

**RAIZZA EVELINE ESCÓRCIO PINHEIRO**

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS COMO ADSORVENTE DE  
AFLATOXINA B<sub>1</sub> E PROBIÓTICOS EM PISCICULTURA**

TERESINA - PI

2016

**RAIZZA EVELINE ESCÓRCIO PINHEIRO**

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS COMO ADSORVENTE DE  
AFLATOXINA B<sub>1</sub> E PROBIÓTICOS EM PISCICULTURA**

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

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

TERESINA - PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**P654p** Pinheiro,Raizza Eveline Escórcio

Potencial de aplicação de leveduras como adsorvente de aflatoxina B<sub>1</sub> e probióticos em piscicultura / Raizza Eveline Escórcio Pinheiro - 2016.

91 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

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

1.Aquicultura 2.Adsorção 3.Biologia molecular 4.Cepas viáveis 5.*Colossoma macropomum* 6.*Saccharomyces cerevisiae*. I.Título

**CDD 639.8**

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS COMO ADSORVENTE DE  
AFLATOXINA B<sub>1</sub> E PROBIÓTICOS EM PISCICULTURA**

**RAIZZA EVELINE ESCORCIO PINHEIRO**

**Tese aprovada em: 03/03/2016**

**Banca Examinadora:**

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

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

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Maria Marluccia Gomes Pereira (Interna) / DMV/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Externo) / IFMA**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni (Externo) / UFRRJ**

*“Escolha sempre o caminho que pareça o melhor, mesmo que seja o mais difícil; o hábito brevemente o tornará fácil e agradável”.*

(Pitágoras)

**DEDICATÓRIA**

*À Deus, minha fonte de fé, pela proteção de todos os dias. Aos meus amados pais, Hildebrando Pinheiro de Moura e Verbenia de Melo Escórcio Moura, pela educação, carinho, amor e apoio necessário em todas as circunstâncias. Ao meu irmão, Rafael Escórcio Pinheiro, pela companhia e por compartilhar os momentos de alegria e tristeza ao longo deste período. Aos meus familiares e amigos, pelos conselhos, incentivo e por me proporcionarem momentos de felicidade.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, que foi uma extensão da minha casa nestes dez anos, incluindo graduação, mestrado, doutorado e a qual agora faço parte como docente. Agradeço por todo o aprendizado que adquiri ao longo deste percurso e que agora terei a oportunidade de retribuir com muito orgulho.

Ao apoio financeiro da CAPES, “entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos”, em parceria com o Ministerio de Ciencia, Tecnología y Innovación Productiva (Mincyt – Argentina) para realização do projeto. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) em parceria com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante parte do doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Christina Sanches Muratori pela orientação, amizade e por fornecer subsídios para o meu crescimento profissional. Obrigada por sempre me ensinar a superar as dificuldades e persistir em busca de soluções diante das adversidades da vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Nasaré Bona de Alencar Araripe, por todo o carinho com que sempre me atendeu e pela gentileza em prestar contribuições valiosas na parte experimental, além da disponibilização da infraestrutura do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPESPI/CCA/UFPI).

Ao Prof. Dr. Manoel Henrique Klein Júnior pela valiosa amizade e transmissão de seus conhecimentos e sabedoria, que foram fundamentais como incentivo para ingressar na carreira acadêmica.

Aos Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni (UFRRJ) e Sérgio Gaspar de Campos pela grandiosa contribuição durante a realização do curso de identificação de leveduras.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Marlúcia Gomes Pereira pelos conselhos, amizade e por sempre estar disponível em ajudar.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet pelo apoio e ensinamentos frequentes.

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

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. João Batista Lopes, por sua gentileza e contribuições prestadas com as análises estatísticas.

Ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao professor Dr. Carlos Augusto Rosa e à Ana Raquel de Oliveira Santos pelo suporte técnico na identificação molecular das leveduras.

À Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina, primeiramente, pela oportunidade de permitir a realização do estágio no Laboratório de Micologia e, posteriormente, pela parceria na realização do projeto conjunto, sob coordenação internacional da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Mabel Torres. À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilia Renée Cavaglieri pela ajuda na identificação das leveduras. Ao Dr. Guillermo Gaj Merlera por ter vindo de tão longe para dar suporte e treinamento sobre biologia molecular. À Dr<sup>a</sup>. Carina Maricel Pereyra pelos ensinamentos transmitidos, paciência, amizade e incentivo. Aos demais pesquisadores e colegas que tive a oportunidade de conhecer na Argentina.

Ao Campus da UFPI de Bom Jesus pelo acolhimento e oportunidade de atuar na carreira docente. Aos estimados colegas professores, funcionários e alunos que fazem parte desta casa. Em especial, as minhas amigas Jamylla Mirck (comadre), Márcia Paula e Priscila Teixeira por todo o cuidado e apoio imprescindíveis para viver longe de casa.

Ao meu querido amor, Marcos Antônio Holanda Gomes Filho, pela motivação diária, pelo companheirismo e por me ajudar nesse momento tão importante da minha vida.

Agradeço especialmente à minha amiga e fiel companheira Aline Maria Dourado Rodrigues (*sias*), por sua dedicação em sempre me ajudar e também por ter me ensinado a ter paciência durante todo o doutorado, que foi fundamental para conclusão da parte experimental. Às minhas queridas amigas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do NUEPPA (Núcleo de Pesquisas Estudos e Processamento de Alimentos): Aline Marques Monte, Cristiane Evangelista

Lima, Juliet Teixeira de Oliveira, e Juliana de Abreu Costa pela imensa contribuição na realização das análises e por serem minhas companheiras de laboratório, compartilhando aprendizados e momentos de alegria. Às amigas “*Nuecats*”: Josyanne Araújo Neves e Verbena Carvalho Alves, que mesmo de longe transmitiam sua energia positiva. Ao José Humberto Santos Filho por sua boa vontade em sempre ajudar ao próximo. À Maria Liliane Ximenes Azevedo pela contribuição na preparação do núcleo de toxina. A toda família NUEPPA pela agradável convivência diária.

À minha querida amiga Mabell Nery Ribeiro pelo apoio, incentivo e contribuição com a análise estatística.

Ao Sr. Erivelton Teixeira César, do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) de Piripiri, pela doação das tambatingas e posteriormente dos alevinos de tambaqui.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eldelita Franco Holanda pelo auxílio na elaboração dos *abstracts* e pelo incentivo científico. Estendo meus sinceros agradecimentos a toda sua família pelo apoio ao longo dessa etapa.

Aos meus eternos amigos da graduação e a todos os amigos da Pós-Graduação em Ciência Animal pela companhia durante os momentos de aprendizado pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do NUEPPA/CCA/UFPI, em especial, ao Sr. Francisco, e Sr. Aminthas Floriano Filho, pela prestatividade e ao técnico do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, George Emanuel Pereira da Silva, pela ajuda fundamental no laboratório.

Ao laboratório de Patologia Animal/CCA/UFPI, em especial à Emanuelle Karine Frota Batista pelo auxílio nas análises histopatológicas. Ao prof. Evandro e aos colegas do Laboratório de Solos (LASO/CCA/UFPI), pela contribuição e auxílio na biologia molecular. Ao prof. Leal (DPPA) por ter permitido a utilização da máquina de moer. Ao Laboratório de Microbiologia Veterinária pela doação das cepas de bactérias. Ao José, funcionário do Lapespi, pelo auxílio fundamental durante o manejo com os alevinos no projeto *in vivo*.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal - UFPI pela atenção e disponibilidade.

A todos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
<b>3 CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DAS LEVEDURAS DE RAÇÃO E INTESTINO DE TAMBATINGAS</b>	22
Resumo .....	24
Abstract .....	25
Introdução .....	26
Material e métodos .....	27
Resultados .....	32
Discussão .....	34
Conclusões .....	37
Referências bibliográficas .....	38
<b>4 CAPÍTULO II: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO AGENTE PROBIÓTICO E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B<sub>1</sub></b>	42
Resumo .....	44
Abstract .....	44
Introdução .....	45
Material e métodos .....	47
Resultados e discussão .....	51
Conclusões .....	57
Referências bibliográficas .....	57
<b>5 CAPÍTULO III: EFEITOS DA ADIÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM RAÇÕES CONTAMINADAS COM AFLATOXINA B<sub>1</sub> SOBRE O DESEMPENHO E SANIDADE DE ALEVINOS DE TAMBAQUI</b>	61
Resumo .....	62
Abstract .....	63
Introdução .....	64

Material e métodos .....	65
Resultados e discussão .....	70
Conclusões .....	73
Referências bibliográficas .....	74
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DAS LEVEDURAS DE RAÇÃO E INTESTINO DE TAMBATINGAS</b>		22
Tabela 1	Espécies de levedura isoladas do intestino de tambatingas de dois ambientes de cultivo .....	33
Tabela 2	Frequência de leveduras isoladas em diferentes marcas comerciais de ração para peixes .....	33
<b>CAPÍTULO II: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO AGENTE PROBIÓTICO E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B<sub>1</sub></b>		42
Tabela 1	Interpretação dos resultados de auto-agregação de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
Tabela 2	Média e desvio padrão da capacidade de auto-agregação entre cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidas em diferentes ambientes .....	52
Tabela 3	Ensaio de co-agregação entre cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e cepas de patógenos .....	52
Tabela 4	Efeito da passagem simulada pelo pH do estômago (pH 2,0) de tambaqui na viabilidade de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	54
Tabela 5	Efeito da passagem simulada pelo pH do intestino (pH 7,0) de tambaqui, pela adição de bile a 0,5% na viabilidade de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	55
Tabela 6	Adsorção (%) de diferentes níveis (10 e 25 ng. mL <sup>-1</sup> ) de aflatoxina B <sub>1</sub> por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	56
<b>CAPÍTULO III: EFEITOS DA ADIÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM RAÇÕES CONTAMINADAS COM AFLATOXINA B<sub>1</sub> SOBRE O DESEMPENHO E SANIDADE DE ALEVINOS DE TAMBAQUI</b>		61
Tabela 1	Desempenho de alevinos de tambaqui alimentados com aflatoxina B <sub>1</sub> (T3 e T4) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (T2 e T4) no período de 34 dias .....	79
Tabela 2	Alterações histopatológicas observadas em tecidos de alevinos de tambaquis alimentados com aflatoxina B <sub>1</sub> (T3 e T4) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (T2 e T4) aos 34 dias .....	80
Tabela 3	Média e desvio padrão da contagem de leveduras da ração e do intestino de alevinos de tambaquis alimentados com aflatoxina B <sub>1</sub> (T3 e T4) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (T2 e T4) aos 34 dias .....	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DAS LEVEDURAS DE RAÇÃO E INTESTINO DE TAMBATINGAS</b>		22
Figura 1	Perfil de bandas obtido com a reação de PCR utilizando o iniciador EI1. Da esquerda para a direita: (Pd) padrão de peso molecular, cepas de leveduras P1 a P16 isolados do intestino de tambaquis e ração para peixes R19 a R31 e (c-) controle negativo .....	32
 <b>CAPÍTULO III: EFEITOS DA ADIÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM RAÇÕES CONTAMINADAS COM AFLATOXINA B<sub>1</sub> SOBRE O DESEMPENHO E SANIDADE DE ALEVINOS DE TAMBAQUI</b>		61
Figura 1	Fotomicrografia de tecido renal de alevino de tambaqui corada por H-E (aumento 40x) .....	82
Figura 2	Fotomicrografia de tecido hepático de alevino de tambaqui corada por H-E (aumento 40x) .....	83
Figura 3	Fotomicrografia de tecido muscular de alevinos de tambaqui corada por H-E (aumento 40x) .....	84
Figura 4	Perfil de bandas obtido com a reação de PCR utilizando o iniciador (GTG) <sub>5</sub> . Da esquerda para a direita: cepas de leveduras I, II, III, IV e V isoladas do intestino de tambaquis, (CN) controle negativo e (Sc) cepa padrão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	85

## POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS COMO ADSORVENTE DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> E PROBIÓTICOS EM PISCICULTURA

### RESUMO

A utilização de leveduras na agricultura tem um grande potencial em reduzir o dano econômico causado por fungos toxigênicos, podendo atuar como agentes de biocontrole e ainda, na redução da contaminação de matérias-primas por micotoxinas. Neste sentido, a busca por compostos naturais, que possam exercer tais funções é importante para o desenvolvimento tecnológico, econômico e para a sanidade em aquicultura. Deste modo objetivou-se isolar e identificar leveduras presentes nos intestinos de tambatinga cultivados em tanques comerciais de piscicultura e da ração dos ambientes de cultivo; verificar *in vitro* o potencial probiótico e adsorvente de *Saccharomyces cerevisiae* para aflatoxina B<sub>1</sub> e avaliar os efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* em rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> sobre o desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui. A identificação molecular das leveduras da ração e intestino de tambatingas foi realizada pela reação de PCR e amplificação por NL1/NL4 e sequenciamento das regiões D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Foram identificadas 16 leveduras da espécie *Candida nivariensis* no intestino dos peixes. Nas amostras de ração, foram isoladas e identificadas as espécies: *Hyphopichia burtonii* (23,08%), *Lodderomyces elongisporus* (15,39%) e *Trichosporon asahii* (15,39%), *Candida nivariensis* (7,69%), *Candida orthopsilosis* (7,69%), *Candida parapsilosis* (7,69%), *Rhodotorula minuta* (7,69), *Sterigmatomyces elviae* (7,69), *Cryptococcus liquefaciens* (7,69). As cepas de *S. cerevisiae* A8L2, RC1 e RC3 foram submetidas aos seguintes testes *in vitro* para avaliação de seu potencial probiótico: inibição homóloga, auto-agregação, co-agregação, atividade antibacteriana, viabilidade às condições gastrointestinais e adsorção de AFB<sub>1</sub>. Constatou-se que as cepas A8L2, RC1 e RC3 possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB<sub>1</sub>. Em testes *in vitro*, a estirpe A8L2 foi mais eficiente que as demais por ter melhor capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>, apresentar atividade antibacteriana e ser viável em condições simuladas do trato gastrointestinal de tambaqui. Foram também avaliados os seguintes parâmetros: qualidade da água, desempenho zootécnico, análises histopatológicas, contagem e isolamento das leveduras da ração e intestino. Constatou-se que a cepa A8L2 de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> foi capaz de colonizar o intestino dos alevinos de tambaqui, entretanto, sua inclusão associada com 100 µg.kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> em rações não promoveu melhorias nos parâmetros de GPM, GCM, TCE, Fator K e histopatológicos desses animais.

**Palavras-Chave:** Adsorção; Aquicultura; Biologia molecular; Cepas viáveis; *Collossoma macropomum*; *Saccharomyces cerevisiae*.

## POTENTIAL APPLICATION OF YEAST AS ADSORBENT OF AFLATOXIN B<sub>1</sub> AND PROBIOTICS IN FISH FARMING

### ABSTRACT

The use of yeasts in agriculture has great potential in reducing the economic damage caused by toxicogenic fungi which can act as biocontrol agents and of yeasts in reducing contamination of raw materials for mycotoxins. In this way, the search for natural compounds which can perform such functions is important to the technological and economic development in aquaculture sanity. The aim of the study was to identify yeasts species from feed and intestine of fish tambatinga intended at fish farming; to evaluate in vitro the probiotic potential and adsorption of *Saccharomyces cerevisiae* for aflatoxin B<sub>1</sub> and to evaluate the effects of the addition of *Saccharomyces cerevisiae* in feeds contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub> on the performance and sanity of fingerling of tambaqui. The molecular identification was performed by the PCR reaction and amplification NL1 / NL4 and sequencing of the regions D1/D2 of the large subunit rRNA gene. Sixteen *Candida nivariensis* strains in the intestinal tract were identified. The feed fish samples had a higher variability of yeast species. Were isolated species such as *Hyphopichia burtonii* (23.08%), *Lodderomyces elongisporus* (15.39%) and *Trichosporon asahii* (15.39%) and less frequently *Candida nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula minuta*, *Sterigmatomyces elviae*, *Cryptococcus liquefaciens*. Strains of *S. cerevisiae* A8L2, RC1 e RC3 were subjected to the following in vitro tests: (homologous inhibition, self-aggregation, co-aggregation, antibacterial activity, gastrointestinal conditions tolerance and adsorption of AFB<sub>1</sub>). Thus, it was observed that the strains of *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, RC1 and RC3 have potential probiotic and adsorbent of AFB<sub>1</sub>. In vitro tests the A8L2 strain is more efficient than the others by having better AFB<sub>1</sub> adsorption capacity, providing antibacterial activity and being viable in simulated conditions of the gastrointestinal tract of tambaqui. The following parameters were evaluated: the quality of the water, zootechnical performance, histopathological analysis, counting and isolation of yeasts of the feed and intestine. It was found that the A8L2 strain *Saccharomyces cerevisiae* in the concentration of 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> was able to colonize the intestine of the of fingerlings of tambaqui, however, its inclusion associated with 100 µg kg<sup>-1</sup> of AFB<sub>1</sub> in feeds did not promote improvements in GPM, GCM, TCE, Factor K and histopathological parameters of these animals.

**Keywords:** Adsorption; Aquaculture; Molecular biology; Viable strains; *Collossoma macropomum*; *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos de qualidade vem mudando o cenário atual das pesquisas, visando uma maior inter-relação entre as diversas áreas que cuidam da sanidade animal e buscando fontes de alimentação saudáveis com o intuito de estabelecer melhorias aplicáveis para a produção animal.

De acordo com os últimos relatórios da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, o Brasil destaca-se como o 12º maior produtor mundial em aquicultura (FAO, 2012). A produção mundial de pescado em 2012 foi de 158 milhões de toneladas, dos quais 136,2 milhões de toneladas foram utilizados no consumo humano (FAO, 2012). Os peixes foram os organismos aquáticos mais cultivados, com uma produção de 44,1 milhões de toneladas.

Segundo os dados oficiais do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção brasileira de pescado em 2013 foi de 1.241.807 toneladas, sendo a região Nordeste a maior produtora em 2013, com 140.748 toneladas de pescado (BRASIL, 2015). Dentro da piscicultura regional e brasileira, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seu híbrido tambatinga, têm destaque consolidado em função da adaptação aos sistemas de cultivo locais e as suas características desejáveis como hábito alimentar onívoro, além de ter grande importância na gastronomia do estado do Piauí.

Para atender à crescente demanda por pescado, a piscicultura vem tornando-se cada vez mais intensiva favorecendo assim, o aparecimento de doenças e afetando o desenvolvimento econômico da atividade em muitas regiões. Esta problemática, muitas vezes, está associada à alimentação destes animais, por questões de deficiências no armazenamento e seleção de ingredientes inadequados para elaboração de rações. Em uma escala global uma alta porcentagem de matérias-primas e rações destinadas à piscicultura estão contaminadas por metabólitos secundários produzidos por fungos, denominados micotoxinas. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são predominantes nos ingredientes usados em rações e destacam-se por serem potentes compostos cancerígenos naturais para os animais.

Os estudos disponíveis sobre os efeitos das micotoxinas em piscicultura mostram que o desempenho e o estado de saúde destes animais são afetados negativamente, além de gerar perdas econômicas. O grande número de contaminações por micotoxinas nos produtos agrícolas tem motivado pesquisadores de todo o mundo a desenvolver métodos de prevenção e de desintoxicação destes compostos tóxicos. As soluções para esta problemática devem ser

desenvolvidas com o intuito de minimizar o impacto negativo das micotoxinas sobre o desempenho e a saúde dos peixes expostos. Além disso, o risco para os consumidores também deve ser levado em conta, visto que resíduos de micotoxinas já foram encontrados em musculatura de peixes.

Diferentes estratégias de prevenção e controle sobre a contaminação de micotoxinas têm sido desenvolvidas, tais como: a utilização de procedimentos físicos, químicos e biológicos que propiciem redução de contaminantes tóxicos nos alimentos. Uma das alternativas disponíveis para atenuar o efeito de alguns grupos de micotoxinas, o das aflatoxinas é a descontaminação biológica realizada por bactérias e leveduras que tenham propriedades probióticas. Estes micro-organismos quando adicionados aos alimentos contaminados, são capazes de sequestrar e eliminar micotoxinas do trato gastrointestinal. Sendo assim, a proposta de buscar novos compostos com atividade antifúngica e antimicotoxígena, com potencial ação preventiva visando diminuir os efeitos deletérios das micotoxicoses sobre a sanidade dos animais é imprescindível.

A inclusão de cepas benéficas à dieta dos animais se dá pela administração de probióticos, que são micro-organismos vivos que conferem efeitos benéficos ao consumidor, melhorando seu balanço microbiano a nível intestinal. Desta forma, vale ressaltar o importante papel das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que são úteis na remoção de micotoxinas, sendo objetos de estudo por parte de laboratórios de referência. Muitos trabalhos estudam a eficiência dos probióticos na saúde animal e outros acerca do processo de adsorção. Em poucos destes trabalhos, no entanto, verifica-se o estudo complementar sobre o papel de estirpes probióticas no processo de adsorção de micotoxinas. Neste sentido, a busca por compostos naturais, que possam exercer tais funções é importante para o desenvolvimento tecnológico, econômico e para a sanidade animal.

Baseado nestes fatos formulou-se a seguinte hipótese: As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em diferentes ambientes possuem potencial probiótico e adsorvente de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) para serem incluídas na alimentação animal, influenciando no desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui. Para testar a hipótese, os objetivos do presente trabalho foram: Isolar e identificar leveduras presentes nos intestinos de tambatinga cultivados em tanques comerciais de piscicultura e da ração dos ambientes de cultivo; Testar *in vitro* o potencial probiótico e adsorvente de *Saccharomyces cerevisiae* para aflatoxina B<sub>1</sub>; Avaliar os efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* em rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> sobre o desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui.

O trabalho foi dividido estruturalmente em três capítulos, apresentados na forma de artigos científicos: Capítulo I: “Ocorrência e diversidade das leveduras de ração e intestino de tambatingas”; Capítulo II: “*Saccharomyces cerevisiae* como agente probiótico e adsorvente para aflatoxina B<sub>1</sub>”; Capítulo III: “Efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* em rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> sobre os parâmetros de desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui”. Os artigos foram elaborados respectivamente de acordo com as normas das revistas: Aquaculture International, Annals of Microbiology e Semina - Ciências Agrárias, às quais serão submetidos para publicação.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### *Agentes probióticos*

Os probióticos são micro-organismos vivos que, uma vez administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao consumidor, melhorando seu balanço microbiano a nível intestinal e na prevenção de doenças. (FULLER, 1989; MATTAR et al., 2001). Constituem uma das alternativas ao uso de antibióticos no controle de doenças (GRAM et al., 1999; NIKOSKELAINEN et al., 2001).

O probióticos são amplamente utilizados na produção animal proporcionando uma redução nas doenças, melhoria no desempenho dos animais e na aquicultura, através da atuação na saúde dos peixes e na microbiota aquática (MIRANDA, 2012). Dentre os requisitos necessários para seleção de cepas com capacidade probiótica estão: viabilidade no trato gastrointestinal, não ser considerado um organismo patogênico, especificidade de hospedeiro e sua proximidade com o ecossistema. (FULLER, 1989; GATESOUPE, 1999). Existem vários atributos que um micro-organismo deve ter para atuar como agente probiótico, no entanto, para seleção de uma cepa probiótica, esta deve possuir o máximo de características positivas ou mesmo ser utilizada juntamente com outras espécies, com efeito sinérgico, para proporcionar efeitos benéficos ao hospedeiro de forma complementar sobre o desempenho e saúde animal (MERRIFIELD et al., 2010).

De acordo com Fuller (1989), a atuação de produtos comerciais formados por micro-organismos desencadeia a produção de compostos antimicrobianos; promovem alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática e estímulo da imunidade do hospedeiro. Podem ainda, desencadear efeitos fisiológicos, como o desenvolvimento de células epiteliais do trato gastrointestinal, aumentando a espessura da mucosa intestinal e a superfície de absorção (TSUKAHARA et al., 2003).

Além de todas as propriedades mencionadas, as cepas probióticas devem possuir certificados de segurança alimentar para que possam ser inseridas na alimentação sem representar riscos à saúde. Neste sentido, todos os aditivos alimentares que sejam considerados seguros devem ser aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos e recebem a denominação GRAS, (do inglês *Generally Recognized as Safe*). Uma substância pode ser GRAS somente se o seu reconhecimento geral de segurança atender aos nos pareceres de peritos qualificados para avaliar sua segurança. O *status* GRAS pode basear-se em uma história de uso seguro dessa substância em alimentos ou baseado em procedimentos científicos (FDA,

2015). No caso de micro-organismos, as cepas recebem esta classificação baseada em várias avaliações de toxicidade e não podem ser patogênicas. Segundo Lane; Morrissey (2010), as indústrias têm optado por micro-organismos que não tragam riscos à saúde, de modo que se utilizem apenas os que estão listados na categoria GRAS. A *Food and Drug Administration* (FDA) e a Farmacopeia Japonesa (NITTA; KOBAYASHI, 1999) classificaram *Saccharomyces cerevisiae* como um micro-organismo GRAS. Este fato permite o uso seguro desta espécie como células ativas, como probióticos ou por meio de componentes da parede celular em suplementos alimentares, proporcionando resultados satisfatórios em avaliações *in vivo*.

Outra classificação de importância na indústria de alimentos é o *status* QPS, (do inglês *Qualified Presumption of Safety*), “Presunção de Segurança Qualificada”, que é habilitado pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) aos micro-organismos que passaram por uma sistemática de avaliações de sua segurança, antes de serem comercializados, para estabelecimento de sua identidade, patogenicidade e o uso pretendido das cepas. O Comitê Científico da EFSA publicou uma lista de micro-organismos recomendados para Presunção Qualificada de lista de Segurança (QPS) em 2007, que vem sendo atualizada conforme solicitação para inclusão de novas cepas. Atualmente este *status* QPS é dado a algumas leveduras de importância na área de biotecnologia e dentre elas encontra-se a *Saccharomyces cerevisiae* (EFSA, 2015).

### ***Leveduras como agentes probióticos em piscicultura***

As leveduras são fungos unicelulares, aeróbios e facultativos, raramente anaeróbios, eucarióticos e ubíquos, podendo ser encontradas no ar, solos, água, vegetais e animais (LIMA et al., 2001; SOUZA et al., 2011). O conteúdo celular, também denominado extrato de levedura, é rico em proteína (37% a 45%), possui um excelente balanço de aminoácidos essenciais, principalmente em lisina total, tornando-as valiosas para serem utilizadas em combinação com grãos de cereais (LAZZARI et al., 2006; GONÇALVES; CARVALHO; VIEGAS, 2010; ROSTAGNO et al., 2011). Devido a sua riqueza em vitaminas do complexo B, as leveduras têm sido utilizadas como suplemento vitamínico em dietas para animais monogástricos. Além de seu excelente valor nutricional, possuem uma elevada velocidade de multiplicação para produção de biomassa, sendo utilizada em uma grande variedade de processos industriais e podem ser produzidas nos mais diferentes substratos (PEREYRA et al., 2015).

As leveduras, sejam elas vivas ou não, possuem em sua composição uma fração de carboidratos (20 a 40%), que, na grande maioria, faz parte da parede celular, composta principalmente por glucanas e mananas, as quais parecem ter impacto no sistema imunológico e na habilidade em prevenir a colonização por bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (HISANO et al., 2004; SILVA et al., 2009).

Um dos grandes diferenciais das leveduras é que raramente são tóxicas ou causadoras de doenças e por isso são largamente utilizadas nas dietas de humanos e de animais (SOUZA et al., 2011). Os exemplos mais comuns de micro-organismos eucarióticos com propriedades probióticas incluem os gêneros: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Yarrowia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Isaatchenkia* e *Kluyveromyces*. (NAYAK, 2011). Dentro do gênero *Saccharomyces*, destacam-se *S. cerevisiae* e *S. boulardii* (HOLZAPFEL et al., 2001). Dentre todas essas espécies, *Saccharomyces cerevisiae* é mais conhecida e tornou-se o organismo escolhido para estudos de metabolismo, genética molecular, sendo, portanto, o primeiro eucarioto com o genoma completamente sequenciado (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

O uso de levedura como probiótico tem proporcionado resultados significativos em humanos e animais. No entanto, seus efeitos são pouco estudados em organismos aquáticos (PATRA; MOHAMED, 2003). As leveduras vivas favorecem a saúde do trato gastrointestinal dos animais multiplicando-se muito pouco e transitando juntamente com o bolo alimentar, atuando como probiótico, vindo a diminuir a pressão exercida pelos microrganismos patogênicos (COSTA, 2004). Segundo Ohashi; Ushida (2009), a levedura não possui a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal dos animais e, portanto, a administração na dieta deve ser contínua.

As cepas de leveduras podem ser utilizadas na nutrição animal de diversas formas. O fornecimento da dieta pode ser feito diretamente a partir de resíduos de fermentados industriais ou então como probióticos a partir da ingestão direta de células viáveis que visam estimular a microbiota intestinal. A sua capacidade de atuar como probiótico dependerá do uso contínuo e do fornecimento de quantidade suficiente de células vivas (CUARÓN, 2000).

As paredes celulares das leveduras podem agir também como substâncias sequestrantes de micotoxinas, ao se ligarem a elas, promovendo dessa forma a detoxificação. Entretanto, para que a detoxificação seja mais ou menos completa, é preciso que alguns fatores, entre eles, o tempo de permanência do bolo alimentar e o comprimento do trato digestivo do animal, estejam condizentes para tal ligação (COSTA, 2004).

## ***Micotoxinas***

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por alguns fungos filamentosos. Os fungos mais prevalentes responsáveis pela ocorrência de micotoxinas são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Já foram relatadas mais de 400 micotoxinas diferentes e estas podem ser agrupadas em cinco classes principais: aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenonas e tricotecenos (CAST, 2003).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais predominantes nos ingredientes usados nas rações para animais no Brasil e no mundo (KUBITZA, 2010). As aflatoxinas são toxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*. A aflatoxina B<sub>1</sub> é o mais importante carcinógeno formado (KLICH, 2007), responsável por desencadear toxicidade aguda e crônica e gerar danos cancerígenos, mutagênicos, hepatotóxicos e imunossupressores aos homens e animais (ŁAZICKA; ORZECOWSKI, 2010). São metabólitos tóxicos importantes em piscicultura, pois sua presença exerce um impacto econômico negativo relevante, podendo gerar graves problemas de saúde às espécies aquáticas, após exposição à alimentação contaminada. Deste modo, vários pesquisadores passaram a monitorar a microbiota e o nível de contaminação das micotoxinas em rações para aquicultura (CARDOSO FILHO et al., 2013; CALVET et al., 2015; NUNES et al., 2015).

Os efeitos tóxicos das micotoxinas são variáveis, dependendo de sua estrutura química, concentração, duração de exposição, espécie, sexo, idade e vulnerabilidade do animal afetado. Geralmente os animais monogástricos jovens são mais sensíveis às micotoxinas do que os ruminantes e de maior idade (DENLI; PERÉZ, 2006). Desta forma, a presença de micotoxinas em matérias-primas ou alimentos prontos, como rações, requer um monitoramento eficaz para prevenir o aparecimento de micotoxicoses na produção animal, reduzir perdas econômicas e minimizar os riscos para a saúde humana (PINHEIRO et al., 2015).

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

A utilização de matéria-prima de origem vegetal em rações para animais possibilita que alguns ingredientes contaminados sejam utilizados em suas formulações (SANTOS et al., 2010). Apesar dos bons programas de triagem, seleção de matérias-primas de alta qualidade e ingredientes para alimentação animal e boas condições de armazenamento, é muito difícil garantir a ausência de micotoxinas em alimentos para o setor de aquicultura. Por isso, é mais importante encontrar formas adequadas para enfrentar o problema através de uma gestão eficaz

dos riscos decorrentes de contaminações por micotoxinas. (SANTOS et al., 2010). As micotoxinas geram um impacto econômico ao longo de toda indústria de alimentos para humanos e animais. Devido esses prejuízos, vários métodos foram elaborados para evitar a contaminação de alimentos por micotoxinas ou para descontaminar produtos (PFLIEGLER et al., 2015).

Diferentes estratégias foram propostas para prevenir a contaminação dos cultivos e das matérias-primas por fungos durante seu armazenamento, assim como para reduzir o impacto da contaminação dos ingredientes por micotoxinas. Dentre as estratégias de detoxificação destacam-se os diferentes procedimentos físicos, químicos e biológicos, voltados para destruir ou adsorver as micotoxinas no trato gastrointestinal dos animais, impedindo a sua absorção (DENLI; PERÉZ, 2006).

Um processo comercial viável de detoxificação, além de ser efetivo contra uma gama de micotoxinas, também deve ser econômico, utilizar uma tecnologia acessível, gerar produtos atóxicos e não alterar as propriedades nutricionais dos alimentos. (HUWIG et al., 2001; DIAZ et al., 2004).

Uma estratégia já amplamente utilizada na gestão de risco de micotoxinas é a inclusão de ligantes ou adsorventes na ração. Ligantes ou adsorventes foram utilizados para neutralizar os efeitos de micotoxinas, impedindo a sua absorção a partir do trato digestivo do animal (HUWIG et al., 2001). Os aglutinantes mais comuns são argilas, bentonitas, zeólitos, sílicas e silicatos de alumínio. No entanto, esta estratégia não funciona bem para todos os grupos de micotoxinas, tendo particularidades entre elas (SANTOS et al., 2010).

De acordo com Mallman et al. (2006), do ponto de vista técnico, para que um produto seja selecionado como adsorvente de micotoxinas são necessárias avaliações *in vitro* e *in vivo*. As avaliações *in vitro* de um adsorvente têm por objetivo principal, determinar a capacidade que um produto tem de adsorver as micotoxinas presentes em um meio líquido e torná-las indisponíveis. Estas metodologias têm sido estudadas por diversos pesquisadores, no entanto, quando no organismo animal, o adsorvente é submetido a muitas situações que não estão presentes nos ensaios *in vitro*, como variações no pH das soluções e presença de enzimas e outras substâncias.

Estes propósitos estimulam os pesquisadores a buscar novas estratégias de descontaminação que evitem o uso de agentes químicos e reduzam as perdas e o valor nutritivo dos alimentos descontaminados, sem diminuir o desempenho produtivo.

### ***Leveduras no controle de micotoxinas***

Uma das estratégias promissoras é a detoxificação ou adsorção através do uso de produtos de origem biológica, que são adicionados aos alimentos durante o processo de formulação destes (PINHEIRO et al., 2015). Estes produtos atuam posteriormente sequestrando as toxinas no trato gastrointestinal reduzindo a biodisponibilidade das mesmas. Atualmente diversos micro-organismos vêm sendo usados com esta finalidade, como é o caso das bactérias ácido-láticas e algumas leveduras (BOVO et al., 2010; JUODEIKIENE et al., 2012).

A utilização de leveduras na agricultura tem um grande potencial em reduzir o dano econômico causado por fungos toxigênicos, podendo atuar como agentes de biocontrole em vários processos tecnológicos e ainda, na redução da contaminação de matérias-primas por micotoxinas (PFLIEGLER et al., 2015). Este fato reflete sobre a produção animal, visto que os animais que são alimentados com dietas contaminadas por estes metabólitos ficam sujeitos a inúmeras patologias, podendo levar a morte.

As espécies de leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizadas como aditivos naturais na alimentação de animais de produção. A presença de macromoléculas na sua parede celular tais como manoproteínas e  $\beta$ -glucanos constitui uma boa fonte de adsorventes (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Podem ser utilizadas na forma ativa, inativa ou a partir da extração de seus componentes. Na forma de parede celular, várias espécies de levedura são capazes de adsorver micotoxinas de produtos agrícolas, bem como produtos que contenham células de levedura probiótica também são aplicados para neutralizar micotoxicoses em animais (PFLIEGLER et al., 2015). A adição destes componentes em produtos comerciais ainda tem como benefícios a capacidade de suportar altas temperaturas, sendo fator importante, visto que as rações passam por processos de peletização e também são capazes de resistir às condições químicas e físicas do trato digestivo dos animais (PERRY, 1995). Segundo Juodeikiene et al. (2012), cepas de *S. cerevisiae* com capacidade de ligação com micotoxinas, podem ser utilizadas como aditivos para muitos alimentos de origem humana e animal, sem alterar as características do produto final.

A idéia de aliar a capacidade probiótica de *Saccharomyces cerevisiae*, juntamente com seu potencial adsorvente de micotoxinas pode trazer melhorias para a sanidade e o desempenho de peixes. Ensaio *in vitro* e *in vivo* são ferramentas poderosas para a seleção de agentes probióticos e adsorventes. Neste sentido, a busca por compostos naturais, que possam exercer tais funções é importante para o desenvolvimento tecnológico, econômico e para a sanidade em aquicultura.

### **3. Capítulo I<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Elaborado conforme normas da revista Aquaculture International

## Ocorrência e diversidade das leveduras de ração e intestino de tambatingas

*Ocurrence and diversity of yeast species isolated from feedstuffs and gut of fish tambatingas*

Raizza E. E. Pinheiro<sup>1\*</sup>, Aline M. D. Rodrigues<sup>2</sup>, Julliet T. de O. Santos<sup>2</sup>, Juliana de A. Costa<sup>2</sup>, Carina M. Pereyra<sup>3</sup>, Adriana M. Torres<sup>3</sup>, Carlos A. Rosa<sup>4</sup>, Ana R. de O. Santos<sup>4</sup>, Maria Christina S. Muratori<sup>5</sup>

<sup>\*1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Docente do Curso de Medicina Veterinária, Campus Bom Jesus – Universidade Federal do Piauí (UFPI), 64900-000, Piauí, Brasil. \*Autor para correspondência: raizza\_eveline@hotmail.com; Telefone: 5586999524328.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mails: alinemary2@yahoo.com.br, jullietteixeira@hotmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología y Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina, Córdoba, Argentina; Member of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CIC-CONICET), Argentina. E-mails: carinapereyra06@hotmail.com, atorres@exa.unrc.edu.ar

<sup>4</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627; Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais. E-mails: carlosrosa@icb.ufmg.br, anaraquel@icb.ufmg.br

<sup>5</sup> Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br

**RESUMO.** O conhecimento das leveduras existentes na alimentação e no trato intestinal de peixes auxilia a compreender sua participação na saúde e nutrição destes animais em diferentes ambientes, que pode resultar em melhorias nas condições sanitárias e no desempenho da produção dos mesmos. Desta forma, objetivou-se identificar leveduras de ração e dos intestinos de tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomum*) cultivados em tanques comerciais de piscicultura. Para tanto, foram adquiridos 20 tambatingas e 30 amostras de ração de diferentes marcas em ambientes produtivos do estado do Piauí, Brasil. Os intestinos foram divididos em três regiões iguais: anterior, média e posterior, das quais foram seccionados proporcionalmente fragmentos de 10 cm de cada parte, totalizando 60 amostras. As leveduras foram isoladas no Ágar Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YPD) e Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). A identificação molecular foi realizada pela reação de PCR, amplificação por NL1/NL4 e sequenciamento das regiões D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Foram identificadas 16 leveduras da espécie *Candida nivariensis* na região intestinal, com maior frequência (50%) na porção anterior. Nas amostras de ração analisadas, obteve-se um maior número de espécies como: *Hyphopichia burtonii* (23,08%), *Lodderomyces elongisporus* (15,39%) e *Trichosporon asahii* (15,39%), *Candida nivariensis* (7,69%), *Candida orthopsilosis* (7,69%), *Candida parapsilosis* (7,69%), *Rhodotorula minuta* (7,69), *Sterigmatomyces elviae* (7,69), *Cryptococcus liquefaciens* (7,69). Conclui-se que nem sempre leveduras encontradas em ração são isoladas do trato intestinal de tambatingas. *Candida nivariensis* pode estar presente no bioma intestinal de tambatingas em diferentes ambientes de cultivo e na ração. As espécies de levedura *Hyphopichia burtonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Trichosporon asahii*, *Candida nivariensis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula minuta*, *Sterigmatomyces elviae*, *Cryptococcus liquefaciens* podem ser encontradas em amostras de ração para piscicultura. A identificação molecular permitiu o isolamento de espécies de leveduras que ainda não haviam sido relatadas em ração e intestino de tambatingas.

**Palavras-chave:** Identificação molecular, piscicultura, *Candida nivariensis*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomum*.

**ABSTRACT.** Know the yeast inherent of feed and fish intestinal tract; understand their participation in fish health and nutrition of different environments can improve the sanitary conditions and fish production performance. The aim of the study was to identify yeasts species from feed and intestine of fish tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomum*) intended at fish farming. Twenty tambatingas fish and 30 feed samples from diferents brands were acquired from two productive locals of the state of Piauí, Brazil. The intestines were divided in three equal parts, anterior, medium and posterior, sectioned at a proportionally of 10 cm fragments, totaling 60 samples. The yeasts were isolated using agar yeast extract peptone dextrose (YPD) and dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC). The molecular identification was performed by the PCR reaction and amplification NL1 / NL4 and sequencing of the regions D1/D2 of the large subunit rRNA gene. Sixteen *Candida nivariensis* strains in the intestinal tract were identified; the initial portion (50%) of the intestine was the highest frequency. The feed fish samples had a higher variability of yeast species. Were isolated species such as *Hyphopichia burtonii* (23.08%), *Lodderomyces elongisporus* (15.39%) and *Trichosporon asahii* (15.39%) and less frequently *Candida nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula minuta*, *Sterigmatomyces elviae*, *Cryptococcus liquefaciens*. It was concluded that yeast founded in feed is not always detected isolated at the intestinal tract of tambatingas. *Candida nivariensis* may be present in the intestinal biome of tambatingas in different culture environments and feed. The yeast species *Hyphopichia burtonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Trichosporon asahii*, *Candida nivariensis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula minuta*, *Sterigmatomyces elviae*, *Cryptococcus liquefaciens* may be found in fish farming feed samples. Molecular identification allowed the isolation of yeast species that had not been reported in feed and intestine of tambatingas.

**Keywords:** Molecular identification, fish farming, *Candida nivariensis*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomum*.

## INTRODUÇÃO

Conforme a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO 2014), a produção pesqueira e de aquicultura em nível mundial foi de 158 milhões de toneladas em 2012, considerada assim, o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo. O peixe continua a ser um dos alimentos mais comercializados em nível mundial, tendo atingido o valor de cerca de 130 milhões de dólares em 2012 (FAO 2014).

O tambatinga, um peixe híbrido obtido do cruzamento do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), está entre os peixes redondos mais cultivados na piscicultura nacional, especialmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (Ibama 2008). A produção nacional dos peixes redondos, grupo que engloba as espécies dos gêneros *Colossoma* e *Piaractus*, entre eles o tambaqui, pacu, pirapitinga e híbridos, apresentou uma surpreendente expansão no cultivo, com uma produção de 186 mil toneladas em 2014 (Kubitza 2015). O tambatinga, apresenta grande importância para a piscicultura e na gastronomia (Pessoa 2009) e com o intuito de conhecer melhor sobre o hábito alimentar da espécie sua descrição anatômica foi realizada por Ferreira et al. (2013).

A conformidade anatômica do trato intestinal e o tipo de alimento ingerido podem afetar diretamente a microbiota (Ringo et al. 2010). O trato gastrointestinal contém micro-organismos variáveis que integram um complexo ecossistema que reflete o ambiente, a composição microbiana da água e a dieta fornecida (Fjellheim et al. 2007; Nayak 2010). A conservação do equilíbrio microbiano é fundamental para manutenção da nutrição e a saúde do hospedeiro. Essas comunidades microbianas complexas podem ser interrompidas e alteradas por diferentes dietas na alimentação animal, sendo uma das principais causas de infecção dos peixes (Ringo et al. 2010; Omar et al. 2012).

O controle microbiológico da ração destinada à alimentação animal é de suma importância, visto que a ingestão deste alimento contaminado por micro-organismos patogênicos pode interferir na sanidade dos peixes, acarretando prejuízos na produção e desempenho dos animais e também torná-los vetores de contaminação para o homem (Andriquetto et al. 2002).

Dentre os principais micro-organismos encontrados, as leveduras participam de diversos processos nos ecossistemas, estabelecendo relações ecológicas com outros organismos. Leveduras foram identificadas como parte da microbiota de peixes selvagens e cultivados interferindo na nutrição

e sanidade dos peixes (Gatesoupe 2007; Navarrete e Tovar-Ramírez 2014). Espécies de leveduras têm sido isoladas de vários ecossistemas aquáticos, com maior prevalência os gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Trichosporon* (Rawls et al. 2004; Gadanho e Sampaio 2005; Kutty et al. 2013).

Inicialmente, a identificação de espécies de leveduras era baseada nas propriedades morfológicas e fisiológicas dos isolados de leveduras. Posteriormente, a identificação passou a ser realizada pela análise da sequência de DNA. Esta evolução resultou na identificação de maior diversidade de leveduras e aumento de duas vezes no número de cepas descritas ao longo da última década (Navarrete e Tovar-Ramírez 2014).

A microbiota bacteriana dos peixes exerce efeito benéfico por participar de processos biológicos importantes, tais como: processamento de nutrientes e desenvolvimento do sistema imunológico das mucosas (Rawls et al. 2004). A ictiofauna brasileira é abundante e por esse motivo, as leveduras que fazem parte da microbiota intestinal dos peixes de cultivo precisam ser mais investigadas, para compreender sua participação na saúde e nutrição dos peixes de diferentes ambientes, visando melhorar as condições sanitárias e desempenho produtivo. Desta forma objetivou-se identificar leveduras presentes nos intestinos de tambatinga cultivados em tanques comerciais de piscicultura e da ração utilizada em cultivos de peixes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de amostras**

A metodologia adotada para o desenvolvimento desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI), Teresina, PI, sob o protocolo nº 013/14. De maio a junho de 2014 foram capturados 20 exemplares adultos de tambatinga, provenientes de dois ambientes de cultivo: (I) Estação de Piscicultura Ademar Braga, pertencente ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) do município de Piripiri, PI e (II) dos viveiros de Piscicultura do Departamento de Zootecnia (DZO), do Centro de

Ciências Agrárias (CCA), da UFPI, Teresina, PI, Brasil. As médias dos pesos dos tambatingas analisados nos ambientes I e II foram de  $839,2\text{g} \pm 272,5$  e  $591,0\text{g} \pm 151,4$ , respectivamente.

Em cada ambiente, foram coletados dez peixes, os quais foram insensibilizados e acondicionados em recipientes de polipropileno com 20 litros de água, sendo 10 mL de solução alcoólica de eugenol a 5,0%. Após insensibilização os peixes foram eutanasiados por secção medular e depois armazenados em sacos plásticos, identificados e em seguida acondicionados em recipiente isotérmico com gelo reciclável para transporte até o Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Estudo, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), do Departamento de Morfofisiologia Animal, CCA, UFPI, Teresina, PI para realização das análises microbiológicas. Foram também coletadas amostras de rações de três marcas comerciais diferentes (A, B e C) que eram fornecidas aos peixes dos ambientes de cultivo pesquisados, bem como de outras propriedades próximas que possuíam tanques de piscicultura, perfazendo um total de 30 amostras de ração.

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

### **a) Dos intestinos de tambatingas**

O isolamento das leveduras foi realizado no Laboratório de Microbiologia do NUEPPA, CCA, UFPI. Após a eutanásia, os peixes foram pesados em balança semi-analítica (Eduotec®) e em seguida, com os peixes em decúbito lateral foi realizada assepticamente uma incisão longitudinal desde o opérculo até a região perianal para remoção da musculatura e melhor exposição do conteúdo cavitário. Logo após os intestinos foram separados dos demais componentes do tubo digestório e individualizados em três diferentes regiões: anterior, média e posterior. A delimitação das regiões intestinais foi baseada na localização anatômica topográfica do segmento e pelo aspecto morfológico da mucosa. Foram seccionados fragmentos de 10 cm de cada porção do trato e feito um corte longitudinal em cada fragmento, expondo assim, a mucosa.

Posteriormente, cada amostra foi inoculada em 150 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) para enriquecimento da amostra por 48h em estufa a 37°C (Armando et. al. 2011;

Keller 2012). O isolamento foi realizado segundo metodologia de diluição decimal seriada com semeadura por espalhamento em superfície. Diluições decimais seriadas foram realizadas em tubos com caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) até  $10^{-5}$ . Alíquotas de 0,1 mL das respectivas diluições foram semeadas nos meios Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e em Agar YPD para o isolamento seletivo de leveduras. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 h em estufas microbiológicas com controle de temperatura (Pitt e Hocking 2009).

Para a obtenção de cultivos puros, cada colônia de levedura isolada foi repicada em placas de YPD pelo método de esgotamento em placas por estrias e logo após os cultivos semeados em Agar Extrato de Malte (MEA) para posterior identificação das espécies (Kurtzman e Fell 1998; Pitt e Hocking 2009).

#### **b) Das rações comerciais**

O isolamento das leveduras de rações comerciais foi realizado segundo metodologia de diluição decimal seriada com semeadura por espalhamento em superfície, onde 10 gramas de cada amostra de ração foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo-se a diluição inicial de  $10^{-1}$ . As demais diluições decimais seriadas foram realizadas até  $10^{-3}$ . De cada diluição, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em Agar extrato de levedura peptona dextrose (YPD) para o isolamento seletivo de leveduras. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 25°C por até sete dias em estufas microbiológicas. Para obter isolados puros, cada colônia de levedura foi repicada em placas de YPD pelo método de esgotamento em placas por estrias. Logo após, os isolados obtidos a partir de uma única UFC foram transferidos para tubos inclinados de Agar extrato de malte (MEA) para sua posterior identificação em espécies (Kurtzman e Fell 1998; Pitt e Hocking 2009).

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

#### **c) Extração de DNA**

A extração de DNA das leveduras foi realizada no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras (ICB/UFMG). As colônias puras foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise,

incubadas em banho-maria a 65°C por 35 minutos. No protocolo de extração, foi utilizado: 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), 70 µL de isopropanol, 200 µL de etanol a 70%. Os tubos contendo o *pellet* foram deixados em temperatura ambiente para secagem “*overnight*”, sendo o *pellet* depois eluído em 50 µL Buffer TE (TRIS-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8), sendo incubados em estufa a 37°C. A seguir, o DNA obtido foi dosado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000; 220-750nm) da Thermo Scientific e diluído até atingir a concentração aproximada de 200 ng/ µL.

#### **d) Impressão digital de DNA utilizando o iniciador EI1**

Para o agrupamento das leveduras em perfis similares foi utilizada a impressão digital pela técnica de PCR utilizando o iniciador EI1 (5'- CTGGCTTGGTGTATG-3'), segundo protocolo descrito por Barros Lopes et al. (1996, 1998). A reação de PCR foi realizada utilizando-se 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador EI1 10 pmol (Invitrogen USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1,0 µL de DNA.

O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 25 µL. A PCR foi realizada em um termociclador mastercycler (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 33 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 45°C por dois minutos e extensão a 74°C por um minuto e meio, seguidos de extensão final a 74°C por 5 minutos. Após as reações de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Eurobio) a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5% (TBE – 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2,0 mM EDTA) a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat França). Os padrões de impressão das bandas dos isolados foram comparados para agrupamento de perfis similares.

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

De cada um dos perfis moleculares obtidos, um isolado foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA como descrito por Lachance et al. (1999). Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5,0 µL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (MBI Fermentas), 1,0 µL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1,0 µL do primer NL1 10 pmol (Invitrogen, USA), 1,0 µL do primer NL4 10 pmol (Invitrogen USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1,0 µL de DNA. O volume da reação foi ajustado com a adição de água deionizada.

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

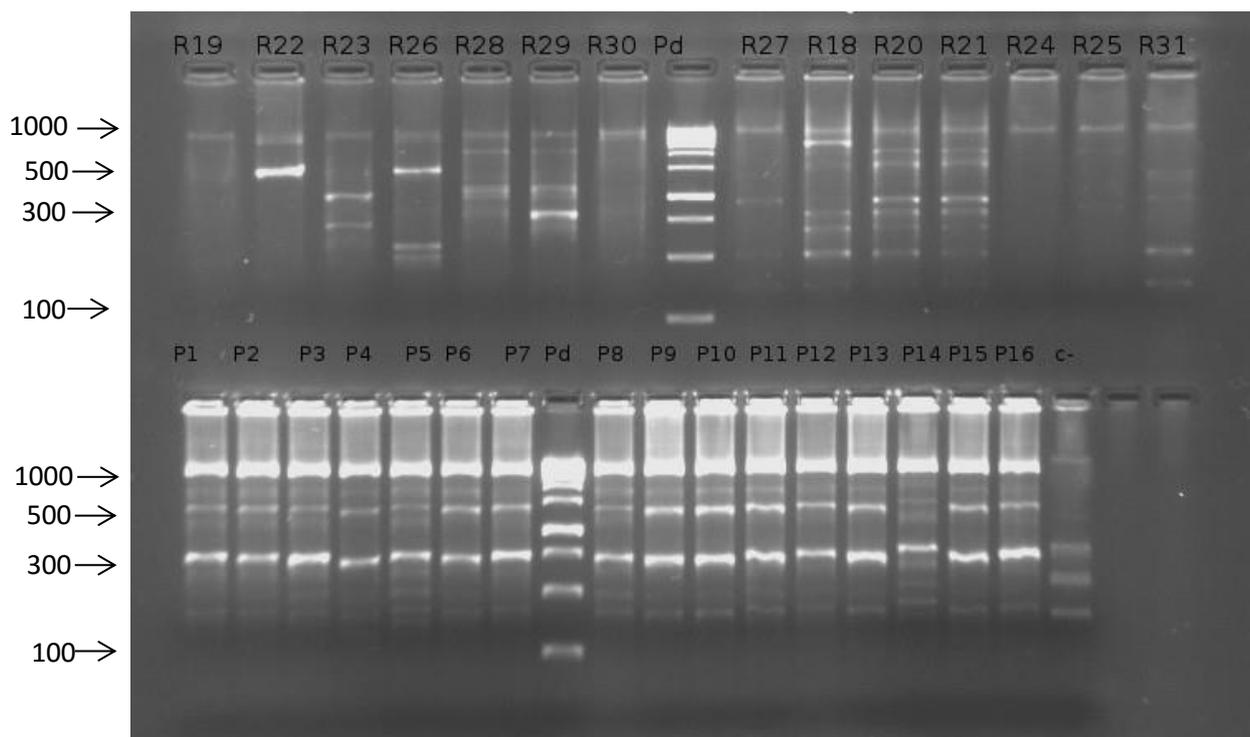
Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 45 µL, foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto. Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 13.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado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

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas utilizando o Kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. As seqüências foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local 562 Alignment

Serch Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), sendo comparadas com aquelas depositadas no GenBank.

## RESULTADOS

Na Figura 1 pode ser observado gel correspondente a reação de PCR por *Fingerprint* utilizando o iniciador EI1.



**Figura 1.** Perfil de bandas obtido com a reação de PCR utilizando o iniciador EI1. Da esquerda para a direita: (Pd) padrão de peso molecular, cepas de leveduras P1 a P16 isolados do intestino de tambaquis e ração para peixes R19 a R31 e (c-) controle negativo

Os padrões de impressão das bandas dos isolados foram comparados para agrupamento de perfis similares. Apresentaram o mesmo perfil de bandas as amostras: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16; R20 e R21; R28 e R29. Logo após, foram selecionadas as amostras que tinham as bandas diferenciadas para a realização da reação de PCR com os iniciadores NL1/NL4 e os isolados com perfil molecular iguais foram selecionados para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA. De um total de 60 amostras de intestino de

tambatinga, 16 leveduras foram caracterizadas pela biologia molecular e após o sequenciamento foram identificadas como *Candida nivariensis*, sendo a porção anterior (50,00%) do intestino a de maior frequência da levedura, seguida pela porção média (31,25%) e a posterior com 18,75% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de levedura isoladas do intestino de tambatingas de dois ambientes de cultivo

Leveduras	Porção do intestino	Números de isolados	Frequência (%)
<i>Candida nivariensis</i>	anterior	8	50,00
<i>Candida nivariensis</i>	média	5	31,25
<i>Candida nivariensis</i>	posterior	3	18,75
<b>Total</b>		16	100,0

Nas diferentes marcas de ração encontradas nos ambientes de cultivo pesquisados, obteve-se um maior número de espécies de leveduras, com um total de nove cepas, conforme a identificação descrita na Tabela 2.

**Tabela 2.** Frequência de leveduras isoladas em diferentes marcas comerciais de ração para peixes

Marcas	Leveduras	Diâmetro da ração*/fase de cultivo	Números de isolados	Frequência (%)
A	<i>Hyphopichia burtonii</i>	6,0 a 8,0 mm/ crescimento	3	23,08
A e C	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	6,0 a 8,0 mm /crescimento	2	15,39
B	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	6,0 a 8,0 mm/ crescimento	1	7,69
A	<i>Candida nivariensis</i>	4,0 a 6,0 mm/ juvenil	1	7,69
A	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	2,0 a 4,0 mm/ juvenil	1	7,69
A	<i>Candida orthopsilosis</i>	1,0 a 2,0 mm/ alevino	1	7,69
A	<i>Trichosporon asahii</i>	1,0 a 2,0 mm/ alevino	2	15,39
B	<i>Candida parapsilosis</i>	< 1,0 mm/ pós-larva	1	7,69
B	<i>Rhodotorula minuta</i>	< 1,0 mm / pós-larva	1	7,69
	<b>Total</b>		13	100,00

\*= intervalo de granulometria de acordo com a fase de cultivo dos peixes; rações extrusadas

A marca A apresentou o maior número de isolados de levedura (*Hyphopichia burtonii*, *Sterigmatomyces elviae*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida nivariensis*, *Candida orthopsilosis* e

*Trichosporon asahii*) totalizando nove cepas, seguida pela marca B com três isolados (*Cryptococcus liquefaciens*, *Candida parapsilosis* e *Rhodotorula minuta*) e a marca C apresentou apenas um único isolado (*Lodderomyces elongisporus*) (Tabela 2). As rações com maiores diâmetros fornecidas durante a fase de crescimento dos peixes (6,0 a 8,0 mm) apresentaram um maior número de isolados em relação às rações de menor granulometria utilizadas nas fases: juvenil (2,0 a 6,0 mm), alevinos (1,0 a 2,0 mm) e pós-larva (< 1,0 mm).

A espécie *Candida nivariensis* encontrada no intestino das tambatingas coletadas nos dois ambientes de cultivo foi isolada a partir da ração de marca A com granulometria de 4,0 a 6,0 mm que era fornecida aos peixes na fase juvenil. As demais espécies de leveduras identificadas na ração não foram encontradas no intestino dos tambatingas.

## DISCUSSÃO

As pisciculturas comerciais de grande escala exigem uma elevada densidade de peixes estocados, sendo comum o surgimento de doenças causadas por estresse durante o cultivo, o que implica em uma alta mortalidade e perdas econômicas para o produtor (Garcia-Marengoni e Menezes-Albuquerque 2015). Este fato associado ao conhecimento das características morfofisiológicas, comportamentais e ao manejo alimentar das espécies de peixes é fundamental para o sucesso da aquicultura (Rotta 2003).

A colonização intestinal dos peixes tem papel importante na estimulação do desenvolvimento do sistema imune e, seu desequilíbrio tem sido associado à susceptibilidade a infecções e desordens imunes, quando ocorre um predomínio de cepas patogênicas (Almeida et al. 2008; Walker 2008). A ocorrência de leveduras no intestino de peixes é variável e pode ser encontrada desde níveis não detectáveis até  $10^7$  CFU/g de conteúdo intestinal. Os ascomicetos *Debaryomyces hansenii*, *Candida* sp., e *Saccharomyces cerevisiae*, e os basidiomicetos *Leucosporidium* sp., e *Rhodotorula* tem sido frequentemente isolados como leveduras dominantes do intestino de truta arco-íris (Gatesoupe 2007). O gênero *Rhodotorula*, conhecidas como leveduras vermelhas, são comumente encontrados na microbiota de peixes, assim como *Cryptococcus* e *Trichosporon* (Gatesoupe 2007). Estes três gêneros

de levedura também foram encontrados nesta pesquisa, contudo, estavam presentes somente nas rações que eram fornecidas aos peixes nas diferentes fases de cultivo.

O presente estudo mostrou a prevalência de *Candida nivariensis* no intestino de tambatingas, com uma frequência de 50% destas leveduras encontradas na porção inicial do intestino. As infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida* spp. continuam sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em hospedeiros imunocomprometidos (Wright e Wenzel 1997; Ruhnke 2006). Um aumento no número de infecções foi atribuído aos fungos *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, and *C. krusei* emergindo, nos últimos anos, como importantes patógenos oportunistas (Nucci e Marr 2005). As primeiras cepas de *C. nivariensis* foram relatadas em humanos e reportadas como agentes oportunistas, apresentando resistência a muitos agentes antifúngicos (Alcobaflorez et al. 2005). Desta forma, a *C. nivariensis* é considerada uma levedura patogênica emergente clinicamente importante (Borman et al. 2008). De acordo com os estudos de Gatesoupe (2007) sobre a importância das leveduras no intestino dos peixes, o mesmo descreve que a maioria dos estudos das espécies em água doce como a truta arco-íris ou o *Oncorhynchus* spp. tem encontrado a *Debaryomyces hansenii* com frequência, no entanto as espécies *Candida* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Leucosporidium* sp. também foram predominantes em algumas amostras intestinais de trutas.

Segundo Navarrete e Tovar-Ramírez (2014), pisciculturas intensivas têm resultado em uma crescente problemática de infecções bacterianas, levando ao uso intensivo de antimicrobianos no tratamento. Sendo assim, a produção é prejudicada pelas mortalidades imprevisíveis que podem ocorrer devido às interações negativas entre peixes e bactérias patogênicas. A presença de *Candida nivariensis* tem sido reportada como agente causador de infecções, entretanto, essas espécies podem ser habitantes naturais dos intestinos de tambatingas, sendo responsáveis, juntamente com as bactérias, pelo equilíbrio dos processos fisiológicos, tendo em vista que não foram observados processos patológicos nos peixes utilizados nesta pesquisa. Entretanto, não foram encontrados relatos de sua ocorrência neste habitat, levando em conta que ainda há pouco conhecimento das espécies de leveduras em peixes devido à existência de uma ampla variedade de espécies, habitats e alimentos.

As espécies de leveduras encontradas nas rações para peixes analisadas (Tabela 2) foram: *Hyphopichia burtonii* (23.08%), *Lodderomyces elongisporus* (15,39%), *Trichosporon asahii*

(15,39%), *Candida nivariensis* (7,69%), *Candida orthopsilosis* (7,69%), *Candida parapsilosis* (7,69%), *Rhodotorula minuta* (7,69%), *Sterigmatomyces elviae* (7,69%), *Cryptococcus liquefaciens* (7,69%). A marca A apresentou uma maior frequência de isolados (61,54%), seguida das marcas B (23,08%) e C (7,69%). Algumas destas espécies, como as dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Trichosporon* e *Geotrichum* têm sido relatadas como patogênicas aos animais (Girmenia et al. 2005; Cabañes 2010). *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., e *Trichosporon* sp. foram isoladas em desordens patológicas de peixes, ocasionando lesões internas, inchaço da bexiga natatória com presença de material denso e exoftalmia (Gatesoupe 2007).

A maioria dos estudos que identifica leveduras de alimentos visa a procura por espécies probióticas. Neste sentido, Armando et al. (2011), ao buscar estratégias para descontaminação biológica de micotoxinas a partir de micro-organismos nativos na produção animal, foi capaz de isolar as seguintes cepas de leveduras da ração de suínos: *Trichosporon asahii*, *Pichia guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*, *Criptococcus sp* e *S. cerevisiae*.

Alguns ascomicetos, como a *Candida* spp. são tipicamente espécies ubíquas encontradas nos oceanos e em outros ambientes aquáticos. Dentre os basidiomicetos, algumas espécies de *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* são bastante difundidas por várias regiões oceânicas (Kandasamy et al. 2012). Os componentes das leveduras,  $\beta$ -glucanos e mananoproteínas, podem estimular os sistemas imunológicos e antioxidantes dos hospedeiros. Compreender a participação das leveduras na saúde e nutrição dos peixes pode melhorar tanto as condições sanitárias quanto a performance da produção de pescados (Navarrete e Tovar-Ramírez 2014).

A microbiota intestinal dos organismos aquáticos, em especial dos peixes, está fortemente relacionada à microbiota aquática e esta, por sua vez, mantém estreita relação, tanto quantitativa quanto qualitativamente, com aspectos físico-químicos e microbiológicos do ambiente (Pupo 2006). *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula minuta* e *Hyphopichia burtonii* foram espécies isoladas dos ambientes marinhos, de peixes e águas de acordo com alguns relatos (Roth et al. 1962; Lachance e Starmer 1998; Gadanho e Sampaio 2005). Desta forma, a distribuição das espécies de leveduras depende da concentração e dos tipos de matéria orgânica disponíveis em águas de viveiros e ração para peixes.

Neste sentido, verificou-se que uma cepa de *Candida nivariensis* foi isolada a partir da ração de marca A fornecida durante a fase juvenil dos peixes. O pequeno número de isolados desta espécie pode ter ocorrido em virtude de terem sido coletadas apenas as rações abertas que estavam sendo fornecidas nos ambientes de cultivo. Verificou-se que a mesma marca de ração que foi identificada esta cepa era utilizada nos dois ambientes de cultivo pesquisados. Entretanto, os peixes utilizados no estudo estavam em fase de terminação, sendo assim estavam recebendo uma ração diferente da que foi identificada a cepa de *Candida nivariensis*. Contudo, a cepa pode estar presente na água e substrato dos viveiros, tendo em vista que as sobras de rações são depositadas nos fundos dos viveiros e pode permanecer viáveis devido à elevada carga de matéria orgânica neste ambiente.

Embora a microbiologia, especificamente a bacteriologia do trato intestinal de peixes marinhos e de água doce, tenha sido investigada por muitos autores (Balcázar et al 2008; Jatobá et al. 2008; Makino et al. 2012), há pouco relatos sobre a diversidade microbiana em relação à pesquisa de leveduras (Oliveira Santos 2015). Segundo Kurtzman e Fell (2006), apenas 1% das espécies de levedura foram descritas. Esse estudo propiciou o isolamento de novas espécies de leveduras do intestino e das rações de peixes. Essa informação juntamente com outras identificações disponíveis em banco de dados por meio de estratégias moleculares e um estudo mais aprofundado sobre a ocorrência de novas espécies permitiu uma melhor caracterização da população de leveduras em habitats e nos intestinos de peixes.

## CONCLUSÕES

Nem sempre leveduras encontradas em ração são isoladas do trato intestinal de tambatingas. *Candida nivariensis* pode estar presente no bioma intestinal de tambatingas em diferentes ambientes de cultivo e na ração. As espécies de levedura *Hyphopichia burtonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Trichosporon asahii*, *Candida nivariensis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula minuta*, *Sterigmatomyces elviae*, *Cryptococcus liquefaciens* podem ser encontradas em amostras de ração para piscicultura. A identificação molecular permitiu o isolamento de espécies de leveduras que ainda não haviam sido relatadas em ração e intestino de tambatingas.

## AGRADECIMENTOS

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos”, em parceria com o Ministério de Ciencia, Tecnología y Innovación Productiva (Mincyt – Argentina). Agradecemos ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais pelo suporte técnico na identificação molecular das leveduras e a Universidad Nacional de Río Cuarto pela parceria na realização do projeto.

## REFERÊNCIAS

- Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E, del Pilar Arévalo M. (2005). Phenotypic and molecular characterisation of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol* 43:4107-4111
- Almeida LB, Marinho CB, Souza CS, Cheib VBP (2008) Disbiose intestinal. *R Bras Nut Cl* 24:58-65
- Andriquetto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A (2002) As bases e os fundamentos da nutrição animal. Nobel, São Paulo
- Armando M, Dogi C, Pizzolitto R, Escobar F, Peirano M, Salvano M, Sabini L, Combina M, Dalcerio A, Cavaglieri L (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin J.* 4:59-68
- Balcázar JL, Vendrell D, Blas I, Zarzuela-Ruiz I, Musquiz JL, Girones O (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278:188-191
- Barros Lopes M, Soden A, Henschke PA, Landgridge P (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol* 62:4514-4520
- Barros Lopes M, Soden A, Martens AL, Henschke PA, Langridge P (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J Syst Bacteriol* (48):279-286

- Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM (2008) *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 46:933–938
- Lachance MA, Starmer WT (1998) Ecology and yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam, Elsevier, pp21-30.
- Cabañes FJ (2010) Yeast pathogens of domestic animals. In: Ashbee HR, Bingell EM (eds) *The Yeast Handbook: Pathogenic Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp253-279
- Fao (2014) *The State of Fisheries and Aquaculture in the World*. <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Cited 25 Jan 2014
- Ferreira AHC, Alencar Araripe MNB, Guerra SPL, Lopes JB, Araripe HGA, Andrade FT, Santana Júnior HA (2013) Anatomy of the digestive tract of tambatinga. *R Electr Nutrit*. 10:2501-2512
- Fjellheim AJ, Playfoot KJ, Skjermo J, Vadstein O (2007) *Vibrionaceae* dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 269:98-106
- Gadanhó M, Sampaio JP (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the Mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microb Ecol* 50:408-17
- Garcia-Marengoni N, Menezes-Albuquerque D (2015) Quantification of intestinal bacteria, operating cost and performance of fingerlings Nile tilapia subjected to probiotics. *Lat Am J Aquat Res* 43:367-373
- Gatesoupe FJ (2007) Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267:20-30
- Girmentria C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, Mei L, Buelli M, Pizzarelli G, Venditti M, Martino P (2005). Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol* 43:1818-1828.
- Ibama (2008) *Estatística da Pesca. Brasil: grandes regiões e unidades de federação*. <http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>. Cited 23 feb 2008

- Jatobá A, Vieira FN, Buglione Neto C, Silva CB, Mouriño JLP, Jerônimo GT, Dotta G, Martins ML (2008) Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilapia-do-nilo como probióticos. *Pesq Agropec Bras* 43:1201-1207
- Kandasamy K, Alikunhi N, Subramanian M. (2012) Yeasts in marine and estuarine environments. *J Yeast Fungal Res* 3:74-82.
- Keller KM (2012) Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal. Tese, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
- Kubitza F (2015) Aquicultura no Brasil: conquistas e desafios. *Panor Aquicult* 25:10-23.
- Kurtzman CP, Fell JW (1998) *The Yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science
- Kurtzman CP, Fell JW (2006). *Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology*. In: Rosa CA, Peter G (eds) *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp11-30
- Kutty SN, Philip R, Damodaran R (2013) Marine yeasts in the slope sediments of Arabian sea and bay of Bengal. *Eur J Exp Biol* 3:311-327.
- Lachance MA, Starmer WT (1998) Ecology and yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam, Elsevier, pp21-30.
- Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JS (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45:172-177
- Makino LC, Faustino F, Paes MCF, Beraldo-Massoli MC, Cardozo MV, Schocken-Iturrino RP, Nakaghi LSO (2012) Morfologia e quantificação da microbiota intestinal do curimatá (*Prochilodus lineatus*) e do cascudo cinza (*Pterygoplichthys anisitsi*) cultivados em cativeiro. *Arq Bras Med Vet Zootec* 64:916-926
- Nayak SK (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Res* 41:1553-1573
- Nucci M, Marr KA (2005) Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 41:521-526.
- Oliveira Santos JT (2015) Identificação das leveduras isoladas do intestino de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas. Dissertação, Universidade Federal do Piauí

- Omar SS, Merrifield DL, Kühlwein H, Williams PEV, Davies SJ (2012) Biofuel derived yeast protein concentrate (YPC) as a novel feed ingredient in carp diets. *Aquaculture* 330–333:54–62
- Navarrete P, Tovar-Ramírez D (2014) Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. In: Hernandez-Vergara MP, Perez-Rostro CI (eds) *Agricultural and Biological Sciences - Sustainable Aquaculture Techniques*. Rijeka, Intech, pp135-172
- Pessoa NO (2009) Avaliação cinética do sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-104®) ou Ringer em três meios de ativação. Dissertação, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza
- Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and food spoilage*. New York, Springer
- Pupo HDD (2006) Diversidade da microbiota gram negativa em sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação, Universidade Federal de Lavras
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved, responses to the gut microbiota. *P Natl Acad Sci* 101:4596-4601.
- Ringo E, Lovmo L, Kristiansen M, Bakken Y, Salinas I, Myklebust R, Olsen RE, Mayhew TM (2010) Lactic acid bacteria vs. Pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Res* 41:451-467
- Roth F, Ahean D, Fell JW, Meyers S, Meyer S (1962) Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limnology and Oceanography* 7:178-185
- Rotta MA (2003) Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Documentos 53 – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p 48
- Ruhnke M (2006) Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 7:495-504
- Walker WA (2008) Mechanisms of action of probiotics. *Clin Infect Dis* 46:87-91
- Wright WL, Wenzel RP (1997) Nosocomial *Candida*. *Epidemiology, transmission and prevention*. *Infect Dis Clin N Am* 11:411-425.

#### 4. Capítulo II<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Elaborado conforme normas da revista Annals of Microbiology

## ***Saccharomyces cerevisiae* como agente probiótico e adsorvente para aflatoxina B<sub>1</sub>**

### *Saccharomyces cerevisiae as probiotic agent and aflatoxin B<sub>1</sub> adsorbent*

Raizza Eveline Escórcio Pinheiro<sup>\*I</sup>, Aline Maria Dourado Rodrigues<sup>II</sup>, Cristiane Evangelista Lima<sup>II</sup>,  
Julliet Teixeira de Oliveira Santos<sup>II</sup>, Carina Maricel Pereyra<sup>III</sup>, Adriana Mabel Torres<sup>III</sup>, João Batista  
Lopes<sup>IV</sup>, Maria Christina Sanches Muratori<sup>V</sup>

<sup>\*I</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Docente do Curso de Medicina Veterinária, Campus Bom Jesus – Universidade Federal do Piauí (UFPI), 64900-000, Piauí, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio CAPES/MINCyT. \*Autor para correspondência: raizza\_eveline@hotmail.com;

<sup>II</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mails: alinemary2@yahoo.com.br, criz\_evangelista@hotmail.com; jullietteixeira@hotmail.com

<sup>III</sup> Departamento de Microbiología y Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina, Córdoba, Argentina; Member of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CIC-CONICET), Argentina. E-mails: carinapereyra06@hotmail.com, atorres@exa.unrc.edu.ar

<sup>IV</sup> Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: lopesjb@uol.com.br

<sup>V</sup> Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br

**RESUMO** – Objetivou-se, com esta pesquisa, avaliar *in vitro* o potencial probiótico e adsorvente de *Saccharomyces cerevisiae* para aflatoxina B<sub>1</sub>. Foram utilizadas três cepas de leveduras, sendo duas provenientes de cachaçaria: *S. cerevisiae* RC1 e *S. cerevisiae* RC3 e uma de ambiente de piscicultura: *S. cerevisiae* A8L2. As leveduras selecionadas foram submetidas aos seguintes testes *in vitro*: inibição homóloga, auto-agregação, co-agregação, atividade antibacteriana, viabilidade às condições gastrointestinais e adsorção de AFB<sub>1</sub>. Os ensaios de viabilidade às condições gastrointestinais foram realizados simulando artificialmente as condições de pH e o tempo de passagem do alimento no aparelho digestório de tambaqui. Todas as estirpes de *S. cerevisiae* mostraram boa capacidade de auto-agregação e co-agregação com bactérias patogênicas (*Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*). Apenas a cepa A8L2 foi capaz de inibir a *Salmonella* spp. no teste de atividade antibacteriana. Todas as estirpes de levedura foram capazes de sobreviver às condições gastrointestinais. Em condições ácidas, os fatores (cepa x tempo) tiveram interação (P=0,0317), resultando em variações significativas entre as cepas testadas nos períodos de tempo analisados. Observou-se que também houve interação (P=0,0062) em condições intestinais, havendo um aumento do número de células no período de 12h para todas as cepas avaliadas. No ensaio de adsorção, a estirpe A8L2 foi a mais eficaz estatisticamente (P<0,005), para as duas concentrações de AFB<sub>1</sub> avaliadas neste estudo (10 e 25 ng. mL<sup>-1</sup>). Desta forma, conclui-se que as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, RC1 e RC3 possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB<sub>1</sub>. Em testes *in vitro* a estirpe A8L2 foi mais eficiente que as demais por apresentar melhor capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>, possuir atividade antibacteriana contra *Salmonella* spp. e ser viável em condições simuladas do trato gastrointestinal de tambaqui.

**Palavras-chave:** Adsorção. Atividade antibacteriana. Agregação. Inibição homóloga. Viabilidade.

**ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate *in vitro* the probiotic potential and absorption of *Saccharomyces cerevisiae* for the aflatoxin B<sub>1</sub>. Three yeast strains were used, two from cachaçaria: *S. cerevisiae* RC1 and *S. cerevisiae* RC3 and one from a fish farming environment: *S. cerevisiae* A8L2. The selected yeasts were subjected to the following *in vitro* tests: (homologous inhibition, self-aggregation, co-aggregation, antibacterial activity, gastrointestinal conditions tolerance and adsorption of AFB<sub>1</sub>). The gastrointestinal conditions tolerance tests were conducted to simulate artificially the conditions of pH and time of passage of food in the digestive apparatus of tambaqui. All *S. cerevisiae* strains showed good capability of self-aggregation and co-aggregation with pathogenic bacteria (*Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*). Only A8L2 strain was able to inhibit *Salmonella* spp. in the antibacterial activity test. All yeast strains were able to survive the gastrointestinal conditions. In acidic conditions, the factors (strain vs. time) had interaction (P = 0.0317), resulting in significant variation among the strains tested in the time periods analyzed. It was observed that there was also interaction (P = 0.0062) in intestinal conditions, with an increased

number of cells in the 12-hour period for all strains tested. In the adsorption test, the A8L2 strain was statistically more effective ( $P < 0.005$ ) for both AFB<sub>1</sub> concentrations evaluated in this study (10 and 25 ng. mL<sup>-1</sup>). Thus, it was observed that the strains of *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, RC1 and RC3 and have potential probiotic and adsorbent of AFB<sub>1</sub>. In in vitro tests the A8L2 strain is more efficient than the others by having better AFB<sub>1</sub> adsorption capacity, providing antibacterial activity and being viable in simulated conditions of the gastrointestinal tract of tambaqui.

**Keywords:** Adsorption. Antibacterial activity. Aggregation. Homologous inhibition. Viability.

## INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por alguns fungos filamentosos, sendo responsáveis por causar uma resposta tóxica denominada micotoxicose, quando ingerida por animais e seres humanos (Pitt 2000). A maioria das micotoxinas de interesse são produzidas por três gêneros fúngicos, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, além de gêneros de fungos dematiáceos (*Alternaria*, *Helminthosporium*, *Drechslera*, *Phoma*, *Zygosporium*) (Ismaiel e Papenbrock 2015). A qualidade dos produtos utilizados na alimentação animal pode ser afetada já que os ingredientes são substratos ideais para o crescimento de fungos e sob condições propícias, podem favorecer a síntese de micotoxinas (Poloni et al. 2015).

As aflatoxinas são toxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*. As aflatoxinas são metabólitos tóxicos importantes em piscicultura, pois sua presença exerce um impacto econômico negativo relevante, podendo gerar graves problemas de saúde às espécies aquáticas, após exposição à alimentação contaminada. A contaminação de micotoxinas em espécies aquáticas se dá principalmente pela ingestão de rações contaminadas, visto que o aumento de uso de vegetais como ingredientes de ração proporciona o aparecimento destas substâncias tóxicas (El-Sayed et al. 2009; Calvet et al. 2015; Nunes et al. 2015).

O grande número de contaminações por micotoxinas nos produtos agrícolas tem motivado pesquisadores de todo o mundo a desenvolver métodos de prevenção e de desintoxicação destes compostos tóxicos (Hernandez-Mendoza et al. 2009; Armando et al. 2011; Pizzolitto et al. 2011; Pereyra et al. 2015). Devido a grande importância da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) na produção animal e por ser cancerígena e hepatotóxica, tem crescido a busca por adsorventes capazes de capturar estas toxinas no trato gastrointestinal e diminuir os efeitos deletérios das micotoxicoses sobre a sanidade dos animais (Cast 2003). A utilização de mecanismos de controle físicos, químicos e biológicos vem sendo constantemente pesquisada, propiciando respostas significativas para a redução de contaminantes tóxicos de alimentos (Turbic et al. 2002; Cast 2003; Gimeno e Martins 2011; Rahaie et al. 2012, Pereyra et al. 2015).

Entre os métodos biológicos, a detoxificação microbiana é uma alternativa promissora para a redução dos níveis de micotoxinas. Sua efetividade fundamenta-se na ação de compostos químicos específicos produzidos por um determinado micro-organismo. A utilização de alimentos funcionais que contenham micro-organismos benéficos pode auxiliar no processo de descontaminação de micotoxinas (Pinheiro et al. 2015). Quando possuem cepas viáveis, são denominados probióticos e atuam benéficamente no organismo do animal, promovendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal (Fuller 1989). Estes micro-organismos devem apresentar características aceitáveis ao serem utilizados para tal fim. As cepas probióticas formadas por micro-organismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) são classificadas como seguras e constituem uma das ferramentas importantes da biotecnologia, tornando-se uma alternativa válida na descontaminação de micotoxinas. *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) têm sido utilizadas em alimentos funcionais como probióticos e como potenciais micro-organismos para descontaminação de micotoxinas pela sua capacidade de ligar-se a AFB<sub>1</sub> (Baptista et al. 2004, Armando et al. 2011; Pizzolitto et al. 2012; Pereyra et al. 2015).

A levedura da cana-de-açúcar (*S. cerevisiae*) vem sendo utilizada na dieta de diferentes espécies animais, incluindo peixes. Segundo Hisano et al. (2004), leveduras e derivados do seu processamento se destacam por sua biossegurança e fácil incorporação à mistura durante o processamento da ração. Além de seu excelente valor nutricional, leveduras produzem uma elevada quantidade de biomassa que é utilizada em vários processos industriais e como fonte de proteínas para alimentação animal (Shetty e Jespersen 2006; Pereyra et al. 2015). Este tipo de suplemento gera benefícios em termos de melhora nos parâmetros produtivos e na saúde dos animais (Shety e Jepersen 2006).

De acordo com Juodeikiene et al. (2012) estirpes dos componentes de *S. cerevisiae* com capacidade elevada de ligação de micotoxinas, podem ser empregadas como aditivos em pequenas quantidades para muitos alimentos, sem alterar as características do produto final. A inclusão de cepas viáveis na dieta dos peixes modifica a microbiota intestinal por meio da produção de substâncias antimicrobianas e enzimas e por competição por sítios de adesão e nutrientes com os micro-organismos indesejáveis (Fuller 1989; Cyrino et al. 2010).

Uma cepa para ser considerada como probiótica deve cumprir alguns princípios: sobreviver às condições ácidas e básicas do trato gastrointestinal; aderir às mucosas; proliferar em condições intestinais, competindo com a microbiota naturalmente presente; ser viável a altas concentrações ( $10^6$  a  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>); não estar associada com enfermidades; possuir estabilidade genética durante o processamento; ausência de propriedades organolépticas indesejáveis nos alimentos. Deve, ainda, ter capacidade de exercer propriedades benéficas, tais como produção de substâncias antimicrobianas, auto-agregação, co-agregação com patógenos intestinais e produção de compostos bioativos (Fuller 1989; Klaenhammer e Kullen 1999; Morelli 2000; Forestier et al. 2001; Isolauri et al. 2001; D'Aimmo et al. 2007).

A eficiência dos probióticos na saúde animal tem sido pesquisada com frequência. Entretanto, além da capacidade probiótica, torna-se necessário avaliar o papel de diferentes cepas no processo de adsorção de micotoxinas (Armando et al. 2011; Pizzolitto et al. 2011). Neste sentido, a busca por compostos naturais que possam exercer tais funções é importante para o desenvolvimento tecnológico, econômico e para a sanidade animal. Pelo exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial probiótico e adsorvente de *Saccharomyces cerevisiae* para aflatoxina B<sub>1</sub>.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Cepas de leveduras**

Foram utilizadas três cepas de leveduras, sendo duas provenientes de cachaçaria: *S. cerevisiae* RC1 e *S. cerevisiae* RC3 e uma de ambiente de piscicultura: *S. cerevisiae* A8L2, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Núcleo de Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA/CCA/UFPI). As cepas selecionadas foram utilizadas para os ensaios probióticos e de adsorção de AFB<sub>1</sub>.

### **Cepas de bactérias patogênicas**

Para os ensaios de co-agregação e atividade antibacteriana foram utilizadas quatro cepas de bactérias patogênicas cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Veterinária, do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI). As cepas utilizadas foram: *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp.

### **Ensaio para a seleção de cepas de leveduras com potencial probiótico e adsorvente**

As leveduras selecionadas foram submetidas aos testes *in vitro* para avaliação de seu potencial probiótico: inibição homóloga, auto-agregação, co-agregação, atividade antibacteriana, viabilidade às condições gastrointestinais. Posteriormente, as leveduras foram submetidas ao teste de adsorção de AFB<sub>1</sub>. Os ensaios de viabilidade às condições gastrointestinais foram realizados simulando artificialmente as condições de pH e o tempo de passagem do alimento utilizado para os tambaquis.

### **Inibição homóloga entre as cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

Para este ensaio foram utilizadas as três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e utilizou-se o método de estrias cruzadas descrito por Muzzolón (2010). Cada cepa era semeada, uma por vez, em linha reta da borda superior da placa até a borda inferior, de forma centralizada, nas placas de Petri contendo agar extrato de levedura peptona dextrose (YPD), sendo posteriormente incubadas a 37°C por 48 h. Em seguida, após crescimento da estria central de cada placa, estas foram inativadas por exposição a vapores de clorofórmio durante 20 minutos. Posteriormente, as diferentes cepas foram

semeadas por estrias cruzadas até a borda da estria central. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. Transcorrido o tempo proposto, as placas foram analisadas, sendo consideradas positivas quando havia a presença de halos de inibição de crescimento ( $\geq 5$  mm) ao redor da estria central, e negativas quando detectava-se ausência de halo ou inibição ( $< 5$  mm).

### Auto-agregação

A capacidade de auto-agregação foi realizada segundo a metodologia descrita por Kos et al. (2003). Previamente realizou-se a contagem de células de *Saccharomyces* utilizando uma Câmara de Neubauer dupla espelhada (Herka®) para padronização inicial do inóculo em escala de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. As cepas de leveduras foram incubadas durante 24h a 37°C em 4,0 mL de caldo YPD. Após o período de incubação foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS) com pH 7,2. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 4,0 mL do mesmo PBS e submetidos a homogeneização em agitador tipo vórtex.

Para avaliar a capacidade de autoagregação, o conteúdo foi incubado sem agitação por duas horas a 37°C em estufa de cultura modelo 002CB (Fanem LTDA®) com controle de temperatura. Em seguida, foram coletados 2,0 mL da parte superior da solução para medição da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Biospectro Modelo SP-220) a 600nm. A DO inicial foi padronizada para aproximadamente 0,5. A porcentagem de auto-agregação foi expressa pela seguinte fórmula:  $1 - (A_t/A_0) \times 100$ , sendo as densidades (DO) medidas no tempo 0 ( $A_0$ ) e duas horas após o período de repouso ( $A_t$ ). A interpretação do ensaio de auto-agregação foi classificada de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1.** Interpretação dos resultados de auto-agregação de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Resultado	Observação
(-)	% Agregação $\leq 60$
(+)	% Agregação $< 80 > 60$
(++)	% Agregação $\geq 80$

Fonte: Kos et al. (2003).

### Capacidade de co-agregação com micro-organismos patógenos de peixes

O método para preparação das leveduras para co-agregação foi o mesmo utilizado para o ensaio de auto-agregação e a metodologia empregada foi proposta por Xu et al. (2009). Foram utilizadas quatro cepas de bactérias associadas a infecções em peixes: *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp. Os inóculos de cada bactéria patogênica foram obtidos em Caldo Nutriente após 24h em estufa com controle de temperatura a 37°C. Logo após, a

suspensão de bactérias foi submetida à centrifugação de 5000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas com PBS (pH 7,2). Realizou-se uma padronização inicial tanto da suspensão de leveduras quanto das bactérias em espectrofotômetro a 600nm para uma DO de 0,7, sendo a densidade ajustada com adição de PBS para as suspensões mais concentradas. Volumes iguais (2,0 mL) das cepas de leveduras e das bactérias patogênicas foram transferidos para um tubo de ensaio para serem homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados a 37°C durante duas horas sem agitação. Então, a absorvância da mistura (DO<sub>mix</sub>) foi quantificada por espectrofotômetro a 600nm. A co-agregação foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Co-agregação \%} = [1 - \text{DO}_{\text{mix}} / (\text{DO}_{\text{levedura}} + \text{DO}_{\text{bactéria}}) / 2] \times 100$$

### **Atividade antibacteriana frente a patógenos**

A atividade antibacteriana foi realizada pelo método *Slab test* no ágar YPD de acordo com a metodologia de Strus (1998). As cepas de bactérias patogênicas utilizadas neste ensaio foram: *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp. Padronizou-se a suspensão de bactérias com auxílio de espectrofotômetro a 600nm para uma D.O. de 0,7. Após padronização, as bactérias foram semeadas em placas de ágar Nutriente e incubadas a 37°C por 48 h. Pedacos do ágar YPD de 14 mm de diâmetro contendo as leveduras crescidas após 48h a 25°C foram cortados em condições assépticas e adicionados às placas contendo as cepas de bactérias. Cada tratamento foi realizado em duplicata. A interpretação dos resultados foi realizada após 24 h de incubação a 37°C, pelo surgimento ou não de zonas claras ao redor, indicando o efeito inibitório de um micro-organismo sobre o outro. Os diâmetros de zonas de inibição do crescimento em torno das placas de agar foram medidos e os resultados dados em mm, subtraindo-se o diâmetro da placa de ágar.

### **Teste de viabilidade às condições gastrointestinais**

#### **a) Tolerância a pH baixo (pH 2,0)**

Foram realizadas suspensões de cada uma das cepas isoladas de *S. cerevisiae* (RC1, RC3 e A8L2) em água peptonada para obter a concentração de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> utilizando uma câmara de Neubauer, seguindo a proposta de Van der Aa Kuhle et al. (2005), com algumas modificações. Logo em seguida, 100 µL desta solução foram adicionados a 900 µL de caldo YPD ajustado a pH 2 pela adição de ácido clorídrico P.A para simular as condições estomacais de tambaqui (Rotta 2003).

As soluções contendo os inóculos foram submetidas a agitação constante de 150 rpm em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab®) com temperatura da sala mantida em torno de  $\pm 30^\circ\text{C}$ . Os cultivos foram recolhidos nos tempos: 4, 8 e 12h para retirada de alíquotas de 100 µL e contagem de

células viáveis através da diluição decimal e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. O ensaio foi realizado em duplicata.

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

Para a determinação da viabilidade e tolerância das cepas de leveduras as condições biliares do intestino de tambaqui, realizou-se o teste utilizando-se a metodologia semelhante ao teste de tolerância as condições de pH baixo. Para isso foi utilizado o caldo YPD suplementado com bile de boi a 0,5% (Sigma – Aldrich®) ajustado para pH 7,0 (pela adição de solução de hidróxido de sódio 1M) simulando as condições intestinais de peixes onívoros (Rotta 2003).

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

O ensaio de adsorção de AFB<sub>1</sub> foi realizado de acordo Bueno et al. (2007) e Poloni et al. (2015), incluindo algumas modificações. A solução inicial de AFB<sub>1</sub> utilizada no ensaio foi ressuspensa em acetonitrila a partir de um extrato seco de núcleo com concentração conhecida (14,7µg AFB<sub>1</sub>). Soluções estoques de AFB<sub>1</sub> (10 e 25 ng.mL<sup>-1</sup>) foram preparados em PBS (pH 2,0 e 7,0). As leveduras utilizadas no ensaio foram previamente preparadas em caldo YPD e logo após o seu crescimento foram padronizadas com o auxílio da câmara de Neubauer em 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 1,0mL desta solução foi colocado em microtubos, submetidos a centrifugação durante 15 min a 5000 rpm à temperatura ambiente. Logo após, foram lavados com água destilada e submetidos novamente a centrifugação. Foram adicionados 1mL da solução de PBS contendo AFB<sub>1</sub>, inicialmente em pH 2,0, para simular a acidez do estômago de tambaqui e incubados a 30°C por 30 minutos e agitados manualmente. Em seguida, foram centrifugados e os *pellets* adicionados à 1,0mL de PBS em pH 7,0 contendo AFB<sub>1</sub> nas concentrações testadas (10 e 25 ng.mL<sup>-1</sup>).

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

Para a detecção e quantificação de AFB<sub>1</sub>, utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Waters e2695; Waters, Milford, MA, USA), com excitação e emissão de 360 nm e 440 nm, respectivamente (Trucksess et al. 1994), equipado com coluna de fase reversa de sílica gel C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula, Phenomenex, Luna, Torrance, CA, USA). Para análise, utilizou-se uma alíquota de 100 µL do extrato da amostra, que foi acrescida de 350 µL de solução derivatizante, composta por ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: água (20:10:70, v/v). Como

fase móvel, utilizou-se um sistema isocrático acetonitrila: metanol: água (17:17:66 v/v) a uma vazão de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>.

A curva de quantificação da toxina foi realizada por medição das alturas e sua interpolação a uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de padrão de AFB<sub>1</sub>, dissolvida em acetonitrila, de onde foram extraídos os limites de detecção e quantificação da técnica. As quantificações de AFB<sub>1</sub> adsorvidas foram estabelecidas por meio da correlação entre as áreas dos picos das amostras e da curva padrão. Para o cálculo dos percentuais de adsorção, utilizou-se a seguinte fórmula:

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

### **Análise estatística**

Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (três cepas de leveduras; quatro tempos de viabilidade) para o teste de viabilidade e 3x2 (três cepas de leveduras; duas concentrações de AFB<sub>1</sub>) para o teste de adsorção, com duas repetições por tratamento. As contagens de colônias obtidas no teste de viabilidade às condições gastrointestinais foram analisadas e o número de células de levedura transformado em escala logarítmica  $\log_{10}^{(x+1)}$  e depois aplicada à análise de variância. Os dados obtidos (co-agregação, viabilidade e adsorção de AFB<sub>1</sub>) foram analisados segundo os procedimentos do SAS 9.0 e submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo SNK considerando-se um nível de 5% de significância.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No ensaio de inibição homóloga, constatou-se que as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* testadas A8L2, RC1 e RC3 desenvolveram-se naturalmente entre as estrias nas placas sem a presença de halo entre elas. Por outro lado, Muzzolón (2010) constatou que 31% das cepas de *Enterococcus* sp. avaliadas em seu estudo foram capazes de inibir o desenvolvimento de todas as cepas de BAL avaliadas. Esta propriedade de inibição homóloga é importante, pois permite a utilização de uma mescla de cepas para atuarem juntas como probióticas (De Angelis et al. 2006). A partir destes resultados, observa-se que as três cepas podem ser utilizadas em conjunto, visto que elas não apresentaram poder de inibição frente às outras, desta forma, caso sejam utilizadas em conjunto, podem propiciar a potencialização de seus efeitos.

No teste de auto-agregação (Tabela 2) a cepa RC3 foi a mais eficiente com percentual de 87,1%, sendo considerada agregação forte, já as cepas A8L2 e RC1 obtiveram percentuais de 76,0% e 78,1%, respectivamente, sendo consideradas como positivas conforme classificação de Kos et al. (2003).

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da capacidade de auto-agregação entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas em diferentes ambientes

Cepas	DO <sub>600</sub> (t <sub>0</sub> ) <sup>1</sup>	DO <sub>600</sub> (t <sub>1</sub> ) <sup>2</sup>	1- (DO <sub>600</sub> t <sub>1</sub> / DO <sub>600</sub> t <sub>0</sub> ) x 100	Escore de Agregação <sup>3</sup>
A8L2	0,586 ± 0,013	0,140 ± 0,050	76,0 ± 9,10	+
RC1	0,545 ± 0,007	0,119 ± 0,004	78,1 ± 0,62	+
RC3	0,576 ± 0,022	0,074 ± 0,022	87,1 ± 3,33	++

<sup>1</sup>Densidade óptica inicial; <sup>2</sup>Densidade óptica após duas horas; <sup>3</sup>(-): agregação ≤ 60, (+): agregação < 80 > 60, (++) : agregação ≥ 80

Estes resultados vão de encontro aos apresentados por Pizzolitto et al. (2012), que isolaram cepas de alimentos para frangos com capacidade de auto-agregação de 68,4 a 84,7%. Em outro estudo, Armando et al. (2011) encontraram valores próximos, variando de 85,3 a 97,9%. Os percentuais de auto-agregação encontrados apontam que as cepas apresentam boa capacidade para unir-se, representando uma característica desejável para espécies probióticas (Muzzolón 2010). Os resultados de inibição homóloga e poder de auto-agregação são favoráveis à possível utilização destas cepas em uma mesma formulação de produtos comerciais.

Apesar de todas as cepas utilizadas pertencerem a espécie *Saccharomyces cerevisiae* pode-se observar que ocorreu uma variação individual (P<0,05) entre as estirpes quanto a capacidade de co-agregação (Tabela 3) com as bactérias patogênicas utilizadas no ensaio.

**Tabela 3.** Ensaio de co-agregação entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e cepas de patógenos

Cepas	Co-agregação (%)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
A8L2	50,70 <sup>a</sup>	36,14 <sup>a</sup>	16,76 <sup>b</sup>	49,49 <sup>b</sup>
RC1	40,64 <sup>c</sup>	30,98 <sup>b</sup>	45,29 <sup>a</sup>	58,53 <sup>a</sup>
RC3	45,71 <sup>b</sup>	35,35 <sup>a</sup>	42,01 <sup>a</sup>	59,52 <sup>a</sup>
CV (%)	1,69	2,58	3,39	2,64

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste SNK (p<0,05).

Para a *Escherichia coli*, a estirpe A8L2 foi a mais eficiente, enquanto para a *Salmonella* foram às cepas A8L2 e RC3. Nos testes com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp.* as cepas RC1 e RC3 apresentaram melhores percentuais de co-agregação com esses patógenos (Tabela 3). Em termos gerais, a cepa RC3 foi a mais efetiva, pois apresentou melhores percentuais de co-agregação para três patógenos testados. Estes resultados foram mais efetivos do que os obtidos por Pizzolitto et al. (2012), que encontraram valores entre 25,3% a 36,0% de co-agregação para cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus*. Ainda neste ensaio, apenas uma de suas cepas foi capaz de atingir um nível de agregação razoável (entre 15 a 26%) com os patógenos usados no ensaio, dos quais três deles foram testados neste estudo (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*). Os

resultados apresentados estão abaixo dos valores encontrados nesta pesquisa, sendo que a melhor cepa para este ensaio conseguiu atingir valores que variaram entre 42,01% a 59,52%. De acordo com Camargo e Andrade (2007) as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido estudadas na dieta de frangos, demonstrando que o seu uso frequente pode reduzir a carga de bactérias patogênicas, como exemplo a *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* e de alguns vírus, parasitas e fungos.

Os resultados de co-agregação entre as cepas estudadas sugerem que pode ser estabelecida uma barreira pelas cepas de *S. cerevisiae* para evitar a colonização por micro-organismos patogênicos, constituindo um mecanismo de defesa contra possíveis infecções. Neste sentido, segundo Mello (2012), complementa em seu estudo que, compostos ou processos que possam prevenir a aderência de bactérias patogênicas por competição de sítios no trato gastrointestinal de peixes, são eficazes em reduzir a colonização de patógenos.

Para o teste de atividade antibacteriana, apenas a cepa A8L2 mostrou-se capaz de inibir a *Salmonella spp.*, com um diâmetro de inibição de 11 mm, não apresentando efeito sobre as demais cepas testadas. A cepa A8L2 também apresentou um dos melhores percentuais (36,14%) de co-agregação com a bactéria *Salmonella spp.* Este resultado é importante, tendo em vista que para uma cepa ser considerada probiótica ela deve ser capaz de inibir patógenos que ocorrem no trato digestivo dos animais (Fuller 1989). De Keersmaecker et al. (2006) em seu estudo também observaram a ocorrência de atividade antimicrobiana por uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* contra *Salmonella entérica*.

Em relação às cepas RC1 e RC3, não foram constatados halos de inibição com as bactérias testadas. Para Draksler et al. (2004) em seu estudo, somente 0,7% das cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* utilizadas como probióticos em alimentos para cabras, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. typhimurium* e *E.coli*. Os 93,3% restantes não apresentaram qualquer atividade. Segundo Meurer et al. (2007), para que haja uma maior eficiência num sistema produtivo de peixes, os micro-organismos que compõem os probióticos devem ter especificidade para o hospedeiro. Desta forma, podem promover um estímulo do sistema imunológico do hospedeiro e os mecanismos não imunitários pelo antagonismo/competição com eventuais patógenos. Neste sentido, a cepa que apresenta melhor especificidade para o hospedeiro seria a A8L2 por ter sido isolada de ambiente de piscicultura, sendo que as demais RC1 e RC3 foram provenientes de cachaçaria. Entretanto, estes parâmetros não foram avaliados neste estudo, sendo necessários estudos *in vivo* para uma melhor compreensão destes aspectos.

Por outro lado, a levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905, isolada da produção de cachaça, foi capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal de camundongos, além de proteger esses animais contra um desafio oral com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Typhimurium* e *Clostridium difficile* (Martins et al. 2005). Estes resultados apontam que cepas originadas de outros

ambientes também podem exercer efeitos benéficos em diferentes hospedeiros, sendo esta capacidade dependente das características próprias de cada cepa.

Nas tabelas 4 e 5 observa-se a capacidade de sobrevivência de cepas de *S. cerevisiae* no testes de viabilidade às condições *in vitro* simuladas do trato gastrointestinal de tambaqui. Estes resultados são essenciais para seleção de cepas probióticas, uma vez que estes compostos devem ser tolerantes à presença de ácido no estômago e aos sais biliares no intestino (Gueimonde e Salminen 2006).

**Tabela 4.** Efeito da passagem simulada pelo pH do estômago (pH 2,0) de tambaqui na viabilidade de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Variável	Cepas	Tempo (horas)				Média <sup>1</sup>	CV(%)
		0h	4h	8h	12h		
Viabilidade (log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) (cepa/tempo)	A8L2	7,57 <sup>aA</sup>	7,56 <sup>abA</sup>	7,74 <sup>aA</sup>	7,56 <sup>cA</sup>	7,61	5,03
	RC1	8,17 <sup>aA</sup>	6,84 <sup>bC</sup>	7,48 <sup>aB</sup>	7,82 <sup>bAB</sup>	7,58	
	RC3	8,16 <sup>aA</sup>	8,16 <sup>aA</sup>	6,83 <sup>bB</sup>	8,06 <sup>aA</sup>	7,80	
Média <sup>1</sup>		7,97	7,52	7,35	7,81		

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna, para o mesmo tempo, diferem significativamente entre si pelo teste SNK (p<0,05).

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para a mesma cepa, diferem entre si pelo teste SNK (p<0,05).

Todas as estirpes testadas mostraram um percentual ótimo de sobrevivência (Tabela 4) às condições simuladas do pH do estômago de tambaqui (pH 2,0). No entanto, os fatores (cepa x tempo) tiveram interação (P=0,0317), resultando em variações significativas entre as cepas testadas nos períodos de tempo analisados. A cepa A8L2 mostrou ser a mais estável (P>0,05) desde o início do teste até o período final de 12h. RC1 e RC3 apresentaram variações ao longo do período testado, onde houve uma redução das células viáveis após 4h para a cepa RC1. A cepa RC3 apresentou diferença (P<0,05) no período de 8h (6,83 UFC. mL<sup>-1</sup>), que logo foi restabelecida com um aumento da viabilidade destas cepas, culminando no valor final de 8,06 UFC.mL<sup>-1</sup> (após 12h), próximo ao valor inicial que era de 8,16 UFC. mL<sup>-1</sup> para esta cepa. A acidez do pH neste teste pode ter influenciado na viabilidade das cepas RC1 e RC3 no intervalo de tempo entre 4h e 8h, havendo uma redução na contagem neste período. Logo após, entretanto, as células viáveis apresentaram certa estabilidade, que possivelmente permitiu a multiplicação de algumas células neste meio, demonstrada no aumento da contagem final.

Este teste permitiu uma simulação do pH do estômago de tambaqui, mas o intervalo de tempo de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal, em condições *in vivo*, varia entre as espécies, além de ter influências do conteúdo alimentar e de fatores ambientais como a temperatura da água (Silva et al. 2003). Deste modo, observa-se a importância de verificar as variações ocorridas nos intervalos de tempo analisados (4h, 8h), não excluindo a relevância do período total, tendo em vista

que este resultado também pode ser útil para outras espécies de peixes que possuam uma digestão mais prolongada (Dias-Koberstein et al. 2005; Braga et al. 2007).

Quando as cepas de *S. cerevisiae* foram expostas as condições intestinais (Tabela 5) simuladas (pH 7,0) de tambaqui por um período de 12 horas, as estirpes apresentaram um comportamento diferente daquele apresentado na tabela 4, afinal verifica-se que houve um aumento do número de células viáveis no período de 12h para todas as cepas avaliadas.

**Tabela 5.** Efeito da passagem simulada pelo pH do intestino (pH 7,0) de tambaqui, pela adição de bile a 0,5% na viabilidade de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Variável	Cepas	Tempo (horas)				Média <sup>1</sup>	CV(%)
		0h	4h	8h	12h		
Viabilidade (log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) (cepa/tempo)	A8L2	7,65 <sup>ad</sup>	7,91 <sup>ac</sup>	8,72 <sup>ab</sup>	9,07 <sup>aA</sup>	8,34	2,64
	RC1	6,65 <sup>bc</sup>	6,53 <sup>bc</sup>	7,27 <sup>bb</sup>	7,85 <sup>cA</sup>	7,08	
	RC3	7,47 <sup>ab</sup>	6,30 <sup>bc</sup>	7,57 <sup>bb</sup>	8,52 <sup>bA</sup>	7,47	
Média <sup>1</sup>		7,26	6,91	7,85	8,48		

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna, para o mesmo tempo, diferem significativamente entre si pelo teste SNK (p<0,05).

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para a mesma cepa, diferem entre si pelo teste SNK (p<0,05).

Observa-se que também houve interação entre os fatores analisados (P=0,0062). A estirpe A8L2 demonstrou ser a mais eficaz nestas condições, tendo em vista que seu aumento foi crescente em todos os tempos (4h, 8h e 12h), apresentando um valor final de 9,07 UFC. mL<sup>-1</sup>. Neste sentido, Nayak (2010) argumenta que, um probiótico ideal é aquele capaz de se estabelecer, multiplicar-se e colonizar o epitélio de revestimento do intestino do hospedeiro.

Estes resultados de tolerância às condições simuladas do estômago (Tabela 4) e intestino (Tabela 5) de tambaquis estão de acordo com os descritos por Armando et al. (2011), visto que todas as quatro cepas de *S. cerevisiae* isoladas de alimentos e intestino de suínos testadas em sua pesquisa foram capazes de sobreviver em condições gastrointestinais simuladas de animais de produção. Segundo Keller (2012), a sobrevivência das cepas probióticas ingeridas nas diferentes porções do trato gastrointestinal difere de um organismo para o outro. Algumas são rapidamente inibidas no estômago, enquanto outras podem atingir o intestino com elevadas concentrações. Desta forma, a cepa A8L2 foi capaz de resistir às condições ácidas simuladas do estômago e apresentou elevadas concentrações no intestino ao final do teste.

Na Tabela 6 pode ser observada a capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub> por três cepas de *S. cerevisiae*. As leveduras foram testadas em duas diferentes concentrações de AFB<sub>1</sub> (10% e 25%).

**Tabela 6.** Adsorção (%) de diferentes níveis (10 e 25 ng. mL<sup>-1</sup>) de aflatoxina B<sub>1</sub> por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Variável	Cepas	Concentração (ng. mL <sup>-1</sup> )		Média <sup>1</sup>	CV(%)
		10	25		
Adsorção (%) (cepa/concentração)	A8L2	21,19	19,77	20,48 <sup>a</sup>	21,18
	RC1	14,53	4,69	9,61 <sup>b</sup>	
	RC3	13,75	15,20	14,47 <sup>b</sup>	
Média <sup>1</sup>		16,49 <sup>a</sup>	13,22 <sup>a</sup>		

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste SNK (P<0,05).

Para esta variável não houve interação entre os fatores analisados (P>0,05). A cepa A8L2 foi a mais eficaz estatisticamente (P<0,005), com percentuais de adsorção de 21,19% e 19,77%, para as duas concentrações testadas, respectivamente, resultando em uma média geral de 20,48%. Valores próximos foram relatados por Pinheiro (2013) ao simular o pH do estômago e do intestino de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com soluções tampão fosfato salino (PBS). O autor verificou que a eficiência da capacidade anti-micotoxina de leveduras secas de cervejaria da espécie *S. cerevisiae* em diferentes valores de pH foi de 12,4 a 21,6% em uma concentração de 1000 ng.mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>.

No entanto, percentuais mais altos foram encontrados nos ensaios de adsorção desenvolvidos por Pizzolitto et al. (2011). Utilizando uma concentração de 500 ng.mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> obtiveram valores de 18,4% a 65,7% para cepas viáveis de *S. cerevisiae*. Armando et al. (2011) ao utilizarem as mesmas concentrações de células de leveduras deste estudo detectaram que as percentagens de adsorção de AFB<sub>1</sub> variaram entre estirpes de *S. cerevisiae* e conforme a concentração de AFB<sub>1</sub> utilizada em seu estudo, encontrando valores de 16,4 a 82% para 50 ng.mL<sup>-1</sup>; 21,3 a 48,7% para 100 ng.mL<sup>-1</sup> e 20,2 a 65,5% para 500 ng.mL<sup>-1</sup>. Entretanto, contrapondo-se aos resultados apresentados por estes pesquisadores, não houve diferença (P>0,05) entre os valores de adsorção das cepas de *S. cerevisiae* nos níveis 10 e 25 ng. mL<sup>-1</sup> neste estudo. Contudo, os valores testados por Pizzolitto et al. (2011) e Armando et al. (2011) foram relativamente maiores (50 ng. mL<sup>-1</sup> a 500 ng. mL<sup>-1</sup>) do que os utilizados nesta pesquisa e desta forma a diferença entre os percentuais de adsorção de AFB<sub>1</sub> por cepas viáveis de *S. cerevisiae* pode ser alterada quando são utilizados níveis mais altos da toxina.

Diante destes dados, percebe-se que a quantidade de toxina adsorvida nos diferentes estudos é dependente da concentração e do nível de ligação, variando entre as estirpes, indicando a natureza específica do micro-organismo no processo de adsorção (Pizzolitto et al. 2012). Deste modo, a melhor forma de avaliar a eficiência da adsorção de um micro-organismo é utilizando mais de uma concentração de toxina.

As diferenças no processo de adsorção observadas entre diferentes estirpes de *S. cerevisiae* quando expostas a diferentes condições de meios, pode ser explicada pela variabilidade estrutural da parede da levedura, que é formada por beta-glucanos e mananoproteínas, sítio específico para ligação de toxinas e bactérias patogênicas (Yiannikouris et al. 2004; Zaghini et al. 2005; Shetty e Jespersen 2006). Pinheiro (2013) sugere que em ensaios de adsorção, além de avaliarem diferentes concentrações de micotoxinas, deve-se também analisar se diferentes concentrações de micro-

organismos interferem na atividade anti-micotoxina. No entanto, Pizzolitto et al. (2011) observaram que o aumento das concentrações de bactérias ou leveduras, na presença de uma concentração fixa de AFB<sub>1</sub>, promovem um aumento na ligação destes compostos, mas ainda insuficiente para ligar todas as toxinas presentes.

Com base nos resultados constatou-se que as cepas de *S. cerevisiae* testadas possuem características desejáveis para atuarem como probióticos e capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>. Deste modo, a inclusão destas cepas em dietas para tambaquis pode possibilitar uma melhoria nos aspectos de sanidade e, também reduzir a quantidade de AFB<sub>1</sub> ingerida ocasionalmente em rações contaminadas. No entanto, estudos *in vivo* com estas espécies devem ser conduzidos para uma avaliação mais completa de seu uso na piscicultura.

## CONCLUSÕES

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* A8L2, RC1 e RC3 possuem potencial probiótico e adsorvente de AFB<sub>1</sub>. Em testes *in vitro* a estirpe A8L2 foi mais eficiente que as demais por ter melhor capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>, apresentar atividade antibacteriana e ser viável em condições simuladas do trato gastrointestinal de tambaqui.

## AGRADECIMENTOS

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos”, em parceria com o Ministerio de Ciencia, Tecnología y Innovación Productiva (Mincyt – Argentina). Agradecemos a Universidad Nacional de Río Cuarto pela parceria na realização do projeto e pela ajuda na realização dos ensaios probióticos e de adsorção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armando MR, Pizzolitto RP, Escobar F, Dogi CA, Peirano MS, Salvano MA, Sabini LI, Combina M, Dalcero AM, Cavaglieri LR (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin J* 4(1):59-68
- Baptista AS, Horii J, Calori-Domingues MA, Glória EM, Salgado JM, Vizioli MR (2004) The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World J Microbiol Biotechnol* 20:475-481
- Braga LGT, Borghesi R, Dairiki JK, Cyrino JEP (2007) Trânsito gastrintestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. *Pesq Agropec Bras* 42(1):131-134
- Bueno DJ, Casale CH, Pizzolitto RP, Salvano MA, Oliver G (2007) Physical adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J Food Prot* 70:2148-2154
- Calvet RM, Pereira MMG, Costa APR, Torres AM, Muratori MCS (2015) Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. *Ciênc Rural* 45(6):1021-1026

- Camargo ARO, Andrade JIR (2007) Evaluación de la capacidade probiotica in vitro de uma cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo final para optar al título de Microbiología Industrial y Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Cast. (2003) Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report n °139, Ames, USA.
- Cyrino JEP, Bicudo AJA, Sado RY, Borghesi R, Dairiki JK (2010) A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. Rev Bras Zootec 39:68-87
- D'Aimmo MR, Modesto M, Biavati B (2007) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. Int J Food Microbiol 115:35–42
- De Angelis M, Siracusa S, Berloco M, Caputo L, Settanni L, Alfonso G, Amerio M, Grande A, Ragni A, Gobbetti M (2006) Selection of potential probiotic lactobacilli from pig faeces to be used as additives in pelleted feeding. Res Microbiol 157:792–801
- De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Vanderleyden J, Nagy I (2006) Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. FEMS Microbiol Lett 259:89-96
- Dias-Koberstein TCR, Carneiro DJ, Urbinati EC (2005) Tempo de trânsito gastrintestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. Acta Sci Anim Sci 27(3):413-417
- Draksler D, Gonzales S, Oliver G (2004) Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. Reprod Nutr Dev 44:397-405
- El-Sayed YS, Khalil RH, Saad TT (2009) Acute toxicity of ochratoxin-A in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Chemosphere 75:878–882
- Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B (2001) Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol 152:167-173
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animal. J Appl Bacteriol 66:365-378
- Gimeno A, Martins ML (2011) Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Mexico: Inc. USA
- Gueimonde M, Salminen S (2006) New method for selecting and evaluating probiotics. Dig Liver Dis 38:242–247
- Hernandez-Mendoza A, Garcia HS, Steele JL (2009) Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. Food Chem Toxicol 47:1064-1068
- Hisano H, Pezzato LE, Barros MM, Freire ES, Gonçalves GS, Ferrari JEC (2004) Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Sci Anim Sci 26:171-179
- Ismail AA, Papenbrock J (2015) Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. Agriculture 5:492-537

Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73:444-450

Juodeikiene G, Basinskiene L, Bartkiene E, Matusevicius P (2012) Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes. In BARTKIENE et al. Structure and function of food engineering. Rijeka: InTech

Keller KM (2012) Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal. Tese, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Klaenhammer TR, Kullen MJ (1999) Selection and desing of probiotics. *Int J Food Microbiol* 50:45-47

Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 94:981-987

Martins FS, Nardi RMD, Arantes RME, Rosa CA, Neves MJ, Nicoli JR (2005) Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J Gen Appl Microbiol* 51(2):83-92

Mello H (2012) *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito probiótico. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo

Meurer F, Hayashi C, Costa MM, Freccia A, Mauerwerk, MT (2007) *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-Nilo submetidos a desafio sanitário. *Rev Bras Zootec* 36(5):1219-1224

Morelli L (2000) *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol*. 1:59-67

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

Nayak SK (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol* 29:2-14

Nunes EMCG, Pereira MMG, Costa APR, Rosa CAR, Pereyra CM, Calvet RM, Marques ALA, Cardoso Filho FC, Muratori MCS (2015) Screening of aflatoxin B1 and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. *Lat Am J Aquat Res* 43:595-600

Pereyra CM, Cavaglieri LR, Keller KM, Chiacchiera SM, Rosa CAR (2015) Dalcero, A. M. In vitro ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. *Rev Bras Med Vet* 37(1):25-28

Pinheiro REE (2013) Eficiência antimicotoxina de composto à base de leveduras secas de cervejaria e de probióticos comerciais para adsorção in vitro de aflatoxina B<sub>1</sub>. Dissertação, Universidade Federal do Piauí.

Pinheiro REE, Rodrigues AMD, Ribeiro MN, Cavalcante DH, Pereyra CM, Muratori MCS (2015) Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. *Rev Eletr Nutrit* 12(5):4268-4279

Pitt JI (2000) Toxigenic fungi: which are important. *Med Mycol* 38:17-22

Pizzolitto RP, Bueno DJ, Armando MR, Cavaglieri LR, Dalcero AM, Salvano MA (2011) 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. In: GUEVARA-GONZALEZ, R. G. Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology. InTech, pp 323 – 346

Pizzolitto RP, Armando MR, Combina M, Cavaglieri LR, Dalcerro AM, Salvano MA (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 Health part B 47: 933–941

Poloni V, Dogi C, Pereyra CM, Juri MGF, Kohler P, Rosa CAR, Dalcerro AM, Cavaglieri LR (2015) 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(6):970-976

Rahaie S, Emam-Djomeh A, Razavi SH, Mazaheri M (2012) Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. Int J Food Sci Tech 47:1647–1653

Rotta MA (2003) Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Corumbá: Embrapa Pantanal

Shety PH, Jespersen L (2006) *Saccharomyces cerevisiae* a lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Review. Trends Food Sci Technol 17:48-55

Silva JAM, Pereira Filho M, Oliveira-Pereira M (2003) Frutos e sementes consumidos pelo tabaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), incorporados em rações: digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. Rev Bras Zootec 32:1815-1824

Strus M (1998) A new method for testing antagonistic activity of lactic acid bacteria (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria, Med Dosw Mikrobiol 50:123–130

Trucksess MW, Stack ME, Nesheim S, Albert RH, Romer TR (1994) 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. J AOAC Int 77:1512-1521

Turbic A, Ahokas JT, Haskard CA (2002) Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. Food Addit Contam 19:144-152

Van der Aa Kuhle A, Skovgaard K, Jespersen L (2005) In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int J Food Microbiol 101:29-39

Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J (2009) Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Lett Appl Microbiol 49:434–442

Yiannikouris A, Francois J, Poughon L, Dussap CG, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP (2004) Influence of pH on complexing of model beta-d-glucans with zearalenone. J Food Prot 67:2741–2746

Zaghini A, Martelli G, Roncada P, Simioli M, Rizzi L (2005) Mannan oligosaccharides and aflatoxin B<sub>1</sub> in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> residues in eggs, and aflatoxin B<sub>1</sub> levels in liver. Poult Sci 84:825-832

## 5. Capítulo III<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Elaborado conforme normas da revista Semina: Ciências Agrárias

1 **Efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* em rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> sobre o**  
 2 **desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui**

3 *Effects of addition of Saccharomyces cerevisiae in feed contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub> on the performance*  
 4 *and sanity of fingerlings of tambaqui*

5 Raizza Eveline Escórcio Pinheiro<sup>1\*</sup>, Aline Maria Dourado Rodrigues<sup>2</sup>, Mabell Nery Ribeiro<sup>2</sup>, Emanuelle  
 6 Karine Frota Batista<sup>2</sup>, Aline Marques Monte<sup>3</sup>, Rodrigo Maciel Calvet<sup>4</sup>, Carina Maricel Pereyra<sup>5</sup>, Adriana  
 7 Mabel Torres<sup>5</sup>, Maria de Nasaré Bona de Alencar Araripe<sup>6</sup>, Maria Christina Sanches Muratori<sup>7</sup>

9 <sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Docente do Curso de Medicina Veterinária, Campus Bom Jesus –  
 10 Universidade Federal do Piauí (UFPI), 64900-000, Piauí, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio CAPES/MINCYT.

11 \*Autor para correspondência: raizza\_eveline@hotmail.com

12 <sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-  
 13 mails: alinemary2@yahoo.com.br, mabell\_nery@hotmail.com, emanuellefrota@yahoo.com.br

14 <sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí,  
 15 Brasil. E-mail: montealine@yahoo.com.br

16 <sup>4</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão. Campus Caxias, Maranhão, Brasil. E-mail:  
 17 rodrigocalvet@hotmail.com

18 <sup>5</sup> Departamento de Microbiología y Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina, Córdoba, Argentina;  
 19 Member of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CIC-CONICET), Argentina.  
 20 E-mails: carinapereyra06@hotmail.com, atorres@exa.unrc.edu.ar

21 <sup>6</sup> Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí,  
 22 Brasil. E-mail: nasare@ufpi.edu.br

23 <sup>7</sup> Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-  
 24 550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br

25  
 26 **RESUMO.** Objetivou-se, com este trabalho, avaliar os efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* em  
 27 rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> sobre o desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui. Utilizou-se  
 28 um delineamento inteiramente casualizado, representados por quatro tratamentos: (T1) com 0,0 µg kg<sup>-1</sup> de  
 29 AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura (controle); (T2) com 0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura; (T3)  
 30 com 100 µg.kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura e (T4) com 100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de  
 31 levedura, sendo quatro repetições por tratamento. Durante um período de 34 dias, foram utilizados 192  
 32 alevinos com peso inicial de 2,9 ± 0,2 g e comprimento 26,1 ± 1,3 mm, sendo 12 peixes por unidade  
 33 experimental, distribuídos em 16 caixas d'águas de polipropileno com capacidade para 250 litros cada. Para  
 34 formulação da ração experimental foi adicionado um núcleo de AFB<sub>1</sub> (T3 e T4) e uma cepa de *Sacharomyces*  
 35 *cerevisae* A8L2 à ração comercial (T2 e T4). Os seguintes parâmetros foram avaliados: qualidade da água,  
 36 desempenho zootécnico, análises histopatológicas, contagem e isolamento das leveduras da ração e intestino.  
 37 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste SNK a 5% de  
 38 significância. Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se dentro dos padrões, não influenciando

39 sobre os parâmetros zootécnicos. Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na taxa de  
40 crescimento específico, ganho de comprimento médio e fator de condição de Fulton dos alevinos de  
41 tambaqui no período experimental. Em relação ao ganho de peso médio, pôde-se observar que houve  
42 diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. As alterações histopatológicas nos tecidos hepáticos e renais dos  
43 alevinos de tambaqui foram mais acentuadas no T3 e T4, indicando comprometimento destes órgãos. Com  
44 base nos aspectos histopatológicos, sugere-se que a levedura não foi capaz de reduzir os efeitos  
45 característicos de aflatoxicoses em alevinos de tambaqui alimentados com  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub>. Constatou-  
46 se que a cepa A8L2 de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de  $10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  foi capaz de colonizar o  
47 intestino dos alevinos de tambaqui, mas sua inclusão associada com  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> em rações não  
48 promoveu melhorias nos parâmetros de GPM, GCM, TCE, Fator K e histopatológicos desses animais.

49 **Palavras-chave:** adsorção, análises histopatológicas, isolamento de leveduras, parâmetros zootécnicos.

50 **ABSTRACT.** The objective of this study was to evaluate the effects of the addition of *Saccharomyces*  
51 *cerevisiae* in feeds contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub> on the performance and sanity of fingerlings of  
52 tambaqui. It was used a completely randomized design, represented by four treatments: (T1) with  $0,0 \mu\text{g kg}^{-1}$   
53 of AFB<sub>1</sub> and  $0,0$  UFC  $\text{g}^{-1}$  of yeast (control); (T2) with  $0,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  of AFB<sub>1</sub> and  $10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  of yeast; (T3) with  
54  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  of AFB<sub>1</sub> and  $0,0$  UFC  $\text{g}^{-1}$  of yeast and (T4) with  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  of AFB<sub>1</sub> and  $10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  of yeast,  
55 with four repetitions per treatment. Over a period of 34 days, it was used 192 fingerlings with initial weight  
56 of  $2.9 \pm 0.2$  g and  $26.1 \pm 1.3$  mm and length  $26,1 \pm 1,3$  mm, 12 fish per experimental unit, distributed in 16  
57 polypropylene water storage tanks with capacity of 250 liters each. For the formulation of the experimental  
58 feed was added a core of AFB<sub>1</sub> (T3 and T4) and one strain of *Sacharomyces cerevisiae* A8L2 commercial  
59 feed (T2 and T4). The following parameters were evaluated: the quality of the water, zootechnical  
60 performance, histopathological analysis, counting and isolation of yeasts of the feed and intestine. Data were  
61 subjected to analysis of variance and average compared by SNK test at 5% of significance level. The water  
62 quality parameters remained within the standards not influencing on the zootechnical parameters. No  
63 significant differences were observed ( $P > 0.05$ ) in the specific growth rate, average length gain and Fulton  
64 condition factor of tambaqui fingerlings in the trial period. In relation to the average weight gain can be  
65 observed that there was no difference ( $P < 0.05$ ) among the treatments. Histopathological changes in liver and  
66 kidney tissues of fingerlings of tambaqui were more pronounced in T3 and T4, indicating damage of these  
67 organs. Based on histopathological findings, it is suggested that the yeast was not able to reduce the  
68 characteristic effects of aflatoxicosis in tambaqui fingerlings fed with  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  of AFB<sub>1</sub>. It was found that  
69 the A8L2 strain *Saccharomyces cerevisiae* in the concentration of  $10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  was able to colonize the  
70 intestine of the of fingerlings of tambaqui, however, its inclusion associated with  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  of AFB<sub>1</sub> in  
71 feeds did not promote improvements in GPM, GCM, TCE, Factor K and histopathological parameters of  
72 these animals.

73

74 **Keywords:** adsorption, histopathological analysis, isolation of yeasts, zootechnical parameters.

## 75 INTRODUÇÃO

76 O Brasil é considerado um dos países de maior potencial para aquicultura, graças ao forte potencial de  
77 mercado, elevada produção de grãos, presença de muitas indústrias de ração, com boa disponibilidade hídrica  
78 e áreas favoráveis para a construção de tanques e açudes (KUBITZA, 2015). O tambaqui (*Colossoma*  
79 *macropomum*) é a principal espécie nativa produzida em âmbito nacional e juntamente com outros peixes  
80 redondos, que incluem todas as espécies dos gêneros *Colossoma* e *Piaractus*, apresentaram grande expansão  
81 no cultivo, com uma produção de 186 mil toneladas em 2014 (KUBITZA, 2015).

82 A piscicultura brasileira apresentou melhorias consideráveis nos últimos anos, em função dos avanços  
83 nutricionais, genéticos e de manejo, aliado ao aumento do consumo de pescado. Dessa forma, qualquer fator  
84 que afete negativamente a produção pode gerar prejuízos econômicos para o cultivo. A presença de  
85 contaminantes em rações destinadas à piscicultura destaca-se como um dos fatores primordiais que afetam o  
86 desempenho de várias espécies de peixes (NUNES et al., 2015; TOLA et al., 2015).

87 O termo micotoxinas é usado para designar um grupo de compostos produzidos por algumas espécies  
88 de fungos que podem contaminar os alimentos destinados ao consumo humano e animal, provocando efeitos  
89 teratogênicos, hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (KLICH, 2007). Entre as principais micotoxinas,  
90 a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) destaca-se por ser o carcinógeno hepático mais potente demonstrado em várias  
91 espécies de animais. Alimentos contaminados com aflatoxinas são responsáveis por causar danos em várias  
92 espécies cultivadas em ambiente aquático, gerando desequilíbrios fisiológicos, redução do crescimento,  
93 alterações histológicas, morfológicas, principalmente no fígado, além de oferecer riscos à saúde do  
94 consumidor, pela presença da toxina na musculatura de peixes (BOONYARATPALI et al., 2001;  
95 GOPINATH et al., 2012), causando prejuízos econômicos como redução no desempenho produtivo, queda  
96 na produção e mortalidade dos animais (KUBITZA, 2010).

97 Diferentes estratégias de prevenção e controle sobre a contaminação de micotoxinas têm sido  
98 desenvolvidas (MALLMANN et al., 2006). Uma das alternativas promissoras é a descontaminação biológica  
99 realizada por bactérias e leveduras que tenham propriedades probióticas (PINHEIRO et al., 2015, POLONI  
100 et al., 2015). Estes micro-organismos quando adicionados aos alimentos contaminados são capazes de  
101 adsorver micotoxinas no trato gastrointestinal para serem eliminadas pelas fezes.

102 A inclusão de cepas benéficas à dieta dos animais se dá pela administração de probióticos que são  
103 micro-organismos vivos e uma vez administrados em quantidades adequadas conferem efeitos benéficos ao  
104 consumidor, melhorando seu balanço microbiano em nível intestinal (FULLER, 1989; FAO, 2009). Cepas de  
105 *Saccharomyces cerevisiae* são úteis na remoção de micotoxinas, sendo objeto de estudo por parte de  
106 laboratórios de referência (BAPTISTA et al., 2004; PFLIEGLER et al., 2015; POLONI et al., 2015).  
107 Algumas pesquisas têm relatado seus efeitos benéficos como aditivo melhorador de desempenho e sua  
108 capacidade de sequestrar micotoxinas presentes na dieta. Como estas propriedades são cepa-dependentes,  
109 torna-se necessária a avaliação de cada cepa nova ou produto derivado das mesmas (KELLER, 2012).

110 Ensaios *in vitro* e *in vivo* são ferramentas poderosas para a seleção de agentes probióticos e  
111 adsorventes de micotoxinas. Entretanto, as avaliações *in vitro* simulando as condições presentes no

112 organismo animal não inibem a necessidade de corroborar sua efetividade *in vivo*, tendo em vista que se uma  
113 cepa é efetiva como adsorvente *in vitro* não necessariamente implica que tenha a mesma eficácia *in vivo*  
114 (GARCIA et al., 2004).

115 Alguns trabalhos recomendam a utilização de cepas nativas para estes testes, ou seja, aquelas  
116 advindas do mesmo local de onde atuam naturalmente. Torna-se imperativo esse tipo de investigação, na  
117 busca por compostos naturais, que possam exercer tais funções, visando melhorias no desempenho animal e  
118 contribuições para o desenvolvimento tecnológico, econômico e para a sanidade animal. Assim, verifica-se a  
119 importância de avaliar a possibilidade da utilização das cepas isoladas a partir de segmentos da aquicultura  
120 como descontaminantes de AFB<sub>1</sub>, em testes *in vivo*. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo  
121 avaliar os efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* em rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> sobre o  
122 desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui.

## 123 MATERIAL E MÉTODOS

### 124 *Delineamento*

125 Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, representados por quatro tratamentos e quatro  
126 repetições, com 12 peixes por unidade experimental. Os tratamentos foram classificados em Tratamento 1  
127 (T1) com 0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura (Controle); Tratamento 2 (T2) com 0,0 µg kg<sup>-1</sup> de  
128 AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura; Tratamento 3 (T3) com 100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura e  
129 Tratamento 4 (T4) com 100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura.

### 130 *Dietas experimentais*

#### 131 *1. Preparação da ração e suplementação com levedura*

132 Foi utilizada uma cepa de *Sacharomyces cerevisiae* A8L2 isolada de ambiente de piscicultura,  
133 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Núcleo de Pesquisa e  
134 Processamento de Alimentos (NUEPPA/CCA/UFPI) para suplementação da ração experimental de dois  
135 tratamentos (T2) e (T4). Inicialmente, a ração comercial foi moída em moinho de fluxo contínuo  
136 (Marconi®), e logo em seguida, pelletizada com auxílio de máquina de moer, sendo a granulometria ajustada  
137 com auxílio de peneira Bertel® (abertura de 2,38 a 4,76 mm). Após esse processamento, as rações foram  
138 submetidas à secagem em estufa por 48h a 50°C. Para formulação do tratamento, as rações foram aspergidas  
139 com *Saccharomyces cerevisiae* em caldo YPD e homogeneizados manualmente em cabine de segurança  
140 biológica. Em seguida, as rações foram colocadas em estufa de secagem por 48h a ± 30°C. Ao final deste  
141 processo as rações foram analisadas através da diluição decimal seriada com sementeira por espalhamento  
142 em superfície, no período inicial, para verificação da quantidade de leveduras na ração. Posteriormente, as  
143 rações foram armazenadas em frascos, contendo 1,5 kg cada e permaneceram sob refrigeração durante todo o  
144 período experimental. Após 15 dias e no final do experimento as rações foram novamente analisadas para  
145 contagem total de células viáveis de levedura em UFC g<sup>-1</sup>.

146

## 147 2. Produção de AFB<sub>1</sub> e incorporação à ração

### 148 2.1 Produção de núcleos

149 Para produção de AFB<sub>1</sub> utilizou-se a cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (USDA,  
150 Agricultural Research Service, Peoria, IL), conforme recomendado pela metodologia de Magnoli et al.  
151 (2011). A quantificação do núcleo de aflatoxina foi realizada utilizando a metodologia recomendada pela  
152 AOAC (1998). A detecção e quantificação de AFB<sub>1</sub> foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência  
153 (CLAE), utilizando um cromatógrafo SHIMADZU®, modelo PROMINENCE com detector de fluorescência  
154 modelo RF-10AXL SUPER de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al. (1994). A curva  
155 padrão foi construída em diferentes níveis de AFB<sub>1</sub>. Esta toxina foi quantificada pela correlação das alturas  
156 dos picos do extrato da amostra com o da curva padrão.

157

### 158 2.2 Detecção de micotoxinas nas rações comerciais de peixes

159 Para o preparo dos tratamentos, três amostras de rações comerciais para peixes foram enviadas para  
160 detecção de AFB<sub>1</sub> no Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria,  
161 RS. A amostra que apresentou níveis não detectáveis de AFB<sub>1</sub> foi utilizada para constituir a ração controle  
162 (T1) e para formular os demais tratamentos, após ajuste com adição de AFB<sub>1</sub> (T3 e T4) e de levedura no T2 e  
163 T4.

164

### 165 2.3 Ajustes das dosagens de AFB<sub>1</sub> nas rações

166 A ração selecionada foi moída, fracionada em dois grupos de 1,5 kg e acrescida de núcleos de arroz  
167 contendo AFB<sub>1</sub> para obter a concentração de 100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> nos tratamentos T3 e T4. Posteriormente,  
168 foram homogeneizadas em baldes devidamente vedados para evitar contaminação do manipulador. Em  
169 seguida, foram novamente peletizadas com auxílio da máquina de moer, através da adição de água (±30% do  
170 volume preparado) à ração, sendo, posteriormente, a granulometria ajustada com auxílio de peneira Bertel®  
171 (abertura de 2,38 a 4,76 mm). Em seguida, as rações foram levadas à estufa e permaneceram por um período  
172 de 48 horas a 50°C. Após homogeneização, as rações foram armazenadas em temperatura refrigerada durante  
173 todo o período experimental.

174

## 175 Fase experimental do teste in vivo

### 176 1. Local e Instalações

177 Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais e foi aprovada pelo  
178 Comitê de Ética e Experimentação no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina,  
179 PI, sob o protocolo nº 013/14. O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura  
180 (LAPESPI/CCA/UFPI). Foram utilizadas 16 caixas d'águas de polipropileno com capacidade para 250 litros

181 cada, abastecidas com água de poço, supridas com aeração constante. O período de realização desta etapa foi  
182 de 34 dias, compreendidos entre os meses de novembro a dezembro de 2015.

183

## 184 2. Conservação das dietas experimentais

185 As rações permaneceram acondicionadas em geladeira durante o período experimental.  
186 Semanalmente era pesada uma quantidade de ração para uso. Tal quantidade era colocada em recipientes  
187 plásticos, identificados conforme o tratamento e devidamente vedados, sendo mantidos sob conservação com  
188 bolsas de gelo dentro de caixas térmicas de isopor. A cada dois dias as bolsas térmicas eram trocadas,  
189 visando preservar a qualidade das rações fornecidas aos peixes.

190

## 191 3. Animais

192 Inicialmente, foram adquiridos 2.000 alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), que foram  
193 pré-selecionados por meio de uma máquina selecionadora de peixes (Bernauer aquacultura®) e transferidos  
194 para quatro tanques iniciais de 1000L, sendo mantidos sob oxigenação com ajuda de um sistema de aeração.  
195 Os peixes permaneceram neste local para adaptação, por um período de 40 dias, sendo alimentados com  
196 ração com níveis não detectáveis de AFB<sub>1</sub> duas vezes ao dia à vontade. Quando necessário, a limpeza das  
197 unidades experimentais era realizada por sifonamento do substrato para remoção dos resíduos existentes e a  
198 água era trocada.

199 Após este período, realizou-se a biometria dos alevinos selecionando-se 192 animais com peso  
200 corporal ( $2,9 \pm 0,2$  g) e comprimento ( $26,1 \pm 1,3$  mm), que foram distribuídos em 16 caixas d'água na  
201 densidade de 12 alevinos por caixa. Para realização da biometria inicial, os alevinos foram anestesiados  
202 utilizando-se a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> de eugenol. Durante o período experimental a oferta de alimento  
203 foi realizada até a aparente saciedade do animal, três vezes ao dia (08h00, 12h00 e 17h00), de forma manual.

204

## 205 Parâmetros analisados

### 206 1. Monitoramento da qualidade da água

207 Os parâmetros da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura, amônia e nitrito) foram verificados  
208 semanalmente utilizando-se o kit do produtor de água doce da ALFAKIT®, de acordo com as  
209 recomendações do manual do fabricante. Ao serem observados valores fora dos padrões indicados por Boyd  
210 (1990) para águas de piscicultura, era realizada a sifonagem dos tanques e renovação da água do sistema.

211

### 212 2. Desempenho zootécnico

213 Ao final do experimento os animais foram submetidos a 24 horas de jejum e, posteriormente, todos  
214 os alevinos foram anestesiados para coleta das biometrias finais. Em seguida, os animais foram eutanasiados  
215 utilizando-se a concentração de 424 mg L<sup>-1</sup> de eugenol e destinados para as análises histopatológicas e de

216 contagem das leveduras do intestino. Para determinação dos parâmetros zootécnicos, foram selecionados três  
217 exemplares de cada repetição dos alevinos. Os dados coletados foram utilizados para determinação de: ganho  
218 de peso médio (GPM), ganho de comprimento médio (GCM), taxa de crescimento específico (TCE), e fator  
219 de condição (fator K), através das seguintes fórmulas:

220 Ganho de peso médio (GPM) = (PMF – PMI);

221 Ganho de comprimento médio (GCM) = (CMF – CMI);

222 Taxa de crescimento específico (TCE) =  $[(\text{Ln Pf} - \text{Ln Pi}) \times 100] / T$ ;

223 Fator de condição de Fulton (Fator K) =  $(\text{GPM}/\text{GCM}^3) \times 1000$ ;

224 em que: PMF: peso médio final; PMI: peso médio inicial; CMF: comprimento médio inicial; CMI:  
225 comprimento médio inicial; Ln Pf: logaritmo neperiano do peso final; Ln Pi: logaritmo neperiano do peso  
226 inicial; T: tempo experimental; GPM: ganho de peso médio; GCM: ganho de comprimento médio.

227

### 228 3. *Estudo histopatológico*

229 Após a realização da biometria final, os alevinos foram eutanasiados e selecionaram-se três alevinos  
230 de cada repetição para as análises histopatológicas. Realizou-se uma análise visual dos peixes para observar  
231 alterações externas. Em seguida foram retiradas amostras da musculatura, fígado, e rins. As amostras foram  
232 transferidas para tubos, fixadas em formol tamponado a 10% e encaminhadas ao Laboratório de  
233 Histopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI) para processamento  
234 histológico. Os tecidos fixados foram processados segundo técnicas rotineiras de inclusão em parafina,  
235 cortados em micrótomo (4,0  $\mu\text{m}$ ) e corados pela hematoxilina e eosina (H-E) (LUNA, 1968). Os cortes  
236 histológicos foram examinados em microscópio de luz binocular (Olympus, Tóquio, Japão) com aumento de  
237 100, 200 e 400 vezes e fotografados com sistema fotomicrográfico digital.

238

### 239 4. *Contagem e isolamento das leveduras no intestino*

240 Ao final do experimento, após insensibilização dos animais, foram coletados duas unidades de  
241 alevinos por repetição para contagem e isolamento das leveduras presentes no intestino dos animais. Vale  
242 ressaltar que os peixes permaneceram em jejum por 24 horas para esvaziamento intestinal, com a finalidade  
243 de verificar a colonização da levedura, fornecida através da ração. Inicialmente, realizou-se assepticamente  
244 uma incisão longitudinal para melhor exposição do conteúdo cavitário. Logo após, os intestinos foram  
245 separados dos demais componentes do tubo digestório e cada amostra foi transferida para 150 mL de caldo  
246 extrato de levedura peptona dextrose (YPD) e permaneceu por 48h em estufa a 37°C (ARMANDO et. al.,  
247 2011; KELLER, 2012). O isolamento foi realizado segundo metodologia de diluição decimal seriada com  
248 sementeira por espalhamento em superfície. Diluições decimais seriadas foram realizadas em tubos com  
249 caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) até  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 mL das respectivas diluições  
250 foram semeadas em Agar YPD para o isolamento seletivo de leveduras. Todas as placas foram incubadas a  
251 37°C por 48 h em estufas microbiológicas com controle de temperatura (PITT; HOCKING, 2009).

252 Após crescimento das leveduras, realizou-se a contagem das colônias totais viáveis em placas,  
253 expressas como UFC g<sup>-1</sup>. Para a obtenção de cultivos puros, cada colônia de levedura isolada foi repicada em  
254 placas de YPD pelo método de esgotamento em placas por estrias e, logo após, os cultivos semeados em  
255 Agar Extrato de Malte (MEA) para posterior identificação das espécies.

256

## 257 5. Identificação molecular

### 258 5.1 Extração de DNA

259 A extração de DNA das leveduras foi realizada no Laboratório de Microbiologia do NUEPPA, CCA,  
260 UFPI. As colônias puras foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lise e 5 µL de B-mercaptoetanol,  
261 agitadas em vortex e incubadas em banho-maria a 65°C por uma hora. Logo em seguida, foram adicionados  
262 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitados até obter uma suspensão homogênea e submetidos  
263 a centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga Hermle (modelo Z216MK). Na sequência,  
264 foram transferidos 200 µL do sobrenadante para um microtubo que recebeu 200 µL de isopropanol. Para a  
265 precipitação do DNA os tubos permaneceram em repouso *overnight* a -20°C. Em seguida, os microtubos  
266 foram centrifugados em microcentrífuga a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi  
267 descartado por inversão e os tubos foram lavados com 500 µL de etanol a 70%, centrifugados a 14.000 rpm  
268 por 15 minutos. Logo após, a fase líquida foi retirada e os tubos foram colocados para secar em estufa  
269 Fanem® (modelo 320 – SE) à 60°C. O *pellet* foi ressuscitado com 100 µL de tampão Tris- EDTA (TE) 0,1  
270 M e em seguida, o DNA obtido foi dosado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000; 220-750nm) da  
271 Thermo Scientific e diluído até atingir a concentração aproximada de 25 ng µL<sup>-1</sup>.

272

### 273 5.2 PCR fingerprinting com iniciador (GTG)<sub>5</sub>

274 Para o agrupamento das leveduras em perfis similares foi utilizada a impressão digital pela técnica de  
275 PCR utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>(5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). A reação de PCR foi  
276 realizada utilizando-se 2,5 µL de tampão 10X (Ludwig Biotech Brasil), 2,5 µL de dNTP 2,0 mM (Ludwig  
277 Biotech Brasil), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Ludwig Biotech Brasil), 1,5 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> com  
278 concentração de 10 pmol-1 (*GBT*® Oligos), 0,25 µL de taq DNA polimerase 5 U (Ludwig Biotech Brasil) e  
279 2,5 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 25 µL. A PCR foi  
280 realizada em um termociclador (Bioer technology®) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C  
281 por dois minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a  
282 72°C por um minuto, seguidos de extensão final a 72°C por seis minutos. Após as reações de amplificação,  
283 os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Biotec®) a 1,5% em tampão Tris-Borato-  
284 EDTA 0,5%. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Uniscience) e visualizadas sob luz  
285 ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação L.Pix (Loccus biotecnologia). Os  
286 padrões de impressão das bandas dos isolados foram comparados ao padrão da cepa de *Saccharomyces*  
287 *cerevisiae* A8L2.

288

289 *Análise Estatística*

290 Para avaliação do desempenho animal os dados foram submetidos à análise de variância e o teste de  
291 comparação de médias de SNK ao nível de 5% de probabilidade, seguindo os procedimentos do programa  
292 SAS versão 9.0 (SAS, 2002).

## 293 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

294 Durante o período experimental as médias das temperaturas mínimas e máximas do ambiente foram  
295 de  $26 \pm 0,74^{\circ}\text{C}$  e  $38 \pm 1,12^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados  
296 semanalmente; as concentrações de temperatura da água ( $27 \pm 0,53^{\circ}\text{C}$ ), teor médio de oxigênio dissolvido  
297  $6,9 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH  $7,37 \pm 0,27$ , amônia  $0,30 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$  e nitrito  $0,19 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$  mantiveram-se  
298 dentro dos padrões recomendados para peixes tropicais segundo Boyd (1990). Sendo assim, pode-se afirmar  
299 que as variáveis aferidas não influenciaram nos parâmetros zootécnicos.

300 Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na taxa de crescimento específico, ganho de  
301 comprimento médio e fator de condição de Fulton dos alevinos de tambaqui no período experimental. Em  
302 relação ao ganho de peso médio pode-se averiguar que houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos T1  
303 (controle) e T4 (AFB<sub>1</sub> + levedura) (Tabela 1). Os demais tratamentos não apresentaram diferença entre si,  
304 para esta variável.

305 Com esses resultados, pode-se inferir que a adição da cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*  
306 A8L2 não apresentou melhorias no desempenho dos animais. Apesar destes aspectos não terem sido  
307 avaliados neste estudo, é importante destacar que a administração de leveduras probióticas pode melhorar a  
308 sanidade do cultivo, através do estímulo da imunidade do hospedeiro e pela redução do número de infecções  
309 (FULLER, 1989).

310 No T3, a concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> na ração, não resultou em diferenças significativas  
311 para as variáveis GPM, GCM, TCE e Fator K. Em outro estudo realizado por Nunes (2014), verificou-se que  
312 a inclusão na dieta de  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $1.000 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $2.000 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> afetou significativamente o  
313 crescimento, ganho de peso e conversão alimentar, além de terem sido constatadas mortalidades durante todo  
314 o período experimental em alevinos de tambaqui cultivados sobre condições experimentais semelhantes. Anh  
315 Tuan et al. (2002) ao utilizarem dietas com concentrações de zero, 250, 2.500, 10.000 e 100.000  $\mu\text{g kg}^{-1}$   
316 para alevinos de tilápia, constatou que dietas com níveis de 100.000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  levavam a perda de peso severa  
317 e altas taxas de mortalidade, indicando assim que os efeitos da intoxicação por AFB<sub>1</sub> dependem da dose de  
318 toxina ingerida pelos animais. Por outro lado, pesquisas relataram a resistência de algumas espécies de  
319 peixes frente às aflatoxinas, como exemplo alevinos de channel catfish (*Ictalurus punctatus*) em dietas de 20  
320  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (MANNING et al., 2005) e alevinos de rohu (*Labeo rohita*) com aflatoxinas administradas por via  
321 intramuscular ( $1,25 \text{ mg kg}^{-1}$  por peixe) (SAHOO; MUKHERJEE, 2002).

322 Com relação ao T4, a inclusão da levedura juntamente com a toxina na ração promoveu uma redução  
323 no GPM dos alevinos, apesar de não ter influenciado o GCM, TCE e Fator K. Este fato pode ter ocorrido  
324 pela palatabilidade da dieta ou até mesmo pela dificuldade de absorção de nutrientes, conforme relatado por

325 Lopes et al. (2009) que, em seu estudo, constataram que alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) não aceitaram  
326 muito bem a ração contendo adsorvente à base de aluminossilicato a 0,3 e 0,6% e com isso, houve perda de  
327 ganho de peso e de comprimento total no período experimental de 90 dias.

328 Em estudos anteriores, a mesma cepa utilizada neste trabalho obteve percentuais de 21,19% e  
329 19,77% de adsorção quando submetida a níveis de 10 e 25 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>, respectivamente, em condições  
330 *in vitro* simulando o pH do trato gastrointestinal de tambaquis. De acordo com Mallman et al., 2006, os  
331 testes *in vitro* são apenas uma simulação, mesmo reproduzindo as condições do meio, através dos sucos do  
332 trato gastrointestinal. Quando ingerido pelo animal, juntamente com os componentes da dieta, o adsorvente  
333 pode ter sua ação dificultada por um ou mais destes componentes, que não estão presentes nos ensaios *in*  
334 *vitro* (LEMKE et al., 2001). É possível que fatores como concentração dos micro-organismos utilizados, o  
335 processo de inclusão da cepa na ração, a presença de enzimas, as concentrações das toxinas e o tempo de  
336 contato (BOLOGNANI et al., 1997; TOMASEVIC-CANOVIC et al., 2003; EL-NEZAMI et al., 2004;  
337 PIZZOLITTO et al., 2011) possam ter interferido nos resultados desta pesquisa.

338 Ao longo dos 34 dias experimentais, verificou-se a mortalidade de um alevino no T3 e durante a  
339 retirada dos órgãos uma das carcaças dos alevinos desse mesmo tratamento estava com coloração anêmica.  
340 Anemia e leucopenia foram observados por Rizkalla et al. (1997) em tilápias do Nilo expostas a baixas  
341 concentrações de AFB<sub>1</sub> por longos períodos. Nunes (2014) relatou mortalidade de um alevino de tambaqui  
342 após ingestão de 500 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> no período de 39 dias e constatou que o número de peixes mortos  
343 aumentou ao fornecer níveis mais altos de toxina na ração (1.000 µg kg<sup>-1</sup> e 2.000 µg kg<sup>-1</sup>). Este fato pode ser  
344 reflexo dos efeitos da AFB<sub>1</sub> sobre estes animais.

345 As análises histopatológicas indicaram em T1 o parênquima renal, espaço de Bowman, tubular e os  
346 hepatócitos preservados (Figura 1 e 2). Foram observadas alterações histopatológicas nos tecidos hepáticos e  
347 renais dos alevinos de tambaqui no T3 e T4, apresentando maior grau de alteração e comprometimento  
348 destes órgãos (Tabela 2) (Figuras 1 e 2). O tecido muscular de todos os tratamentos não apresentou alteração  
349 histológica (Tabela 2 e Figura 3). De acordo com os estudos de Mahfouz e Sherif (2015) ao avaliarem os  
350 efeitos tóxicos de AFB<sub>1</sub> sobre os parâmetros zootécnicos e de sanidade de *Oreochromis niloticus* estes  
351 detectaram que os peixes que receberam dietas de 100 µg kg<sup>-1</sup> tiveram 4% de mortalidade e redução de ganho  
352 de peso após seis e 12 semanas de experimento. Esses autores ainda relataram ausência de AFB<sub>1</sub> residual na  
353 musculatura, embora tenha sido detectada a presença de 10 µg kg<sup>-1</sup> residual em fígado, várias alterações  
354 gordurosas e vacuolização nos hepatócitos do fígado no período de seis semanas de ingestão de dieta  
355 contaminada.

356 Apesar desta análise de toxina residual não ter sido realizada no presente estudo, estes dados podem  
357 ser relacionados com os achados histopatológicos, onde os alevinos de tambaqui receberam a mesma  
358 concentração de AFB<sub>1</sub> na dieta por cinco semanas e foram encontradas alterações histopatológicas no fígado  
359 e rins, com exceção da musculatura. Por outro lado, Nunes (2014) não relatou efeitos pronunciados e  
360 residuais de AFB<sub>1</sub> nos tecidos do fígado, rins e musculatura de alevinos de tambaqui que receberam dietas de  
361 500 µg kg<sup>-1</sup>, sendo encontradas alterações graves e residuais de AFB<sub>1</sub> apenas nos que receberam dietas de  
362 1000 e 2000 µg kg<sup>-1</sup>.

363 A deposição hepatocelular de lípidos é um sinal clássico de aflatoxicoses em peixes, conforme os  
364 relatos de Zychowski et al. (2013). De acordo com os resultados observados nos cortes histológicos de T3 e  
365 T4 observa-se que ambos apresentaram vacuolização das células e degeneração do epitélio nos rins (Figura  
366 1) e vacuolização gordurosa e degeneração dos hepatócitos no fígado (Figura 2). Estes achados confirmam a  
367 hipótese de que a levedura não foi capaz de reduzir os efeitos característicos de aflatoxicoses em alevinos de  
368 tambaqui alimentados com  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub>, visto que as alterações histopatológicas encontradas foram  
369 semelhantes nos dois tratamentos. Em contrapartida, Keller (2012) constatou redução dos efeitos promovidos  
370 por AFB<sub>1</sub> ao administrar parede celular de levedura na concentração de 0,2% em dietas de frangos de corte,  
371 através da observação dos cortes histológicos de fígado, onde descreveu redução dos danos nos hepatócitos  
372 no grupo que recebeu a suplementação com a parede celular de levedura quando comparados com os animais  
373 que receberam dietas com 1ppm ( $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) de AFB<sub>1</sub>.

374 Alguns estudos *in vitro* sugerem que as cepas sejam tratadas antes da inclusão na dieta, que pode ser  
375 feita através da extração da parede celular das leveduras ou por meio de tratamentos com produtos químicos,  
376 com o objetivo de selecionar os componentes específicos que atuem na adsorção. De acordo com alguns  
377 relatos, pesquisas que usaram cepas tratadas termicamente ou com adição de ácidos, tiveram eficiência para  
378 remover 90% a 100% de AFB<sub>1</sub> (RASIC et al., 1991; SHAHIN, 2007).

379 Outra avaliação abordada nesta pesquisa foi em relação à contagem de leveduras nas rações que  
380 foram suplementadas. Observou-se que a contagem das leveduras no primeiro dia experimental, no 15° e 34°  
381 dia, permaneceu em  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup>. Este fato permite constatar que a refrigeração foi capaz de conservar a  
382 quantidade de cepas viáveis na ração, não havendo interferência deste fator nos tratamentos. Desta forma, os  
383 alevinos alimentados com os tratamentos T2 e T4 apresentaram contagem de leveduras no intestino de  $5,41 \pm$   
384  $1,62$  e  $5,22 \pm 0,87$  UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente, evidenciando que houve a colonização das leveduras no  
385 intestino dos alevinos que receberam a ração suplementada com *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 3). Nos  
386 demais tratamentos T1 e T3 não foram encontrados isolados de leveduras.

387 Esse resultado pode ser comparado aos estudos desenvolvidos por Jatobá et al. (2008), que  
388 encontraram contagens maiores de bactérias ácido-láticas ( $5,60$  e  $6,31$  log UFC mL<sup>-1</sup>) no intestino de tilápias  
389 alimentadas com rações suplementadas com  $1 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup> de *Lactobacillus* em comparação ao grupo  
390 controle ( $2,66$  log UFC mL<sup>-1</sup>). Segundo Gatesoupe (2008), a microbiota do intestino de organismos aquáticos  
391 varia de acordo com o ambiente, a escassez de nutrientes e o uso de cepas probióticas, corroborando com o  
392 que ocorreu nesta pesquisa, onde a microbiota intestinal foi influenciada pelas leveduras que foram  
393 adicionadas à ração. Por outro lado, Ohashi e Ushida (2009), afirmam que as leveduras não possuem  
394 capacidade de colonizar o trato gastrointestinal dos animais e, portanto, a administração na dieta deve ser  
395 contínua.

396 Após a contagem das colônias totais viáveis de leveduras nos intestinos dos alevinos, observou-se que  
397 as características macroscópicas e microscópicas das cepas eram semelhantes. Desta forma foram  
398 selecionados cinco colônias isoladas e através da reação de PCR utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>, constatou-se  
399 que todos os isolados apresentaram perfis moleculares iguais e ao serem comparados com uma cepa padrão  
400 de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram o mesmo padrão de bandas (Figura 1). Este resultado permite

401 comprovar que os intestinos dos tambaquis alimentados com dieta suplementada com *Saccharomyces*  
402 *cerevisiae* foram colonizados por esta cepa.

403 Os resultados desse estudo podem ser relacionados aos de Meurer et al. (2007), que utilizaram  
404 *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico em rações para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis*  
405 *niloticus*) e constataram que houve colonização desse micro-organismo no intestino dos peixes. Entretanto,  
406 esta colonização não foi suficiente para influenciar no desempenho produtivo e a sobrevivência neste sistema  
407 de cultivo com desafio sanitário. Contrariando os resultados obtidos neste experimento, Selim et al. (2014)  
408 encontraram efeitos significativos de adsorção de micotoxinas ao avaliarem o efeito de três adsorventes para  
409 reduzir os efeitos de AFB<sub>1</sub> em *Oreochromis niloticus*. Estes pesquisadores constataram que o grupo tratado  
410 com dieta contaminada de 200 ppb de AFB<sub>1</sub> e suplementados com 0,25% de *Saccharomyces cerevisiae*  
411 apresentou melhorias significativas nos parâmetros sanguíneos, de desempenho e estado imunológico, além  
412 de propiciar uma redução de AFB<sub>1</sub> residual na musculatura destes animais.

413 Apesar da suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* não ter apresentado efeito sobre os dados de  
414 desempenho e sanidade dos alevinos de tambaqui, ressalta-se a importância da realização de novos estudos  
415 com níveis maiores de inclusão dessas cepas nas dietas ou através da extração de componentes, como a  
416 parede celular da levedura. Ainda nesse sentido, pesquisas recomendam que a associação de diferentes tipos  
417 de micro-organismos permite uma maior disponibilidade dos pólos de ligação destes com a toxina. Dessa  
418 forma, verifica-se a importância de dar continuidade a esse tipo de investigação em busca de resultados mais  
419 eficazes, que permitam melhorias no desempenho e sanidade dos peixes.

## 420 CONCLUSÕES

421 A cepa A8L2 de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> foi capaz de colonizar o  
422 intestino dos alevinos de tambaqui, entretanto, sua inclusão associada com 100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> em rações  
423 não promoveu melhorias nos parâmetros de GPM, GCM, TCE, Fator K e histopatológicos desses animais.

## 424 AGRADECIMENTOS

425 Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) de Piripiri-PI pela doação dos  
426 alevinos e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Nasaré Bona de Alencar Araripe pela valiosa contribuição no  
427 desenvolvimento da parte experimental realizada no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura  
428 (LAPESPI/CCA/UFPI). Ao Laboratório de Solos (LASO/CCA/UFPI) pelo apoio na biologia molecular.

429

## 430 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

431 ANH TUAN, N.; GRIZZLE, J.M.; LOVELL, R.T. MANNING, B. B.; ROTTINGHAUS, G. E. Growth and  
432 hepatic lesions of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* fed diets containing aflatoxin B<sub>1</sub>. *Aquaculture*, v. 212,  
433 p. 311-319, 2002.

- 434  
435 AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*. 15. ed. Arlington, v. 2,  
436 cap. 49, p. 49-53, 1998.
- 437  
438 ARMANDO, M. R. PIZZOLITO, R. P.; ESCOBAR, F.; DOGI, C. A.; PEIRANO, M. S.; SALVANO, M.  
439 A.; SABINI, L. I.; COMBINA, M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. *Saccharomyces cerevisiae*  
440 strains from animal environment with in vitro aflatoxin B1 binding ability and anti-pathogenic bacterial  
441 influence. *World Mycotoxin Journal*, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.
- 442  
443 BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLORIA, E. M.; SALGADO, J. M.;  
444 VIZIOLI, M. R. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate  
445 aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p. 475-481, 2004.
- 446  
447 BOLOGNANI, F.; RUMNEY, C. J.; ROWLAND, I. R. Influence of carcinogen binding by lactic acid  
448 producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and*  
449 *Chemical Toxicology*, v. 35, p. 45-535, 1997.
- 450  
451 BOONYARATPALI, M.; SUPAMATTAYA, K.; VERAKUNPIRIYA, V.; SUPRASERT, D. Effects of  
452 aflatoxin B<sub>1</sub> on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in  
453 black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*). *Aquaculture Research*, v. 32, p. 388-398, 2001.
- 454  
455 BOYD, C. E. *Water quality management for ponds fish culture*. Development in aquaculture and fisheries  
456 science. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing 21 Company, 1990, 345p.
- 457  
458 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09 de  
459 novembro de 1988. Fixa padrões de tolerância para aflatoxinas em alimentos para consumo animal: matérias  
460 primas e rações. D.O.U., Brasília, DF, 1988. Seção I, p. 21.968.
- 461  
462 EL-NEZAMI, H. S.; SALMINEN, S.; SALMINEN, E.; HASKARD, C.; MYKKANEN, H. Lactic acid  
463 bacteria as a tool for enhancing food safety by removal of dietary toxins. In: SALMINEN, S. et al. *Lactic*  
464 *acid bacteria microbiological and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, 2004. Cap. 12, p.397-406.
- 465  
466 FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. *Yearbook of fishery statistics:*  
467 *summary tables*. FAO, Roma. Disponível em: <[www.fao.org](http://www.fao.org)> Acesso em: 02 jan. 2015.
- 468  
469 FERREIRA, A. H. C.; ALENCAR ARARIPE, M. N. B.; GUERRA, S. P. L.; LOPES, J. B.; ARARIPE, H.  
470 G. A.; ANDRADE, F. T.; SANTANA JÚNIOR, H. A. Anatomy of the digestive tract of tambatinga. *Revista*  
471 *Eletrônica Nutritime*, v. 10, p. 2501-2512, 2013.

- 472  
473 FULLER, R. Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, p. 365-378, 1989.
- 474 GARCÍA, A. R.; MARTINEZ, R. R.; ORDOÑEZ, J. B.; AVILA, E. *In vitro* binding ability of ochratoxin A  
475 by commercial mycotoxin binders available in Mexico. *Veterinaria México*, v. 35, p. 351-358, 2004.
- 476  
477 GATESOUBE, F. J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and  
478 probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.
- 479  
480 GOPINATH, R.; RAJ, R. P.; GEORGE, K. C.; SANIL, N. K. Ultrastructural changes in the hepatopancreas  
481 of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B<sub>1</sub> diets. *Aquaculture Research*, v. 43, p. 32-43, 2012.
- 482  
483 JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE NETO, C.; SILVA, C.B.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.;  
484 DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de  
485 tilapia-do-nilo como probióticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p.1201-1207, 2008.
- 486  
487 KELLER, K. M. *Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para*  
488 *aplicação na produção animal*. 2012. 168f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós-  
489 Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.
- 490  
491 KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, p. 713-  
492 722, 2007.
- 493  
494 KUBITZA, F. Micotoxinas e seus efeitos sobre os peixes. *Panorama da Aquicultura*, v. 20, p. 14-23, 2010.
- 495  
496 KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: conquistas e desafios. *Panorama da Aquicultura*, v. 25, n. 150, p. 10-  
497 23, 2015.
- 498  
499 KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- 500  
501 LEMKE, S. L.; OTTINGER, S. E.; MAYURA, K.; AKE, C. L.; PIMPUKDEE, K.; WANG, N.; PHILLIPS,  
502 T. D. Development of a multi-tiered approach to the *in vitro* prescreening of clay-based enterosorbents.  
503 *Animal Feed Science and Technology*, v. 93, p. 17-29, 2001.
- 504  
505 LOPES, P. R. S.; POUHEY, J. L. O. F.; ENKE, D. B. S.; MALLMAN, C. A.; KICH, H. A.; SOQUETTA, M.  
506 B. Utilização de adsorventes em rações contendo aflatoxina para alevinos de jundiá. *Revista Brasileira de*  
507 *Zootecnia*, v. 38, n. 4, p. 589-595, 2009.
- 508

- 509 LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3.ed. New  
510 York : McGraw Hill, 258p, 1968  
511
- 512 MAGNOLI A. P.; MONGE, M. P.; MIAZZO, R. D.; CAVAGLIERI, L. R.; MAGNOLI, C. E.; MERKIS, C.  
513 I.; CRISTOFOLINI, A. L.; DALCERO, A. M.; CHIACCHIERA, S. M. Effect of low levels of aflatoxin  
514 B<sub>1</sub> on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler liver tissues in the presence of  
515 monensin and sodium bentonite. *Poultry Science*, v. 90, p. 48–58, 2011.  
516
- 517 MAHFOUZ, M. E.; SHERIF, A. H. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on  
518 *Oreochromis niloticus* health status. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. v. 71, p. 48–59, 2015.  
519
- 520 MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. Critérios para seleção de um bom  
521 sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
522 AVÍCOLAS, 2006, Santos. *Anais...* Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 213-224,  
523 2006.  
524
- 525 MANNING, B. B.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Aflatoxins from moldy corn cause no reductions in  
526 channel catfish *Ictalurus punctatus* performance. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 36, n. 1, p.  
527 59-67, 2005.  
528
- 529 MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M.; FRECCIA, A.; MAUERWERK, M. T. *Saccharomyces*  
530 *cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-nilo submetidos a desafio sanitário. *Revista Brasileira*  
531 *de Zootecnia*, v. 36, n. 5, p. 1219-1224, 2007.  
532
- 533 NUNES, E. M. C. G. *Efeitos da aflatoxina B<sub>1</sub> no desempenho e sanidade de alevinos de tambaqui*  
534 *(Colossoma macropomum)*. 2014. 50f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Curso de Pós-Graduação em  
535 Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 2014.  
536
- 537 NUNES, E. M. C. G.; PEREIRA, M. M. G.; COSTA, A. P. R.; ROSA, C. A. R.; PEREYRA, C. M.;  
538 CALVET, R. M.; MARQUES, A. L. A.; CARDOSO FILHO, F. C.; MURATORI, M. C. S. Screening of  
539 aflatoxin B<sub>1</sub> and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. *Latin American*  
540 *Journal of Aquatic Research*, v. 43, p. 595-600, 2015.  
541
- 542 OHASHI, Y.; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science*  
543 *Journal*, v. 80, p. 361-371, 2009.  
544
- 545 PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Mycotoxins – prevention and decontamination by  
546 yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, v. 54, p. 1–14, 2015.

- 547  
548 PINHEIRO, R. E. E.; RODRIGUES, A. M. D.; RIBEIRO, M. N.; CAVALCANTE, D. H.; PEREYRA, C.  
549 M.; MURATORI, M. C. S. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. *Revista Eletrônica*  
550 *Nutritime*, v. 12, n. 5, p. 4268-4279, 2015.
- 551  
552 PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York: Springer, 2009.
- 553  
554 PIZZOLITTO, R. P.; BUENO, D. J.; ARMANDO, M. R.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.;  
555 SALVANO, M. A. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*: a  
556 useful model to determine the most efficient microorganism. In: GUEVARA-GONZALEZ, R. G. *Aflatoxins*  
557 *- Biochemistry and Molecular Biology*. InTech, 2011, p. 323-346.
- 558  
559 POLONI, V.; Dogi, C.; Pereyra, C. M.; Juri, M. G. F.; Kohler, P.; Rosa, C. A. R.; Dalcero, A. M.;  
560 Cavaglieri, L. R. Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different  
561 probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 32, n. 6,  
562 p. 970-976, 2015.
- 563  
564 RASIC, J.L.; SKRINJAR, M.; MARKOV, S. Decrease of aflatoxins B<sub>1</sub> in yoghurt and acidified milks.  
565 *Mycopathologia*, v. 9, p. 113-117, 1991.
- 566  
567 RIZKALLA, E. H.; ZAHRA, M. H.; DEAB, A.; FARAG, M. F. Hematological responsiveness of  
568 *Oreochromis aureus* to dietary aflatoxins contamination and the role of selenium and vitamin E. *Alexandria*  
569 *Journal of Veterinary Sciences*, v. 13, n. 4, p. 423–438, 1997.
- 570  
571 SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Influence of high dietary atocopherol intakes on specific immune  
572 response, nonspecific resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced  
573 immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, v.8, p.159-167,  
574 2002
- 575  
576 SAS. Statistical analysis systems user's guide: Version 9.0. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2002.
- 577  
578 SELIM, K. M.; EL-HOFY, H.; KHALIL, R. H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate  
579 aflatoxin B<sub>1</sub>-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, v. 22, p. 523–540, 2014.
- 580  
581 SHAHIN, A.A.M. Removal of aflatoxin B<sub>1</sub> from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria.  
582 *International Journal of Agriculture & Biology*, v. 9, p. 71-75, 2007.
- 583

- 584 TOLA, S.; BUREAU, D.P.; HOOFT, J.M.; BEAMISH, F. W. H.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.;
- 585 ENCARNAÇÃO, P.; PETKAM, R. Effects of wheat naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on
- 586 growth performance and selected health indices of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*).
- 587 *Toxins*, v. 7, p. 1929-1944, 2015.
- 588
- 589 TOMASEVIC-CANOVIC, M.; DAKOVIC, A.; ROTTINGHAUS, A. MATIJASEVIC, S.; DURICIC, M.
- 590 Surfactant modified zeolites – new efficient adsorbents for micotoxins. *Microporous and Mesoporous*
- 591 *Materials*, v. 61, p. 173-180, 2003.
- 592
- 593 TRUCKSESS, M. W.; STACK, M. E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R. H.; ROMER, T. R. Multifunctional
- 594 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,
- 595 almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC International*. v. 77,
- 596 p. 1512–1521, 1994.
- 597
- 598 ZYCHOWSKI, K.E.; HOFFMANN, A.R.; LY, H.J.; POHLENZ, C.; BUENTELLO, A.; ROMOSER, A.;
- 599 GATLIN, D.M.; PHILLIPS, T.D. The effect of aflatoxin-B1 on Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) and
- 600 assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. *Toxins*, v. 5, p. 1555–
- 601 1573, 2013.
- 602
- 603
- 604
- 605
- 606
- 607
- 608
- 609
- 610
- 611
- 612
- 613
- 614
- 615
- 616
- 617
- 618
- 619
- 620

621 **Tabela 1.** Desempenho de alevinos de tambaqui alimentados com aflatoxina B<sub>1</sub> (T3 e T4) e *Saccharomyces*  
 622 *cerevisiae* (T2 e T4) no período de 34 dias

Variáveis	Tratamentos				CV (%)
	T1	T2	T3	T4	
GPM (g)	16,40 <sup>a</sup>	14,41 <sup>ab</sup>	13,61 <sup>ab</sup>	13,12 <sup>b</sup>	9,32
GCM (mm)	49,82 <sup>a</sup>	48,83 <sup>a</sup>	48,40 <sup>a</sup>	47,83 <sup>a</sup>	5,69
TCE (%)	5,54 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>	5,09 <sup>a</sup>	4,98 <sup>a</sup>	6,62
Fator K	0,13 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	13,58

623 Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem pelo teste SNK (P<0,05)

624 T1 = Controle (0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T2 = (0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T3 = (100 µg  
 625 kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T4 = (100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura).

626 GPM = ganho de peso médio; GCM = ganho de comprimento médio; TCE = taxa de crescimento específico; fator K = fator de  
 627 condição de Fulton.

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644 **Tabela 2.** Alterações histopatológicas observadas em tecidos de alevinos de tambaquis alimentados com  
 645 aflatoxina B<sub>1</sub> (T3 e T4) e *Saccharomyces cerevisiae* (T2 e T4) aos 34 dias

Tratamento	Tecido	Alteração
T1	Muscular	Sem alteração perceptível - fibras normais, núcleos preservados
	Hepático	Hepatócitos preservados, vasos e conjuntivo normais
	Renal	Tecido renal com epitélios preservados e conjuntivo preservado, vasos e ductos sem alterações
T2	Muscular	Sem alteração perceptível - fibras normais, núcleos preservados
	Hepático	Discreta hiperemia e moderada vacuolização dos hepatócitos
	Renal	Discreta vacuolização das células epiteliais e oclusão da luz tubular; espaço de Bowman preservados
T3	Muscular	Sem alteração perceptível - fibras normais, vasos e tecido conjuntivo preservados
	Hepático	Moderada vacuolização citoplasmática e degeneração dos hepatócitos, hiperemia
	Renal	Moderada vacuolização das células epiteliais, oclusão da luz tubular e degeneração do epitélio, diminuição do espaço de Bowman
T4	Muscular	Sem alteração perceptível - fibras normais, vasos e tecido conjuntivo preservados
	Hepático	Moderada vacuolização citoplasmática e degeneração dos hepatócitos, elevada hiperemia
	Renal	Moderada vacuolização das células epiteliais e degeneração do epitélio, oclusão da luz tubular, diminuição do espaço de Bowman

646 T1 = Controle (0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T2 = (0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T3 = (100 µg  
 647 kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T4 = (100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura).

648

649

650

651 **Tabela 3.** Média e desvio padrão da contagem de leveduras da ração e do intestino de alevinos de tambaquis  
 652 alimentados com aflatoxina B<sub>1</sub> (T3 e T4) e *Saccharomyces cerevisiae* (T2 e T4) aos 34 dias

Variáveis	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Contagem de leveduras na ração (log UFC g <sup>-1</sup> )*	--	6,85 ± 0,12	--	6,67 ± 0,10
Contagem de leveduras no intestino (log UFC g <sup>-1</sup> )	--	5,41 ± 1,62	--	5,22 ± 0,87

653 T1 = Controle (0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T2 = (0,0 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T3 = (100 µg  
 654 kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 0,0 UFC g<sup>-1</sup> de levedura); T4 = (100 µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de levedura).

655 \* Média da contagem no final do período experimental (34º dia)

656 (--) Não apresentou contagem

657

658

659

660

661

662

663

664

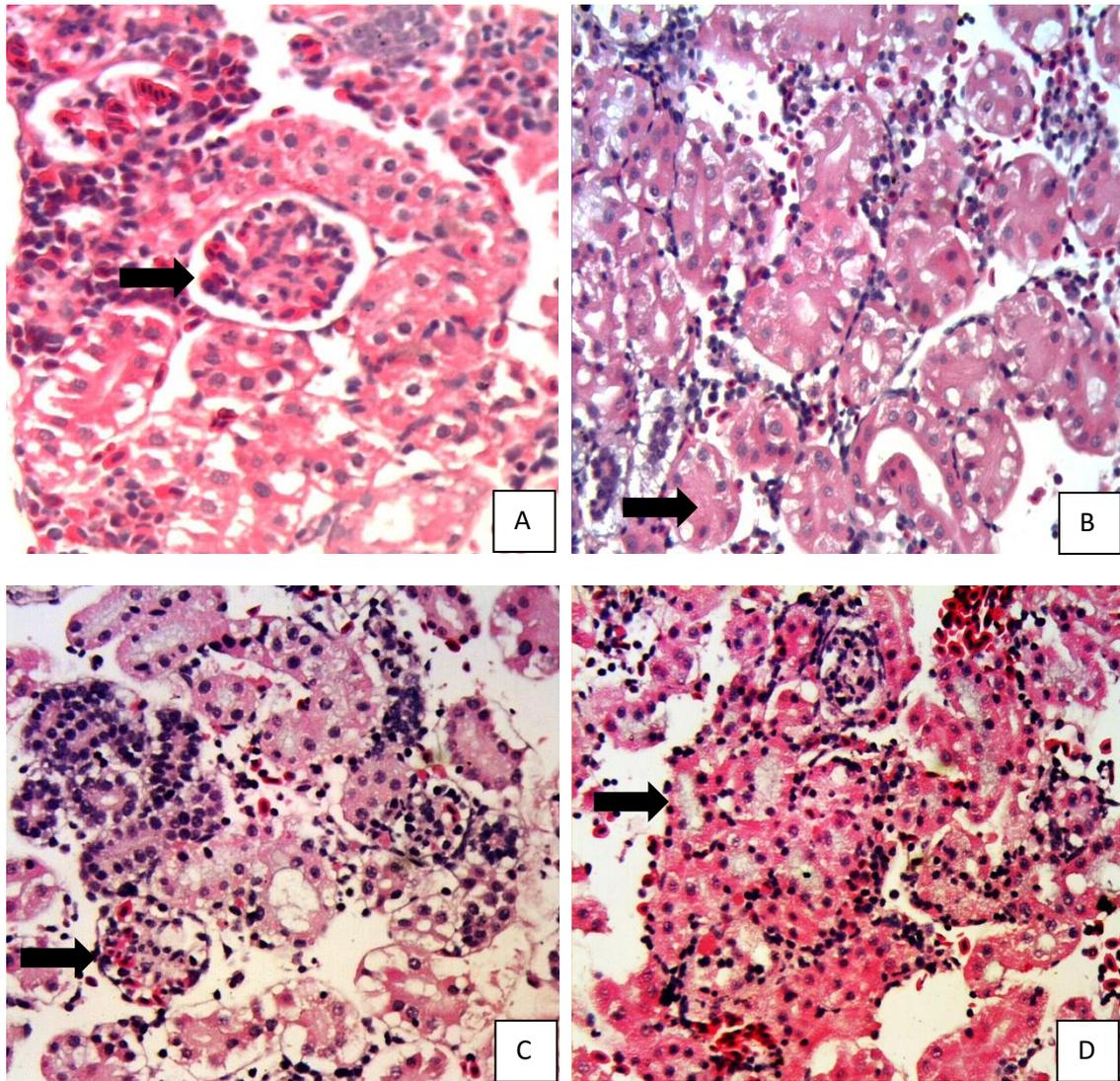
665

666

667

668

669



670

671

672 **Figura 1.** Fotomicrografia de tecido renal de alevino de tambaqui corada por H-E (aumento 40x).  
 673 (A) T1- Parênquima renal preservado; espaço de Bowman e tubular preservados; (B) T2- Discreta  
 674 vacuolização das células epiteliais e oclusão da luz tubular; (C) T3 - Moderada vacuolização das  
 675 células epiteliais, diminuição do espaço de Bowman e oclusão da luz tubular; (D) T4 - Moderada  
 676 vacuolização das células epiteliais e degeneração do epitélio.

677

678

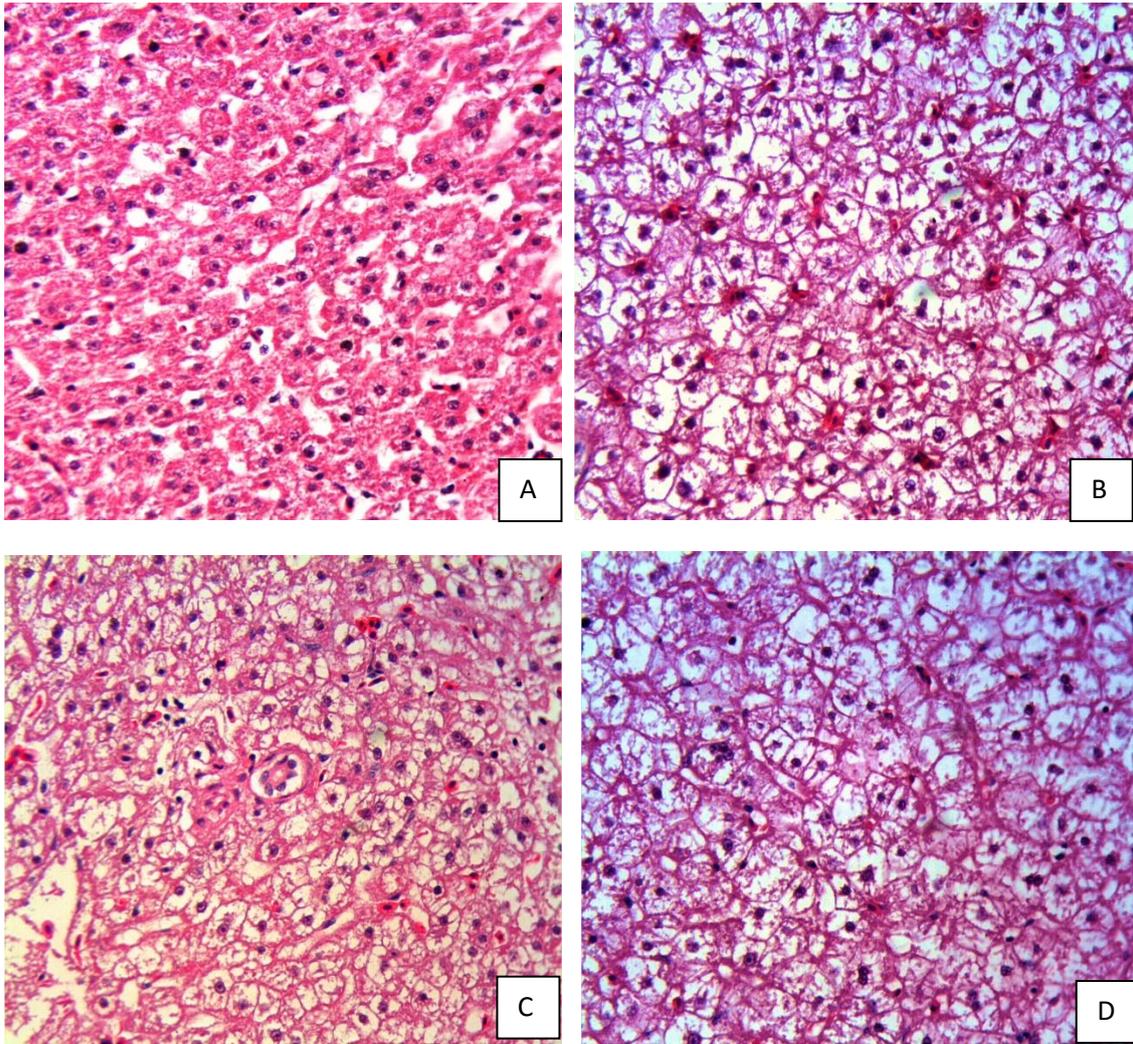
679

680

681

682

683



684

685

686 **Figura 2.** Fotomicrografia de tecido hepático de alevino de tambaqui corada por H-E (aumento  
687 40x). (A) T1- hepatócitos cordonais; (B) T2- moderada vacuolização; (C) T3 e (D) T4 - intensa  
688 vacuolização gordurosa, degeneração de hepatócitos.  
689

690

691

692

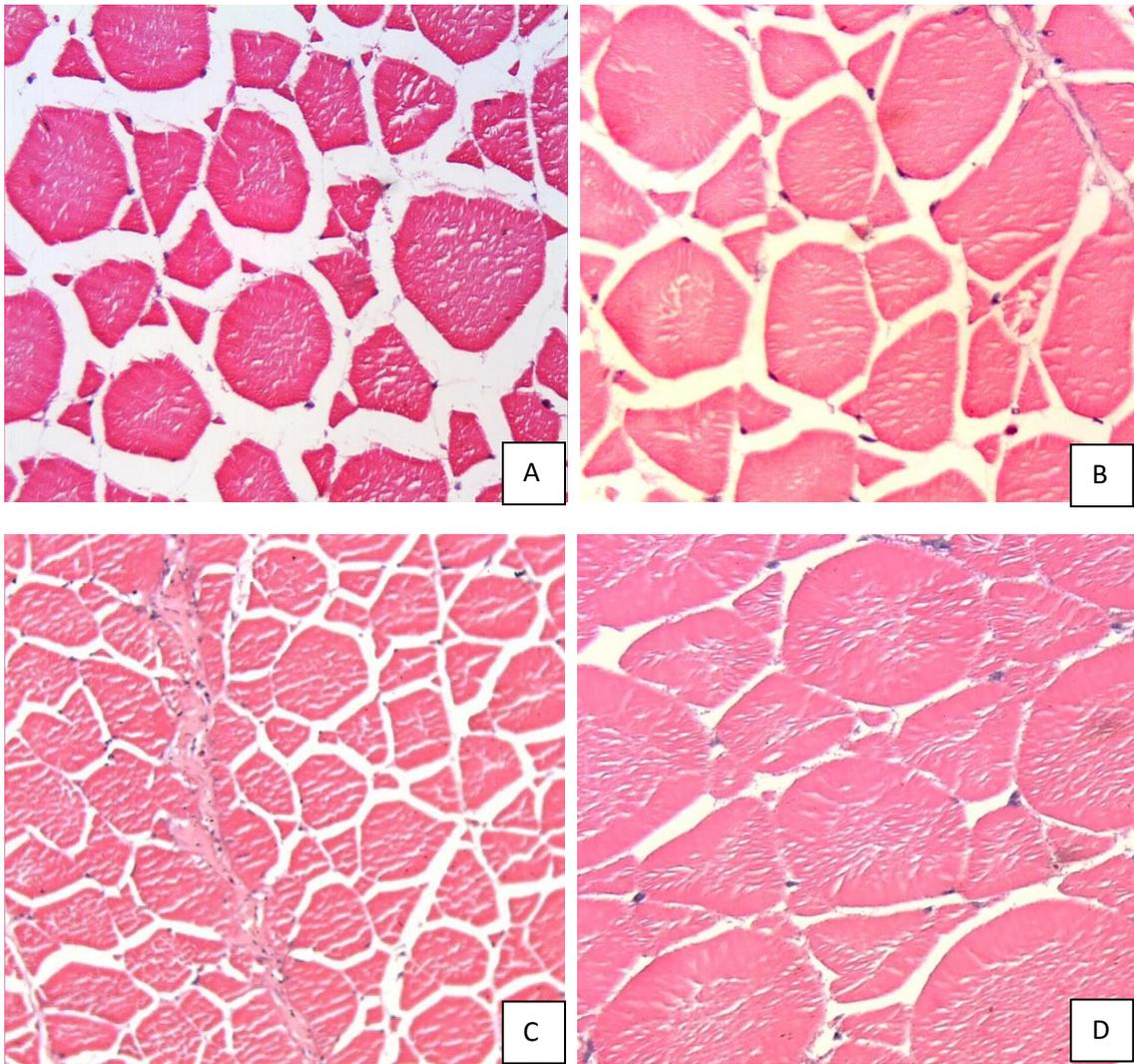
693

694

695

696

697



698

699

700 **Figura 3.** Fotomicrografia de tecido muscular de alevinos de tambaqui corada por H-E (aumento  
701 40x). (A)- T1; (B) - T2; (C) - T3 e (D) - T4. Tecido muscular com fibras preservadas e núcleos  
702 dispostos na periferia da célula com aspecto normal.

703

704

705

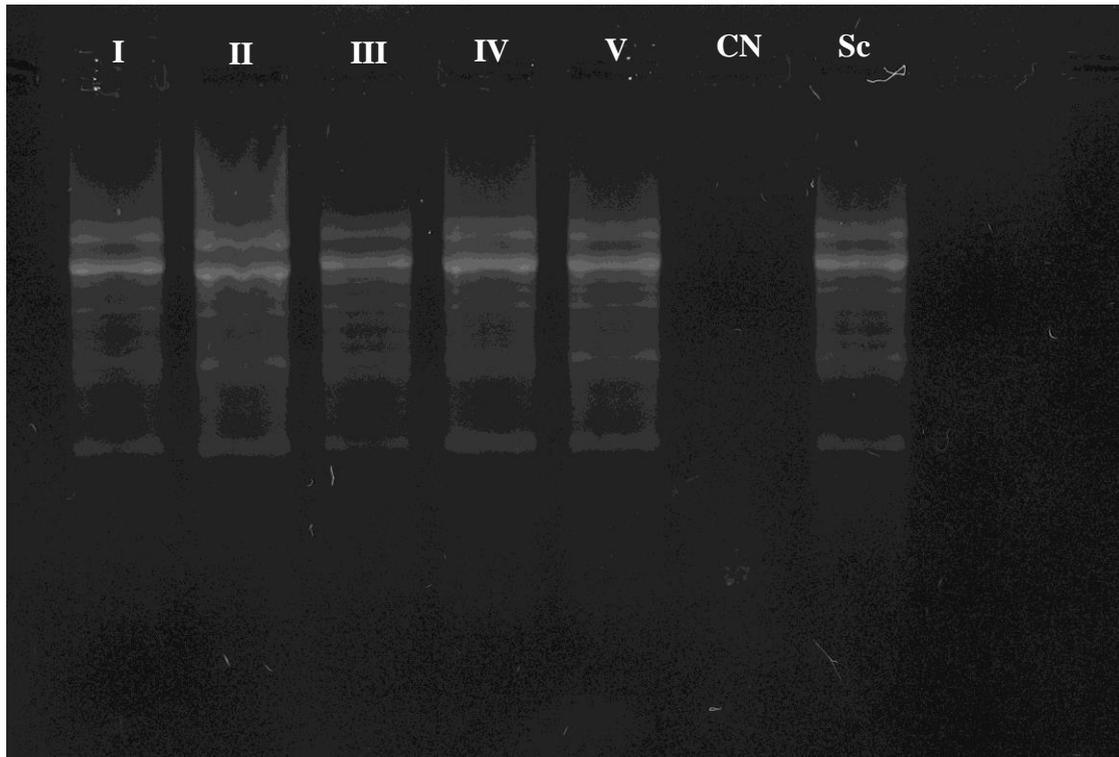
706

707

708

709

710



711

712 **Figura 4.** Perfil de bandas obtido com a reação de PCR utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>. Da esquerda para a  
713 direita: cepas de leveduras I, II, III, IV e V isoladas do intestino de tambaquis, (CN) controle negativo e (Sc)  
714 cepa padrão de *Saccharomyces cerevisiae*

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda existem poucos relatos sobre a diversidade microbiana nos ambientes aquícolas. Investigações que permitam a caracterização de leveduras na água, nos resíduos e no próprio animal que vive neste habitat, propiciam um melhor entendimento dos aspectos relacionados à sanidade animal. O isolamento de cepas nativas de ambientes de aquicultura, que sejam consideradas probióticas, permite a utilização destes compostos como aditivos naturais na alimentação das espécies que vivem neste local. Este tipo de suplementação pode gerar incremento nos parâmetros produtivos e na saúde dos animais.

Em paralelo a esta proposta, a utilização de cepas de leveduras provenientes de ambientes naturais, que tenham capacidade de detoxificação biológica é uma das alternativas para a redução dos níveis de micotoxinas em aquicultura. A atuação desses compostos sequestrando as toxinas no trato gastrointestinal e reduzindo a biodisponibilidade destas podem propiciar melhorias no cultivo. Entretanto, é necessário que fatores como a concentração dos microorganismos utilizados e o processo de inclusão da cepa na ração sejam estudados com frequência em busca de obter a melhor forma de inclusão nas dietas. Em estudos futuros, deve ser levado em consideração não somente a redução das micotoxinas, mas também que a substância empregada não cause produtos de degradação tóxica, não venha a reduzir o valor nutritivo dos alimentos tratados e nem tampouco prejudique a palatabilidade do alimento em relação à apreensão dos mesmos pelos animais.

Com base nos resultados dos testes *in vitro* desta pesquisa, constatou-se que as cepas de *S. cerevisiae* testadas possuem características desejáveis para atuarem como probióticos e capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>. No entanto, em estudos *in vivo* desenvolvidos com alevinos de tambaqui alimentados com dietas contaminadas com AFB<sub>1</sub> e suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* isolada de ambiente de piscicultura, não foram constatadas melhorias nos parâmetros de desempenho e sanidade desses animais.

Nesse sentido, ressalta-se que as avaliações *in vitro* simulando as condições presentes nos animais não inibem a necessidade de corroborar sua efetividade *in vivo*. As avaliações *in vitro* são de grande utilidade como métodos de pré-seleção e permitem obter uma ideia da afinidade pelas toxinas em um tempo relativamente curto e com um custo reduzido. Apesar do custo elevado e do trabalho, devem ser conduzidos experimentos *in vivo* com a espécie que se queira investigar o processo de adsorção de micotoxinas. É importante dar continuidade a esse tipo de investigação em busca de resultados mais eficazes que permitam melhorias no desempenho e sanidade dos peixes. Estudos desenvolvidos nesta temática são cada vez mais necessários para

complementar e apoiar de forma significativa os avanços na nutrição animal e melhorar nossa compreensão do papel benéfico da *Saccharomyces cerevisiae* e de outras leveduras na descontaminação de micotoxinas em alimentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Pesca e Aquicultura. **Plano de Desenvolvimento da aquicultura brasileira 2015/2020**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano\\_de\\_Desenvolvimento\\_da\\_Aquicultura-2015-2020.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Desenvolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf)>. Acesso em: 16 out. 2015.

CALVET, R. M. et al. Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, 2015.

CARDOSO FILHO, F. C. et al. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 305-311, 2013.

CAST. **Council for Agricultural Science and Technology**. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, 2003. Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA.

COSTA, L. F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, p. 01-06, 2004.

CUARÓN, J. A. I. La influencia de la levadura em la dieta, respuesta microbiológica antagonista. In: Simpósio sobre aditivos alternativos na nutrição animal, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA. 2000, p71-79.

DENLI, M.; PÉREZ, J. F. **Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención**. Avances en Nutrición y Alimentación Animal, XXII. Curso de Especialización FEDNA, Cilt I, 1-17, Barcelona, 2006.

DIAZ, D. E. et al. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, p. 233–241, 2004.

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

FAO. Food and Agriculture Organization. **World aquaculture production by culture environment. 2012**. Disponível em< <http://www.fao.org/fishery/statistics/es>> Acesso em: 02 fev. 2016.

FDA. Food and Drug Administration. **Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients>> Acesso em: 02 jan. 2016.

- FULLER, R. Probiotics in man and animal. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 370, p. 365-378, 1989.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147–165, 1999.
- GONÇALVES, L. U.; CARVALHO, M.; VIEGAS, E. M. M. Utilização de levedura íntegra e seus derivados em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1173-1179, 2010.
- GRAM, L. et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 969-9732, 1999.
- HISANO, H. et al. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v. 26, p. 171-179, 2004.
- HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S-373, 2001.
- HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179-188, 2001.
- JUODEIKIENE, G. et al. Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes. In BARTKIENE et al. **Structure and function of food engineering**. Rijeka: InTech, 2012. p. 171-204.
- KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 713-722, 2007.
- KUBITZA, F. Micotoxinas e seus efeitos sobre os peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 20, p. 14-23, 2010.
- LANE, M. M.; MORRISEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17 – 26, 2010.
- ŁAZICKA, K.; ORZECOVWSKI, S. The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. **Natural Science**, v. 2, p. 544-550, 2010.
- LAZZARI, R. et al. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 36, p. 240-246, 2006.
- LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W; **Biotecnologia Industrial**. Fundamentos. v. 1. São Paulo: Edgard Blucher, 1 ed., 2001, 254p.
- MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos, SP. **Anais...** Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p.213-224.

MATTAR, A.F. et al. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery International**, v. 17, p. 265-268, 2001.

MERRIFIELD, D. L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, p. 1-18, 2010.

MIRANDA, L. T. V. **Levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para lambaris-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)**. 2012. 48f. Dissertação (Biologia Animal) – Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

NAYAK, S. K. **Biology of eukaryotic probiotics**. Probiotics, Microbiology Monographs 21. p. 29–55 in M.T. Liong, *ed.* Probiotic biology, genetics and health aspects. *Springer*, Berlin, Heidelberg, 2011.

NIKOSKELANEN S.; SALMINEN S.; BYLUND G. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2430-2435, 2001.

NITTA, K.; KOBAYASHI, F. Brewer's yeast as health foodstuff. **New Foods Industry**, v. 41, p. 17–23, 1999.

NUNES, E. M. C. G. et al. Screening of aflatoxin B<sub>1</sub> and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, p. 595-600, 2015.

OHASHI, Y.; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 361-371, 2009.

PATRA, S. K.; MOHAMED, K. S. Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. **Aquaculture International**, v. 11, p. 505–514, 2003.

PEREYRA, C. M. et al. *In vitro* ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 1, p.25-28, 2015.

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.

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.

PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 1–14, 2015.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: UFV, 2011, 252p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

SANTOS, G. A. et al. **Mycotoxins in aquaculture: Occurrence in feeds components and impact on animal performance.** 2010. Avances em Nutrição Acuícola X - Memórias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, Novo León., México. p. 502-513.

SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 48-55, 2006.

SILVA, V. K. et al. Digestibilidade do extrato de leveduras em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 1969-1973, 2009.

SOUZA, R. B. et al. Utilização de leveduras de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) nas rações de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 8, n. 6, p. 1632-1646, 2011.

TSUKAHARA, T. et al. Stimulation of butyrate production in the large intestine piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. **Journal Nutritional Science and Vitaminology**, v. 49, p. 311-314, 2003.