on growth performance, condition indices and bioaccumulation of AFB 1 residues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 475, p. 8–15, jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.003>>.
- IZVEKOVA, G. I.; SOLOVYEV, M. M.; KASHINSKAYA, E. N.; IZVEKOV, E. I. Variations in the activity of digestive enzymes along the intestine of the burbot *Lota lota* expressed by different methods. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 39, n. 5, p. 1181–1193, 14 out. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10695-013-9773-y>>.
- YIANNIKOURIS, A.; ANDRÉ, G.; POUGHON, L.; FRANÇOIS, J.; DUSSAP, C. G.; JEMINET, G.; BERTIN, G.; JOUANY, J. P. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules*, v. 7, n. 4, p. 1147–1155, 2006.
- LICKWAR CR, CAMP JG, WEISER M, COCCHIARO JL, KINGSLEY DM, FUREY TS, et al. Dissecção genômica da regulação transcricional conservada em células epiteliais intestinais. *PloS Biol* (2017) 15(8):e2002054. Doi: 10.1371/journal.pbio.2002054.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 3, p. 631, 27 set. 2008. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2800>>.
- MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos. *Anais...* Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p. 213-224.
- NGUYEN, T.H; FLEET, G.H.; ROGERS, P.L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 50, p. 206-212, 1998.

NOGUEIRA S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. *Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação*, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 77, n. 9, p. 754–766, 1999.

PERALI, C. Avaliação do desempenho da parede celular de leveduras como aditivo antimicotóxicas na intoxicação experimental por aflatoxina, zearalenona, zearalenona ou fumonisina, 2016. Tese (Doutorado em ciências) Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 2016.

PEREYRA, C.; GIL S.; BONCI, M.; MERKIS, C.; MONGE, M.; CAMPOS, S.; ONTENEGRO, M; CAVAGLIERI, L. Optimización de la Producción de Pared Celular de la Cepa Probiótica *S. cerevisiae* VM014 Adsorbente de Aflatoxina B₁. IX Congreso Latinoamericano de Micología, 2017.

PEREYRA, C. M.; CAVAGLIERI, L. R.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B 1 and zearalenone by yeast cell wall. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, n. 3, p. 655–662, mar. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article/114/3/655/6716203>>.

PHROMPANYA, P.; SAENPHET, K.; SAENPHET, S. Comparative histochemical study of the gastrointestinal tracts of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the hybrid catfish (*Clarias batrachus* x *Clarias gariepinus*). *Acta Histochemica*, v. 121, n. 3, p. 261–267, abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.01.003>>.

PINHEIRO, R. E. E.; RODRIGUES, A. M. D.; LIMA, C. E.; SANTOS, J. T. O.; PEREYRA, C. M.; TORRES, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; LOPES, J. B.; MURATORI, M. C. S. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic agent and a possible aflatoxin B₁ adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, n. 3, p. 862–870, maio 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352020000300862&tlng=en>.

PINHEIRO, R.E.E.; RODRIGUES, A.M.D.; RIBEIRO, M.N.; CAVALCANTE, D.H.; PEREYRA, C.M.; MURATORI, M.C.S. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. v. 12, Nº 05, set/out de 2015.

PIOTROWSKA, M.; MASEK, A. *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. *Toxins*, v. 7, n. 4, p. 1151–1162, 2 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/7/4/1151>>.

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

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.

RAWLING, M.; SCHIAVONE, M.; APPER, E.; MERRIFIELD, D. L.; CASTEX, M.; LECLERCQ, E.; FOEY, A. Yeast cell wall extracts from *Saccharomyces cerevisiae* varying in structure and composition differentially shape the innate immunity and mucosal tissue responses of the intestine of zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. May, p. 1–17, 2023.

REGULAMENTO (CE) N.º 386/2009 DA COMISSÃO. **Jornal Oficial da União Europeia**, 12 de maio de 2009. Estabelecimento de um novo grupo funcional de aditivos para a alimentação animal. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:118:0066:0066:PT:PDF>.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal. 2003. p. 23

SANTOS, F. C. F. **Fungos em rações para camarões cultivados no Estado do Piauí**. 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

SHETTY, P. H.; HALD, B.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 41–46, jan. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506004405>>.

SKRBIC, B. et al. Fusarium mycotoxins in wheat samples harvested in Serbia: A preliminary survey. **Food Control**, v. 22, p.1261-1267, 2011.

TABANEZ, P. O uso dos betaglucanos na rotina clínica, VETS info for Vets. Disponível em: < <https://avertsaudeanimal.com.br/images/uploads/files/12/61f80e9d6496c.pdf> > Acesso em: 23 jun, 2023.

TRUCKSESS, M. W.; STACK, M. E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R. H.; ROMER, T. R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 77, p. 1512–1521, 1994.

ZHANG, Z.; FAN, Z.; YI, M.; LIU, Z.; KE, X.; GAO, F.; CAO, J.; WANG, M.; CHEN, G.; LU, M. Characterization of the core gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication of a putative novel *Cetobacterium* species and analysis of its potential function on nutrition. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 12, p. 690, 3 dez. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-022-03301-1>>.