

ELDO JOSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROBIÓTICAS E CAPACIDADE DE ADSORÇÃO
“*in vivo*” DE AFLATOXINA B₁ NA PISCICULTURA**

TERESINA, PI

2023

ELDO JOSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROBIÓTICAS E CAPACIDADE DE ADSORÇÃO
“*in vivo*” DE AFLATOXINA B₁ NA PISCICULTURA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori

**TERESINA-PI
2023**

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

S237o Santos, Eldo José Rodrigues dos.
Otimização de leveduras probióticas e capacidade de adsorção *in vivo*” de aflatoxina b1 na piscicultura / Eldo José Rodrigues dos Santos -- 2023.
84 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Teresina, 2023.

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

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Maltodextrina. 3. Micotoxinas. 4. *Oreochromis niloticus*. 5. Probióticos. I. Muratori, Maria Christina Sanches. II. Título.

CDD 639.3


Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**OTIMIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROBIÓTICAS E CAPACIDADE DE
ADSORÇÃO "IN VIVO" DE AFLATOXINA B1 NA PISCICULTURA**

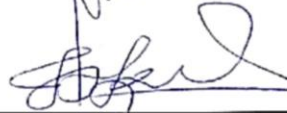
ELDO JOSE RODRIGUES DOS SANTOS

Tese aprovada em: 18/08/2023

Banca Examinadora:




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



Prof. Dr. João Batista Lopes (Interno) / DZO/CCA/UFPI



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



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



Prof. Dr. Thiago Vinicius Costa Nascimento (Externo) / UFS

DEDICATÓRIA

À minha família

em especial meus pais.

À minha esposa, pela paciência.

Por tudo que vocês fizeram por mim

Com muita gratidão

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pelo amor incondicional, pela sabedoria, por me abençoar e iluminar durante esta jornada.

Aos meus pais, José Rodrigues dos Santos e Maria dos Anjos Pimentel dos Santos, pelo carinho, respeito, paciência e compreensão para alcançar meus objetivos na busca de conhecimentos para transformação de um mundo melhor.

A todos os irmãos Manoel Rodrigues dos Santos, Diomedes Rodrigues dos Santos, Manoel Batista Rodrigues dos Santos, Antônio José Rodrigues dos Santos, Elson Rodrigues dos Santos e Emerson Rodrigues dos Santos, pelo contínuo incentivo e apoio nesta caminhada.

Ao meu avô Elói Rodrigues dos Santos, (*in memoriam*), por ter me ensinado a ser uma pessoa honesta e humilde, meu eterno obrigado.

Agradeço em especial, minha esposa Marluce Pereira Damasceno Lima, pelo carinho, respeito, amor, companheirismo e principalmente pela compreensão mesmo à distância e segurar firme no cuidado e educação de nosso filho (Eduardo Lima Rodrigues) muito obrigado meu amor.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori, pela oportunidade de fazer parte dessa família maravilhosa, pelos ensinamentos, orientação, amizade, e motivação, mesmo nos momentos mais difíceis para superação dos obstáculos, meu muito obrigado.

A toda família de minha esposa, em especial minha sogra, Maria da Cruz Pereira Abade Lima, que sempre esteve na torcida e no incentivo para alcançar meus objetivos, meu muito obrigado.

A todos os membros da banca examinadora pelas correções e propostas sugeridas para finalização da tese de forma concreta e com qualidade.

Ao Grupo do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), João Farias de Sousa Junior, Cristiane Evangelista Lima, José Humberto Santos Filho, Rafael Gomes Abreu Bacelar, Maria da Penha Silva do Nascimento, Victor Luan Ferreira Torres, Aloisio Saraiva de Barros Júnior, Naira Soares e Silva e aos demais pelo companheirismo e amizade de todos.

Ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) através da professora Maria das Graças Freire de Medeiros e professor Stanley Juan Chavez pelo apoio e colaboração no microencapsulamento das leveduras por *spray-dryer* e ao amigo Márcio dos Santos Rocha, pela disponibilidade em cooperar na operação e manutenção do equipamento (*spray-dryer*).

Ao laboratório de Patologia Animal/CCA/UFPI, principalmente à residente Lais que auxiliou no processo de centrifugação das leveduras para serem utilizadas no microencapsulamento.

Ao laboratório de morfofisiologia humano em nome do professor Airton Mendes conde Júnior no auxílio para o processamento histológico das lâminas de fígado e rim de peixes.

Ao laboratório de morfofisiologia veterinária, na pessoa do professor Amilton Paulo Raposo Costa, na colaboração pela utilização de centrifuga para serem utilizadas no processo de microencapsulação, muito grato pela parceria.

Ao laboratório de fisiopatologia da reprodução, em nome do professor Ney Rômulo de Oliveira Paula, pelo apoio e parceria na utilização do espectrofotômetro na avaliação de leveduras probióticas em testes *in vitro*.

A toda equipe do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Lusmarina, Sr. Francisco, Sr. Aminthas, Dona Nasaré, Dona Socorro, Edna e George Emanuel pelo apoio em todos esses anos.

Aos colegas residentes, pelo apoio e momentos de descontração no dia-a-dia do laboratório, muito grato a todos.

Aos bolsistas de iniciação científica, Breno Oliveira Ferreira, Érika Ribeiro Barbosa, Maxwell Jhonata da Silva Martins e Pérola que participaram na realização deste trabalho.

A minha querida amiga Luciana da Silva Bastos, que sempre esteve me apoiando nessa jornada acadêmica e sempre disposta a ajudar no que preciso, meu muito obrigado.

A todos os meus amigos do doutorado em Ciência Animal por compartilharam os momentos de alegria, dificuldades, angústias e por proporcionarem momentos inesquecíveis durante esse período.

À Universidade Federal do Piauí, por contribuir e proporcionar tantas oportunidades de qualificação em minha vida acadêmica desde o ensino técnico até o doutorado, foi essencial para formação científica e conhecimentos de vida.

Ao apoio financeiro da CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante todo esse período doutorado que foi essencial para minha manutenção no mundo da pesquisa.

A todos os funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/CCA/UFPI, pelas informações e disponibilidade quando solicitadas.

Para finalizar, gostaria de agradecer os demais amigos que contribuíram de forma direta ou indireta nesta jornada e sempre torceram pelo meu sucesso, deixo meu obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Micro-Organismos Probióticos.....	17
2.2 Capacidade probiótica de leveduras.....	18
2.3 Parede celular de levedura	20
2.4 Atividade antimicotoxigênica das leveduras	22
2.4.1 Adsorção de aflatoxina B1.....	24
2.4.2 Encapsulamento de leveduras para adsorção de aflatoxina B1	26
CAPÍTULO I - VIABILIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B1 PELA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8L3 ISOLADA DE AMBIENTE DE PISCICULTURA	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Testes probióticos <i>in vitro</i>	32
2.2 Capacidade de autoagregação e co-agregação da levedura	32
2.3 Inibição de micro-organismos patogênicos	34
2.4 Tolerância simulada das condições de pH baixo e aos sais biliares	34
2.5 Teste de adsorção de AFB1	35
2.6 Análise estatística	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4. CONCLUSÃO	40
5. REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO 2 - ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B1 POR <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MICROENCAPSULADA COM MALTODEXTRINA: EFEITO NO DESEMPENHO E SANIDADE DE TILÁPIA-DO-NILO	44
RESUMO	45
ADSORPTION OF AFLATOXIN B1 BY <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MICROENCAPSULATED WITH MALTODEXTRIN: EFFECT ON THE PERFORMANCE AND HEALTH OF NILE TILAPIA	46
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Local e instalações	49
2.2 Delineamento experimental	49
2.3 Dietas experimentais	50
2.3.1 Preparo das microcápsulas de leveduras	50
2.3.2 Produção de núcleos de AFB1	50
2.3.3 Detecção de micotoxinas nas rações comerciais de peixes	51
2.3.4 Ajustes das dosagens de AFB1 e leveduras para incorporação nas rações	52
2.3.5 Acondicionamento das dietas experimentais	52
2.3.6 Animais	52
2.4 Parâmetros analisados	53
2.4.1 Acompanhamento da qualidade da água	53
2.4.2 Desempenho zootécnico	53
2.4.3 Contagem e isolamento das leveduras no intestino	54
2.4.4 Detecção de resíduos de aflatoxinas nos órgãos	54
2.4.5 Estudo histopatológico	55
2.5 Análise Estatística	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS	68
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7. LITERATURA CITADA	77

LISTA DE FIGURAS

	pág.
REFERENCIAL TEÓRICO	
Figura 1. Adsorção de micotoxinas na parede celular de leveduras.....	23
Figura 2. Composição química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ e M ₂	25
CAPÍTULO 2. Adsorção de aflatoxina B1 por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> microencapsulada com maltodextrina: efeito no desempenho e sanidade de tilápia-do-Nilo	
Figura 1. Fotomicrografias de tecido hepático de alevinos de tilápia.....	63
Figura 2. Fotomicrografias de tecido renal de alevinos de tilápia.....	65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - VIABILIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B1 PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 ISOLADA DE AMBIENTE DE PISCICULTURA

Tabela 1. Capacidade probiótica da cepa <i>S. cerevisiae</i> A8L3 para coagregação e atividade antimicrobiana para os micro-organismos testados.....	37
Tabela 2. Tolerância ao pH baixo (pH 2,0) e com sais biliares (pH 7,0) sobre a viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> A8L3 por um período de 12 horas.....	39
Tabela 3. Adsorção (%) na concentração de 25 e 50 ng mL ⁻¹ de AFB1 pela cepa de <i>S. cerevisiae</i> A8L3 isolada de ambiente de piscicultura	40
Tabela 1. Tratamentos experimentais da alimentação de alevinos de tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) testados com diferentes níveis de aflatoxina B1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e maltodextrina.....	49
Tabela 2. Composição química da ração comercial para peixes onívoros e dos demais ingredientes utilizados para formulação dos tratamentos das dietas experimentais fornecidas para fase de alevinagem.....	51
Tabela 3. Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água das caixas de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB1, <i>S. cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada e maltodextrina durante o período de 45 dias.....	56
Tabela 4. Médias e desvio padrão do desempenho zootécnico de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB1, <i>S. cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada e maltodextrina no período de 45 dias	59
Tabela 5. Médias e desvio padrão da contagem de leveduras da ração e do intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo <i>S. cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada no período de 45 dias.....	62
Tabela 6. Média e desvio padrão de detecção de aflatoxinas nos órgãos de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo aflatoxina B1, <i>S. cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada e maltodextrina no período de 45 dias.....	63

OTIMIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROBIÓTICAS E CAPACIDADE DE ADSORÇÃO “*in vivo*” DE AFLATOXINA B₁ NA PISCICULTURA

RESUMO

As micotoxinas são compostos tóxicos resultantes do metabolismo secundário de fungos nos mais variados substratos, inclusive na ração animal. A detoxificação biológica realizada por bactérias e leveduras com propriedades probióticas constitui alternativa promissora para controle de micotoxinas. Estes micro-organismos, quando adicionados aos alimentos contaminados são capazes de adsorver micotoxinas. Com esse trabalho, objetivou-se verificar se a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolada de viveiros de piscicultura apresenta capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1 em testes *in vitro*, bem como avaliar se a adsorção de aflatoxina B1 por *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 é potencializada pelo microencapsulamento com maltodextrina e analisar se esse processo favorece o desempenho e sanidade de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A levedura *S. cerevisiae* A8L3 foi submetida aos testes de capacidade probiótica de autoagregação e coagregação, inibição de micro-organismos patogênicos e tolerância simulada das condições de pH do estômago (pH 2,0) e do intestino (pH 7,0) de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), além de testes adsorventes de aflatoxina B1. Para os testes *in vivo* o preparo das microcápsulas foi utilizado a técnica por *spray dryer* utilizando-se a cepa de *S. cerevisiae* A8L3, após teste *in vitro* da capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1. O experimento *in vivo* foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura seguindo delineamento em blocos ao acaso, representado por oito tratamentos e quatro repetições. Foram avaliados os seguintes parâmetros: qualidade da água, desempenho zootécnico, contagem de leveduras da ração e do intestino, determinação da concentração de aflatoxina B1 e histopatológico de fígado e rim. Nos testes *in vitro* ficou evidenciado que, a cepa A8L3 atende os requisitos analisados para ser utilizada em formulação de dietas para uso em ensaios *in vivo* na piscicultura. A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina possui capacidade probiótica *in vivo*, por ser capaz de colonizar-se no intestino de alevinos de tilápia e manter-se viável em quantidades desejáveis no lume intestinal. A *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 introduzida em ração contaminada com 100 µg/kg de AFB1 adsorve essa micotoxina, promove efeito sanitário significativo por preservar as lesões hepáticas e renais.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; maltodextrina; Micotoxinas; *Oreochromis niloticus*; Probióticos

OPTIMIZATION OF PROBIOTIC YEAST AND “*in vivo*” ADSORPTION CAPACITY OF AFLATOXIN B1 IN FISH FARMING

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic compounds resulting from the secondary metabolism of fungi in the most varied substrates, including animal feed. Biological detoxification carried out by bacteria and yeast with probiotic properties is a promising alternative for controlling mycotoxins. These microorganisms, when added to contaminated food, are capable of adsorbing mycotoxins. This work aimed to verify whether the *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 yeast strain isolated from fish farms has probiotic and aflatoxin B1 adsorbing capacity *in vitro* tests, as well as evaluating whether the adsorption of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 is enhanced by microencapsulation with maltodextrin and analyze whether this process favors the performance and health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. The yeast *S. cerevisiae* A8L3 was subjected to tests of probiotic capacity for self-aggregation and co-aggregation, inhibition of pathogenic microorganisms and simulated tolerance of pH conditions in the stomach (pH 2.0) and intestine (pH 7.0) of tilapia -of the Nile (*Oreochromis niloticus*), in addition to aflatoxin B1 adsorbent tests. For *in vivo* tests, the preparation of microcapsules was used using the spray dryer technique using the *S. cerevisiae* A8L3 strain, after *in vitro* testing of the probiotic and aflatoxin B1 adsorbent capacity. The *in vivo* experiment was carried out at the Fish Farming Research Laboratory following a randomized block design, represented by eight treatments and four replications. The following parameters were evaluated: water quality, zootechnical performance, yeast count in feed and intestine, determination of aflatoxin B1 concentration and liver and kidney histopathology. *In vitro* tests it was evident that the A8L3 strain meets the analyzed requirements to be used in formulating diets for use *in vivo* tests in fish farming. The *S. cerevisiae* A8L3 strain microencapsulated with maltodextrin has probiotic capacity *in vivo*, as it is capable of colonizing in the intestine of tilapia fry and remaining viable in desirable quantities in the intestinal lumen. *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 introduced into feed contaminated with 100 µg/kg of AFB1 adsorbs this mycotoxin, promoting a significant health effect by preserving liver and kidney damage.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; maltodextrin; Mycotoxins; *Oreochromis niloticus*; probiotics.

1. INTRODUÇÃO

O mercado pesqueiro vem crescendo na busca por melhorias e tecnologias aplicadas à produção de pescado. No cenário das pesquisas com essa temática, tem se destacado a grande procura por nutrição, bem-estar e sanidade destes animais que serão fontes de alimentos saudáveis para a população (BOER; AIKING, 2022). Neste sentido, há uma crescente demanda global para o consumo de peixes, principalmente em observância aos sistemas de produção mais sustentáveis (ZANDER; FEUCHT, 2017; HÖTZEL; VANDRESEN, 2022).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil ocupa a 13ª posição com relação a produção de peixes em cativeiro, e a 8ª quando se trata de peixes de água doce (FAO 2022). De acordo com os dados do Anuário Brasileiro da Piscicultura, a piscicultura no Brasil obteve crescimento de 45,7% em oito anos, equivalente ao aumento médio de 5,7% ao ano, e atingiu uma produção de 841.005 toneladas no ano de 2021, representando o maior índice de todas as proteínas animais no país (PEIXE BR, 2022).

No que se refere a espécie, A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a quarta espécie mais produzida no mundo, e lidera a produção nacional, representando aproximadamente 63,5% de toda a cadeia produtiva (FAO, 2022; PEIXE BR, 2022). A tilápia possui grande destaque no que se refere adaptação de cultivo e manejo alimentar, é muito apreciada na culinária do Nordeste, por todas as faixas etárias.

No contexto desta crescente demanda por pescados de alta qualidade e consequente aumento da produção de peixes, a piscicultura vem buscando novos caminhos que incluem, alternativamente, a produção em cativeiro, o que pode desencadear o aparecimento de enfermidades que afetam a produtividade. O principal gargalo da piscicultura é a nutrição desses animais que, algumas vezes, recebem rações mal armazenadas, expostas a umidade e luz solar, ou com adição de ingredientes de baixa qualidade. Os componentes dessas rações podem conter substratos que facilitam o desenvolvimento de micro-organismos, como fungos que podem produzir metabólitos denominados micotoxinas (GOMES *et al.*, 2021; EL-SAYED *et al.*, 2022; MARQUEZONI *et al.*, 2022).

As micotoxinas são compostos tóxicos resultantes do metabolismo secundário de fungos em variedade de substratos. Uma vez presente nos alimentos, esses metabólitos apresentam risco potencial à saúde humana e animal (FURIAN *et al.*, 2022). Os gêneros

fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* são os mais frequentemente encontrados e os maiores produtores de micotoxinas (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2020; HAMMOOD; AL-NAZZAL, 2020).

A contaminação por fungos micotoxigênicos pode ocorrer em qualquer momento durante a produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento de grãos. Os principais fatores que propiciam o crescimento dos fungos toxigênicos são as condições de umidade e temperatura relacionadas à armazenagem (DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019).

As aflatoxinas são os metabólitos mais conhecidos e estudados, sendo produzidas, principalmente, pelos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nominus*, *Aspergillus tamaris* e *Aspergillus pseudotamaris* ao contaminar rações animais produzidas a partir de grãos infectados (BALDISSERA *et al.*, 2018; PICKOVA *et al.*, 2020). São extremamente hepatotóxicas, teratogênicas e cancerígenas em certos animais, há uma forte ligação epidemiológica entre a ingestão de aflatoxina e o carcinoma hepatocelular em seres humanos (BENKERROUM, 2020; HUA *et al.*, 2021; SINGH; GUPTA; GUPTA, 2021).

Dessa forma, alimentos prontos como rações, necessitam de acompanhamento eficaz, como forma de prevenir o surgimento de micotoxicoses na produção animal, a fim de minimizar as perdas e diminuir os riscos para os seres humanos (DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2020).

Várias estratégias de controle têm sido desenvolvidas, tais como: prevenção da contaminação e do crescimento fúngico, descontaminação de alimentos que contenham micotoxinas e ainda, inibição ou a adsorção no trato gastrointestinal de micotoxinas presentes no alimento consumido. Dentre estas, a melhor forma de controle das micotoxinas baseia-se na utilização de condições desfavoráveis para o desenvolvimento de fungos. Caso este controle não seja eficiente, podem ser utilizados procedimentos físicos, químicos e biológicos que propiciem redução de contaminantes tóxicos nos alimentos (PATRIARCA; PINTO, 2017; SIPOS *et al.*, 2021). De forma mais específica, o controle biológico de micotoxinas se refere à detoxificação realizada por micro-organismos probióticos, como bactérias e leveduras, que adicionados aos alimentos contaminados são capazes de adsorver micotoxinas (MUHIALDIN; SAARI; HUSSIN, 2020).

Entre os agentes biológicos que podem ser utilizados para remoção de micotoxinas, as leveduras possuem vantagens em relação a outros micro-organismos pela capacidade de assimilar grande variedade de substratos, facilidade na extração de sua biomassa e alta

velocidade de crescimento (WACHOWSKA *et al.*, 2022; WEAVER, 2022). O uso da parede celular com esta finalidade está relacionado com a sua capacidade de adsorção de micotoxinas, com boa relação custo-benefício, assim provocando um impacto econômico significativo na produção animal, uma vez que parede celular desses micro-organismos pode ser utilizada em alimentos para animais e reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas e os seus efeitos tóxicos (TUPPIA *et al.*, 2017; CARUSO *et al.*, 2022).

Para que esses agentes biológicos (leveduras probióticas) atinja seu objetivo e potencialize seu poder de ação, é necessário o uso de métodos eficazes que atuem na proteção contra ambientes agressivos como a trato gastrointestinal de peixes. A técnica de microencapsulamento de leveduras com agentes encapsulante como a maltodextrina é uma forma de manter a sua viabilidade e características benéficas até o momento do consumo do alimento adicionado. Visando a empregabilidade das leveduras como complemento alimentar de peixes, o estudo sobre os efeitos da inclusão de leveduras microencapsulada em rações contaminadas com aflatoxina B₁ é de fundamental importância para a adsorção de micotoxinas e melhorar o desempenho e sanidade na piscicultura.

Nesse contexto, as leveduras poderão ser utilizadas para fins biotecnológicos, especialmente na produção de peixes. Portanto, com essa pesquisa objetivou-se: a) testar se a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 possui capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B₁ em testes *in vitro*; b) testar se a maltodextrina associada à cepa *S. cerevisiae* A8L3 otimiza a capacidade probiótica em testes *in vivo* c) verificar se a levedura *S. cerevisiae* A8L3 com maltodextrina adsorve aflatoxina B₁ na ração durante testes *in vivo* com tilápia-do-Nilo; d) verificar se os efeitos relacionados com inclusão da cepa *S. cerevisiae* A8L3 com maltodextrina em rações contaminadas com aflatoxina B₁ interfere nos parâmetros zootécnicos e sanitários de tilápia-do-Nilo; e) verificar se as diferentes concentrações de aflatoxina B₁ acrescentadas à ração favorecem o aumento de lesões hepáticas e renais por meio de exame histopatológico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Micro-Organismos Probióticos

O termo probiótico foi introduzido por Lilley e Stillwell, em 1965, sendo descrito como “substância produzida por um micro-organismo que estimula o crescimento de outro micro-organismo”. em 1974, Richard Parker definiu probiótico como “organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal”, enquanto Fuller, em 1989, modificou este conceito, introduzindo nova definição, que seria “suplemento alimentar constituído de micro-organismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal”. Essa definição foi ampliada para outras microbiotas do corpo, além da intestinal, ao considerar que “probiótico é uma preparação com micro-organismos vivos que aplicada a homens ou animais, afeta benéficamente seu hospedeiro melhorando as propriedades da sua microbiota endógena” (SALMINEM *et al.*, 1999 *apud* DAWOOD *et al.*, 2019).

A definição de probiótico mais aceita diz que o termo se refere a “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro” (CASELLI *et al.*, 2013; HILL *et al.*, 2014).

Os probióticos agem como reguladores do sistema digestório, pois proporcionam benefícios aos homens e aos animais por meio da inibição de patógenos, bem como atuando como antígenos, potencializando a resposta imune do hospedeiro, além da regulação da fisiologia digestiva, fornecendo vitaminas e fontes energéticas (DAS *et al.*, 2022). Podem atuar no organismo por diferentes mecanismos de ação, como competição pelo sítio de adesão; produção de metabólitos com atividade antimicrobiana; neutralização dos compostos indesejáveis, a exemplo de enterotoxinas, amônia e aminas biogênicas tóxicas; alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; indução da imunidade pelo estímulo à atividade de linfócitos e macrófagos (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018; KERRY *et al.*, 2018)

As aplicações terapêuticas atribuídas ao uso de culturas probióticas são: promoção do crescimento; controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; redução dos efeitos colaterais causados por antibióticos; estímulo do sistema imunológico; aumento da resistência a infecções gastrointestinais; auxílio na digestão da lactose; prevenção da diarreia; auxílio na constipação; aumento na absorção de minerais; síntese de vitaminas; produção de fatores antimicrobianos e anticancerígenos; redução da incidência de

tumores intestinais; estímulo da redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos; e prevenção de infecções urogenitais (AL-KHALAIFAH HS, *et al.* 2020; KERRY *et al.*, 2018; ZOUMPOPOULOU *et al.*, 2017).

A escolha do micro-organismo a ser utilizado em determinado produto como probiótico depende de fatores como a segurança de utilização, o que implica no uso de linhagens não patogênicas e/ou toxigênicas, além de não possuírem plasmídeos de resistência a antibióticos e a vírus; resistência a pH ácido, enzimas pancreáticas e bile para manter-se viável durante o trânsito até o intestino (PEREIRA *et al.*, 2018).

A capacidade de resistência a condições estressantes do sistema digestivo, também, é um fator importante a ser considerado. Micro-organismos probióticos podem se multiplicar e aderir no intestino, colonizando-o e produzindo ácidos orgânicos e outros compostos biologicamente ativos *in situ*, para combater ou eliminar patógenos (ZOUMPOPOULOU *et al.*, 2017). Goodarzi (2016) coloca ainda como fator importante a resistência à processos industriais de produção em larga escala. Um probiótico comercializado deve manter a viabilidade sob condições normais de estocagem para estar ativo no alimento carreador antes do consumo para permanecer estável até o final da vida comercial do produto.

Os micro-organismos mais comumente utilizados em preparações probióticas são bactérias *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Bacillus* sp., bactérias ácido-lácticas, bacteriófagos, algas unicelulares e leveduras, como as do gênero *Saccharomyces* (AMENYOGBE *et al.*, 2020; KHADEMZADE *et al.*, 2020). Esta última, tem sido a levedura de escolha utilizada como micro-organismo probiótico na aquicultura, melhorando as taxas de sobrevivência em cultivos com baixa salinidade, auxiliando a resposta à múltiplos fatores causadores de estresse e atuando no sistema imunológico dos animais cultivados (MARTINEZ-ANTONIO *et al.*, 2019; RINGO *et al.*, 2020).

2.2 Capacidade probiótica de leveduras

Leveduras são seres predominantemente anaeróbios facultativas, eucarióticos e ubíquos, podendo ser encontradas no ar, solos, água, vegetais e animais (TLEIS; YU *et al.*, 2011; SĘDZIELEWSKA *et al.*, 2012; VERBEEK, 2015). Podem ser definidas como fungos de crescimento unicelular com reprodução predominantemente assexuada, por fissão ou brotamento, não formando corpos de frutificação. As principais características celulares desses micro-organismos são: presença de parede celular rígida, formada por polissacarídeos

do grupo dos glucanos e mananoproteínas, ausência de mobilidade, reprodução sexuada e assexuada e ausência de clorofila (KURTZMAN, FELL; BOEKHOUT, 2011).

São organismos heterotróficos que apresentam grande diversidade fisiológica e bioquímica. Em geral necessitam de quantidades significativas de carbono orgânico como fonte de energia e minerais para compor a maioria dos constituintes celulares (LACHANCE; STARMER, 1998). O tamanho reduzido das células de leveduras resulta em alta relação de superfície/volume, o que favorece a rápida aquisição de nutrientes essenciais. Além disso, podem tolerar amplas faixas de pH e muitas vezes são encontradas em substratos muito ácidos, onde a maioria das bactérias não são capazes de competir (STARMER; LACHANCE, 2011). Elas podem desenvolver-se até mesmo em superfícies lisas e inertes, sendo capazes de formar pseudo-hifas ou hifas que penetram e espalham na superfície do substrato, formando biofilmes (LACHANCE; STARMER, 1998).

As leveduras são micro-organismos mesófilos que se multiplicam entre 18°C e 45°C, porém, variações podem ocorrer (KURTZMAN; FELL, 1998). As espécies *Leucosporidium scottii* e *Mrakia frigida* são psicrófilas com temperatura ótima para multiplicação entre -1,0°C a 4,0°C (DEAK, 2006). Já a espécie *Candida thermophila*, sendo termófila por ser capaz de se desenvolver a 51°C (SHIN *et al.*, 2001).

As leveduras estão relacionadas a diversos processos nos ecossistemas, sendo primariamente decompositores de matéria orgânica, participando também da colonização primária de substratos ricos em nutrientes. Além disso, elas podem formar variadas relações ecológicas com outros organismos, podendo ser mutualistas, competidoras, parasitas ou patógenos (STARMER; LACHANCE, 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 elevada velocidade de multiplicação para produção de biomassa, sendo utilizada em grande variedade de processos industriais, podendo ser produzidas nos mais diferentes substratos (PEREYRA *et al.*, 2015).

As leveduras selecionadas para fins probióticos são atóxicas e inofensivas, por isso são largamente utilizadas nas dietas de humanos e de animais (SEN; MANSELL, 2020). Os exemplos mais comuns de leveduras com propriedades probióticas incluem os gêneros: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Isaatchenkia*, *Kluyveromyces*. (NAYAK, 2011). Dentro do gênero *Saccharomyces*, destacam-se a *S. cerevisiae* e *S. boulardii* (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). A *S. cerevisiae* é a mais utilizada para

essa finalidade, sendo amplamente utilizada para estudos de metabolismo, genética molecular, e foi o primeiro ser eucarioto com o genoma completamente sequenciado (GOFFEAU, 1996; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

O fornecimento de cepas de leveduras na dieta pode ser feito diretamente a partir de resíduos de fermentados industriais ou 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).

O uso de levedura como probiótico tem proporcionado resultados relevantes em humanos e animais, apresentando efeitos positivos para a saúde e produtividade de organismos aquáticos (SEN; MANSELL, 2020; AHIWE *et al.* 2021; WANG *et al.*, 2019). As leveduras vivas favorecem a saúde do trato gastrointestinal dos animais multiplicando-se e transitando juntamente com o bolo alimentar, atuando como probiótico e diminuindo a pressão exercida pelos micro-organismos patogênicos (EL-SAADONY *et al.*, 2021).

As paredes celulares das leveduras podem agir também como substâncias sequestrantes de micotoxinas, ocorrendo dessa forma a detoxificação, processo influenciado por fatores como o tempo de permanência do bolo alimentar e o comprimento do trato digestivo do animal (LUO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021).

2.3 Parede celular de levedura

A parede celular é uma estrutura que protege a célula do meio externo e de enzimas exógenas, também preserva estruturas e confere formato à célula (ENE *et al.*, 2015). Métodos analíticos foram desenvolvidos para identificar e quantificar os polissacarídeos presentes na parede celular das leveduras nos diferentes tipos de cepas. Também, foram analisadas as modificações observadas por adaptações a fatores adversos do ambiente e a substâncias fungicidas. As técnicas utilizadas para a análise desses compostos baseiam-se principalmente, em fracionar e hidrolisar os polisacarídeos por métodos químicos, onde os monômeros liberados na hidrólise são quantificados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (LIU *et al.*, 2021).

A parede celular da *S. cerevisiae* é constituída, principalmente, de duas camadas de polissacarídeos, uma externa e outra interna. A camada externa possui manoproteínas que conferem porosidade a parede, atuando como filtro seletivo e protetor contra os ataques

químicos e enzimáticos semelhantes à glucanase. E a camada interna mantém a forma e a rigidez da célula, favorecendo a resistência às mudanças osmóticas e mecânicas do ambiente (GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2021).

A camada interna é composta por beta-glucanos (55 a 65%) que são homopolímeros de glicose formado por ligação glicosídica entre resíduos de glicopirranose. Os beta-glucano consistem em unidades beta-D-glicopiranosil, linearmente ligadas com ligações (1 → 3) e (1 → 6). Outro polissacarídeo presente na estrutura da camada interna da parede celular de leveduras é a quitina (2,0%) que participa da morfologia e multiplicação das leveduras (PINTO *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2016).

A parede celular de leveduras pode ser degradada com a utilização de enzimas líticas tanto para o biocontrole de micro-organismos patogênicos, como para a obtenção de produtos intracelulares, como peptídeos, proteínas recombinantes, ácidos nucleicos, pigmentos, enzimas e lipídios (BORCHANI *et al.*, 2014). As principais enzimas que lizam a parede celular de leveduras são β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases que agem de forma sinérgica e estão intimamente relacionadas com a composição da parede celular. As enzimas líticas podem ser produzidas por alguns microrganismos. A exemplo disso, o microrganismo *Cellulosimicrobium cellulans* é produtor de um complexo enzimático lítico formado por várias isoformas de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases em meios de cultivo contendo diferentes indutores (FLEURI; SATO, 2010)

O estudo da composição dos polissacarídeos favorece a obtenção de cepas com parede celular mais frágil que favorecem a extração química ou enzimática dos metabólitos da célula e aproveitamento do conteúdo celular dos glucanos, das mananoproteínas e da quitina. Esses polissacarídeos podem ser utilizados na indústria de alimentos, fármacos e cosmetologia, como agentes emulsificantes, de texturização, substitutos de gordura e fonte de fibra dietética. A quitina também é usada para a fabricação de comprimidos antiácidos (ALEMU; GETACHEW; MONDAL, 2023).

Os beta-glucanos presentes na parede celular das leveduras possuem ação anti-inflamatória, anticancerígena, antinociceptiva, imunoestimulante e preventiva para a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (DU *et al.*, 2015; KAGIMURA *et al.*, 2015).

Em plantas, o extrato da parede celular de leveduras possui atividade antifúngica e bioestimuladora devido à capacidade indutora de resistência a bactérias e fungos, pela

ativação das vias do jasmonato/etileno e do ácido salicílico, (NARUSAKA *et al.*, 2015; ANUSUYA; SATHIYABAMA, 2015, NIMRICHTER *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018).

Os polissacarídeos componentes estruturais da parede celular da levedura induzem a resposta imunológica contra os micro-organismos, pela associação molecular e indução da expressão gênica de genes relacionados à síntese de enzimas líticas PR1, endoGLU9, endoCHI-like e PR4 (glucanases e quinases). Essas enzimas inativam os micro-organismos por realizarem a lise de suas paredes celulares (PRZYBYLSKA-DIAZ *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2018; NARUSAKA *et al.*, 2015).

2.4 Atividade antimicotoxigênica das leveduras

As leveduras têm sido utilizadas como aditivos naturais na alimentação de animais de produção. Este tipo de suplementação gera incremento nos parâmetros produtivos e na saúde dos animais. Recentemente, os estudos têm focado as frações de polissacarídeos das paredes celulares de leveduras (PCL) como os β -glucanos e os mananos, os quais demonstram efeitos benéficos tanto sobre a saúde de animais de produção como do homem (FULLER *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2021).

As vantagens destes produtos, à base de PCL, devem-se a sua grande capacidade de suportar temperaturas elevadas para peletização e extrusão no processamento das rações, bem como, na capacidade de resistir às condições químicas e físicas do trato gastrointestinal, quantidade presente no alimento, grande área superficial e, certamente, o reduzido risco de contaminação por materiais tóxicos (YIANNIKOURIS *et al.*, 2012).

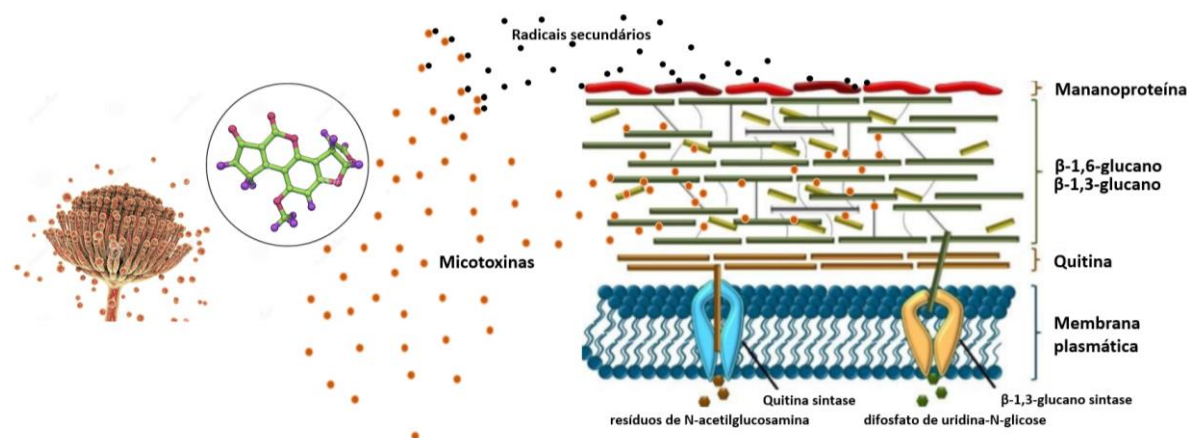
Leveduras probióticas, incluindo *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *S. cerevisiae* var. *boulardii* e *Phaffia Rhodozyma*, apresentam comprovada capacidade de adsorção de micotoxinas (LUO *et al.*, 2020). Os riscos relacionados às micotoxinas a respeito da saúde humana e animal resultaram no desenvolvimento de formas e técnicas para evitar sua formação, inativando ou reduzindo a sua biodisponibilidade em alimentos contaminados. Controlar as condições que favorecem a multiplicação de fungos, seja com a utilização de adequadas tecnologias de cultivo e armazenamento de grãos, ou com a aplicação de fungicidas é a melhor forma para reduzir a produção de micotoxinas nos alimentos (ALTOMARE; LOGRIECO; GALLO, 2021)

Ainda para reduzir ocorrência de contaminantes tóxicos em alimentos, podem ser utilizados mecanismos de controle físicos, químicos e biológicos (NUNES *et al.*, 2021; ORTEGA-BELTRAN; BANDYOPADHYAY, 2021). Entretanto, muitos dos mecanismos

de controle físico e químico não são empregados devido ao custo elevado ou as dificuldades práticas do processo de detoxificação. Uma das alternativas utilizadas para detoxificação biológica de micotoxinas é a utilização de bactérias ácido lácticas e/ou leveduras. Esses micro-organismos são denominados agentes adsorventes pela capacidade de reduzir a biodisponibilidade das micotoxinas (AFSHAR *et al.*, 2020; WANG; XIE, 2020).

O mecanismo de ação antimicotoxigênica de leveduras pode variar de acordo com a composição de sua parede celular. A estrutura tridimensional dos polissacarídeos (figura 1) que constituem a PCL permite a adsorção de diferentes micotoxinas ou seus derivados metabólicos (HASSAN *et al.*, 2021). Os β -D-glucanos da parede das leveduras são capazes de adsorver diversas micotoxinas, enquanto os α -D-mananos inibem a atividade tóxica das micotoxinas, provavelmente por interagir com os radicais destes compostos (LIU *et al.*, 2021). A adsorção de micotoxinas e seus metabólitos secundários pela parede celular de leveduras (figura 1), está diretamente relacionado à rede de polissacarídeos que compõem a parede, sintetizados a partir da transferência de resíduos de N-acetilglucosamina e glicose para as camadas de crescimento de fibras.

Figura - 1. Adsorção de micotoxinas na parede celular de leveduras



Fonte: Adaptado de Fesel e Zuccaro (2016).

A ligação das micotoxinas aos micro-organismos, através de sua parede celular, promove a redução dos efeitos deletérios das micotoxinas por meio da diminuição de sua absorção gastrointestinal (TAHEUR *et al.*, 2017). Ressalta-se que as espécies de levedura são altamente diversas na composição da parede celular, o que influencia a capacidade de adsorção. Além disso, a quantidade de toxina adsorvida depende de fatores como concentração da toxina e do micro-organismo, temperaturas e valores de pH (LUO *et al.*,

2020). Os autores elucidam alguns pontos relacionados aos mecanismos pelos quais ocorre a adsorção de micotoxinas pela PCL. O primeiro se refere à integridade e espessura da PCL, de forma que células com maiores conteúdos de parede celular tendem a apresentar maior porcentagem de remoção de micotoxinas. Um segundo fator predisponente para este processo está relacionado à composição química da parede celular. É sabido que os carboidratos presentes na parede celular das leveduras garantem a redução da biodisponibilidade de micotoxinas. Entretanto, o polissacarídeo β -1,3-glucana parece ser a fonte de carbono mais fortemente responsável por essa ação antimicotoxigênica (LUO *et al.*, 2015).

Corroborando com essas afirmativas, existe ainda, a possibilidade de manipulação gênica para incremento da eficiência de remoção de micotoxinas, em consequência da alteração da composição química e espessura da parede celular e a configuração espacial das estruturas reticulares (LUO *et al.*, 2019).

No que se refere às forças de ligação na adsorção de micotoxinas pelas PCL, foi identificado que essa interação é do tipo ponte de hidrogênio, com características hidrofóbicas e eletrostáticas, podendo também ocorrer interações do tipo van der Waals (LUO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015).

2.4.1 Adsorção de aflatoxina B1

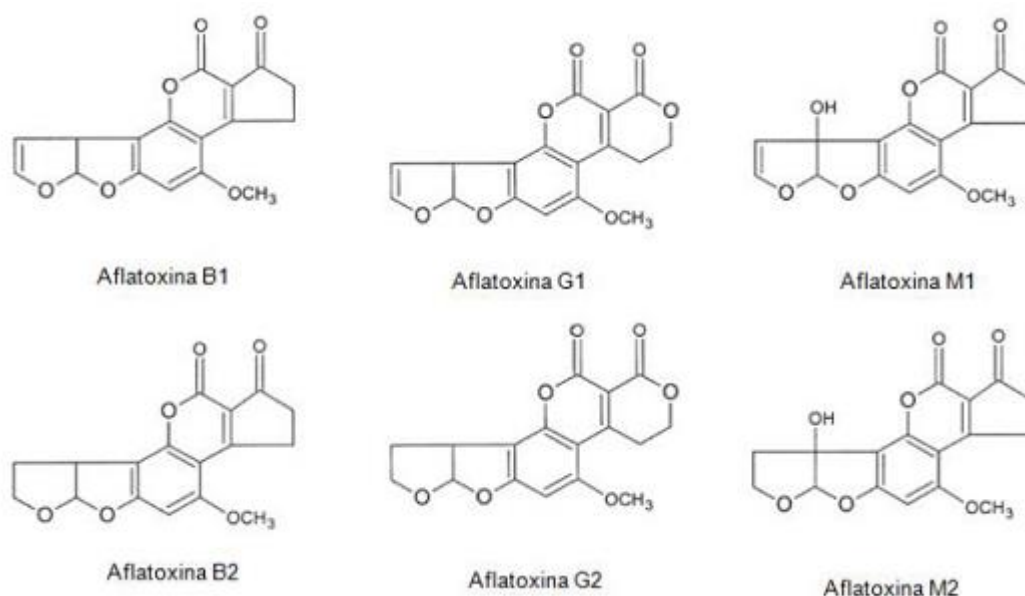
De todas as micotoxinas isoladas em alimentos, as aflatoxinas são as mais amplamente estudadas e distribuídas devido às propriedades tóxicas mais acentuadas (ISMAIL *et al.*, 2021; SALADINO *et al.*, 2018).

Aflatoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas, principalmente, por fungos filamentosos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus*, *A. tamaris* e *A. pseudotamaris* (THANUSHREE *et al.*, 2019; PICKOVA *et al.*, 2020; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2021; MIN *et al.*, 2021).

As espécies de *Aspergillus* são capazes de se multiplicar em cereais, especiarias, oleaginosas e frutas secas, em condições ambientais diversas, principalmente em clima quente e úmido. Esse fato contribui para a presença das aflatoxinas principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical e em diversos alimentos destinados, tanto ao consumo humano quanto ao consumo animal (ASGHAR *et al.*, 2022; BASHIRY *et al.*, 2021; KHODAEI *et al.*, 2021; THANUSHREE *et al.*, 2019).

O termo aflatoxina refere-se à seis diferentes compostos micotoxigênicos denominados B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂ (RUSHING; SELIM, 2018). As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 2) são as mais frequentes e encontradas em maior quantidade na natureza, estando entre as mais importantes (EL-SAYED *et al.*, 2022; ROMERO-SÁNCHEZ *et al.*, 2022).

Figura 2 – Composição química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂



Fonte: (Souto *et al.*, 2017)

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é produzida por todas as linhagens produtoras de aflatoxinas, sendo a micotoxina mais potente dentro desse grupo, seguida por G₁, B₂ e G₂. É tóxica para muitas espécies de animais, causando intoxicações agudas ou crônicas, cuja patogenicidade depende da quantidade ingerida e do tempo de exposição. Os efeitos tóxicos da AFB₁ variam conforme a sua composição estrutural e da associação de outros fatores: composição da dieta, da susceptibilidade do animal, da raça, do sexo e da idade (BENKERROUM, 2020; OLIVEIRA; VASCONCELOS 2020).

A AFB₁ é conhecida, como hepatotóxica e hepatocarcinogênica causando carcinoma hepatocelular em muitas espécies animais. Porém, o consumo de rações contaminadas por AFB₁, também, pode causar outros efeitos tóxicos: baixa produção de leite e ovos, imunossupressão, anemia, redução da reprodução e do crescimento e influência negativa nos parâmetros zootécnicos gerais nos animais, incluindo peixes e outros animais aquáticos (BENKERROUM, 2020; MARCHESE *et al.*, 2018).

Assim, é crescente a demanda por estratégias que previnam tanto a formação de aflatoxinas nos alimentos e rações, bem como a tentativa de redução do impacto da contaminação existente, pela remoção de aflatoxinas em produtos já contaminados, processo chamado de detoxificação (MARSHALL *et al.*, 2020; ORTEGA-BELTRAN *et al.*, 2021; SHEN; SINGH, 2021).

A detoxificação que utiliza micro-organismos e/ou enzimas para adsorver as micotoxinas no trato gastrointestinal de animais surge como uma forma natural e eficaz para prevenção de micotoxicoses. As leveduras estão entre os principais micro-organismos utilizados nesse processo em rações e alimentos contaminados pela capacidade probiótica de adsorção (PENG *et al.*, 2018). Estudos *in vitro* chegaram a demonstrar até 100% de adsorção de aflatoxinas por PCL de forma dose-dependente (ISMAIL; LEVIN, 2017; LUO *et al.*, 2020).

Ressalta-se que fatores como temperatura, pH e tipo de aflatoxina podem influenciar a capacidade de produtos à base de leveduras se ligarem à aflatoxina B1 (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2020). Métodos biotecnológicos que intensificam as respostas probióticas relacionadas à adsorção de micotoxinas incluem a modificação da própria estrutura da parede com estratégias de otimização, que melhorem a adsorção de micotoxinas. Isso confirma que a adsorção de micotoxinas, incluindo a aflatoxina B1, está correlacionada à quantidade de glucano e quitina contida na parede celular da levedura, de forma que o incremento de certas fontes de carbono e consequente aumento da espessura da parede, pode permitir melhores percentuais de adsorção (PEREYRA *et al.*, 2018).

2.4.2 Encapsulamento de leveduras para adsorção de aflatoxina B1

Resultados de muitas pesquisas mostram a utilização de nanopartículas para proporcionar a otimização da entrega de fontes de carbono presentes na parede celular de leveduras (ANJUGAM *et al.*, 2018; KHIAMI *et al.*, 2020; VELAZQUEZ-CARRILES *et al.*, 2018). Como exemplo, Hamza *et al.* (2019) obtiveram maior eficiência de ligação entre a aflatoxina B1 e uma formulação híbrida de componentes da parede celular de *S. cerevisiae* encapsulados com nanopartículas de ácido húmico.

Da mesma forma, avaliando a influência do processamento tecnológico, como estratégia de proteção e armazenamento, na viabilidade, propriedades probióticas e na capacidade adsorvente da PCL, Poloni *et al.* (2021) observaram altas porcentagens de

adsorção de aflatoxina B1 com a utilização de leveduras *S. cerevisiae* liofilizadas com maltodextrina. Esses autores demonstraram que mesmo após o estresse do processo de liofilização, foi mantida a viabilidade celular das leveduras, devido à proteção celular promovida pela maltodextrina.

A maltodextrina é um polissacarídeo, cuja principais fontes comerciais utilizadas na indústria são o milho, a batata e o arroz, sendo um produto amplamente utilizado em processos de encapsulamento de uma variedade de compostos e princípios ativos (GALVES *et al.*, 2021; OKUMUŞ *et al.*, 2021). Além disso, a maltodextrina apresenta comprovada atividade antimicrobiana (PARK; WALSH, 2021)

Ainda, a capacidade de co-agregação das leveduras com outros micro-organismos pode ser melhorada com a utilização de maltodextrina como protetor celular. Possivelmente, micro-organismos patogênicos apresentaram grande capacidade de ligação específica no TGI, o que pode indiretamente impedir a colonização por micro-organismos probióticos. Dessa forma, o processamento biotecnológico de otimização da PCL com a utilização de polissacarídeos como a maltodextrina, pode resultar no desenvolvimento de produtos probióticos promissores (DAWOOD *et al.*, 2019; TRAN; SHENGGANG, 2022).

As leveduras probióticas proporcionam inúmeros benefícios, como estímulo ao sistema imunológico, amadurecimento da microbiota intestinal e aumento da taxa de crescimento dos peixes. Assim, a técnica de microencapsulamento de leveduras com agentes encapsulantes como a maltodextrina, é uma forma de manter a sua viabilidade e características probióticas, justificando-se a utilização das leveduras como aditivo alimentar em rações contaminadas com aflatoxina B1, para melhorar o desempenho e sanidade de peixes, em todos os estágios de crescimento como por exemplo, alevinos de tilápia-do-Nilo.

**CAPÍTULO I - VIABILIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA
B1 PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 ISOLADA DE AMBIENTE
DE PISCICULTURA**

VIABILIDADE PROBIÓTICA E ADSORVENTE DE AFLATOXINA B1 PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 ISOLADA DE AMBIENTE DE PISCICULTURA

RESUMO

Com a presente pesquisa, objetivou-se verificar se a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolada de viveiros de piscicultura apresenta capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1 em testes *in vitro*. Foi utilizada a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 isolada de ambiente de piscicultura, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA). A levedura *S. cerevisiae* A8L3 foi submetida aos testes de capacidade probiótica de autoagregação e coagregação, inibição de micro-organismos patogênicos e tolerância simulada das condições de pH do estômago (pH 2,0) e do intestino (pH 7,0) de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), além de testes adsorventes de aflatoxina B1. A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 apresentou habilidades de autoagregação, coagregação e inibição antibacteriana para todas as cepas avaliadas. Para os testes de tolerância ao pH baixo e aos sais biliares sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* A8L3 em diferentes tempos a cepa testada foi capaz de sobreviver e multiplicar-se satisfatoriamente nas condições simuladas *in vitro* do pH do estômago e do intestino. Além de características probióticas desejáveis, apresentou capacidade para adsorção de AFB1. Assim, fica evidenciado que a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolada de viveiros de piscicultura apresenta uma boa capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1 em testes *in vitro*. A cepa atende os requisitos analisados para ser utilizada em formulação de dietas para uso em ensaios *in vivo* na piscicultura.

Palavras-chave: Levedura. Probiótico. Piscicultura. Ração

**PROBIOTIC AND ADSORBENT VIABILITY OF AFLATOXIN B1 BY THE YEAST
Saccharomyces cerevisiae A8L3 ISOLATED FROM FISH FARMING
ENVIRONMENT**

ABSTRACT

The present research aimed to verify whether the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolated from fish farms has probiotic and aflatoxin B1 adsorbing capacity in in vitro tests. The strain of *S. cerevisiae* A8L3 isolated from a pisciculture environment belonging to the culture collection of the Microbiological Food Control Laboratory of the Center for Studies, Research, and Food Processing (NUEPPA) was used in the experiments. The yeast *S. cerevisiae* A8L3 was subjected to tests of probiotic capacity for self-aggregation and co-aggregation, inhibition of pathogenic microorganisms, and simulated tolerance of pH conditions in the stomach (pH 2.0) and intestine (pH 7.0) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), in addition to aflatoxin B1 adsorbent tests. The *S. cerevisiae* A8L3 strain showed autoaggregation, co-aggregation, and antibacterial inhibition abilities for all strains evaluated. For low pH and bile salt tolerance tests on the viability of *S. cerevisiae* A8L3 at different times, the tested strain was able to survive and multiply satisfactorily in simulated in vitro pH conditions of the stomach and intestine. In addition to desirable probiotic characteristics, the strain had the ability to adsorb AFB1. Thus, it is evident that the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolated from fish farms has good probiotic and aflatoxin B1 adsorbing capacity in in vitro tests. The strain meets the analyzed requirements to be used in formulating diets for use in in vivo tests in fish farming.

Key words: Yeast. Probiotic. Pisciculture. Portion.

1. INTRODUÇÃO

Diversos tipos de micro-organismos têm sido pesquisados como probióticos na alimentação humana e animal no intuito de melhorar as respostas inerentes ao sistema digestivo. Neste sentido Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos capazes de produzir um equilíbrio intestinal e produzir efeitos positivos à saúde ou a fisiologia do indivíduo que o ingere (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011; Hill *et al.*, 2014; CARUFFO *et al.*, 2015). Com propriedades probióticas, dentre os micro-organismos estudados e utilizados como probióticos, destacam-se as bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* e leveduras como *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* (PINHEIRO *et al.* 2020; TERHAAG; BERTUSSO; PRUDÊNCIO, 2020).

Assim como bactérias, as leveduras fazem parte de outros grupos de micro-organismos que têm uma série de qualidades para serem utilizados como agente probiótico. As leveduras apresentam os mais variados benefícios, como características de adsorção de micotoxinas presentes em sua parede celular, além de possuir diversos componentes imunoestimulantes, como os β -glucanos o que pode favorecer melhor resposta de proteção contra agentes patogênicos (VARGAS *et al.*, 2021). Outros fatores em que as leveduras têm se destacado, dizem respeito à proteção da saúde tanto de animais quanto de humanos, benefícios estes que tem despertado o interesse dos pesquisadores na utilização desses micro-organismos na descontaminação de micotoxinas produzidas por fungos micotoxigênicos. (PFLIEGLER; PUSZTAHELYI; PÓCSI, 2015; HASSAN; ZHOU, 2018).

Os fungos filamentosos são os principais produtores de micotoxinas, que são consideradas metabólitos secundários possuindo baixo peso molecular advindo do metabolismo desses micro-organismos. A maioria de seus metabólitos produzidos apresentam uma boa estabilidade em relação a altas temperaturas, podendo resistir no alimento como cereais e rações mesmo durante o processo de extrusão, além de resistir às mais variadas faixas de pH do trato gastrointestinal de peixes (MATEJOVA *et al.*, 2017; PEREYRA *et al.*, 2018; CAMPAGNOLLO *et al.*, 2020).

Quando estas micotoxinas estão presentes em alimentos, principalmente na estocagem de rações, podem apresentar diversas perdas econômicas e conseqüentemente reduzir o índice de produção desses animais. As micotoxinas são metabólitos de elevada toxicidade representando riscos elevados, podendo levar a altas taxas de mortalidade na piscicultura (MATEJOVA *et al.*, 2017; TIBOLA; FERNANDES. 2020).

Diversas alternativas têm sido utilizadas no controle das micotoxinas por conta de sua atividade tóxica, tais como: prevenção da contaminação e multiplicação fúngicas; descontaminação de alimentos e redução da absorção das micotoxinas presentes no alimento consumido no trato gastrointestinal pela inibição ou a adsorção (LUO *et al.*, 2020).

Dentre as mais variadas estratégias de controle de micotoxinas a que mais tem mostrado bons resultados é detoxificação biológica que pode ser realizada por leveduras que apresentem atividades probióticas comprovadas. Estes micro-organismos podem adsorver micotoxinas, propiciando assim uma eliminação ou redução nos níveis de toxinas do alimento para um nível seguro (PEREYRA *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2020).

Deste modo, com a presente pesquisa objetivou-se em verificar se a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolada de viveiros de piscicultura possui capacidade probiótica e adsorvente de aflatoxina B1 em testes *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Testes probióticos *in vitro*

Para os seguintes testes foi utilizada a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 isolada de ambiente de piscicultura, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Essa cepa foi testada para avaliar sua capacidade probiótica em testes *in vitro* simulando a fisiologia de tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*).

Para avaliar a capacidade da viabilidade probiótica, a levedura *S. cerevisiae* A8L3 foi submetida aos seguintes testes: capacidade de autoagregação e coagregação da levedura, inibição de micro-organismos patogênicos e tolerância simulada das condições de pH do estômago (pH 2,0) e do intestino (pH 7,0) de tilápia-do-Nilo, além de testes de adsorção de aflatoxina B1.

2.2 Capacidade de autoagregação e co-agregação da levedura

Foi utilizada a metodologia descrita por Pizzolitto *et al.*, (2012), com algumas modificações, para determinar a propriedade de adesão célula-célula das leveduras pelos ensaios de autoagregação e coagregação. Os inóculos da cepa de levedura *S. cerevisiae*

A8L3 ressuspensos, foram cultivados em caldo YPD e incubados em estufa microbiológica a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente, logo após lavadas duas vezes em água destilada estéril, ressuspensas em 4,0 mL de tampão fosfato salino (PBS - pH 7,2) e homogeneizadas em agitador tipo vórtex. Nos dois ensaios, as suspensões de células foram padronizadas, densidade ótica $(DO_{inicial})_{600nm} = 0,5$. Os tubos com as suspensões foram incubados a 37°C por duas horas sem agitação. Em seguida, os valores de absorvância da camada superior foram medidos para densidade ótica final $(DO_{final})_{600nm}$ em espectrofotômetro. Para determinar a porcentagem de autoagregação de cada cepa foi aplicada a seguinte fórmula:

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

Em que:

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

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

O método de preparação das suspensões de leveduras para co-agregação foi o mesmo utilizado para o ensaio de autoagregação como descrito por Pizzolitto *et al.* (2012). Foram utilizados neste ensaio quatro diferentes micro-organismos patogênicos cedidos pela Coleção de Micro-organismos de Referência do NUEPPA: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Typhimurium* INCQS 00150 (ATCC 14028; *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) e *Aeromonas hydrophila* INCQS 00318 (IOC/FDA 110-36), que representam riscos à saúde dos peixes e do consumidor. Foi realizado um cultivo de cada bactéria patogênica em caldo cérebro coração (BHI) e incubado por 24 horas a 37 °C, em seguida cada cultivo foi centrifugado a 5.000 rpm durante 10 minutos. Na sequência foi descartado o sobrenadante e ressuspensos as células em PBS (pH 7,2). Foram realizadas diluições com a mesma solução tampão para ajustar a concentração final tanto de leveduras quanto de bactérias a $DO_{600 nm} = 0,5$. Posteriormente, volumes iguais (2,0 mL) de leveduras e bactérias patogênicas foram misturados em tubos estéreis, homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados a 37°C durante duas horas sem agitação. Em seguida, o sobrenadante da mistura descrita acima (DO_{mix}) e dos tubos controle com suspensões de leveduras ($DO_{levedura}$) e bactérias ($DO_{patógeno}$) tiveram sua absorvância medida a 600 nm. Para determinação da porcentagem de co-agregação foi aplicada a seguinte fórmula:

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

Em que:

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

$\text{DO}_{\text{Patógeno}}$ = Densidade ótica do patógeno

$\text{DO}_{\text{levedura}}$ = Densidade ótica da levedura

2.3 Inibição de micro-organismos patogênicos

A levedura foi testada para a inibição de micro-organismos patogênicos usando o método *slab test* no meio YPD (STRUS; 1998). As cepas de bactérias patogênicas utilizadas neste ensaio foram as mesmas utilizadas no teste de co-agregação. Para o ajuste da concentração bacteriana suficiente para atingir 0,5 na escala de Mc Farland, as bactérias patogênicas foram semeadas em ágar Nutriente a 37,0 °C por 24 horas em estufa microbiológica. Posteriormente, do ágar foram retirados com alça de platina inóculos de cada cultivo para ressuspender em solução salina (0,9%), procedendo dessa maneira até a obtenção de suspensões bacterianas correspondentes a 0,5 da escala de Mc Farland. Após ajuste do inóculo, com auxílio de *swab* esterilizado (Cral®) as bactérias foram semeadas em estrias por toda a superfície de placas de Petri com ágar Nutriente. Em seguida, discos de ágar YPD de 14 mm contendo as leveduras semeadas previamente a 25,0 °C por 48 horas, foram cortados assepticamente e adicionados às placas com ágar Nutriente que foram semeadas anteriormente com as bactérias patogênicas. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após 24 horas de incubação a 37,0 °C, foram medidos os diâmetros das zonas de inibição do crescimento em torno das placas de ágar. Os resultados foram descritos em milímetros (mm), subtraindo-se o diâmetro do disco de ágar de YPD.

2.4 Tolerância simulada das condições de pH baixo e aos sais biliares

A padronização do inóculo seguiu metodologia adaptada por Pizzolitto *et al.*, (2012). 100 µL da suspensão foram adicionados a 900,0 µL de caldo YPD ajustado a pH 2,0. As soluções contendo as células foram incubadas sob agitação constante (150 rpm) em diferentes tempos: 4, 8 e 12 horas a 30 ± 2,0°C. Ao final de cada tempo de incubação foram retiradas alíquotas de 100,0 µL para a contagem de células viáveis pela diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 24 h a 37°C.

Para a determinação da viabilidade e tolerância das cepas de leveduras na presença de sais de bile nas condições do intestino de tilápia-do-Nilo, foi realizado o teste utilizando-se a metodologia semelhante ao ensaio de tolerância ao pH baixo. Para isso foi utilizado o caldo YPD suplementado com sais de bile a 0,5% (Sigma-Aldrich®) ajustado para pH 7,0. Ao final dos diferentes tempos de incubação: 4, 8 e 12 horas, foram retiradas alíquotas de 100 µL para a contagem de células viáveis por meio da diluição decimal seriada e semeadura por espalhamento em superfície de ágar YPD. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37,0 °C. Controles do ensaio foram realizados, submetendo-se cada cepa ao mesmo procedimento descrito, porém com inoculação em caldo YPD pH 7,0 e sem o acréscimo dos sais de bile.

2.5 Teste de adsorção de AFB1

O teste de adsorção de AFB1 foi realizado de acordo com Pizzolitto *et al.* (2011); Poloni *et al.* (2015), com algumas modificações. Para realização da solução inicial de AFB1 foi extraído de um núcleo produzido da cepa padrão de *A. parasiticus* NRRL 2999 (USDA, Agricultural Research Service, Peoria, IL), na concentração de 2,67 µg/mL. (MAGNOLI *et al.* 2011).

Foram realizadas suspensões na concentração de 10^7 células/mL a partir de tubos de MEA, previamente, semeados, com isolados da cepa de *S. cerevisiae* A8L3 e padronização feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Foram preparadas em microtubos soluções de trabalho de AFB1 (25 e 50 ng/mL) em PBS (pH 2,0 e 7,0). Na sequência, 1,0 mL de cada suspensão de células foi submetido à centrifugação durante 15 minutos a 5000 rpm à temperatura ambiente. Logo após, foram lavados duas vezes com água destilada e submetidos à centrifugação. Foram adicionados 1,0 mL da solução de PBS (pH 2,0) contendo AFB1, para simular a acidez do estômago de tilápia-do-Nilo e incubados a 30,0 °C por 60 minutos em agitação constante (150 rpm). Em seguida, foram centrifugados e aos concentrados de células adicionou-se 1,0 mL de PBS em pH 7,0 contendo AFB1 nas concentrações testadas (25,0 e 50,0 ng/mL). Logo após, foram incubados por 60 minutos a $30,0 \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidos à agitação constante.

Após este período, as células foram sedimentadas por centrifugação durante 15 min a 5.000 rpm à temperatura ambiente, e o sobrenadante contendo micotoxinas não ligadas foi recolhido e armazenado a -20°C para análise do percentual de adsorção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A detecção e quantificação de AFB1 não adsorvida foi realizada utilizando um cromatógrafo HPLC Shimadzu® (modelo Prominence) com detector de fluorescência modelo RF-10AXL Super, de acordo com a metodologia proposta por Trucksess *et al.* (1994) e Scudamore e Macdonald (1998). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa C18 (de sílica gel, 150 x 4,6 mm id., 5,0 µm de tamanho de partículas, Varian, Inc. Palo Alto, EUA). Para análise, uma alíquota de 200 µL da amostra foi derivatizada com 700 µL de solução composta por ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: água (20:10:70, v/v/v). como fase móvel utilizou-se acetonitrila: metanol: água (17:17:66 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/min. O volume de injeção foi de 20,0 µL.

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

Adsorção de AFB1 = $100 \times [1 - (\text{área do pico da amostra} / \text{área do pico de micotoxina no controle positivo})]$

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão. Para as análises da capacidade probiótica, foram expressos em percentual (auto-agregação, co-agregação) e em log UFC/g (tolerância ao pH baixo e aos sais biliares).

Para os testes de adsorção de AFB1, foram expressos em quantidade de micotoxina adsorvida (ng mL⁻¹) e percentual de micotoxina adsorvida, nas respectivas concentrações. A análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando o procedimento PROC GLM, do software SAS® University Edition. Foi utilizado o teste de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de p<0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes probióticos *in vitro* de co-agregação e atividade antimicrobiana, realizados com a cepa de levedura *S. cerevisiae* A8L3, e de tolerância, que tem como base o estado fisiológico de Tilápia, estão apresentados na Tabela 1 e 2. A cepa apresentou percentual de

auto-agregação superior a 60%, sendo considerada boa devido ao escore (+) que lhe confere capacidade de adesão da cepa com células do trato gastrointestinal, além de qualidades desejadas para um bom probiótico, como um melhor equilíbrio da microbiota dos peixes. Nos testes para capacidade de co-agregação (tabela 1) os resultados mostraram que houve eficiência de ligação com as cepas bacteriana com maiores valores para *S. Typhimurium* (43,77%) e menor para a bactéria *Escherichia coli* (27,87%), mais no geral todas apresentaram boa capacidade de co-agregação com a cepa testada, o que favorece na proteção contra micro-organismos patogênicos no organismo do hospedeiro.

Quanto aos testes realizados para verificar atividade antibacteriana (tabela 1), a levedura *S. cerevisiae* A8L3 mostrou-se excelente inibidora do crescimento de micro-organismos patogênicos utilizados no ensaio, o que mostra que esta cepa apresenta atividade antagonista podendo ser utilizada como probiótico.

Tabela 1. Capacidade probiótica da cepa *S. cerevisiae* A8L3 para coagregação e atividade antimicrobiana para os micro-organismos testados

Cepas bacterianas testadas (**)	Co-agregação (%)	Atividade antimicrobiana
		Halo de inibição em mm e escores de interpretação*
<i>E. coli</i>	27,87 ^c ± 2,25	19,50 ^a ± 0,58 (+++)
<i>S. Typhimurium</i>	43,77 ^a ± 1,45	18,50 ^a ± 1,15 (+++)
<i>S. aureus</i>	37,10 ^b ± 1,50	14,00 ^b ± 0,58 (++)
<i>A. hydrophila</i>	31,70 ^c ± 1,20	18,50 ^a ± 0,58 (+++)

\bar{X} : média, DP: desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). * Antibiograma e seus escores de interpretação: (-): zona de inibição $\leq 3,0$ mm; (+): zona de inibição $\geq 3,0$ mm e $\leq 9,0$ mm; (++) zona de inibição $\geq 10,0$ mm e $\leq 15,0$ mm; (+++) zona de inibição > 15 mm. (**) *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922); *Salmonella enterica enterica* Typhimurium INCQS 00150 (ATCC 14028; *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) e *Aeromonas hydrophila* INCQS 00318 (IOC/FDA 110-36)

Os resultados obtidos para a cepa *S. cerevisiae* A8L3 nos testes de autoagregação apresentaram escore de agregação de (62,2 % ± 7,89), sendo considerada como uma forte agregação, escore (+), segundo classificação de Kos *et al.* (2003), valores estes que estão em consonância aos obtidos por Pinheiro *et al.* (2020) que também utilizaram cepas de leveduras *S. cerevisiae* provenientes de ambiente de piscicultura e cachaçaria. A mesma espécie isolada em alimentos fermentados à base de milho na Nigéria foi testada com mesma metodologia e apresentou forte agregação, com valores superiores a 80% (OGUNREMI; SANNI; AGRAWAL, 2015), o que confere ao indivíduo ótima colonização

intestinal, já que a parede celular dessas leveduras é rica em carboidratos e propriedades que proporcionam adesão, e possibilitam a sua fixação e multiplicação no epitélio intestinal.

A capacidade de co-agregação de um probiótico está atrelada a prevenção de agentes patogênicos que podem ultrapassar a barreira do lúmen intestinal provocando danos ao hospedeiro (ABBASILIASI *et al.* 2017). A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 demonstrou bons resultados no teste de co-agregação principalmente para *S. Typhimurium* (tabela 1), que é potencialmente patógeno entérico. Essa capacidade pode ser variável, conforme a cepa de *S. cerevisiae* e a espécie bacteriana patogena testada (PINHEIRO *et al.* 2020; MIRANDA; RAMOS, 2021). Por ser capaz de se ligar a esses patógenos intestinais, a cepa A8L3 pode ser utilizada para prevenir enfermidades associadas a esses agentes, agindo como barreira para prevenção de patógenos invasores do trato gastrointestinal.

A cepa de *S. cerevisiae* A8L3, além de apresentar capacidade de co-agregação aos patógenos, também, possui aptidão para inibir os patógenos testados. Esta cepa foi isolada em ambiente de piscicultura, provavelmente por esse motivo, a inibição da multiplicação bacteriana pode ter ocorrido pela falta de contato prévio delas com as leveduras utilizadas, portanto. Além da capacidade probiótica já discutida anteriormente, a cepa *S. cerevisiae* A8L3 pode contribuir na proteção à saúde do hospedeiro, evitando possíveis desenvolvimentos de resistência aos antimicrobianos utilizados na piscicultura, podendo futuramente ser pesquisada como um agente potencial para produção de fármacos com capacidade antibiótica.

Palma *et al.*, (2015), ressaltam que o uso dessas cepas com comprovada atividade probiótica podem ser utilizadas como possíveis carreadores profiláticos e terapêuticos no combate a doenças específicas. Rajkowska *et al.* (2012), utilizando mesma metodologia do *slab test*, encontraram inibição apenas para bactéria *Staphylococcus aureus*, utilizando a levedura *S. cerevisiae* var. *boulardii*, enquanto os resultados desta pesquisa mostram atividade antagonista para todos os micro-organismos testados.

Na Tabela 2, estão representados os resultados para o efeito da passagem simulada da levedura *S. cerevisiae* A8L3 pelo pH do estomago (pH 2,0) e intestino (pH 7,0) e acrescido de bile 0,5% sobre a sua viabilidade por um período de 12 horas. Constatou-se que houve interação ($p < 0,05$) entre os níveis de pH e tempo de contagem de células viáveis. Assim, observou-se que não houve diferença para contagem de *S. cerevisiae* A8L3 ($p > 0,05$) para todos os níveis de pH nos quatro tempos observados. No entanto, verificou-se que para os tempos de 8 e de 12 horas, o valor da contagem para foi semelhante entre si ($p > 0,05$) e

superior ao tempo zero ($p < 0,05$), tanto para simulação no estômago como no intestino (pH = 7,0) acrescido de sais biliares.

Tabela 2. Tolerância ao pH baixo (pH 2,0) e com sais biliares (pH 7,0) sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* A8L3 por um período de 12 horas

pH	Contagem de <i>S. cerevisiae</i> A8L3 (log UFC/g) / Tempo (Horas)			
	(X̄ ± DP)			
	0	4	8	12
2,0	6,83 ^{aB} ± 0,75	7,19 ^{aAB} ± 0,16	7,87 ^{aA} ± 0,09	8,17 ^{aA} ± 0,08
7,0 (controle)	6,67 ^{aB} ± 0,26	7,54 ^{aAB} ± 0,08	7,65 ^{aAB} ± 0,15	8,48 ^{aA} ± 0,03
7,0 (com bile)	6,89 ^{aB} ± 0,16	6,93 ^{aB} ± 0,21	7,63 ^{aAB} ± 0,03	8,26 ^{aA} ± 0,01

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

Ressalta-se que um micro-organismo com potencial probiótico deve ser capaz de ultrapassar a barreira do lúmen intestinal com seus diferentes valores de pH ao longo do trato gastrointestinal, além de enfrentar as diferenças fisiológicas e de metabolismo que essas regiões possuem. Dessa forma, é imprescindível que esse micro-organismo resista às mais variadas situações (ABBASILIASI *et al.* 2017; BANERJEE; RAY, 2017).

A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 testada foi capaz de sobreviver e multiplicar-se satisfatoriamente nas condições simuladas *in vitro* com pH do estômago e do intestino de tilápia-do-Nilo (Tabela 2) (ROTTA, 2003). Os resultados obtidos nessa pesquisa vão de encontro com outros trabalhos que relatam a capacidade das leveduras em sobreviver com elevadas concentrações à passagem simulada das condições gastrointestinais (GREPPI *et al.*, 2017; POLONI *et al.*, 2017; ZENG, 2019). A cepa de levedura *S. cerevisiae* A8L3 apresentou excelente passagem nos diversos tempos observados e que além da passagem pelo TGI ocorreu multiplicação nas condições testadas, características que configuram qualidades desejadas para um bom probiótico.

Na Tabela 3, estão expressas as porcentagens de adsorção de AFB1 *in vitro* pela cepa de *S. cerevisiae* A8L3 isolada em ambiente de cultivo de piscicultura. A cepa testada foi capaz de adsorver AFB1, tanto na concentração de 25 ng mL⁻¹, quanto na concentração 50 ng mL⁻¹. em percentuais semelhantes, apresentando valores acima de 50% de adsorção.

Tabela 3. Adsorção (%) na concentração de 25 e 50 ng mL⁻¹ de AFB1 pela cepa de *S. cerevisiae* A8L3 isolada de ambiente de piscicultura

Concentração AFB1	AFB1 Adsorvida	% de AFB1 Adsorvida
(ng mL⁻¹)	(ng mL⁻¹)	(ng mL⁻¹)
25 (X̄ ± DP)	13,93 ± 1,67	55,70 ^a ± 5,74
50 (X̄ ± DP)	25,62 ± 2,70	51,23 ^a ± 5,07

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

A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 testada (Tabela 3) é detentora, além de características probióticas desejáveis, adequada porcentagem de adsorção de AFB1 55,70% e 51,23%, não diferenciando estatisticamente em relação às concentrações utilizadas de (25 ng e 50 ng mL⁻¹) respectivamente. Pinheiro *et al.*, (2020), em ensaio de adsorção com três estirpe de leveduras em duas concentrações de AFB1 avaliadas (10 e 25ng. mL⁻¹) encontraram valores de adsorção em percentuais de 21,19% e 19,77%, respectivamente, sendo a estirpe A8L2 a mais eficaz, valores inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

Os resultados obtidos indicam a viabilidade da inclusão desta cepa na alimentação de tilápia-do-Nilo, possibilitando redução na quantidade de AFB1 na ração, ocasionalmente, ingerida por esses animais, o que pode levar numa melhoria de aspectos fisiológicos e sanitários. Para tanto, se tornam necessários estudos *in vivo* com estes animais para se obter uma melhor avaliação no manejo em piscicultura.

4. CONCLUSÃO

Deste modo, com a presente pesquisa fica evidenciado que a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 isolada de viveiros de piscicultura apresenta capacidade probiótica e de adsorção de aflatoxina B1 em testes *in vitro*. Com todas essas características desejáveis para um probiótico, esta cepa atende os requisitos analisados para ser utilizada na formulação de dietas para uso em ensaios *in vivo* na piscicultura.

5. REFERÊNCIAS

- ABBASILIASI, S. *et al.* In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017.
- BANERJEE, G., Ray, A.K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**. 115, 66–77. 2017.
- CAMPAGNOLLO F. B. *et al.* In vitro and in vivo capacity of yeast-based products to bind to aflatoxins B1 and M1 in media and foodstuffs: A systematic review and meta-analysis. Fernanda B. **Food Research International**, v. 137. 109505. 2020.
- CARUFFO, M. *et al.* Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. **Frontiers in Microbiology**. 6, 1–9. 2015.
- GREPPI, A. *et al.* Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. **Food Microbiology**, v. 62, p. 169–177, 2017.
- HASSAN, Y. I.; ZHOU, T. Promising detoxification strategies to mitigate mycotoxins in food and feed. **Toxins**, v. 10, n. 3, p. 116, 2018.
- HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.
- KOS B. *et al.* Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981–987, 2003.
- LUO, Y. *et al.* Trends in Food Science & Technology Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption : Current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, n. July 2019, p. 127–134, 2020.
- MAGNOLI, A. P. *et al.* Effect of low levels of aflatoxin B 1 on performance , biochemical parameters , and aflatoxin B 1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 48–58, 2011.
- MATEJOVA, I. *et al.* Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: **Journal of the World Aquaculture Society**. 48, 186–200, 2017.
- MIRANDA, N. M. Z; RAMOS, C. L. Caracterização probiótica de leveduras isoladas de fermentos endógenos de queijo minas artesanal. In: Anais do Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição. **Anais..Ouro Preto (MG) Edição on-line**, 2021.
- NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos-Revisão da Literatura. **Revista Brasileira Ciência e Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

OGUNREMI, O. R.; SANNI, A. I.; AGRAWAL, R. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 797–808, 2015.

PALMA, M. L. *et al.* Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 6563–6570, 2015.

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.

PEREYRA, C. M. *et al.* The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process. **Food Research International**, v. 111, n. April, p. 306–313, 2018.

PFLIEGLER, W.P., PUSZTAHELYI, T., PÓCSI, I. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. **Journal Basic Microbiol**, 55, 805–818, 2015.

PINHEIRO, R. E. E. *et al.* Avaliação in vitro da adsorção de aflatoxina B1 por produtos comerciais utilizados na alimentação animal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, 2017.

PINHEIRO, R. E. E. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic agent and a possible aflatoxin B1 adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 862–870, 2020.

PIZZOLITTO, R. P. *et al.* Binding of Aflatoxin B1 to Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: A Useful Model to Determine the Most Efficient Microorganism. **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. October, p. 323–346, 2011.

PIZZOLITTO, R. P. *et al.* Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 47, n. 10, p. 933–941, 2012.

POLONI, V. *et al.* Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B1. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 32, n. 6, p. 970–976, 2015.

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

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

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Documentos 53 – EMBRAPA** (Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN: 1517-1973, 48 p. 2003.

SCUDAMORE, K. A.; MACDONALD, S. J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean - up A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, p. 401–440, 1998.

STRUS, M. [A new method for evaluation of the antagonistic action of bacterial lactic acid (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria]. **Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia**. 50, 123– 130. 1998.

TERHAAG, M. M.; BERTUSSO, F. R.; PRUDÊNCIO, S. H. Desenvolvimento de bebidas probióticas não lácteas adicionadas de *Saccharomyces boulardii*: situação atual e perspectivas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, 2020.

TIBOLA C. S.; FERNANDES J. M. C. Micotoxinas no trigo: estratégias de manejo para minimizar a contaminação. editores técnicos. – Brasília, DF: **Embrapa**. PDF (120 p.), 2020.

TRUCKSESS, M. *et al.* Multifunctional column coupled with liquid chromatography for 456 determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and 457 pistachio nuts: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 77, p.1512–1521, 458 1994.

VARGAS, O. *et al.* Probiotic Yeasts and *Vibrio anguillarum* Infection Modify the Microbiome of Zebrafish Larvae. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. June, p. 1–16, 2021.

ZENG, X. Technological properties, and probiotic potential of yeasts isolated from traditional low - salt fermented Chinese fish Suan yu. **J Food Biochem.**, v. 43, n. February, p. 1–14, 2019.

**CAPÍTULO 2 - ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B1 POR *Saccharomyces cerevisiae*
MICROENCAPSULADA COM MALTODEXTRINA: EFEITO NO DESEMPENHO
E SANIDADE DE TILÁPIA-DO-NILO**

ADSORÇÃO DE AFLATOXINA B1 POR *Saccharomyces cerevisiae* MICROENCAPSULADA COM MALTODEXTRINA: EFEITO NO DESEMPENHO E SANIDADE DE TILÁPIA-DO-NILO

RESUMO

A produção de peixes no Brasil tem sido destaque, com crescimento significativo, resultado que reflete no grande potencial no aprimoramento da cadeia produtiva e cultivo sustentável. Com a presente pesquisa, objetivou-se verificar a adsorção de aflatoxina B1 pela cepa *Sacharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina em rações contaminadas e seu efeito no desempenho e sanidade de alevinos de tilápia-do-nilo. O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura em um delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo dois níveis de Aflatoxina B1 (0,0 e 100 µg/kg), dois de *S. cerevisiae* (0,0 e 107 UFC/g) e dois de Maltodextrina (0,0 e 20 g/kg). Foram avaliados os seguintes parâmetros: qualidade da água, desempenho zootécnico, contagem de leveduras da ração e do intestino, determinação da concentração de aflatoxina B1 e histopatológico de fígado e rim. Os parâmetros de qualidade testados na água dos viveiros estavam em conformidade ao estabelecido pela legislação ambiental. Para o ganho de peso médio (GPM) foi observado diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos, com melhores valores de T3 (41,92g), T5 (43,23g) e T6 (38,90g), tendo como melhor ingrediente para GPM a maltodextrina, combinada com outro, ou separada. A técnica de microencapsulação favoreceu que a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 permanecesse viável na ração e intestino, preservando as contagens iniciais e finais acima de 7,00 log UFC/g semelhantes ($P > 0,05$). Na detecção de toxina, apenas foi detectada nos fígados dos alevinos de tilápia-do-Nilo dos tratamentos T4 e T7. A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina possui capacidade probiótica *in vivo*, por ser capaz de colonizar-se no intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e manter-se viável em quantidades desejáveis no lume intestinal.

Palavras-chave: Aflatoxina; Contagem de levedura; Piscicultura; Probióticos.

**ADSORPTION OF AFLATOXIN B1 BY *Saccharomyces cerevisiae*
MICROENCAPSULATED WITH MALTODEXTRIN: EFFECT ON THE
PERFORMANCE AND HEALTH OF NILE TILAPIA**

ABSTRACT

Fish production in Brazil has been highlighted, with significant growth, a result that reflects the great potential for improving the production chain and sustainable cultivation. The present research aimed to verify the adsorption of aflatoxin B1 by the *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 strain microencapsulated with maltodextrin in contaminated feed and its effect on the performance and health of Nile tilapia fingerlings. The experiment was carried out at the Fish Farming Research Laboratory in a randomized block experimental design, in a 2 x 2 x 2 factorial scheme, with two levels of Aflatoxin B1 (0.0 and 100 µg/kg), two of *S. cerevisiae* (0.0 and 10⁷ CFU/g) and two of Maltodextrin (0.0 and 20 g/kg). The following parameters were evaluated: water quality, zootechnical performance, yeast count in feed and intestine, determination of aflatoxin B1 concentration and liver and kidney histopathology. The quality parameters tested in the pond water were in accordance with those established by environmental legislation. For average weight gain (GPM), a significant difference (P<0.05) was observed between treatments, with better values of T3 (41.92g), T5 (43.23g) and T6 (38.90g), having The best ingredient for GPM is maltodextrin, combined with another, or separately. The microencapsulation technique allowed the *S. cerevisiae* A8L3 strain to remain viable in feed and intestine, preserving similar initial and final counts above 7.00 log CFU/g (P>0.05). When detecting the toxin, it was only detected in the livers of Nile tilapia fry from treatments T4 and T7. The strain of *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulated with maltodextrin has probiotic capacity *in vivo*, as it is capable of colonizing in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry and remaining viable in desirable quantities in the intestinal lumen.

Key words: Aflatoxin; Yeast count; Pisciculture; Probiotics.

1. INTRODUÇÃO

A produção de peixes no Brasil tem sido destaque, com um crescimento significativo, resultados que refletem grande potencial no aprimoramento da cadeia produtiva e cultivo sustentável. Os principais fatores que contribuem para esse crescimento estão atrelados a um forte mercado, aumento na colheita de grãos, grande disponibilidade de bacias hidrográficas e extensas áreas para diversas modalidades de manejo, além da presença constante das indústrias de rações (IGARASHI, 2019; PEDROZA FILHO *et al.*, 2020; PEIXE BR, 2023).

Segundo dados do Peixe BR (2023), a tilápia é a principal espécie de peixe mais cultivada pelos piscicultores brasileiros, ultrapassando a marca de 550 toneladas em 2022, representando 63,9% de toda a piscicultura nacional. O Brasil ocupa a quarta posição mundial na produção de tilápia, além de ser o peixe de maior procura no mercado nacional, representa em torno de 88% de toda a exportação de pescado (PEIXE BR, 2023).

A piscicultura brasileira vem apresentando diversas melhorias em avanços tecnológicos, como genética e melhoramento animal, nutrição e manejo que favorecem uma melhoria no consumo de pescado. Com todo esse investimento, qualquer interferência que possa ocasionar prejuízos na produção deve ser combatida com antecedência. Fatores como, contaminantes de rações fornecidas para piscicultura são as principais causas que afetam o rendimento e desenvolvimento de várias espécies de peixes em todo o mundo (MONTANHA *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2022).

Dentre os principais contaminantes de rações, as micotoxinas destacam-se, podendo atingir os alimentos em qualquer estágio da sua cadeia de produção, como na colheita, transporte e estocagem. Estão presentes em alimentos fornecidos para consumo animal e também humano, podendo provocar diversos efeitos à saúde do consumidor como hepatóxico e até mesmo carcinogênicos (MONTANHA *et al.*, 2018; PIETSCH, 2020).

Dentre as principais micotoxinas, tem-se destaque para as aflatoxinas, na qual seus maiores produtores são *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, e pode ocorrer por *A. nomius*, espécies de fungos encontrados, principalmente, em produtos agrícolas ligados ao solo. Em relação à toxicidade e episódios, as aflatoxinas de maiores destaques são a B1, B2, G1 e G2. Cujas denominações ocorrem devido sua fluorescência sob a luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) (FREIRE *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2014; KARLOVSKY *et al.*, 2016).

A aflatoxina B1 é conhecida como a substância natural mais hepatocarcinogênica estudada pelo homem. Quando presentes nos alimentos, são responsáveis por causarem diversos efeitos. Em peixes como tilápia, provoca redução do ganho de peso e crescimento, distúrbios hepáticos como redução do conteúdo lipídico e infiltração de células inflamatórias, degeneração vacuolar dos hepatócitos, podendo ocasionar riscos à saúde do consumidor. Todos esses efeitos trazem sérios prejuízos econômicos para toda a cadeia produtiva da piscicultura (MARIJANI; KIGADYE; OKOTH, 2019; (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2020; KUMAR *et al.*, 2021).

Diversos estudos de controle e prevenção de micotoxinas nos alimentos têm sido realizados no decorrer dos anos, em que a descontaminação por micro-organismos tem sido a de maior destaque. O uso de agentes biológicos como bactérias ácido lácticas e leveduras probióticas merece destaque nesse cenário para prevenir a absorção de micotoxinas no trato gastrointestinal desses animais (PINHEIRO *et al.*, 2015; CECCHINI *et al.*, 2019).

A utilização de cepas de leveduras probióticas como *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores no tocante a agente adsorvente de micotoxinas na aquicultura. Resultados de pesquisas ressaltam a capacidade dessas cepas de leveduras em sequestrar micotoxinas existentes nos alimentos, além de relatar a sua eficiência no desempenho dos animais que consomem (PINPIMAI *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2020).

Para que esses micro-organismos cheguem ao seu local de destino com eficácia são necessárias tecnologias como o microencapsulamento da cepa de levedura com um composto encapsulante rico em carboidratos, como a maltodextrina. O encapsulamento é uma forma de manter a viabilidade, conferir proteção e potencializar a disponibilidade e aproveitamento funcional do alimento até o momento do consumo (POLONI *et al.*, 2021).

Neste sentido, é interessante a possibilidade de avaliar componentes microencapsulantes e otimizador de micro-organismos como leveduras isoladas do próprio ambiente de aquicultura, como fontes adsorventes de AFB1 por testes *in vivo*. Com a presente pesquisa, objetivou-se verificar a adsorção de aflatoxina B1 pela cepa de *Sacharomyces cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina em rações contaminadas e seu efeito no desempenho e sanidade de alevinos de tilápia-do-nilo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e instalações

Este experimento está de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais com aprovação pela Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, sob o registro nº 702/21. A pesquisa foi conduzida no Biotério de Pesquisa e Manutenção de Peixes, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). realizado no período de julho a agosto e outubro a dezembro de 2022. Dentro do período de execução do experimento, foram utilizadas 16 caixas d'água de polietileno com capacidade para 250 litros de água, abastecidas por meio água de poço tubular, supridas com aeração constante com pedra microporosa ligada a um compressor de ar.

2.2 Delineamento experimental

Para o desenvolvimento da pesquisa foi utilizado um delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo dois níveis de Aflatoxina B1 (0,0 e 100 µg/kg), dois de *Saccharomyces cerevisiae* (0,0 e 10⁷ UFC/g) e dois de Maltodextrina (0,0 e 20 g/kg), utilizando-se, assim, oito tratamentos (Tabela 1), com quatro repetições, em que a unidade experimental foi representada por uma caixa d'água de polietileno com capacidade para 250 litros de água, alojando 12 tilápias (*O. niloticus*), perfazendo o total de 384 amostras.

Tabela 1. Tratamentos experimentais da alimentação de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) testados com diferentes níveis de aflatoxina B1, *Saccharomyces cerevisiae* e maltrodextrina

Tratamento	Aflatoxina B1 (AFB1 µg/kg)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UFC/g)	Maltodextrina (g/kg)
T1 (controle)	0,0	0,0	0,0
T2	0,0	10 ⁷	0,0
T3	0,0	0,0	20
T4	100	0,0	0,0
T5	0,0	10 ⁷	20
T6	100	10 ⁷	0,0
T7	100	0,0	20

2.3 Dietas experimentais

2.3.1 Preparo das microcápsulas de leveduras

No preparo das microcápsulas foi utilizada a cepa de levedura *S. cerevisiae* A8L3, isolada em ambiente de piscicultura, que pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA/CCA/UFPI), cultivada em 100,0 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose (caldo YPD) em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 250 mL e incubada sob agitação a 150 rpm durante 48 h a 28,0 °C ± 2,0°C. Após incubação, o meio de cultivo com as células foi centrifugado (4.000 rpm por 10 minutos), desprezando-se o sobrenadante, o sedimento foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada. O concentrado de células (*pellets*) foi pesado e reservado.

Posteriormente, o encapsulante maltodextrina foi pesado em quantidade equivalente à obtida com os *pellets*. O cálculo da quantidade de água destilada necessária para preparo da solução de alimentação do *spray dryer* foi realizado baseado no somatório dos *pellets* e do encapsulante, correspondendo a 5,0% de sólidos. Na sequência, a maltodextrina foi pesada e transferida para um frasco tipo Erlenmeyer contendo água destilada correspondente aos 95% da solução de alimentação do *spray dryer*. Essa solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Logo após resfriar, os *pellets* foram acrescentados asépticamente à solução encapsulante para finalização do preparo da solução de alimentação do *spray dryer* (de escala laboratorial, B-290 mini *spray dryer*, Buchi). Foram utilizadas as seguintes temperaturas: de entrada de 105°C e de saída de 70°C para obtenção de microcápsulas, sendo que essas foram coletadas na base do ciclone e, posteriormente, armazenadas em frascos esterilizados hermeticamente fechados. Os frascos foram armazenados em refrigeração (4,0 °C ± 3,0 °C) até o momento do uso nas dietas experimentais.

2.3.2 Produção de núcleos de AFB1

Para produção de AFB1 foi utilizada a cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (USDA, 150 Agricultural Research Service, Peoria, IL), conforme recomendado pela

metodologia de Magnoli *et al.* (2011), em que se utiliza fermentação de arroz. Para a quantificação de aflatoxinas, foi utilizada a metodologia recomendada da AOAC (1998).

Para detecção e quantificação de AFB 1 foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com cromatógrafo da SHIMADZU®, modelo PROMINENCE com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER (TRUCKSESS *et al.* 1994). Para a construção da curva padrão, foram utilizados diferentes níveis de AFB1, sendo a toxina quantificada pela correlação das alturas dos picos do extrato da amostra com o da curva padrão.

2.3.3 Detecção de micotoxinas nas rações comerciais de peixes

No preparo dos tratamentos, após a obtenção das rações comerciais para peixes, procedeu-se com a detecção de AFB1 por CLAE no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do NUEPPA/CCA/UFPI. As amostras que apresentaram níveis não detectáveis de AFB1 foram utilizadas para constituir a ração controle (T1) e para formular os demais tratamentos.

Tabela 2. Composição química da ração comercial para peixes onívoros e dos demais ingredientes utilizados para formulação dos tratamentos das dietas experimentais fornecidas para fase de alevinagem

Componente	Ração comercial (*)	Maltodextrina (**) liofilizada	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (***)
Valor energético (kcal)		77,0	
Umidade (máx.) g	100		
Carboidrato g		19,2	32,86
Açúcares totais (g)		1,2	
Proteína Bruta (mín.) g	350	0,0	48,51
RNA			7,52
Fibra Bruta (mín.) g	35	0,0	12,19
Extrato Etéreo (mín.) g	80	0,0	3,44
Matéria Mineral (máx.) g	150		8,33
Cálcio (máx.) g	25	0,0028	
Cálcio (mín.) g	7	0,0028	
Fósforo (mín.) mg	7.000		
Vitamina C (mín.) mg	650		
Timol (mín.) mg	11,25		
Carvacrol (mín.) mg	11,25		
Protease (mín.) UI	3.150		
Selênio Orgânico (mín.) mg	0,2		
Sódio (mg)		0,006	
Ferro (mg)		0,00004	

2.3.4 Ajustes das dosagens de AFB1 e leveduras para incorporação nas rações

A ração selecionada foi moída em liquidificador doméstico. A formulação dos tratamentos foi realizada com a mistura da ração moída e adição de AFB1 no T4, T6, T7 e T8, levedura no T2, T5, T6 e T8 e maltodextrina no T3, T5, T7 e T8. Em seguida, as formulações foram pesadas, homogeneizadas, umedecidas ($\pm 20\%$ do volume preparado) e peletizadas em máquina de moer carne para posterior padronização quanto a granulometria, com auxílio de peneira granulométrica Bertel® (abertura de 2,38 a 4,75 mm). Após esse processamento as rações foram secas em estufa de secagem e esterilização (FANEM®, modelo 320-SE) por 48h a 45°C até atingir aproximadamente 3,0% de umidade. Em seguida, 1.000 g de ração de cada tratamento foram transferidos para depósitos plásticos com tampa para uso alimentar, sendo realizado o armazenamento sob refrigeração (4,0°C). No início e final do experimento, as rações T2, T5, T6 e T8 foram analisadas para garantir a contagem total de 10^7 UFC/g células viáveis de levedura.

2.3.5 Acondicionamento das dietas experimentais

As rações fornecidas aos alevinos estavam acondicionadas em recipientes plásticos identificados conforme o tratamento, devidamente vedados, conservados e mantidos sob refrigeração em caixas térmicas de isopor com bolsas de gelo, que foram trocadas a cada dois dias, visando preservar a viabilidade das leveduras nas rações fornecidas aos peixes. Com o intuito de renovação da ração fornecida aos peixes, semanalmente, foram pesados 400g de ração por tratamento, assim evitando possíveis riscos de contaminação.

2.3.6 Animais

Foram adquiridos 500 alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) da empresa Psicultura Aldeia LTDA, localizada na zona rural de Nazária, Piauí. Os peixes foram distribuídos em tanques de cimento de 1.000 L e permaneceram durante 15 dias para adaptação às condições ambientais de água e temperatura, mantidos sob oxigenação com ajuda de um sistema de aeração com pedras microporosas.

Em cada etapa (conforme explicado no item 2.1) foram selecionados 192 alevinos com peso médio de $6,0 \pm 1,0$ gramas e realizada a biometria. A cada retirada dos peixes para

amostragem, foi realizada insensibilização dos mesmos, por meio de banho de imersão de eugenol diluído em água na concentração de 50 mg L⁻¹. Os animais foram distribuídos em 16 caixas d'água na densidade de 12 alevinos por caixa, visando padronizar a distribuição conforme a biomassa por unidade experimental.

A oferta de alimento foi realizada duas vezes ao dia (às 9h e 16h), em quantidades que correspondiam 10% do peso vivo dos animais por unidade experimental. Semanalmente, era realizada a limpeza das unidades experimentais por sifonamento do substrato.

2.4 Parâmetros analisados

2.4.1 Acompanhamento da qualidade da água

Para determinação dos parâmetros de qualidade da água: pH, oxigênio dissolvido, temperatura, amônia e nitrito, foi utilizado o Polikit Piscicultura Água Doce (ALFAKIT®). As análises foram realizadas uma vez por semana, conforme recomendação do fabricante. Os resultados da água dos tanques indicavam quanto a necessidade de trocas realizadas por sifonagem.

2.4.2 Desempenho zootécnico

Após os 45 dias de alimentação com os tratamentos experimentais, os animais foram submetidos a 24 horas de jejum para esvaziamento do tubo gastrointestinal e, posteriormente, todos os alevinos foram anestesiados utilizando-se a concentração de 424 mg/L de eugenol para a coleta de biometrias finais.

Para a análise do desempenho produtivo foram realizadas biometrias no início e no final do período experimental. Os seguintes parâmetros foram avaliados, de acordo com seguintes fórmulas:

$$\text{Ganho de peso médio (GPM)} = (\text{PMF} - \text{PMI})$$

$$\text{Ganho de comprimento médio (GCM)} = (\text{CMF} - \text{CMI})$$

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

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

Em seguida, todos os animais foram eutanasiados por hipotermia em água e gelo para realização das demais etapas (BRASIL, 2013). Foram destinados três tilápias para análises histopatológicas, três para contagem de leveduras no intestino e três para detecção de resíduos de aflatoxinas nos órgãos.

2.4.3 Contagem e isolamento das leveduras no intestino

Dos peixes eutanasiados foram realizadas incisões e removida as partes ósseas e muscular para se obter a visualização anatômica das vísceras e estruturas internas da cavidade celomática. Após visualização das estruturas internas, assepticamente, o trato gastrointestinal foi removido completamente e transferido para a base de placas de Petri esterilizadas. Os intestinos foram abertos longitudinalmente para exposição das mucosas. O conteúdo intestinal foi raspado e os intestinos expostos foram transferidos para frascos de vidro esterilizado contendo 150 mL de caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) para enriquecimento das amostras, que permaneceram por 48h em agitador orbital a 150 rpm a temperatura ambiente aproximada de $28,0 \pm 2,0$ °C (ARMANDO et. al., 2011; KELLER, 2012).

As leveduras foram isoladas por espalhamento em superfície por meio de diluições decimais seriadas em frascos com caldo YPD até 10^{-6} . Alíquotas de 0,1 mL das respectivas diluições foram semeadas em ágar YPD para o isolamento seletivo de leveduras. Todas as placas foram incubadas a 28,0°C por 48 horas em estufas microbiológicas com controle de temperatura (PITT; HOCKING, 2009). Após crescimento das leveduras, foi realizada a contagem das células viáveis expressas como UFC/g utilizando um contador de colônia.

2.4.4 Detecção de resíduos de aflatoxinas nos órgãos

Na detecção da concentração de AFB1 nos órgãos rim e fígado, foi realizado um pool individual das amostras em cada tratamento. Os pools, foram fracionados com auxílio de bisturi e ressuspensos em 100 mL de solução de acetonitrila e água (84:16 v/v) em Erlenmeyer. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em mesa agitadora modelo SL-180/DT (Solab®) a 150 rpm por 30 minutos.

Após homogeneização, essa mistura foi filtrada em papel Whatman nº 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, E.U.A.). Na sequência, foi transferida uma alíquota de 8,0 mL do filtrado para um tubo de ensaio com capacidade para 10,0 mL para purificação, utilizando colunas Multifuncional Mycosep 228® (Romer Labs Inc., MO., E.U.A), seguindo as instruções do fabricante.

Na purificação, transferiu-se uma alíquota de 4,0 mL do extrato purificado para outro frasco tipo Erlenmeyer com capacidade para 25,0 mL até sua completa evaporação em banho-maria a 70,0°C, aproximadamente duas horas. Após esse tempo, o extrato seco para

detecção foi ressuspendido em 4,0 mL de acetonitrila, e seguiu para derivatização, utilizando 200,0 µL da amostra acrescido de 700 µL do derivatizante, composta por ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: água (20:10:70, v/v), onde permaneceu a 70,0°C por oito minutos. Logo após, foi realizada a quantificação de AFB₁, conforme metodologia descrita por Trucksess *et al.* (1994), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do NUEPPA/CCA/UFPI, com metodologia e equipamento semelhante ao tópico produção de núcleos de AFB₁.

2.4.5 Estudo histopatológico

Das tilápias selecionadas para as análises histopatológicas foram retiradas amostras do fígado e rins. As amostras foram transferidas para frascos coletores, fixadas em formol tamponado a 10% e encaminhadas ao Laboratório de Morfofisiologia do CCS/UFPI para processamento histológico. Para fixação dos tecidos, foram utilizadas técnicas rotineiras de inclusão em parafina, com cortes em micrótomo (4,0 µm) e coloração por hematoxilina e eosina (H-E) (LUNA, 1968). As lâminas dos cortes histológicos foram examinadas em microscópio de luz binocular (Olympus, Tóquio, Japão) com aumento de 100, 200 e 400 vezes e as imagens obtidas por meio de fotomicrográfico digital acoplada no próprio microscópio.

2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos no experimento foram submetidos aos procedimentos GLM pelo software SAS versão 9.0 (SAS, 2009) e realizado análise de variância e teste de comparação de médias pelo SNK, baseado no *Lsmeans* a 5,0 % de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade testados na água dos viveiros (tabela 3) encontram-se em conformidade ao estabelecido pela legislação ambiental vigente para classe 2, referentes às águas destinadas à criação natural ou intensiva de organismos aquáticos utilizados para o consumo humano (CONAMA, 2005). Esses valores médios propostos pela legislação referem-se aos ambientes de aquicultura de um modo geral, sem particularizar necessidades específicas das diferentes espécies cultivadas nas variadas latitudes brasileiras.

Tabela 3. Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água das caixas de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB1, *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada e maltodextrina durante o período de 45 dias

Parâmetros	Tratamentos								Padrão (CONAMA, 2005)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
Temperatura da água (°C)	26,1 ^{ab} ± 0,5	25,5 ^b ± 0,5	25,8 ^{ab} ± 0,2	26,1 ^a ± 0,2	25,6 ^{ab} ± 0,4	26,2 ^a ± 0,5	25,6 ^{ab} ± 0,7	25,8 ^{ab} ± 0,7	20,0 a 29,0
pH	7,5 ^a ± 0,6	7,7 ^a ± 0,7	7,3 ^a ± 0,5	7,5 ^a ± 0,7	7,8 ^a ± 0,6	7,1 ^a ± 0,2	7,3 ^a ± 0,5	7,4 ^a ± 0,3	6,0 a 9,0
Amônia (mg/L)	0,5 ^b ± 0,3	0,6 ^b ± 0,5	0,6 ^b ± 0,2	0,5 ^b ± 0,3	0,8 ^a ± 0,4	0,5 ^b ± 0,3	0,5 ^b ± 0,3	0,5 ^b ± 0,3	Máx. 2,0 em pH ≤ 8,0
Nitrito (mg/L)	0,2 ^a ± 0,1	0,1 ^a ± 0,1	0,2 ^a ± 0,1	0,2 ^a ± 0,1	0,2 ^a ± 0,1	0,2 ^a ± 0,1	0,1 ^a ± 0,1	0,3 ^a ± 0,0	Máx. 1,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	10,3 ^{bc} ± 1,6	10,0 ^c ± 1,8	9,8 ^c ± 1,6	11,8 ^a ± 1,6	10,3 ^{bc} ± 2,2	11,1 ^{ab} ± 1,9	9,8 ^c ± 1,1	10,6 ^{bc} ± 1,6	Min. 5,0

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

T1: Controle (0,0 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T2: (0,0 µg/kg de AFB1; 10⁷ UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T3: (0,0 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina); T4:(100 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T5: (0,0 µg/kg de AFB1; 10⁷ UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina); T6: (100µg/kg de AFB1; 10⁷ UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T7: (100µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina) e T8: (100µg/kg de AFB1; 10⁷ UFC/g de levedura e 20 g/kg de maltodextrina)

Devido a sua rusticidade, a tilápia adapta-se a condições ambientais diferentes das que são propostas pela legislação, dentre elas, a temperatura máxima da água de 29,0°C (CONAMA 2005). Ferreira *et al.* 2018, recomendam que temperaturas da água inferiores ou superiores as recomendadas pela legislação (CONAMA 2005) podem causar perdas no desenvolvimento zootécnico. Porém, foi observado por Azaza *et al.* 2020 que as tilápias apresentam bom desempenho entre 22,0 e 30,0°C, com conforto térmico a 28,0°C, sendo capazes de se adaptar até 32,5°C (AZAZA; DHRAIEF; KRAIEM, 2008). Durante o período experimental, observou-se que a temperatura da água nos tanques oscilou entre 21,0°C e 29,5°C, porém as diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$) não representou um fator de estresse para os peixes na avaliação do fator K e permaneceram dentro dos limites recomendado pela legislação (Tabela 3).

Dentre os parâmetros de qualidade da água analisados, os valores de pH, amônia e nitrito podem indicar a interferência das condições ambientais na qualidade de vida dos peixes. O nitrogênio presente na água pode elevar os índices de pH, valores superiores a 7,0 podem estar associados a excreção de amônia pelas brânquias e a decomposição microbiana dos resíduos orgânicos (fezes, restos de ração, dentre outros) e consequente produção de nitrito e nitrato. Os níveis de pH diferentes do recomendado (CONAMA, 2005) aumenta os níveis de estresse das espécies por indicar presença de derivados metabólicos tóxicos, favorecendo a ocorrência de mortalidade dos peixes (KUBITZA, 1998). Pode-se observar que após o período de adaptação das tilápias ao ambiente de cultivo, não houve morte dos peixes durante todo o período experimental, mesmo nos tratamentos com toxina de cultivo, indicando que as variáveis de pH, amônia e nitrito (Tabela 3) estavam adequadas.

Embora, os valores máximos de amônia para cultivo de peixes sejam 2,0 mg/L em $\text{pH} \leq 8,0$ (CONAMA, 2005), a tilápia pode apresentar bom desempenho zootécnico, mesmo com amônia até 20,0 mg/L em $\text{pH} 8,47$, por esse motivo esse peixe pode ser utilizado como índice biológico em estações para tratamento de esgoto (FERREIRA *et al.* 2018). Pode-se observar na Tabela 3, que os índices médios de amônia variaram entre os tratamentos ($P < 0,05$), sendo o T5 o que obteve as maiores médias das substâncias nitrogenadas avaliadas, provavelmente pelo maior esforço metabólico para consumo de proteína derivado da suplementação de leveduras ração comercial.

A leitura do oxigênio dissolvido (OD) na água é importante para analisar a estabilização da matéria orgânica presente no ambiente aquático. Esse elemento é fundamental para a vida dos seres e dos processos de degradação da matéria orgânica.

Teores de OD inferiores a 5,0 mg/litro (CONAMA, 2005) são considerados com fatores de estresse e podem causar mortalidade dos peixes. No ambiente de cultivo pesquisado, os valores de OD variaram nos diversos tratamentos (Tabela 3), porém estão conforme a legislação. Durante o período experimental, os tanques de todos os tratamentos foram sifonados sempre que ocorria acúmulo de matéria orgânica no substrato, sendo constante o nível da água repostado constante e a aeração individual ocorria ininterruptamente. Esses cuidados observados, durante experimento, favoreceram que não ocorresse acúmulo de matéria orgânica no ambiente de cultivo.

As condições físico-químicas do ambiente oferecidas para cultivo experimental estavam adequadas para manutenção do bem-estar dos peixes, garantindo um bom estado de hígidez observado no índice de fator K (Tabela 4). Dessa forma, as variações observadas do desenvolvimento zootécnico das tilápias deve-se aos tratamentos testados (tabela 4). Ocorreram diferenças significativas ($P < 0,05$) para ganho de peso médio, ganho de comprimento médio, taxa de crescimento específico e fator de condição de Fulton dos alevinos de tilápia-do-Nilo durante o período experimental.

Tabela 4. Médias e desvio padrão do desempenho zootécnico de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo AFB1, *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada e maltodextrina no período de 45 dias

Tratamentos	Parâmetros			
	GPM (g)	TCE (%)	GCM (mm)	Fator K
T1 (Controle)	26,27 ^b ± 5,62	1,55 ^c ± 0,09	59,75 ^b ± 13,81	0,13 ^{ab} ± 0,05
T2	32,24 ^b ± 8,34	1,68 ^c ± 0,21	61,25 ^b ± 6,34	0,14 ^a ± 0,04
T3	41,92 ^a ± 6,78	1,93 ^a ± 0,06	77,75 ^a ± 4,92	0,09 ^{cd} ± 0,03
T4	27,69 ^b ± 4,40	1,68 ^c ± 0,09	72,75 ^a ± 7,80	0,07 ^{cd} ± 0,02
T5	43,23 ^a ± 11,71	1,96 ^a ± 0,21	74,25 ^a ± 12,44	0,11 ^{ab} ± 0,04
T6	38,90 ^a ± 7,09	1,86 ^{ab} ± 0,10	70,25 ^{ab} ± 6,94	0,12 ^{ab} ± 0,04
T7	30,00 ^b ± 2,67	1,71 ^b ± 0,19	77,50 ^a ± 7,04	0,06 ^d ± 0,01
T8	27,97 ^b ± 10,77	1,56 ^c ± 0,13	59,50 ^b ± 5,91	0,13 ^{ab} ± 0,04

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

T1: Controle (0,0 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T2: (0,0 µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T3: (0,0 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina); T4:(100 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T5: (0,0 µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 e 20g/kg de maltodextrina); T6: (100µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T7: (100µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina) e T8: (100µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina).

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

O ganho de peso médio (GPM) indica a variação de peso das tilápias do início ao final do período experimental e foi observado diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4). O ingrediente utilizado para a formulação dos tratamentos que favoreceu o melhor resultado para GPM, foi a maltodextrina (T3) tanto isolada na ração, como associada com a levedura (T5). Porém aflatoxina adicionada a ração com maltodextrina não proporcionou o mesmo efeito zootécnico (T7). O principal órgão para o metabolismo de carboidratos em peixes é o fígado (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2017), onde também ocorre a detoxificação de toxinas (PINEIRO *et al.*, 2021). Provavelmente, nesse tratamento houve maior gasto energético para detoxificação da AFB1, ocasionando assim o menor rendimento da atuação da maltodextrina no GPM.

As *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas como probióticas em rações e são capazes de adsorver aflatoxina em testes *in vivo* com peixes (PINEIRO *et al.*, 2021). A *S. cerevisiae* A8L3 adicionada a ração (T2) proporcionou o GPM semelhante ($P > 0,05$) ao tratamento controle (Tabela 4). Porém, no tratamento com *S. cerevisiae* A8L3 e aflatoxina (T6) o GPM foi maior do que o controle, provavelmente por apresentar boas características de adsorver micotoxinas, reduzindo a toxidez do alimento fornecido, e favorecendo o metabolismo dos demais nutrientes da ração (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.* 2017).

A taxa de crescimento específico (TCE) é uma das principais formas para avaliar o desenvolvimento dos peixes, por considerar a relação entre GMP pelo período de cultivos (SILVA; OTA; INOUE, 2021). Trata-se de estimativa válida para avaliar o crescimento de alevinos e peixes juvenis por um curto período (BALDISSEROTTO, 2018). A maltodextrina favoreceu a TCE dos alevinos de tilápia ($P < 0,05$) durante o período experimental, porém quando associada a aflatoxina, observou-se redução nesse desempenho (tabela 4). A maltodextrina é um composto rico em carboidratos, que possui efeito protetor como encapsulante de leveduras (POLONI *et al.*, 2021), embora, não possua capacidade adsorvente de aflatoxina comprovadamente.

Selim *et al.* (2014) ao utilizarem *S. cerevisiae* na suplementação de dietas de alevinos de tilápia-do-Nilo, alcançaram taxa de crescimento específico elevada. Com esses resultados, percebe-se que a adição de *S. cerevisiae* A8L3 na ração de alevinos de tilapia-do-Nilo, além de estimular esse efeito protetor e adsorvente (PINHEIRO *et al.*, 2015) comprovadamente em testes “*in vitro*”, favoreceu o bom desempenho desse parâmetro (TCE), devido a adição de microcápsulas de leveduras na ração experimental.

O ganho de comprimento médio (GCM) é conhecido como crescimento alométrico. Esse parâmetro ajuda a mensurar as modificações que ocorrem na forma do corpo do peixe durante a fase de alevinagem (TOLEDO, 2017). Fatores exógenos relativos ao ambiente e a qualidade dos alimentos podem interferir nessa medida (ROCHA, 2005). O consumo de leveduras não teve interferência nesse parâmetro, os maiores GCM foram obtidos pelos alevinos que consumiram rações suplementadas com maltodextrina e as contaminadas, experimentalmente, com aflatoxina.

Nesses tratamentos, pode ter ocorrido dilatação da cavidade celomática pelo aumento do tamanho e volume das vísceras, interferindo na altura e na largura do corpo causando alterações na forma corpórea do peixe, portanto, estando diretamente ligado com o ganho de peso de animal (SCAPIM; BASSANEZI, 2008).

O fator de condição de Fulton (fator K) é um índice adequado para avaliar o grau higidez e bem-estar dos peixes, quanto mais alto sejam esses valores, melhores as condições de cultivo e menores condições de estresse para esses animais (ROCHA *et al.*, 2005; MEDINA *et al.*, 2022). A utilização de leveduras probióticas na alimentação animal pode estimular a imunidade, com conseqüente redução no número de infecções, além de melhorar a sanidade e bem-estar do cultivo (COPPOLA; TURNES, 2004). Observa-se que a suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 nos tratamentos favoreceu as condições de bem-estar relativa ao fator K, mesmo nos que tinham sido contaminados com aflatoxina (Tabela 4), podendo ser caracterizada como probióticas.

Embora, os carboidratos sejam fonte de energia dietética econômica e ideal, a capacidade dos peixes para utilizá-los depende da complexidade e do nível adicionado a dieta (KAMALAM *et al.*, 2017, AZAZA *et al.*, 2020). Vale destacar, que nos tratamentos com maltodextrina na composição da ração, inclusive quando associados a *S. cerevisiae* A8L3 apresentaram maiores valores para os parâmetros zootécnicos (Tabela 4).

A concentração recomendada para a maioria dos probióticos é 9,00 unidades formadoras de colônias por quilo (log UFC/Kg) de ração (SIMON, 2005) que corresponde a 6,00 (log UFC/g). A técnica de microencapsulação favoreceu que a cepa de *S. cerevisiae* A8L3 permanecesse viável na ração, preservando as contagens iniciais e finais em 7,00 log UFC/g sendo semelhantes ($P > 0,05$) durante o período experimental. Também, foram mantidas nos testes *in vivo* no intestino dos peixes, as quantidades e viabilidade desejáveis para um bom probiótico (Tabela 5).

Iwashita *et al.* (2015), ao utilizarem probiótico comercial em pesquisa com contagens de 6,08 (log UFC/g) de *S. cerevisiae* obtiveram contagens de leveduras no intestino de tilápia-do-Nilo próximo ao observado nesta pesquisa.

Tabela 5. Médias e desvio padrão da contagem de leveduras da ração e do intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada no período de 45 dias

Amostras	Contagem de <i>S. cerevisiae</i> A8L3 microencapsulada nos tratamentos com levedura (log UFC/g)			
	T2	T5	T6	T8
Ração início do experimento	7,11 ^{aA} ± 0,3	7,59 ^{aA} ± 0,1	7,52 ^{aA} ± 0,3	7,38 ^{bA} ± 0,1
Ração após o final do experimento (45 dias)	7,38 ^{aA} ± 0,1	7,34 ^{aA} ± 0,1	7,24 ^{aA} ± 0,2	7,22 ^{bA} ± 0,1
Intestino dos alevinos	8,23 ^{aA} ± 0,3	7,90 ^{aA} ± 0,8	7,98 ^{aA} ± 0,6	8,16 ^{aA} ± 0,5

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas nas colunas e maiúscula nas linhas diferem pelo teste SNK (P<0,05). T2: (0,0 µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T5: (0,0 µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina); T6: (100µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T8: (100µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina).

O trato digestório da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) abrange do esôfago até o ânus, sendo o intestino dividido morfologicamente em anterior, médio e posterior (REIS NETO *et al.* 2018). A distribuição dos micro-organismos ao longo da mucosa intestinal é variável devido a acidez estomacal. Por esse motivo, os micro-organismos probióticos devem ser capazes de sobreviver ao processo de digestão, permanecendo viáveis no intestino dos peixes, durante o cultivo. No intestino dos alevinos de tilápias, em quase todos os tratamentos, as contagens de *S. cerevisiae* A8L3 foram semelhantes às observadas na ração, com exceção do T8 que foram superiores, em relação à ração inicial (Tabela 5). O comprimento médio do intestino dos alevinos foi 30,0 mm, por serem pequenos, foram utilizados integralmente sem diferenciar as suas porções morfológicas, e com isso as leveduras estavam distribuídas ao longo da mucosa, uniformizando as contagens.

Embora, em quatro tratamentos terem sido adicionados 100,0 µg/kg de aflatoxina B1, constatou-se que essa toxina apenas foi detectada nos fígados dos alevinos de tilápia-do-Nilo dos tratamentos T4 e T7 (Tabela 6). Em estudo com fígados de alevinos de matrinxã (*Brycon cephalus*) a AFB1 foi detectada em concentrações superiores a 10 µg/kg de AFB1 (BEDOYA-SERNA *et al.*, 2018), A *Saccharomyces cerevisiae* que pode estimular resposta contra possíveis injúrias e agentes estranhos (OPIYO *et al.*, 2019). A AFLA B1 não foi

detectada no fígado dos peixes dos tratamentos em que a *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada foi adicionada, possivelmente sua ação adsorvente.

A AFLA B1 não foi detectada nos rins dos alevinos de tilápia em todos os tratamentos (Tabela 6), porém, em pesquisa realizada por Nunes *et al.* (2019) foi detectada em rins de tambaquis alimentados com rações com quantidades superiores a 1000 µg/kg. Ressalte-se que no presente experimento, os níveis de AFLA B1 que foram adicionados a ração podem ter sido metabolizados e excretados sem serem retidos nesses órgãos dessa espécie.

Tabela 6. Média e desvio padrão de detecção de aflatoxinas nos órgãos de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo aflatoxina B1, *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada e maltodextrina no período de 45 dias

Órgãos	Concentração AFB1 (µg/kg)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Fígado	--	--	--	0,434 ^a ± 0,02	--	--	0,343 ^b ±0,05	--
Rim	--	--	--	--	--	--	--	--

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem pelo teste SNK (P<0,05). --: Não Detectável.

T1: Controle (0,0 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T2: (0,0 µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T3: (0,0 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina); T4:(100 µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T5: (0,0 µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 e 20g/kg de maltodextrina); T6: (100µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 0,0 de maltodextrina); T7: (100µg/kg de AFB1; 0,0 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina) e T8: (100µg/kg de AFB1; 107 UFC/g de levedura e 20g/kg de maltodextrina).

A legislação brasileira estabelece como limite máximo 50 µg/kg de aflatoxinas para alimentos de consumo animal, matérias primas e rações (BRASIL, 1988). Concentrações superiores a 500 µg/kg favoreceram a mortalidade de tambaquis (NUNES *et al.* 2019). Embora, no presente experimento tenha sido incluído AFB1 em concentrações superiores às aceitáveis, não ocorreu mortalidade dos alevinos de tilápia durante o período experimental.

Os níveis de toxinas detectadas no fígado dos alevinos de tilápia-do-Nilo podem ser causadoras dos achados histopatológicos (Figura 1). Em estudo realizado com tambaqui, em diversos níveis de aflatoxina, esses achados patológicos em fígado de alevinos de tambaqui só foram evidenciados a partir de concentrações superiores a 1000 µg/kg (NUNES *et al.* 2019), provavelmente pela diversidade metabólica entre *Colossoma macropomum* e *Oreochromis niloticus*.

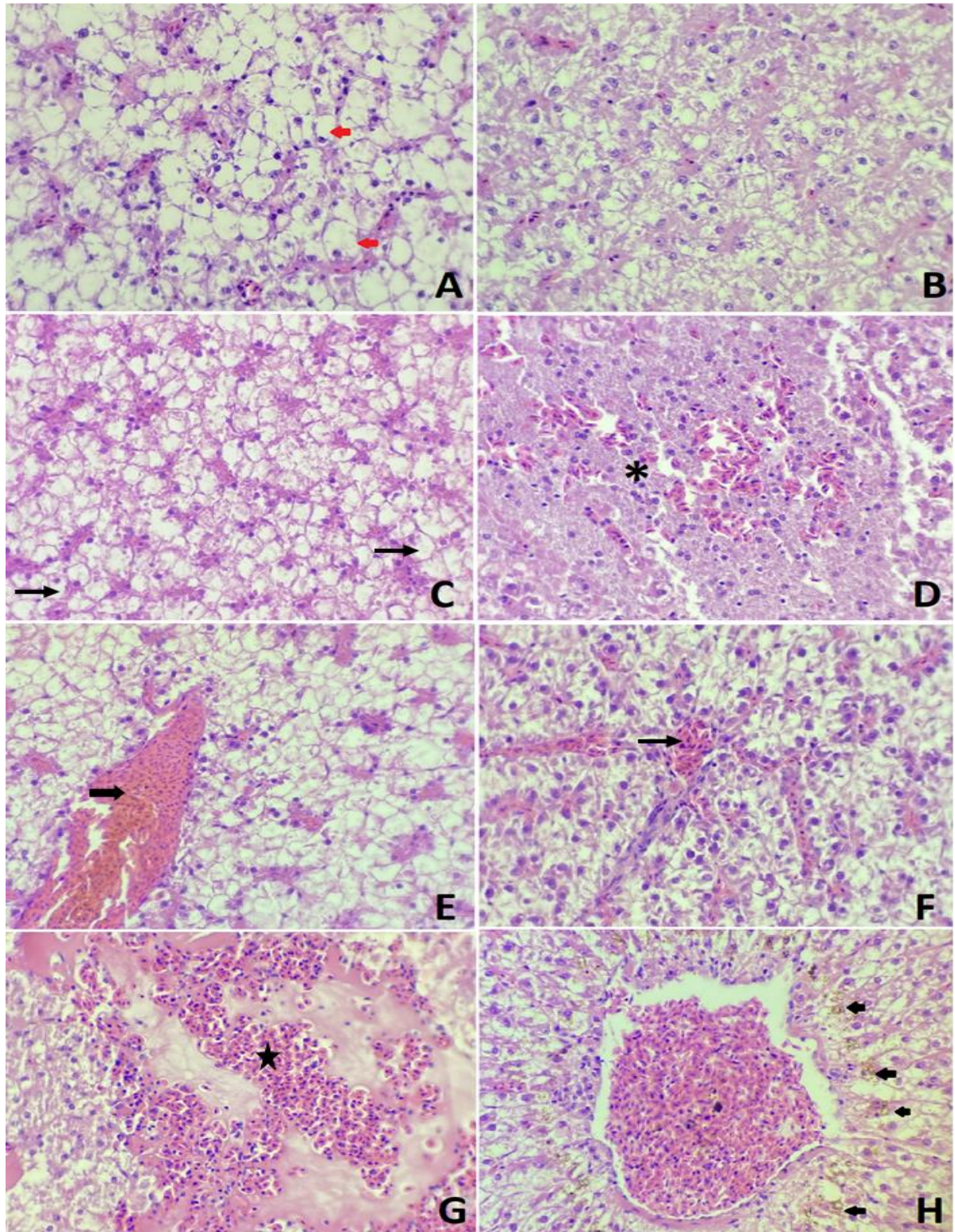


Figura 1. Fotomicrografias de tecido hepático de alevinos de tilápia. (H-E). Aumento de 400x. (A) T1 - Vacuolização de hepatócitos revelando intensa degeneração gordurosa. Notar núcleo dos hepatócitos deslocados na periferia da célula (seta vermelha) em decorrência do acúmulo de lipídeos intracitoplasmático. (B) T2 - Moderada degeneração hidrópica de hepatócitos. (C) T3 - Degeneração gordurosa intensa. (D) T4 - Necrose hepática de coagulação (asterisco), evidenciada pelo aumento da eosinofilia da região e pelos núcleos em picnose, diminuídos de tamanho e intensamente basofílicos. (E) T5 - Degeneração gordurosa intensa e hiperemia de vaso. Notar hemácias no interior do leito vascular (seta), caracterizando hiperemia. (F) T6 - Hiperemia de vaso e sinusoides hepáticos moderada. (G) T7 - Área focalmente extensa de hemorragia, observar hemácias nucleadas fora do leito vascular (estrela). (H) T8 - Hiperemia de vaso. Observar pigmento de hemossiderina (seta preta) no citoplasma de macrófagos, indicando presença de foco de hemorragia antiga.

O consumo de ração comercial proporcionou esteatose nos fígados analisados (Figura 1 A), provavelmente causada pelo alto teor em lipídios na formulação (Tabela 1). A ração suplementada com de maltodextrina (Figura 1 B) ou maltodextrina associada a *S. cerevisiae* (Figura 1 E) não interferiu no nesse processo inflamatório. Dessa forma a essa associação pode acarretar intensa hiperemia de vasos sanguíneos. A inclusão de *S. cerevisiae* isoladamente (Figura 1 B) pode ocasionar moderada degeneração hidrópica dos hepatócitos.

A aflatoxina presente na ração pode causar necrose hepática de coagulação evidenciada pelo aumento de eosinofilia e pelos núcleos em picnose e hemorragia, com provável perda de função hepática (Figura 1 D) a longo prazo. Porém, quando rações contaminadas com aflatoxina são suplementadas com maltodextrina, observa-se formação de lesões mais complexas tais como: hemorragias teciduais e necrose liquefativa (Figura 1 G). A complementação com maltodextrina associada a *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada às rações contaminadas com aflatoxina pode causar hiperemia de vaso, pigmento de hemossiderina no citoplasma de macrófagos, indicando presença de foco hemorrágicos antigos (Figura 1 H). A utilização da *S. cerevisiae* em rações contaminadas com AFB1 observa-se formação de moderada hiperemia nos vasos sanguíneos e nos sinusóides hepáticos, com preservação dos tecidos hepáticos.

Com relação a sanidade renal, pode-se observar que a ração comercial e a *S. cerevisiae* A8L3 não causam lesões nos tecidos renais (Figuras 2 A e 2B). A complementação da ração comercial com maltodextrina pode propiciar presença de cilindros tubulares hialinos e oclusão da luz de túbulo renal, provavelmente decorrentes do acúmulo de proteínas e sais (Figura 2 C). Caso essa ração comercial seja contaminada com Aflatoxina B1 pode ocorrer hemorragia entre os túbulos renais na região intersticial (Figura 2 D).

A lesões renais causadas pelo consumo de maltodextrina na ração não são minimizadas com a associação de *S. cerevisiae* A8L3 (Figura 2 E). Porém, rações contaminadas com alfatoxina B1 podem ter seu efeito tóxico reduzido quando suplementadas com *S. cerevisiae* A8L3 (Figura 2 F). Incluir maltodextrina em rações contaminadas com aflatoxina B pode exacerbar o efeito da micotoxina, causando nefrite intersticial acentuada (Figura 2G).

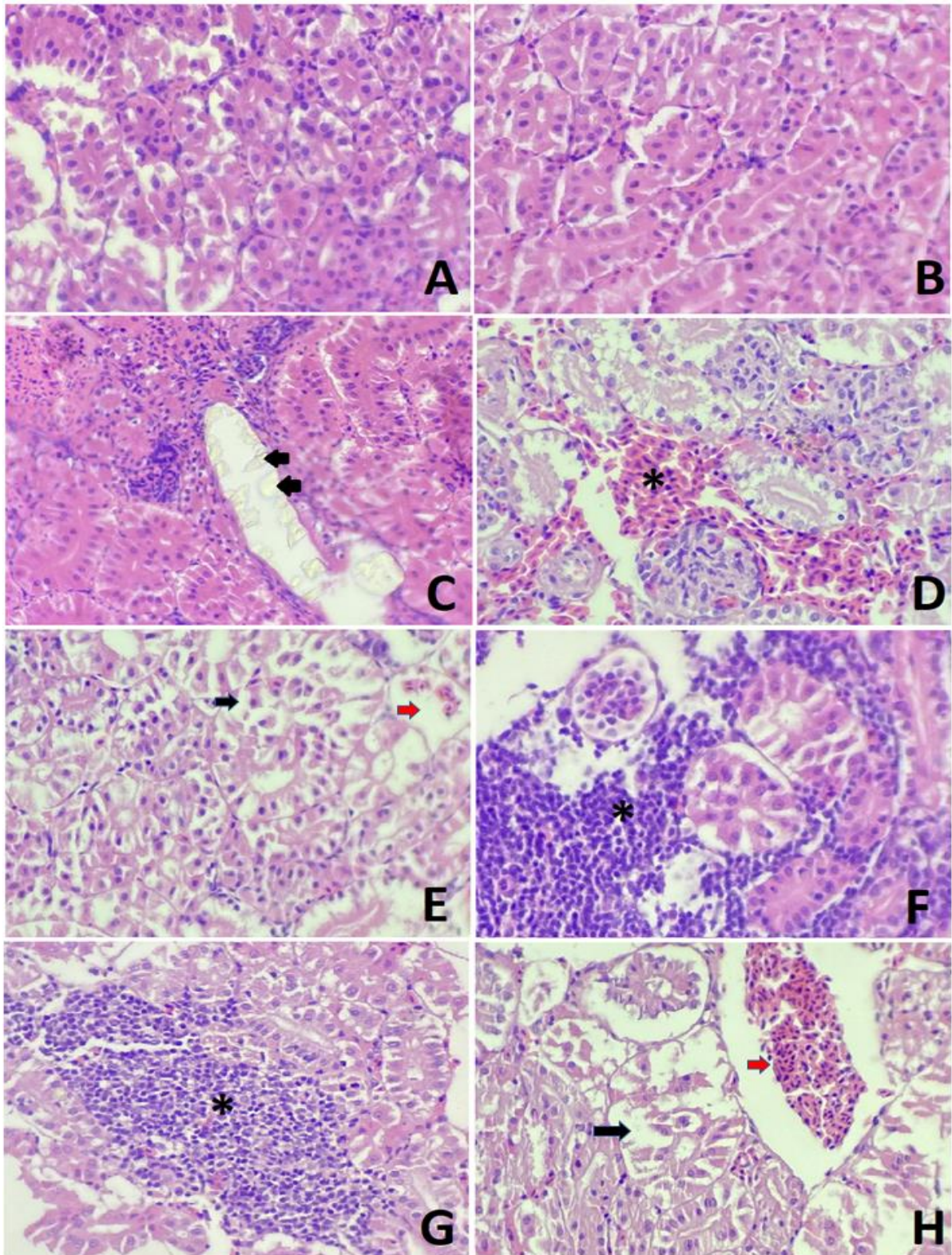


Figura 2. Fotomicrografias de tecido renal de alevinos de tilápia. (H-E). Aumento de 400x. (A) T1 - Túbulos renais com histoarquitetura normal. (B) T2 - Túbulos renais com histoarquitetura normal. (C) T3 - Presença de cilindros tubulares hialinos (seta preta) ocluindo a luz de um túbulo renal, provavelmente decorrentes do acúmulo de proteínas e sais. (D) T4 - Área de hemorragia (asterisco), notar presença de hemácias fora do leito vascular, na região do interstício, entre os túbulos renais. (E) T5 - Degeneração hidrópica de túbulos renais, observar tumefação celular e desorganização do arranjo tubular. (F) T6 - Discreta nefrite intersticial (asterisco) caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear. (G) T7 Nefrite intersticial acentuada (asterisco), observar infiltrado inflamatório com presença de células mononucleares no interstício, entre os túbulos renais. (H) T8 - Hiperemia de vaso sanguíneo, observar hemácias no interior do leito vascular (seta vermelha) e degeneração hidrópica de túbulos renais (seta preta).

O efeito protetor da *S. cerevisiae* A8L3 nos tecidos renais não é observado quando essa levedura se encontra associada à maltodextrina nas rações contaminadas por aflatoxina B1 (Figura 2H). Manteve-se os efeitos observados de aflatoxicose com hiperemia de vaso sanguíneo (figura 2D), e a degeneração hidrópica de túbulos renais causados pelo consumo de maltodextrina (Figura 2C), semelhante ao tratamento T7.

O tecido renal dos alevinos de tilápia-do-Nilo nos tratamentos T1 e T2 apresentou suas estruturas preservadas. Porém, no tecido hepático as alterações observadas são consideradas como reversíveis, podendo ser corrigidas com um monitoramento frequente do manejo desses animais. Nos demais tratamentos, as alterações histopatológicas observadas nos tecidos hepáticos (vacuolização, degeneração dos hepatócitos, necrose e infiltrado inflamatório) e nos tecidos renais (nefrite, presença de cilindros em túbulos renais e hemorragia) podem se tornar crônicos causando redução do desempenho zootécnico, perda de função, redução da sanidade e mortalidade dos peixes. Dessa forma, é relevante dar o prosseguimento a essas investigações, na busca de melhorar cada vez mais o desempenho e sanidade na piscicultura.

4. CONCLUSÕES

A cepa de *S. cerevisiae* A8L3 microencapsulada com maltodextrina possui capacidade probiótica *in vivo*, por ser capaz de colonizar-se no intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e manter-se viável em quantidades desejáveis no lume intestinal. O processo de microencapsulamento da cepa de *S. cerevisiae* A8L3 com maltodextrina permite a adsorção de Aflatoxina B1 adicionada as rações *in vivo*.

A *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 introduzida em ração contaminada com 100 µg/kg de AFB1 adsorve essa micotoxina, promove efeito sanitário significativo por preservar as lesões hepáticas e renais. Além de melhora o desempenho zootécnico dos peixes, porém eleva o nível de estresse, provoca degeneração gordurosa hepática e nefrite intersticial, devendo ser evitada.

5. REFERÊNCIAS

- AFSHAR, P. Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. **Toxicon**, v. 178, p. 50–58, 2020.
- AL-KHALAIFAH, H. S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry Science**, 97:3807–3815, 2018.
- ALTOMARE, C.; LOGRIECO, A. F.; GALLO, A. Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi: Risk and Management. A Challenge for Future Global Food Safety and Security. **Encyclopedia of Mycology**, v. 1, 2021.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington, v. 2, 440 cap. 49, p. 49-53, 1998.
- ARMANDO, M. R. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* 444 strains from animal environment with in vitro aflatoxin B1 binding ability and anti-pathogenic bacterial 445 influence. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.
- ASGHAR, M. A. *et al.* Effects of climatic conditions and hermetic storage on the growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin B1 contamination in basmati rice. **Journal of Stored Products Research**, v. 96, p. 101944, 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, P. Peixe BR da Piscicultura. **Anuario 2022**, p. 1–140, 2022.
- AZAZA, M. S.; DHRAIEF, M. N.; KRAIEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, p. 98–105, 2008.
- AZAZA, M. S. *et al.* Growth Performance, Nutrient Digestibility, Hematological Parameters, and Hepatic Oxidative Stress Response in Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fed Carbohydrates of Different Complexities. **Animals (Basel)**, v. Oct; 10(10, n. 1913, 2020.
- BALDISSERA, M. D. *et al.* Aflatoxin B1-contaminated diet disrupts the blood–brain barrier and affects fish behavior: Involvement of neurotransmitters in brain synaptosomes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 45–51, 1 jun. 2018.
- BALDISSEROTO, Bernardo. Fisiologia de peixes aplicada à Piscicultura. 3. Ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 352 p. 2018.
- BASHIRY, M. *et al.* The prevalence of aflatoxins in commercial baby food products: A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 100–115, 2021.
- BEDOYA-SERNA, C. M. *et al.* Effects of dietary aflatoxin B1 on accumulation and performance in matrinxã fish (*Bryconcephalus*). **Plos One**, v. 13, n. 8, ago 2018.

- BIANCHINI, A.; BULLERMAN, L. B. Biological control of molds and mycotoxins in foods. 333 In: APPELL, M., *et al.* **Mycotoxin prevention and control in agriculture**. ACS Symposium 334 Series: American Chemical Society, 2010. Cap.1, p 1-16.
- BENKERROUM, N. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. **Int J Environ Res Public Health**. v. 1, p. 1–28, 2020.
- BOER, J. DE; AIKING, H. Considering how farm animal welfare concerns may contribute to more sustainable diets. **Appetite**, v. 168, n. August 2021, p. 105786, 2022.
- 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, 2011.
- BOYD, C. E. **Water quality management for ponds fish culture**. Development in aquaculture and fisheries 460 science. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing 21 Company, 1990, 345p.
- BRASIL. Conselho Nacional de Controle De Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013. **Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA**. Brasília, 2013.
- BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, 2007.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Food Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 102–106, maio, 1997.
- CALVET, R. M. *et al.* Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. **Ciênc Rural**. 45(6):1021-1026. 2015.
- CARNEIRO, C. J. *et al.* Cadeia Produtiva da Piscicultura: Um olhar para a evolução da tilapicultura no Brasil. **Revista Perspectiva**, v. 46, p. 25–34, 2022.
- CARUSO, M. A. *et al.* Food Hydrocolloids β -glucans obtained from beer spent yeasts as functional food grade additive: Focus on biological activity. **Food Hydrocolloids**, v. 133, n. July, p. 107963, 2022.
- CASELLI, M. *et al.* Actual concept of “probiotics”: Is it more functional to science or business? **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 10, p. 1527–1540, 2013.
- CAST. Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**, Task Force Report n °139, Ames, USA. 2003.

CECCHINI, F. *et al.* Anthocyanins enhance yeast's adsorption of Ochratoxin A during the alcoholic fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 2, p. 309–314, 2019.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 10 de março de 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília, DF, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiab>>.

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

DAS, T. K. *et al.* Current status of probiotic and related health benefits. **Applied Food Research**, v. 2, n. 2, p. 100185, 2022.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 907–924, 2019.

DORNINGER G. C, JENKINS T, SCHATZMAYR G. Ocorrência global de micotoxinas na alimentação: uma pesquisa de dez anos. **Toxinas**, 11(7): 375, 2019.

EL-SAYED, E. S. R. *et al.* Exploiting the exceptional biosynthetic potency of the endophytic *Aspergillus terreus* in enhancing production of Co₃O₄, CuO, Fe₃O₄, NiO, and ZnO nanoparticles using bioprocess optimization and gamma irradiation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2463–2474, 2022.

FERREIRA, A. H. C. *et al.* Avaliação do efeito da adição de probiótico na dieta de alevinos e juvenis de tilápias-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) criados em esgoto doméstico tratado Probiotic. **Eng Sanit Ambient**, v. 23, n. 4, p. 665–674, 2018.

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

FURIAN, A. F. *et al.* Recent advances in assessing the effects of mycotoxins using animal models. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, p. 100874, 1 out. 2022.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. **Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos**. 3. ed. Mexico: Inc. USA, 2011. 127 p.

GOMES, A. L. *et al.* Fish feed mycobiota and aflatoxins in round fish tissues. **j sci food agric**, v. 102, p. 1391–1396, 2021.

HAMMOOD, M. A. & AL-NAZZAL, A. I. The Effects of Fumonisin-B1 Determined Storage Wheat on Sensory and some Physiological Parameters in Rats. **Tikrit Journal for Agricultural Sciences**, v. 20, n. 1, p. 68–76, 2020.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HÖTZEL, M. J.; VANDRESEN, B. Brazilians' attitudes to meat consumption and production: Present and future challenges to the sustainability of the meat industry. **Meat Science**, v. 192, p. 108893, out. 2022.

HUA, Z. *et al.* Contamination of Aflatoxins Induces Severe Hepatotoxicity Through Multiple Mechanisms. **Front. Pharmacol.** v. 11, n. January, p. 1–14, 2021.

IGARASHI, M. A. Aspectos do potencial econômico da piscicultura, contribuição e perspectivas da atividade para o desenvolvimento sustentável no Brasil. **Revista Unimar Ciências**, v. 28, p. 1–18, 2019.

IWASHITA, M. K. P *et al.* Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 1, p. 60–66, 2015.

KAMALAM, B. S. *et al.* Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. **Aquaculture**, V. 467, Pages 3-27, 2017.

KARLOVSKY, P. *et al.* Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin Research**, v. 32, n. 4, p. 179-205, 2016.

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-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

KERRY, R. G. *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, p. 927 - 939, 2018.

KHIAVIA, N. M. N. *et al.* Reduction of aflatoxin M1 using mixture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cell walls immobilized on silica nanoparticles entrapped in alginate gel. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, p. 103635, 2020.

KHODAEI, D.; JAVANMARDI, F.; KHANEGHAH, A. M. The global overview of the occurrence of mycotoxins in Cereals: A three-year survey, **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 30164-8, 2020.

KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes–Parte I. **Panorama da Aquicultura**, v. 8, n. 47, p. 35-39, 1998.

KUMAR, A. *et al.* Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 3, p. 17, 2021.

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.

LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York: McGraw Hill, 258p, 1968.

MAGNOLI, A. P. *et al.* Effect of low levels of aflatoxin B 1 on performance , biochemical parameters , and aflatoxin B 1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 48–58, 2011.

MALLMANN, C. A. *et al.* Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos. **Anais**. Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p. 213-224.

MARQUEZONI, R. DE S. *et al.* Ocorrência e importância das aflatoxinas em alimentos: uma revisão / Occurrence and importance of aflatoxins in foods: a review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, p. 8464–8471, 2022.

MARCHESE, S. *et al.* Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins**, v. 10, p. 214, 2018.

MARSHALL, H. *et al.* Novel decontamination approaches and their potential application for post-harvest aflatoxin control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 106, p. 489–496, 2020.

MARIJANI, E.; KIGADYE, E.; OKOTH, S. Occurrence of Fungi and Mycotoxins in Fish Feeds and Their Impact on Fish Health. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 17, 2019.

MEDINA, L. DE S. *et al.* Sistema de recirculação aquícola: relações peso-comprimento e fatores de condição de quatro espécies de peixes tropicais. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e52811427368, 2022.

MONTANHA, F. P. *et al.* Mycotoxins in dry-cured meats: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 494–502, 2018.

MUHALDIN, B. J.; SAARI, N.; HUSSIN, A. S. M. Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. **Molecules**, v. 25, n. 11, 2020.

MUZZOLÓN, J. **Uso de bacterias lácticas y/o levaduras en la prevención de aflatoxicosis en animales de compañía**. 2010. 110 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Microbiologia) – Universidade Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, 2010.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos-Revisão da Literatura. **Revista brasileira ciência e saúde**, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

NUNES, E. M. C. G. *et al.* Effects of aflatoxin B1 on performance and health of tambaqui fingerlings (*Colossoma macropomum*). **International Aquatic Research**, v. 11, n. 1, p. 73–83, 2019.

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, V. Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. **Toxins**. v. 12, n. 3, pág. 160, 2020.

- OPIYO, M. A. *et al.* Dietary administration of probiotics modulates non-specific immunity and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2019.
- ORTEGA-BELTRAN, A.; BANDYOPADHYAY, R. Contributions of integrated aflatoxin management strategies to achieve the sustainable development goals in various African countries. **Global Food Security**, v. 30, p. 100559, 2021.
- PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 50–60, 2017.
- PENG, Z. *et al.* Current Major Degradation Methods for Aflatoxins: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 30159-0, 2018.
- PEDROZA FILHO, M. X. *et al.* O mercado de peixes da piscicultura no Brasil: estudo do segmento de supermercados. **Embrapa Pesca e Aquicultura**, v. 1, p. 38, 2020.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, A. *et al.* Dietary carbohydrates improve oxidative status of common dentex (*Dentex dentex*) juveniles, a carnivorous fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 203, p. 17–23, 2017.
- PICKOVA, D. *et al.* A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. **Toxins**. p. 1–33, 2020.
- PIETSCH, C. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. **Mycotoxin Research**, v. 36, p. 41–62, 2020.
- Pinpimai, K. *et al.* The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Res. Vet. Sci.* 102, 103–111. 2015.
- PINHEIRO, R. E. E. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic agent and a possible aflatoxin B1 adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 862–870, 2020.
- PINHEIRO, R. E. E. *et al.* Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, n. 5, p. 4268–4279, 2015.
- PINHEIRO, R.E.E. *et al.* Effect of addition to feed contaminated with aflatoxin B on the health and performance indices of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fingerlings. **WORLD MYCOTOXIN JOURNAL (ONLINE)**, v. 14, p. 1-12, 2021.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3 ed. London: Blackie academic and Professional, 593 p. 2009.
- POLONI, V. L. *et al.* Influence of technological procedures on viability, probiotic and anti-mycotoxin properties of *Saccharomyces boulardii* RC009, and biological safety studies. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 132–140, 2021.

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

RINGO, E. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 116-136, 2020.

ROCHA, M. A. *et al.* Uso do fator de condição alométrico e de fulton na comparação de carpa (*Cyprinus carpio*), considerando os sexos e idade Use of the allometric and the fulton condition factors to compare the carp (*Cyprinus carpio*) considering sexes and ages. **Semina: Ciências Agrárias**, v. v. 26, n. n. 3, p. 429–434, 2005.

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

ROMERO-SANCHEZ, I. *et al.* Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 395, p. 133611, 2022.

RUSHING, B. R.; SELIM, M. I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 18, p. 30849-4, 2018.

SAS Institute Inc. (2002) **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.0. Cary, Statistical Analysis System Institute. 513p.

SCAPIM, J.; BASSANEZI, R. C. Modelo de von Bertalanffy generalizado aplicado às curvas de crescimento animal. **Revista Biomatemática**, v. 18, p. 1–14, 2008.

SHEN, M-H.; SINGH, R. K. Detoxification of aflatoxins in foods by ultraviolet irradiation, hydrogen peroxide, and their combination - A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, p. 110986, 2021.

SINGH, U.; GUPTA, S.; GUPTA, M. A review study on biological ill effects and health hazards of aflatoxins. **Asian Journal of Advances in Medical Science**. v. 3, n. 1, p. 1–8, 2021.

SIPOS, P. *et al.* Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. **Toxins**, v. 13, p. 1–17, 2021.

SILVA, T. S. DE C.; OTA, E. DO C.; INOUE, L. A. K. A. Manejo alimentar de tilápias de 1 g: efeito da taxa e frequência de alimentação no crescimento e custo da produção em diferentes temperaturas Manejo alimentar de tilápias de 1 g: efeito da taxa e frequência de alimentação no crescimento e custo da produ. **Embrapa Agropecuária Oeste**, v. 52, p. 1–12, 2021.

SIMON, O. Micro-organisms as feed additives-probiotics. **Advances in Pork Production**. v. 16, p. 161–167. 2005.

TAPIA-SALAZAR, M. *et al.* Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. **X Avances en Nutrición Acuícola**. In: Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, San Nicolás de los Garza, México. p. 514-546, 2010.

TOLEDO, E. A. DE. O Modelo de crescimento de peixes de Von Bertalanffy. **Jornal Eletrônico de Ensino e Pesquisa de Matemática**, v. 1, 2, p. 84–91, 2017.

The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief. [s.l.] FAO, 2020.

TRAN, N. T.; LI, S. Potential role of prebiotics and probiotics in conferring health benefits in economically important crabs. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 3, p. 100041, 2022.

TRUCKSESS, M. *et al.* Multifunctional column coupled with liquid chromatography for 456 determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and 457 pistachio nuts: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 77, p.1512–1521, 458 1994.

TUPPIA, C. *et al.* Yeast and bacteria from ensiled high moisture maize grains as potential mitigation agents of fumonisin B1. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2443–2452, 2017.

TURBIC, A. *et al.* Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. **Food Additives Contaminants**, v. 19, p. 144-152. 2002.

VIDAL, L. V. O. *et al.* Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43 n. 8,2, 2008.

WACHOWSKA, U. *et al.* The application of antagonistic yeasts and bacteria: An assessment of in vivo and under field conditions pattern of Fusarium mycotoxins in winter wheat grain. **Food Control**, v. 138, n. October 2021, p. 1–10, 2022.

WANG, J.; XIE, Y. Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 3, p. 117–125, 2020.

WEAVER, A. C. *et al.* Meta-analysis of the effects of mycotoxins and yeast cell wall extract supplementation on the performance, livability, and environmental sustainability of broiler production Literature Search and Selection of. **Poultry Science**, v. 101, n. 9, p. 102043, 2021.

ZANDER, K.; FEUCHT, Y. Consumers Willingness to Pay for Sustainable Seafood Made in Europe. **Journal of Inter. Food & Agribusiness Marketing**, v. 0, n. 0, p. 1–25, 2017.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos resultados dos testes *in vitro* deste estudo, foi constatado que a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* A8L3 testada apresenta propriedades para atuar como um bom probiótico e tem a capacidade de adsorver AFB1. Em estudos *in vivo* com alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contaminadas com AFB1 e suplementados com *S. cerevisiae* microencapsulada com maltodextrina, em ambiente de piscicultura, foram observadas melhorias nos parâmetros de desempenho e saúde dos peixes.

A microencapsulação de probióticos constitui-se em abordagem promissora para preservar as propriedades tolerantes dos micro-organismos. Neste sentido, a cepa de levedura *S. cerevisiae* A8L3, microencapsulada em *Spray-dryer*, demonstrou excelente viabilidade, além de sua capacidade de adsorvente conservadas, tornando-a uma alternativa viável de inserção em dietas utilizadas na criação de peixes.

A formulação das dietas com maltodextrina melhorou os quesitos zootécnicos, porém não proporcionou proteção imunológica contra aflatoxinas, além de ocasionar desconforto nesses animais com alterações hepáticas e renais. Já, a levedura *S. cerevisiae* microencapsulada não ocasionou melhorias nos parâmetros zootécnicos dos alevinos de tilápia-do-Nilo, mas , atuou positivamente na imunidade dos peixes.

A adsorção de aflatoxinas por leveduras é um tema de grande importância para a segurança alimentar e a saúde pública. Os estudos mostram que as leveduras têm a capacidade de adsorver as aflatoxinas e reduzir sua concentração em alimentos e ração animal. Portanto, o uso de leveduras para a adsorção de aflatoxinas é uma estratégia promissora e natural para reduzir o risco de contaminação por essas toxinas.

7. LITERATURA CITADA

ALEMU, D.; GETACHEW, E.; MONDAL, A. K. Study on the Physicochemical Properties of Chitosan and their Applications in the Biomedical Sector. **International Journal of Polymer Science**, v. 2023, p. 13 pages, 2023.

AFSHAR, P. Aflatoxins biodetoxification strategies based on probiotic bacteria. **Toxicon**, v. 178, p. 50–58, 2020.

AHIWE E. U. *et al.* Can probiotic or prebiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serve as alternatives to in-feed antibiotics for healthy or disease-challenged broiler chickens: a review. **Journal Appl. Poult. Res.** v. 30: 100164. 2021.

AL-KHALAIFAH HS, *et al.* Efeitos de níveis graduais de grãos de cerveja secos fermentados ou tratados enzimaticamente com micróbios no crescimento, na expressão de genes transportadores de nutrientes e digestivos e na relação custo-benefício em frangos de corte. **BMC Vet Res.** 5 de novembro, 16(1): 424. 2020.

ALTOMARE, C.; LOGRIECO, A. F.; GALLO, A. Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi: Risk and Management. A Challenge for Future Global Food Safety and Security. **Encyclopedia of Mycology**, v. 1, 2021.

AMENYOGBE, E. *et al.* The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions: a review. **Aquaculture International**, 28:1017–1041. 2020.

ANJUGAM M. *et al.* Effect of β -1, 3 glucan binding protein based zinc oxide nanoparticles supplemented diet on immune response and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 76, 247–259. 2018.

ANUSUYA S.; SATHIYABAMA, M. Foliar application of β -D-glucan nanoparticles to control rhizome rot disease of turmeric. **Int J Biol Macromol.** Jan; 72: 1205-12. 2015.

ARROYO-MANZANARES, N. *et al.* Occurrence of mycotoxins in swine feeding from Spain. **Toxins**, 11 (2019)

ASGHAR, M. A. *et al.* Effects of climatic conditions and hermetic storage on the growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin B1 contamination in basmati rice. **Journal of Stored Products Research**, v. 96, p. 101944, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, P. Peixe BR da Piscicultura. **Anuario 2022**, p. 1–140, 2022.

BALDISSERA, M. D. *et al.* Aflatoxin B1-contaminated diet disrupts the blood–brain barrier and affects fish behavior: Involvement of neurotransmitters in brain synaptosomes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 45–51, 1 jun. 2018.

- BASHIRY, M. *et al.* The prevalence of aflatoxins in commercial baby food products: A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 100–115, 2021.
- BENKERROUM, N. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. **Int J Environ Res Public Health**. v. 1, p. 1–28, 2020.
- BOER, J. DE; AIKING, H. Considering how farm animal welfare concerns may contribute to more sustainable diets. **Appetite**, v. 168, n. August 2021, p. 105786, 2022.
- BORCHANI, C. *et al.* Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry** v. 163, 108–113. 2014.
- CAMPAGNOLLO FB. *et al.* In vitro and in vivo capacity of yeast-based products to bind to aflatoxins B1 and M1 in media and foodstuffs: A systematic review and meta-analysis. Fernanda B. **Food Research International**, v. 137. 109505. 2020.
- CARUSO, M. A. *et al.* Food Hydrocolloids β -glucans obtained from beer spent yeasts as functional food grade additive: Focus on biological activity. **Food Hydrocolloids**, v. 133, n. July, p. 107963, 2022.
- CASELLI, M. *et al.* Actual concept of “probiotics”: Is it more functional to science or business? **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 10, p. 1527–1540, 2013.
- CHAMPAGNE, CP, CRUZ AG, DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, 22:160–166. 2018.
- CUARÓN, A. D. Effects of Land-Cover Changes on Mammals in a Neotropical Region: a Modeling Approach. *Conserv Biol*. Dec 18;14(6):1676-1692. 2000.
- DAS, T. K. *et al.* Current status of probiotic and related health benefits. **Applied Food Research**, v. 2, n. 2, p. 100185, 2022.
- DAWOOD, M. A. O. *et al.* Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 907–924, 2019.
- DEAK T. Environmental factors influencing yeasts. In: ROSA CA, PETER G, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin: Springer-Verlag. p. 155-74. 2006.
- DORNINGER G. C, JENKINS T, SCHATZMAYR G. Ocorrência global de micotoxinas na alimentação: uma pesquisa de dez anos. **Toxinas**. v. 11 (7): 375. 2019.
- DU B. *et al.* An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. **Trends in Food Science & Technology** v. 41, 49e59. 2015.
- EL-SAADONY, M T. *et al.* The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 117, 36–52. 2021.
- EL-SAYED, E. S. R. *et al.* Exploiting the exceptional biosynthetic potency of the endophytic *Aspergillus terreus* in enhancing production of Co₃O₄, CuO, Fe₃O₄, NiO, and

ZnO nanoparticles using bioprocess optimization and gamma irradiation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2463–2474, 2022.

ENE, J.V. Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. **Medical Sciences - mBio**, 6(4), e00986-15. 2015.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief.** [s.l.], 2020.

FESEL P.H.; ZUCCARO A. β -Glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, 53-60. 2016.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando β -1,3 glucanase Protoplasts production and yeast cell wall lysis using β -1,3 glucanase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(2): 471-476, abr.-jun. 2010.

FULLER R. *et al.* Yeast-derived β -1,3/1,6 glucan, upper respiratory tract infection and innate immunity in older adults. **Nutrition**, 39–40, 30–35. 2017.

FURIAN, A. F. *et al.* Recent advances in assessing the effects of mycotoxins using animal models. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, p. 100874, 1 out. 2022.

GALVES, C. *et al.* Improving the emulsifying property of potato protein by hydrolysis: an application as encapsulating agent with maltodextrin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 70, 102696. 2021.

GOMES, A. L. *et al.* Fish feed mycobiota and aflatoxins in round fish tissues. **j sci food agric**, v. 102, p. 1391–1396, 2021.

GOODARZI, AG. Obtaining of *Lactobacillus delbrueckii* Cold Sensitive Rif Mutants for Shelf Life Prolongation of Dairy Products. **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**, v. 5, Number 1, pp. 546-552. 2016.

GOFFEAU A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science*. 1996 Oct 25;274(5287):546, 563-7.

HAMMOOD, M. A. & AL-NAZZAL, A. I. The Effects of Fumonisin-B1 Determined Storage Wheat on Sensory and some Physiological Parameters in Rats. **Tikrit Journal for Agricultural Sciences**, v. 20, n. 1, p. 68–76, 2020.

HAMZA Z. *et al.* Preparation and characterization of yeast cell wall beta-glucan encapsulated humic acid nanoparticles as an enhanced aflatoxin B1 binder. **Carbohydrate Polymers**, v. 203,185–192. 2019

HASSAN, M. *et al.*, 2021 SERS based sensor for mycotoxins detection: Challenges and improvements. **Food Chemistry**, Volume 344, 15 May, 128652. 2021.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

Holzappel WH, *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr.** Feb;73 (2 Suppl): 365S-373S. 2001.

HÖTZEL, M. J.; VANDRESEN, B. Brazilians' attitudes to meat consumption and production: Present and future challenges to the sustainability of the meat industry. **Meat Science**, v. 192, p. 108893, out. 2022.

HUA, Z. *et al.* Contamination of Aflatoxins Induces Severe Hepatotoxicity Through Multiple Mechanisms. **Front. Pharmacol.** v. 11, n. January, p. 1–14, 2021.

ISMAIL A, *et al.* Early life exposure to dietary aflatoxins, health impact and control perspectives: A review. **Trends Food Sci Technol**, 112:212–224. 2021.

ISMAIL A *et al.* Effect of different micro-bial concentrations on binding of aflatoxin M1 and stability testing. **Food Control**, v. 73:492–496. 2017.

KAGIMURA, F.Y. *et al.* Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 72, 588–598. 2015.

KERRY, R. G. *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, p. 927 - 939, 2018.

KHADEMZADE, O. *et al.* The effects of water additive *Bacillus cereus* and *Pediococcus acidilactici* on water quality, growth performances, economic benefits, immunohematology and bacterial flora of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) reared in earthen ponds. **Aquaculture Research**. 51:1759–1770, 2020.

KHAN A A. *et al.* Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Effect of irradiation. **Carbohydrate Polymers**. v. 140, 442–450. 2016.

KHIAVI, N. M. N. *et al.* Reduction of aflatoxin M1 using mixture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cell walls immobilized on silica nanoparticles entrapped in alginate gel. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, p. 103635, 2020.

KHODAEI, D.; JAVANMARDI, F.; KHANEGHAH, A. M. The global overview of the occurrence of mycotoxins in Cereals: A three-year survey, **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 30164-8, 2020.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: a taxonomic study**. 5th Edition - April 1. eBook ISBN: 9780080931272. 2011.

Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds). **The yeasts, a taxonomic study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology of yeasts. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds). **The yeasts, a taxonomic study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1998.

LIU Y. *et al.* Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.

173, 445–456. 2021.

LUO, Y. *et al.* Trends in Food Science & Technology Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption : Current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, n. July 2019, p. 127–134, 2020.

LUO Y. *et al.* Exogenous Calcium Ions Enhance Patulin Adsorption Capability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Protection**, Vol. 82, No. 8, Pages 1390–1397, 2019.

LUO, Y. *et al.* Effect of yeast cell morphology, cell wall physical structure and chemical composition on patulin adsorption. **PLoS One**, 1–16. 2015.

MARQUEZONI, R. DE S. *et al.* Ocorrência e importância das aflatoxinas em alimentos: uma revisão / Occurrence and importance of aflatoxins in foods: a review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, p. 8464–8471, 2022.

MARCHESE, S. *et al.* Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins**, v. 10, p. 214, 2018.

MARSHALL, H. *et al.* Novel decontamination approaches and their potential application for post-harvest aflatoxin control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 106, p. 489–496, 2020.

MARTÍNEZ-ANTONIO, E. M. *et al.* Modulation of stress response and productive performance of *Litopenaeus vannamei* through diet. **PeerJ**, v. 2019, n. 5, 2019.

MIN L. *et al.* An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. **Animal Nutrition**. v. 7, 42e48. 2021.

MUHALDIN, B. J.; SAARI, N.; HUSSIN, A. S. M. Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. **Molecules**, v. 25, n. 11, 2020.

NARUSAKA, M. *et al.* Yeast Cell Wall Extract Induces Disease Resistance against Bacterial and Fungal Pathogens in *Arabidopsis thaliana* and Brassica Crop. **Plos One**, 10(1), e0115864. 2015

NIMRICHTER, L. *et al.* Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. **Frontiers in Microbiology**, 7:1034, 2016.

NUNES, V. M. *et al.* Innovative modifications in food processing to reduce the levels of mycotoxins. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 155–161, 2021.

OKUMUS E. *et al.* A novel coating material: Ellagitannins-loaded maltodextrin and lecithin-based nanomaterials. **Food Bioscience**. v. 42. 101158. 2021.

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, V. Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. **Toxins**. v. 12, n. 3, pág. 160, 2020.

ORTEGA-BELTRAN, A.; BANDYOPADHYAY, R. Contributions of integrated aflatoxin management strategies to achieve the sustainable development goals in various African countries. **Global Food Security**, v. 30, p, 100559, 2021.

Park, N.; Walsh, M.K. Microbial inhibitory properties of maltodextrin fatty acid esters against food-related microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**. v. 147, 111664. 2021

PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 50–60, 2017.

PENG, Z. *et al.* Current Major Degradation Methods for Aflatoxins: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 30159-0, 2018.

PEREIRA, G V M. *et al.* How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, 36, pp. 2060-2076. 2018

PEREYRA, C. M. *et al.* The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste in fluences the wall thickness and is implicated on the afatoxin B 1 adsorption process. **Food Res Int**. v. 111, n. April, p. 306–313, 2018.

PEREYRA, C. M. *et al.* In vitro ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. **Rev Bras Med Vet**. v. 37, n. 1, p. 25–28, 2015.

PICKOVA, D. *et al.* A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. **Toxins**. p. 1–33, 2020.

PINTO M. *et al.* Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 116. 215–222. 2015.

POLONI, V. L. *et al.* Influence of technological procedures on viability, probiotic and anti-mycotoxin properties of *Saccharomyces boulardii* RC009, and biological safety studies. **Current Research in Food Science**, v. 4, n. February, p. 132–140, 2021.

PRZYBYLSKA-DIAZ D.A. *et al.* b-glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35 998-1006, 2013.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **BIOLOGIA VEGETAL**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

RINGO, E. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 116-136, 2020.

ROMERO-SANCHEZ, I. *et al.* Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 395, p. 133611, 2022.

RUSHING, B. R.; SELIM, M. I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 18, p. 30849-4, 2018.

SALADINO F. *et al.* Influence of probiotic microorganisms on aflatoxins B1 and B2 bioaccessibility evaluated with a simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Food Composition and Analysis** 68 (2018) 128–132

SEDZIELEWSKA, K. A *et al.* GiFRD encodes a protein involved in anaerobic growth in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, 313–321, 2012.

SEN S.; MANSELL T. J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. **Fungal Genetics and Biology**, v. 137, 103333, 2020.

SHEN, M-H.; SINGH, R. K. Detoxification of aflatoxins in foods by ultraviolet irradiation, hydrogen peroxide, and their combination - A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, p. 110986, 2021.

SHIN KS, *et al.* (2001) *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 51:2167–2170

SINGH, U.; GUPTA, S.; GUPTA, M. A REVIEW STUDY ON BIOLOGICAL ILL EFFECTS AND HEALTH HAZARDS OF AFLATOXINS. **Asian Journal of Advances in Medical Science**. v. 3, n. 1, p. 1–8, 2021.

SIPOS, P. *et al.* Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. **Toxins**, v. 13, p. 1–17, 2021.

SOUTO, P. C. M. C. *et al.* Principais micotoxícoses em suínos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 3, p. 480-494, 2017.

SUN C. *et al.* Yeast cell wall induces disease resistance against *Penicillium expansum* in pear fruit and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry** v. 241, 301–307, 2018.

STARMER, W.T.; LACHANCE, M.A. Yeast Ecology. In *The Yeasts: A Taxonomic Study*; Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Eds.; **Elsevier Science: London**, UK; Burlington, MA, USA, p. 65–83, 2011.

TAHEUR FB. *et al.* Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. **International Journal of Food Microbiology** v. 251, 1–7, 2017.

THANUSHREE, MP. *et al.* Mycotoxin contamination in food: An exposition on spices. **Trends Food Sci. Technol**, v. 93, p. 69-80, 2019.

TLEIS M.; VERBEEK F J. Machine Learning approach to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells using sophisticated image features. **Journal of Integrative Bioinformatics**, 12(3):276, 2015.

- TRAN, N. T.; LI, S. Potential role of prebiotics and probiotics in conferring health benefits in economically important crabs. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 3, p. 100041, 2022.
- TUPPIA, C. *et al.* Yeast and bacteria from ensiled high moisture maize grains as potential mitigation agents of fumonisin B1. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2443–2452, 2017.
- VELAZQUEZ-CARRILES C. Immobilizing yeast β -glucan on zinc-layered hydroxide nanoparticle improves innate immune response in fish leukocytes. **Fish and Shellfish Immunology** v. 82, p. 504–513, 2018.
- WACHOWSKA, U. *et al.* The application of antagonistic yeasts and bacteria: An assessment of in vivo and under field conditions pattern of Fusarium mycotoxins in winter wheat grain. **Food Control**, v. 138, p. 1–10, 2022.
- WANG A. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. **Fish and Shellfish Immunology** (2019). S1050-4648(18)30825-8
- WANG, J.; XIE, Y. Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 3, p. 117–125, 2020.
- WANG. L. *et al.*, Identification of key factors involved in the biosorption of patulin by inactivated lactic acid bacteria (LAS) cell. **PloS One** 10(11) 0143431, 2015.
- WEAVER, A. C. *et al.* Meta-analysis of the effects of mycotoxins and yeast cell wall extract supplementation on the performance, livability, and environmental sustainability of broiler production Literature Search and Selection of. **Poultry Science**, v. 101, n. 9, p. 102043, 2021.
- YIANNIKOURIS. A. *et al.* Comparison of the sequestering properties of yeast cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three in vitro models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, 1641–1650, 2013.
- YU B. Y. *et al.* Image processing and classification algorithm for yeast cell morphology in a microfluidic chip. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16(6) 066008, 2011.
- ZANDER, K.; FEUCHT, Y. Consumers ' Willingness to Pay for Sustainable Seafood Made in Europe. **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, v. 0, n. 0, p. 1–25, 2017.
- ZOUMPOPOULOU, G. *et al.* Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. **International Dairy Journal**, v. 67, 46e60, 2017