

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

KATIA FRANCINE WOCHNER

**INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO *Lactobacillus acidophilus* E
PREBIÓTICOS NA REDUÇÃO E BIOACESSIBILIDADE DE
AFLATOXINAS M₁ e B₁ EM LEITE INTEGRAL**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2017

KATIA FRANCINE WOCHNER

**INFLUÊNCIA DO *Lactobacillus acidophilus* E PREBIÓTICOS NA
REDUÇÃO E BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS M₁ e B₁ EM
LEITE INTEGRAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Deisy A. Drunkler

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Colla

MEDIANEIRA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

W837i

Wochner, Katia Francine

Influência do *Lactobacillus acidophilus* e prebióticos na redução e bioacessibilidade de aflatoxinas M1 e B1 em leite integral / Katia Francine Wochner – 2017.

81 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Deisy Drunkler

Coorientadora: Eliane Colla

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Bactérias. 2. Bactérias - Identificação 3. Probióticos. 4. Micotoxinas 4. Alimentos – Dissertações. I. Drunkler, Deisy, orient. II. Colla, Eliane, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



TERMO DE APROVAÇÃO

INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS E PREBIÓTICOS NA REDUÇÃO E BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINA M1 E B1 EM LEITE INTEGRAL

Por

KÁTIA FRANCINE WACHNER

Essa dissertação foi apresentada às oito horas e trinta minutos, do dia trinta de março de dois mil e dezessete, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler (Orientadora – PPGTA)

Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira (Membro Externo – UTFPR/MD)

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior (Membro Externo – UEM)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

DEDICATÓRIA

Dedico à Deus, à minha família que é minha base forte, meu exemplo de vida, os quais nunca mediram esforços para me ver feliz. E à todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim e que fizeram este caminho mais fácil de ser percorrido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda proteção e bênçãos concebidas na minha vida

Agradeço a minha orientadora professora Dr^a Deisy Drunkler, por ter compartilhado comigo seu imenso conhecimento, sempre me orientando com toda dedicação, carinho, paciência e sabedoria. Obrigada por todos os ensinamentos e conselhos que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal. Por ser essa profissional competente e pessoa maravilhosa, muitas vezes uma segunda mãe. Obrigada por acreditar em mim e ter me motivado sempre.

Agradeço também a minha co-orientadora professora Dr^a Eliane Colla, exemplo de competência e dedicação. Obrigada por todo suporte dado a este trabalho, por compartilhar seu conhecimento e pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos meus pais João e Rosemeri Wochner, por todo apoio e amor incondicional que sempre me deram, pelo exemplo de honestidade e caráter que conduziram à minha formação pessoal e intelectual. Por todos os esforços que sempre fizeram para garantir meus estudos.

A minha irmã Kharin Wochner que é tão essencial na minha vida, por todo incentivo e carinho, sendo essa irmã/amiga sempre presente em todos os momentos e fazendo meus dias melhores.

A minha companheira de apartamento e também minha prima, Julia Wochner, obrigada por fazer esse dois anos os melhores possíveis. Ter sua companhia diária me deu forças nos dias mais difíceis e trouxe mais alegria para os dias bons.

Obrigada Medianeira por colocar na minha vida pessoas que foram e sempre serão muito especiais: Débora Sgorla, Beatriz Niemeyer, Gabriela Pandolfo, Lucas Cardoso, Lucas Fernandes.

Obrigada também as minhas amigas de longa data que mesmo com toda distância sempre se fizeram presentes de alguma maneira.

O meu muito obrigada a Tânia Becker-Algeri e Andressa Centenaro. Vocês foram meus anjos da guarda do laboratório. Sempre prestativas e dispostas a ensinar e compartilhar comigo todo conhecimento de vocês. Sou muito grata por toda ajuda, foram essenciais para realização e finalização deste trabalho.

A Maria Clara Moreira, minha fiel companheira das análises, meu muito obrigada por toda ajuda, pela companhia diária e por compartilhar comigo cada etapa desta jornada.

Obrigada também a minha colega de turma e amiga Rosane Vaniski, pela amizade e parceria, por compartilhar comigo dos momentos de alegria e angústia que o Mestrado proporcionou nesses dois anos.

Obrigada a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR que contribuíram cada um da sua forma para minha formação profissional.

Obrigada a CAPES pela bolsa concedida.

EPÍGRAFE

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”.

Eclesiastes 3:1

RESUMO

WOCHNER, KATIA. **INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO *Lactobacillus acidophilus* E PREBIÓTICOS NA REDUÇÃO E BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS M₁ e B₁ EM LEITE INTEGRAL**: 2017. 83f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

O leite é uma das principais fontes de nutrientes essenciais ao crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde humana. No entanto, pode também ser um veículo de agentes tóxicos, causando sérios riscos à saúde em indivíduos que o consomem, em especial as crianças. Dentre os contaminantes de alimentos, as aflatoxinas se destacam, as quais são metabólitos secundários fúngicos relevantes na saúde humana e animal. Entre os análogos de aflatoxinas identificados até o momento, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais prevalente e a mais tóxica; quando ingerida por animais esta sofre biotransformação hepática convertendo-se parcialmente em aflatoxina M₁ (AFM₁), que é excretada no leite. Entretanto, estudos recentes tem demonstrado a presença de AFB₁ em leite, discordando da literatura quanto à completa conversão desta em AFM₁. Uma vez presente no leite, estas aflatoxinas podem resistir a maioria dos tratamentos para obtenção de derivados lácteos; portanto, podem estar presentes nos queijos e iogurtes. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a capacidade do *Lactobacillus acidophilus* isolado e em conjunto com prebióticos (inulina, oligofrutose, β-glucana e polidextrose) em reduzir a concentração de AFB₁ e AFM₁ e o efeito sobre a bioacessibilidade após digestibilidade em um modelo de digestão *in vitro* em leite contaminado artificialmente. Para tal, foi aplicado um delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* para a avaliação do efeito de seis variáveis do processo (concentração de aflatoxina, tempo de incubação e concentração dos quatro prebióticos), um controle negativo (leite integral puro) e um controle positivo (leite integral fortificado com aflatoxina). Todos os ensaios com a adição do probiótico e prebióticos promoveram redução da AFB₁ e AFM₁ em leite, bem como da sua bioacessibilidade. Os níveis de redução variaram de 13,53 e 35,53% para AFB₁ e 17,61 e 71,52% para AFM₁. Quando comparada com o controle positivo a bioacessibilidade para AFB₁ variou de 23,68 a 72,67% e 0% para AFM₁ (100% de redução de bioacessibilidade). Para verificar a interação do probiótico e prebióticos com as aflatoxinas e possível modificação na estrutura proteica do leite, foi realizada espectroscopia na região do infravermelho por transformada de fourier (FTIR). Foi detectada alteração da região amida I (1700-1600cm⁻¹) nos tratamentos adicionados do probiótico e prebióticos em relação ao tratamento contendo somente as aflatoxinas e leite, o que sugere a ocorrência de um deslocamento das aflatoxinas que estão ligadas a fração proteica do leite para a parede celular do probiótico.

Palavras chave: Bactéria ácido láctica; probiótico; micotoxinas; digestibilidade *in vitro*.

ABSTRACT

WOCHNER, KATIA. **INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO *Lactobacillus acidophilus* E PREBIÓTICOS NA REDUÇÃO E BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS M₁ e B₁ EM LEITE INTEGRAL**: 2017. 83f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

Milk is a major source of essential nutrients for the growth, development and maintenance of human health. However, it can also be a vehicle for toxic agents, causing serious health risks in individuals who consume it, especially children. Among the food contaminants, aflatoxins stand out, which are important secondary fungal metabolites in human and animal health. Among aflatoxin analogues identified to date, aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most prevalent and most toxic. When ingested by animals it undergoes hepatic biotransformation partially converting to aflatoxin M₁ (AFM₁), which is excreted in the milk. However recent studies have demonstrated the presence of AFB₁ in milk, disagreeing in the literature about the complete conversion of AFB₁ to AFM₁. Once present in milk, these aflatoxins can withstand most treatments to obtain dairy products; Therefore, may be present in cheeses and yogurts. The objective of this study was to evaluate the ability of *Lactobacillus acidophilus* alone and in conjunction with prebiotics (inulin, oligofrutose, β -glucan and polydextrose) to reduce the concentration of AFB₁ and AFM₁ and the effect on bioavailability after digestibility in a digestion model *In vitro* in artificially contaminated milk. For this, a *Plackett-Burman* experimental design was used to evaluate the effect of six process variables (aflatoxin concentration, incubation time and concentration of the four prebiotics), a negative control (pure whole milk) and a positive control (Whole milk fortified with aflatoxin). All probiotic and prebiotic assays promoted reduction of AFB₁ and AFM₁ in milk as well as its bioavailability. Reduction levels ranged from 13.53 and 35.53% for AFB₁ and 17.61 and 71.52% for AFM₁. When compared to the positive control the bioaccessibility for AFB₁ ranged from 23.68 to 72.67% and 0% for AFM₁ (100% reduction in bioaccessibility). To verify the interaction of probiotic and prebiotics with aflatoxins and possible modification in the protein structure of the milk, spectroscopy was performed in the infrared region by fourier transform (FTIR). It was detected alteration of the amide I region (1700-1600cm.⁻¹) in the probiotic and prebiotic treatments in relation to the treatment containing only aflatoxin and milk, suggesting the occurrence of aflatoxin displacement that is linked to the milk protein fraction to the cell wall of the probiotic.

Key words: Lactic acid bacteria; probiotic; mycotoxins; digestibility *in vitro*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das principais aflatoxinas encontradas em alimentos.....	18
Figura 2 - Hidroxilação da aflatoxina B ₁ em M ₁ pelo sistema P-450 (Adaptado de Becker-Algeri et al., 2016).....	19
Figura 3 - Representação do modelo de digestão <i>in vitro</i>	37
Figura 4 - Esquema de extração QuEChERS de AFB ₁ e AFM ₁	39
Figura 5 - Curva de concentração bacteriana para a cepa probiótica <i>L. acidophilus</i>	43
Figura 6 - Cromatograma representativo do pico padrão gerado pela aflatoxina AFB ₁	46
Figura 7 - Cromatograma representativo do pico da amostra Controle Positivo com AFB ₁	46
Figura 8 - Cromatograma representativo do pico padrão gerado pela aflatoxina AFM ₁	47
Figura 9 - Cromatograma representativo do pico da amostra Controle Positivo com AFM ₁	47
Figura 10- Análise de FTIR do Leite puro, Leite fortificado com AFB ₁ (4,9 µL ⁻¹) e os ensaios 12 (contendo probiótico) e 13 (contendo probiótico e prebióticos).....	64
Figura 11 - Análise de FTIR dos ensaios fortificados com AFB ₁ e adição do probiótico e prebióticos em conjunto.	65
Figura 12 - Análise de FTIR do Leite puro, Leite fortificado com AFM ₁ (1,5. µL ⁻¹) e os ensaios 12 (contendo probiótico) e 14 (contendo probiótico e prebióticos).....	65
Figura 13 - Análise de FTIR dos ensaios 1,2,3 fortificados com AFM ₁	66
Figura 14 - Análise de FTIR dos ensaios contaminados com AFM ₁ e probiótico e prebióticos em conjunto.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de AFM ₁ em leite e derivados lácteos em diferentes países.	22
Tabela 2 - Ocorrência de AFB ₁ em leite pasteurizado e UAT.	23
Tabela 3 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento <i>Plackett-Burman</i> .	34
Tabela 4 - Matriz do planejamento <i>Plackett-Burman</i> de 12 ensaios, com 3 pontos centrais e os controles.	34
Tabela 5 - Constituintes dos sucos gástricos do modelo de digestibilidade <i>in vitro</i> .	38
Tabela 6 - Valores de precisão, LOD e LOQ para a determinação de AFB ₁ e AFM ₁ em leite, leite fermentado e fluido biológico.	45
Tabela 7 - Matriz de planejamento <i>Plackett-Burman</i> com as variáveis independentes e resposta (variável dependente) de redução (%) das aflatoxinas AFB ₁ e AFM ₁ .	49
Tabela 8 - Efeito dos fatores estudados no planejamento <i>Plackett-Burman</i> sobre o percentual de redução de AFB ₁ numa matriz láctea.	51
Tabela 9 - Efeito dos fatores estudados no planejamento <i>Plackett-Burman</i> sobre o percentual de redução de AFM ₁ numa matriz láctea.	53
Tabela 10 - Matriz de planejamento <i>Plackett-Burman</i> com as variáveis independentes e resposta (variável dependente) de bioacessibilidade (%) das aflatoxinas AFB ₁ e AFM ₁ .	56
Tabela 11 - Efeito dos fatores estudados no planejamento <i>Plackett-Burman</i> sobre a percentagem de bioacessibilidade de AFB ₁ numa matriz láctea.	58
Tabela 12 - Análise das estruturas secundárias do leite, leite contaminado com AFB ₁ e dos ensaios com associação do probiótico e prebióticos (1-13).	67
Tabela 13 - Análise das estruturas secundárias do leite, leite contaminado com AFM ₁ e dos ensaios com associação do probiótico e prebióticos (1-13).	68

LISTA DE SIGLAS

AFB₁ Aflatoxina B₁

AFM₁ Aflatoxina M₁

BAL Bactérias Ácido Láticas

FTIR Espectroscopia na Região do Infravermelho

UATR Modo de refletância total atenuada

UV-vis Ultravioleta-visível

UAT Ultra Alta Temperatura

UFC Unidades Formadoras de Colônia

La-5 Lactobacillus acidophilus

LOQ Limite de quantificação

LOD Limite de detecção

CV Coeficiente de variação

RSD Desvio padrão relativo percentual

UHPLC Cromatografia a líquido de ultra alta eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 MICOTOXINAS	17
3.1.1 Aflatoxinas	17
3.1.1 Ocorrência de aflatoxina em leite e derivados.....	21
3.2 MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E SUA AÇÃO DESCONTAMINANTE.....	23
3.3 PREBIÓTICOS.....	28
3.4 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS EM CONJUNTO NA DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Padrões e reagentes químicos	31
4.2 Preparo da solução padrão de AFB ₁ e AFM ₁ e quantificação.....	31
4.3. Condições de cultura e estimativa da concentração bacteriana.....	32
4.4 Ações do micro-organismo probiótico e dos prebióticos na descontaminação das aflatoxinas.....	33
4.5 Capacidade de remoção das aflatoxinas pelo probiótico e prebióticos	35
4.6 Análises de digestibilidade <i>in vitro</i>	36
4.7 Extração e concentração das aflatoxinas	39
4.8 Quantificação e identificação por cromatografia à líquido de ultra alta eficiência - UHPLC	39
4.9 Validação do método QuEChERS para determinação das aflatoxinas AFB ₁ e AFM ₁ ..	41
4.10 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	41
4.11 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA.....	43
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE AFB ₁ e AFM ₁ ..	44
5.3 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE REDUÇÃO E DA BIOACESSIBILIDADE DE AFB ₁ E AFM ₁ EM LEITE POR <i>Lactobacillus acidophilus</i> E PREBIÓTICOS.....	48
5.3.1 Avaliação do percentual de redução de AFB ₁ e AFM ₁ em leite por <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> e prebióticos	48

5.3.2 Avaliação da bioacessibilidade de AFM ₁ e AFB ₁ pela ação de probiótico e prebióticos	54
5.3.3 Análise do ensaio com maior potencial de descontaminação.....	60
5.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	62
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

O leite é uma das principais fontes de nutrientes essenciais ao crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde humana, por isso o seu consumo e de seus derivados é um importante hábito alimentar que está presente na dieta de todas as faixas etárias (BARLOWSKA et al., 2011). No entanto, o leite também pode ser um veículo de contaminantes, causando várias alterações fisiológicas prejudiciais à saúde em indivíduos que o consomem em especial para crianças, principais consumidoras e cuja sensibilidade é notável e potencialmente maior que em adultos (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

Nos últimos anos, tem aumentado a preocupação quanto aos contaminantes químicos em alimentos (toxinas, metais pesados e pesticidas), devido ao fato de inúmeros trabalhos demonstrarem a ocorrência destes em leite e derivados lácteos (BILANDŽIĆ et al., 2011; SKRBIC et al., 2014; SHAKER; ELSHARKAWY, 2015; BAHRAMI; SHAHBAZI; NIKOUSEFAT, 2016).

Dentre os contaminantes químicos, destacam-se as aflatoxinas, micotoxinas produzidas por fungos, sintetizadas na sua maioria pelas espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* e que podem estar presentes no leite em decorrência da ingestão animal de alimentos contaminados (ração, forragem) pelas mesmas. Segundo a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO), até 25% das culturas de alimentos do mundo são significativamente contaminados com micotoxinas, logo se tornando um importante problema de saúde pública (KABAK; OZBEY, 2012a; SERRANO-NIÑO et al., 2013).

Atualmente, 18 compostos semelhantes são descritos como aflatoxina; porém a mais prevalente e tóxica é aflatoxina B₁ (AFB₁) (MURPHY et al., 2006), que até poucos anos acreditava-se não estar presente no leite e derivados; porém, estudos tem demonstrado a ocorrência desta micotoxina nestes alimentos (CORASSIN et al., 2013; ELSANHOTY et al., 2014). No entanto, quando ingerida pelo gado leiteiro, principalmente através do consumo de ração ou forragem contaminados, pode ser parcialmente biotransformada por enzimas hepáticas em aflatoxina M₁ (AFM₁), um metabólito hidroxilado que é excretado no leite, além de outros tecidos e fluidos biológicos de animais (urina, fezes, bile), se acumulando nos

mesmos (OATLEY et al., 2000; MURPHY et al., 2006). Por isso a legislação já contempla limites máximos da presença de AFM₁ em leites e derivados lácteos (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2001; MERCOSUL, 2002; EUROPEAN COMMISSION, 2006; BRASIL, 2011).

Devido ao alto consumo de leite e derivados lácteos, é de extrema importância que estes sejam livres de compostos tóxicos (FLORES-FLORES et al., 2015). Como a contaminação do leite por micotoxinas não pode ser completamente prevenida e as mesmas não são inativadas por tratamentos térmicos comuns (KHANIKI, 2007), faz-se necessária a busca por métodos de descontaminação que apresentem eficiência, especificidade, ambientalmente seguros e que não causem danos a saúde humana (WU et al., 2009).

Várias estratégias têm sido estabelecidas para descontaminar alimentos, em geral, para realizar a descontaminação do leite são utilizados métodos físicos, químicos e biológicos, os quais não devem modificar significativamente as propriedades físicas do alimento, possuir um custo acessível e ser de fácil utilização (KABAK; VAR, 2008; LEE; HER; LEE, 2015). Os métodos físicos (calor, luz ultravioleta, radiação ionizante) e químicos (adição de agentes clorantes, oxidantes e hidrolíticos) não são considerados os mais apropriados em termos de segurança, economia e qualidade dos produtos tratados, seja por terem eficácia limitada, apresentarem implicações de custo ou proporcionarem perdas nutricionais e sensoriais ao produto alimentício (EL-NEZAMI et al., 1998; SHCHERBAKOVA et al., 2015). Por sua vez, a degradação biológica de contaminantes químicos utilizando micro-organismos ou enzimas é uma alternativa específica e favorável ao meio ambiente para reduzir os níveis ou eliminar esses contaminantes em alimentos, mantendo a segurança e qualidade dos mesmos, já que muitos alimentos são adicionados de micro-organismos durante a elaboração (ALBERTS et al., 2009; BARANYI; KOCSUBÉ; VARGA, 2015; SARLAK et al., 2017).

Entre os métodos biológicos, as bactérias ácido lácticas (BAL) são as mais estudadas e que apresentam resultados mais promissores na remoção desses contaminantes (BHAKTA et al., 2012; BOVO et al., 2013; SERRAÑO-NINÑO et al., 2013; ZHANG et al., 2014; ELSANHOTY et al., 2014). Dentre estas, algumas espécies de *Lactobacillus* são classificadas como probióticos, isto é, 'micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro' (FAO/WHO, 2001).

Por sua vez, poucos trabalhos têm sido realizados visando reduzir a bioacessibilidade de micotoxinas pela adição de prebióticos, que são compostos não digeríveis pelas enzimas do trato digestório, mas que beneficiam o desenvolvimento de micro-organismos benéficos no cólon (SAAD et al., 2013). Ressalta-se que com o aumento de interesse na produção de alimentos simbióticos (KOLIDA; GIBSON, 2010), a associação das bactérias ácido-láticas com caráter probiótico e dos prebióticos poderia auxiliar na redução da contaminação de alimentos e da bioacessibilidade de micotoxinas, alavancando ainda mais a utilização destes ingredientes na indústria alimentícia, caracterizando-se como uma linha de pesquisa bastante promissora na área de micotoxicologia. Poucos estudos têm sido realizados *in vitro* e um número menor ainda em alimentos, o que justifica a importância da realização deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação do *Lactobacillus acidophilus* La-5 e a contribuição dos prebióticos oligofrutose, inulina, polidextrose e β -glucana, na redução e bioacessibilidade dos níveis da AFB₁ e AFM₁ em leite integral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ação do micro-organismo probiótico e dos prebióticos, isolado e/ou combinados, na redução das AFM₁ e AFB₁ em leite ultra alta temperatura (UAT) integral artificialmente contaminado.

Avaliar a ação do micro-organismo probiótico e dos prebióticos, isolado e/ou combinados, na bioacessibilidade das AFM₁ e AFB₁ após a digestão *in vitro* das amostras.

Verificar a possível interação da AFM₁ e AFB₁ com o probiótico e prebióticos, isolado e/ou em conjunto, e se o probiótico e os prebióticos interferem na interação entre aflatoxina e proteína do leite através da técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo que estão divididas em seis classes principais: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e alcalóides de *Ergot* (AHLBERG et al., 2015).

A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas é uma preocupação global devido aos efeitos tóxicos provocados à saúde humana e animal (SHARMA et al., 2016). A principal ocorrência das micotoxinas são alimentos à base de cereais; no entanto, elas também podem ser encontradas em alimentos de origem animal, como leite e seus derivados (CAMPAGNOLLO et al., 2016). Sendo que a micotoxina mais comumente encontrada neste tipo de alimento são as aflatoxinas, em especial, a AFM₁ (BECKER-ALGERI et al., 2016).

3.1.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas e amplamente distribuídas em alimentos, como no leite e derivados lácteos, sendo caracterizadas como as mais tóxicas (PASSONE et al., 2010; SARDIÑAS et al., 2011). São metabólitos secundários de baixo peso molecular, predominantemente produzidas pelos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*, mas também podem ser produzidas por outras cepas como *A. nomius*, *A. tamarii* e *A. pseudotamarii* (ELSANHOTY et al., 2014; EL KHOURY; ATOUIB; YAGHI, 2011).

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas com propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressoras, que podem causar efeitos adversos na saúde humana e animal, os quais são influenciados pela variação da espécie, sexo, idade, estado nutricional, além da dose e do período de exposição do organismo à toxina (BOVO et al., 2013; ELSANHOTY et al., 2014).

Ao total, 18 compostos semelhantes são descritos como aflatoxinas, mas as encontradas naturalmente em alimentos são seis: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂) (CAMPAGNOLLO et al., 2016). Porém a mais prevalente e tóxica é a AFB₁ (MURPHY et al., 2006; CORASSIN et al., 2013).

As aflatoxinas têm uma estrutura policíclica derivada de um núcleo cumarina ligado a um sistema bifurano, quando a toxina é da série B ela está ligada a uma pentanona, ou por uma delta-lactona quando for da série G (Figura 1). São solúveis em solventes como metanol, benzeno e acetonitrila e clorofórmio, e instáveis à luz ultravioleta (UV); porém, muito estáveis a temperaturas acima de 100°C (ABRAR et al., 2013; CAMPAGNOLLO et al., 2016).

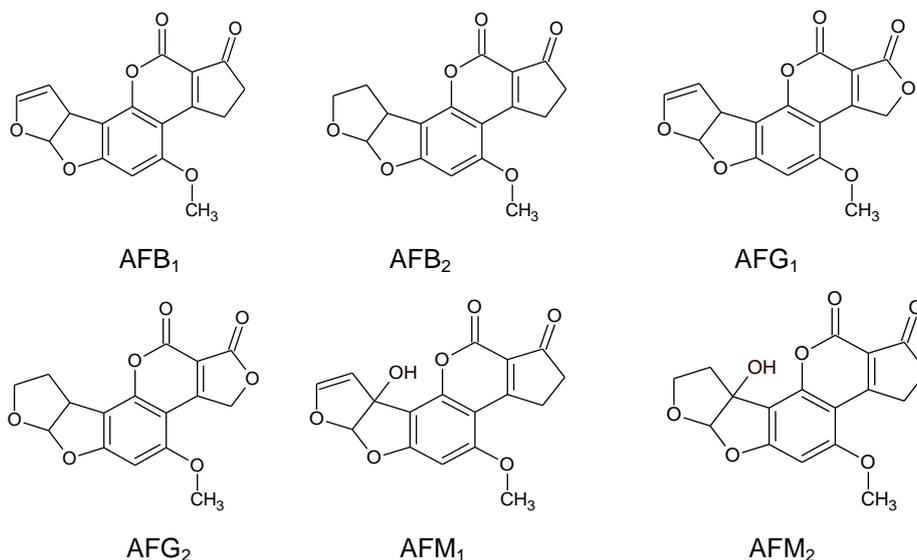


Figura 1 - Estrutura química das principais aflatoxinas encontradas em alimentos.

Quando ocorre a ingestão de AFB₁ pelo gado leiteiro, seja pelo consumo de ração, feno e principalmente silagem contaminada, a mesma sofre biotransformação

hepática por enzimas do complexo citocromo P450, onde sofre quatro tipos de reações: O-desalquilação a aflatoxina P₁, redução a aflatoxicol, epoxidação a AFB₁-8,9-epóxido ou hidroxilação para AFM₁. A AFM₁ devido sua solubilidade em água, é excretada nos fluidos biológicos de animais, como leite e urina, se acumulando nos mesmos (Figura 2) (OATLEY et al., 2000; MURPHY et al., 2006).

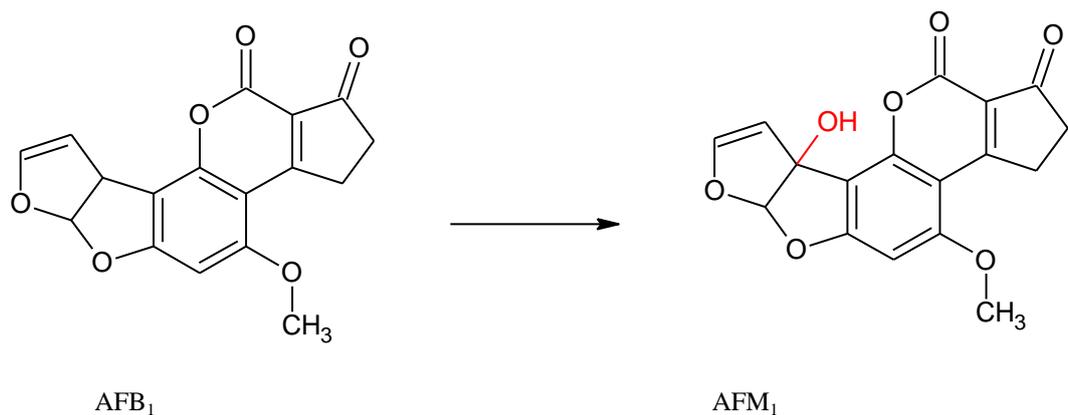


Figura 2 - Hidroxilação da aflatoxina B₁ em M₁ pelo sistema P-450 (Adaptado de Becker-Algeri et al., 2016).

A taxa de conversão de AFB₁ em AFM₁ ainda não foi totalmente elucidada; porém, alguns autores descrevem que cerca de 0,3–6,2% da AFB₁ ingerida é biotransformada hepaticamente no animal e excretada na sua forma hidroxilada (AFM₁), no leite (CREPPY, 2002; KOS et al., 2014). A excreção de AFM₁ inicia após 12-24 h da ingestão de alimentos contaminados com AFB₁, atingindo níveis elevados em poucos dias e desaparecendo cerca de 24 h depois de ter sido eliminados da dieta (NACHTMANN et al., 2007). Essa biotransformação é influenciada por fatores nutricionais e fisiológicos, tais como: regime de alimentação, nível de contaminação e taxa de digestão, saúde e raça do animal, capacidade de biotransformação hepática, presença de infecções mamárias, período de lactação, produção de leite, localização geográfica e estação do ano. Em média, o leite em estações mais frias tem concentrações relativamente mais altas de AFM₁ quando comparado com amostras de leite em estações mais quentes. Isso porque durante estações mais frias, os produtores passam a utilizar menos alimentos frescos como pasto e o substituem por alimentos mais concentrados, como a silagem de plantas forrageiras ou grão úmido, a qual é armazenada por tempo prolongado e muitas

vezes em condições inadequadas, o que poderia fornecer condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos toxigênicos como *Aspergillus* spp (DUARTE et al., 2013; BILANDZIC et al., 2011; BAHRAMI; SHAHBAZI; NIKOUSEFAT, 2016).

Antes de alguns pesquisadores investigarem e comprovarem a presença de AFB₁ em leite, acreditava-se que a mesma era totalmente biotransformada em outros compostos, incluído seu hidroxilado AFM₁; porém estudos recentes tem detectado essa aflatoxina em amostras de leite pasteurizado e UAT (CARVAJAL et al., 2003; SCAGLIONI et al., 2014; BECKER-ALGERI 2016). Uma vez que *in vivo* a AFB₁ é mais tóxica que a AFM₁ (ZAIN 2011) a presença da mesma também deve ser investigada. Por outro lado, falta ainda uma regulamentação com a definição dos níveis máximos permitidos de AFB₁ em leite e derivados lácteos.

Embora AFM₁ seja considerada cerca de dez vezes menos toxigênica que AFB₁, seus efeitos citotóxicos e carcinogênicos estão bem comprovados, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2012), tanto AFB₁ quanto AFM₁ são classificadas como pertencentes ao grupo 1, isto é, carcinogênicas para humanos.

Levando em consideração o alto consumo de leite e de produtos lácteos pela população e os riscos à saúde humana associados com a ingestão de AFM₁, frequentemente presentes nos mesmos, vários países estabeleceram limites de tolerância para AFM₁ em leite e derivados. A Comunidade Européia e o *Codex Alimentarius* recomendam um limite máximo de 0,05 µg L⁻¹ em leite fluido, pó e derivados lácteos (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2001; EUROPEAN COMMISSION, 2006). Já a legislação brasileira segue os mesmos limites estabelecidos pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), os limites máximos de AFM₁ permitidos no leite fluido, leite em pó e queijos são 0,5 µg L⁻¹, 5,0 µg kg⁻¹ e 2,5 µg kg⁻¹, respectivamente (MERCOSUL, 2002; BRASIL, 2011).

Além da problemática relacionada à contaminação natural do leite pela AFM₁, há também a preocupação quanto à estabilidade deste contaminante químico (IQBAL et al., 2015), que é resistente aos tratamentos térmicos aplicados à matéria prima na produção de derivados lácteos, tais como a pasteurização e a esterilização, permitindo o risco desta contaminação estar presente também em produtos como queijos e iogurtes (EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; FALLAH et al., 2011). Além disso, em alguns casos, os produtos lácteos podem apresentar uma maior

concentração de AFM₁ em relação ao leite *in natura*, isso porque a AFM₁ se liga preferencialmente à fração proteica do leite (CAVALLARIN et al, 2014).

3.1.1 Ocorrência de aflatoxina em leite e derivados

A ocorrência de AFM₁ em leite e produtos lácteos foi estudada por vários autores em diferentes países, demonstrando a ocorrência e conseqüente preocupação global sobre esta micotoxina, conforme pode ser observado na Tabela 1. Os níveis de contaminação da AFM₁ variaram entre 0 a 80,6% (Argentina), essa diferença é inerente a vários fatores, como: raça do animal, alimentação, nível de contaminação, tempo de exposição, e fatores ambientais, tais como o clima. Além disso, questões sócio-econômicas devem ser levadas em consideração, uma vez que a legislação mundial não é compatível, pois cada país tem sua própria regulamentação, o que dificulta a fiscalização, além da inexistência de legislação para todos os produtos lácteos produzidos/consumidos em todo o mundo. (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

Quando comparado com AFB₁, há poucos estudos relacionando a presença da AFB₁ em leites e produtos derivados, uma vez que a legislação da maioria dos países só impõe concentrações máximas para AFM₁. No entanto, considerando sua maior toxicidade, a incerteza quanto às taxas de conversão em AFM₁ e a sua ocorrência comprovada em amostras de leite e produtos lácteos, uma maior ênfase deve ser dada a AFB₁ nos estudos destes alimentos (Tabela 2).

Embora a ocorrência de AFM₁ seja alta (considerando a regulamentação da Comunidade Européia e do *Codex Alimentarius*) e os estudos tem demonstrado também a ocorrência de AFB₁, a quantidade total do contaminante presente no produto nem sempre reflete a quantidade que está disponível para a absorção, apenas uma certa proporção está bioacessível, tornando-se necessária a criação de estratégias para, além de prevenir a formação de aflatoxinas em alimentos, eliminar, inativar e reduzir a sua bioacessibilidade em produtos contaminados, mantendo a qualidade e as características sensoriais desses produtos (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009 ;SERRANO-NIÑO, 2013,. BOVO et al., 2013; SCAGLIONI et al., 2014).

Tabela 1 - Ocorrência de AFM₁ em leite e derivados lácteos em diferentes países.

País	Produto avaliado	Número de amostras	Frequência de amostras positivas (%)	Nível de contaminação ($\mu\text{g L}^{-1}$ / $\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a	Excederam a Regulamentação ^b (%)	Referências
Argentina	Leite cru	160	38,8	0,003-0,293	80,6	Michlig et al., 2016
Brasil	Queijo	58	84	0,01-0,3	29,3	Iha et al., 2011
	Iogurte	53	95	0,01-0,53	9,4	
	Bebida láctea	12	95	0,01-0,05	0	
Brasil	Leite UAT	75	23	1,0-4,1	30,7	Oliveira et al., 2013
Brasil	Leite UAT	17	76	0,008-0,215	35,3	Iha et al., 2013
	Leite pasteurizado	30	87	0,009-0,437	60	
	Fórmula infantil	7	0	-	0	
Brasil	Leite UAT	152	87,5	0,0018-0,121	2,6	Silva et al., 2015
Brasil	Leite pasteurizado	12	58	0,7-1,5	100	Scaglioni et al., 2014
	Leite UAT	15	67	0,7-1,5	100	
	Leite UAT	153	54,9	0,006-0,160	20,3	
China	Leite UAT	153	54,9	0,006-0,160	20,3	Zheng et al., 2013
	Leite pasteurizado	26	96,2	0,023-0,154	65,4	
China	Leite cru	530	52,8	0,01-0,2	34,5	Guo et al., 2016
Croácia	Leite cru	3198	61,72	0,00011-0,7644	9,32	Bilandžić et al., 2015
Irã	Leite cru	64	84,3	0,0061-0,1882	35,9	Bahrami, Shahbazi, Nijousefat., 2016
	Queijo	40	65,5	0,0525-0,272	10	
	Iogurte	42	23,8	0,0063-0,0213	0	
México	Queijo branco	45	87	0,0065-0,08	0	Ortiz-Martinez et al., 2013
Paquistão	Leite cru	520	93	0,001-0,26	53	Ismail et al., 2016
Sérvia	Leite pasteurizado; Leite UAT; Leite cru	50	76	0,01-1,44	76	Skrbic et al., 2014

^a Resultados são expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ para leite, e $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para queijo, iogurte e bebida láctea.

^b A Comunidade Européia e o *Codex Alimentarius* recomendam um limite máximo de 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em leite fluido, pó e derivados lácteos.

Tabela 2 - Ocorrência de AFB₁ em leite pasteurizado e UAT.

País	Produto avaliado	Número de amostras	Frequência de amostras positivas (%)	Variação de contaminação (µg L ⁻¹)	Referências
México	Leite pasteurizado e UAT	290	5,2	0,05-0,42	Carvajal et al., 2003
Brasil	Leite pasteurizado	12	42	0,7-1,5	Scaglioni et al., 2014
	Leite UAT	15	13	0,7-1,5	
Brasil	Leite UAT	228	3,1	1,39-14,11	Becker-Algeri, 2016

3.2 MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E SUA AÇÃO DESCONTAMINANTE

Os probióticos têm sido incorporados em produtos lácteos com a finalidade de desenvolver novos produtos funcionais (ABOULFAZLI; SHORI; BABA, 2016; CHAVES; GIGANTE, 2016). Inúmeras são as funções benéficas associadas ao consumo dos probióticos, dentre elas melhoria do funcionamento intestinal pela regulação da microbiota benéfica endógena, estimulação do sistema imunológico, aumento da bioacessibilidade de nutrientes (cálcio, ferro, vitaminas), redução dos sintomas de intolerância à lactose, além de atividade anticancerígena e antimutagênica, atuando na prevenção do câncer de cólon e também de outras doenças intestinais (MALLEBRERA et al., 2013; SHORI, 2015). Porém, nos últimos anos, atenção tem sido dada aos probióticos devido a capacidade de reduzir e/ ou inibir a ação de compostos tóxicos (BILANDŽIĆ et al., 2011; SKRBIC et al., 2014; SHAKER; ELSHARKAWY, 2015; BAHRAMI; SHAHBAZI; NIKOUSEFAT, 2016).

Alguns gêneros de bactérias-láticas, bem como as bifidobactérias e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*, são definidos como probióticos, isto é, 'micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades

adequadas exercem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro' (FAO/WHO, 2001). A maioria dos probióticos comerciais incorporados em produtos lácteos são cepas que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e em relação às leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* é a única reconhecida e caracterizada como probiótica e segura para consumo pela *Food and Drug Administration* (FDA) (HATOUM et al., 2012; SETTACHAIMONGKON et al., 2015).

A ação descontaminante dos micro-organismos probióticos está associada à fermentação, antibiose e à capacidade de os compostos ligarem-se a parede microbiana. Em relação a fermentação e a antibiose, no primeiro caso, a cultura iniciadora adicionada atua sobre o substrato, gerando benefícios ao alimento, enquanto que no segundo, a cultura iniciadora deve inibir o desenvolvimento de micro-organismos ou de suas toxinas, que causam danos ao produto ou à saúde humana (BOVO et al., 2013). Porém, a capacidade de ligação dos compostos tóxicos está relacionada com a ligação do composto químico com a superfície bacteriana através de interações não covalentes fracas, podendo ser parcialmente reversível (SERRANO-NINÑO et al., 2013)

Em relação ao potencial de descontaminação do leite, dependerá do tipo de contaminante químico, acredita-se que venha da afinidade que os micro-organismos têm por alguns metais tóxicos e pelas micotoxinas, ou no caso de pesticidas organofosforados, está correlacionada com a atividade da enzima fosfatase produzida pelas BAL. Tornando-se possível dessa forma sequestrar ou degradar esses contaminantes, antes da sua absorção na corrente sanguínea e tecidos animais e humanos (REID, 2015). Assim, alguns pesquisadores vêm estudando o uso da degradação microbiana como uma das estratégias de descontaminação de contaminantes químicos, sendo considerada uma prática segura e barata (ZHANG et al., 2014; BOVO et al., 2013).

Alguns gêneros de BAL e *Bifidobacterium*, principalmente devido ao seu *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e seu uso como probióticos, são as mais estudadas para reduzir a bioacessibilidade das aflatoxinas AFB₁ e AFM₁ em meios líquidos e leite contaminados (EL-NEZAMI et al., 1998; EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011). As principais BAL reconhecidas por sua capacidade de prevenir ou limitar a produção de toxinas pelos fungos pertencem ao gênero *Lactococcus* e *Lactobacillus* e, em menor grau, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. A atividade antifúngica está limitada por alguns fatores, os quais são fortemente dependentes das espécies:

período de incubação e temperatura, efeito do meio de cultura sobre o metabolismo bacteriano, interferência de compostos nutricionais na produção dos compostos anti-fúngicos, e pH (DALIÉ et al., 2010).

Esses micro-organismos possuem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, ou ainda, possuem a habilidade de remover a micotoxina do meio minimizando a ação da mesma (SANTOS et al., 2014).

O mecanismo de remoção de aflatoxinas por BAL ainda não está totalmente esclarecido. Sugere-se que três mecanismos podem explicar a eficácia antimicrobiana das BAL: produção de ácidos orgânicos, competição por nutrientes e produção de compostos antagonistas (MAGNOSSUM et al, 2003). Porém um pH baixo, o esgotamento de nutrientes, ou a competição microbiana não pode por si só explicar os mecanismos de inibição da síntese de aflatoxina (DALIÉ et al., 2010).

Em controversa, trabalhos indicam que não há degradação pelo metabolismo microbiano, sugerindo que ocorra uma adesão da aflatoxina aos componentes da parede celular bacteriana, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, já que tanto células viáveis quanto inviáveis são capazes de unirem-se às micotoxinas (CORASSIN et al., 2013; EL-NEZAMI et al.,1998; SHETTY; JESPERSEN, 2006). Serrano-Niño et al (2015), por sua vez, afirmaram ainda a importância do ácido teicóico nesta interação, onde sugeriram que o mecanismo de interação acontecesse entre a glicose e glicerol do ácido teicóico das cepas de *Lactobacillus* avaliadas com os grupos hidroxil e com o oxigênio das carbonilas da AFB₁.

A formação e a estabilidade do complexo BAL/aflatoxina são influenciadas por fatores como tipo, concentração e especificidade da cepa bacteriana; tratamento de inativação aplicado, pH, temperatura de incubação, adição de nutrientes, solventes utilizados, entre outros (BOVO et al., 2010).

A fim de elucidar esse mecanismo, Pierides et al. (2000) analisaram a habilidade de células viáveis e tratadas termicamente (inativadas ou inviáveis) de oito cepas de BAL em remover a AFM₁ em tampão fosfato a 37 °C e após 16 horas de contato obtiveram resultados variando de 18,1 a 53,8% para as células viáveis e de 25,5 a 61,5% para as inviáveis. Kabak e Var (2008) examinaram a capacidade de quatro cepas de *Lactobacillus* e duas cepas de *Bifidobacterium* em remover a AFM₁ em solução tampão e observaram que as células foram capazes de remover de

10,22 a 26,65% da AFM₁ presente na solução, enquanto que as células inviáveis removeram de 14,04 a 28,97% da toxina. Os pesquisadores também concluíram que o processo de remoção foi rápido, não havendo diferenças significativas entre os tempos de contato de 0, 4 e 24 horas. Estes resultados encontrados reforçam a teoria de que a interação micro-organismo-toxina não ocorra por degradação microbiana e nem por ligações covalentes, mas sim por adsorção física na superfície da parede celular do micro-organismo através de ligações não covalentes.

Portanto, a viabilidade bacteriana não é pré-requisito para a remoção de AFM₁ e AFB₁ pelas BAL e alguns tratamentos de inativação, sejam eles físicos, químicos ou enzimáticos, são capazes de aumentar a habilidade das BAL em ligar-se à aflatoxina do meio, pois causam modificações na parede celular bacteriana, principalmente na estrutura dos polissacáridos e dos peptidoglicanos, o que pode causar a desnaturação de proteínas, por sua vez, aumentando natureza hidrofóbica da superfície. Tais distúrbios permitem que as aflatoxinas se vinculem aos componentes da membrana celular plasmática que estavam indisponíveis quando esta estava intacta (BOVO, 2011; SARLAK et al., 2017).

A eliminação das aflatoxinas é fortemente dependente da concentração do micro-organismo no meio, e esta relação é linear para concentrações celulares baixas, sugerindo-se que em média um mínimo de 10^7 - 10^8 UFC.mL⁻¹ são necessárias para a remoção da toxina (KABAK; VAR, 2008; SERRANO-NIÑO et al., 2013).

Vários trabalhos têm sido realizados para avaliar a estabilidade do complexo aflatoxina-bactéria. A reversibilidade do processo foi confirmada por libertação de AFB₁ e AFM₁ de volta para a solução, a partir de sucessivas lavagens do micro-organismo, confirmando que a ligação envolvida era fraca interação não-covalente, mostrando que ocorre uma associação aos sítios hidrofóbicos na superfície bacteriana. Portanto, a capacidade de retenção de aflatoxina por BAL não é considerada estável e quanto maior o número de lavagens, maior a quantidade de toxina liberada para a solução (BOVO et al., 2013; SERRANO-NIÑO et al., 2013).

As diferentes cepas de BAL não são equivalentes em termos de remoção da toxina, ao contrário, a capacidade de remoção da aflatoxina é uma característica apenas de linhagens específicas, com sua eficácia variando acentuadamente. Essas variações entre as cepas, sugerem diferenças na parede celular bacteriana e

estrutura do envelope celular e também a presença de diferentes sítios de ligação (BOVO, 2013; SANTOS et al., 2014).

Serrano-Niño et al. (2013) avaliaram a capacidade de cinco cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii* e *Bifidobacterium bifidum*) em reduzir a bioacessibilidade da aflatoxina AFM₁ em leite contaminado artificialmente utilizando um modelo de digestibilidade *in vitro*. A bioacessibilidade da AFM₁ foi reduzida entre 22,72 - 45,17%, dependendo da estirpe de probiótico utilizada. A cepa que teve maior poder de redução (45,17%) foi a *Bifidobacterium bifidum*.

Elsanhoty et al (2014) também estudaram o potencial de cinco linhagens de BAL (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarium*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) e uma de bifidobactéria (*Bifidobacterium angulatum*) para remover a AFM₁ de iogurte. O iogurte fermentado com 50% de cultura de iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e 50% de *L. plantarium* apresentou a maior redução no nível de AFM₁ no final do período de armazenamento, que corresponde ao sétimo dia (87%).

Sarlak et al (2017) analisaram os efeitos de cepas probióticas (*L. acidophilus*, *B. lactis*, *L. rhamnosus* e *L. casei*) sobre a redução de 0,5 µg.L⁻¹ de AFM₁ em Doogh (Tradicional bebida láctea fermentada iraniana). Doogh com um pH final de 4,5 e uma concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹ de *L. acidophilus* mostrou o melhor resultado com uma taxa de 60,2% de redução da aflatoxina em 28 dias de armazenamento.

Sendo assim, o uso de micro-organismos como biocontrole para remoção de micotoxinas do leite é uma abordagem bastante promissora, especialmente para as do gênero *Lactobacillus*, as quais, de acordo com as pesquisas publicadas, fornecem um potencial significativo para reduzir a exposição e os riscos associados com as aflatoxinas em alimentos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para triagem de cepas bacterianas com potencial descontaminante e de um maior entendimento dos mecanismos de ação destas bactérias sobre as aflatoxinas (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010; ELSANHOTY et al., 2014; AHLBERG; JOUTSJOKI; KORHONEN, 2015;).

3.3 PREBIÓTICOS

Originalmente os prebióticos foram definidos como sendo compostos não digeríveis pelas enzimas do trato digestório, mas que estimulam seletivamente o desenvolvimento de micro-organismos benéficos no cólon. Porém, a definição de "prebióticos alimentares" foi atualizada como sendo "um ingrediente fermentado seletivamente que resulta em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, e assim conferindo benefícios sobre a saúde do hospedeiro" (GIBSON et al., 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde e estabelece as diretrizes para sua utilização (BRASIL, 1999).

Prebióticos atuam como extratos específicos para as bactérias benéficas do cólon; portanto, seu consumo da maneira correta provoca um aumento na população de lactobacilos e bifidobactérias (SLAVIN, 2013). E além de estimular a microbiota benéfica, os prebióticos por meio de sua fermentação no intestino grosso por bactérias do cólon, levam a produção de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, propiônico e butírico) e gases, reduzindo assim o pH intestinal e inibindo a proliferação de micro-organismos nocivos (WANG, 2009).

Os benefícios causados pelos prebióticos não ficam limitados somente ao cólon, quando ingeridos em quantidades adequadas além de diminuir o trânsito fecal, aliviar os sintomas da doença inflamatória intestinal e atuar na prevenção do câncer de cólon, podem atuar diminuindo o colesterol e o índice glicêmico, aumentando absorção de cálcio e ferro, e melhorando a saúde óssea (PINEIRO et al., 2008). Os prebióticos são constituídos essencialmente por carboidratos de tamanhos diferentes, desde composição mono, dissacarídeos, oligossacarídeos, até grandes polissacarídeos. E são encontrados em diversas fontes, tais como a chicória, cebola, alho, espargos, alcachofras, alho poró, banana, tomate e muitas outras plantas (AL-SHERAJI, et al., 2013).

Prebióticos podem ser adicionados a uma variedade de alimentos, devido aos seus benefícios nutricionais e econômicos eles têm atraído o interesse de pesquisas e indústria de alimentos. Entre os prebióticos já consolidados e utilizados

comercialmente estão a inulina, oligofrutose e a polidextrose (KONAR et al., 2016). No entanto, existem alguns carboidratos não digeríveis de cadeia longa que vem sendo estudados e apontados como potenciais prebióticos, o qual é o caso da β -glucana (LAM; CHEUNG, 2013; ARENA et al., 2016).

A inulina é um polissacárideo solúvel em água e pertence a um grupo de carboidratos não digeríveis chamados frutanos, sendo encontrada em mais de 30.000 plantas, e as raízes de chicória são consideradas como a fonte mais rica de inulina (APOLINARIO et al., 2014). Trata-se de um carboidrato cuja cadeia é composta predominantemente por unidades de frutose, com uma unidade de glucose terminal, sendo a ligação entre as moléculas de frutose do tipo β 1,2. Na inulina da chicória, o número de unidades de frutose pode variar de 2 a 60 (SHOAI B et al., 2016). Possui baixo teor calórico (cerca de $1,5 \text{ kcal g}^{-1}$, contra 4 kcal g^{-1} da sacarose) e apresenta 10% do poder de doçura da sacarose (KONAR et al., 2016).

A oligofrutose é um frutooligossacarídeo obtido através da hidrólise enzimática da inulina e posterior purificação, seu grau de polimerização varia de 2 a 8. Seu sabor é neutro e moderadamente doce. O valor calórico é de aproximadamente $1,5 \text{ kcal g}^{-1}$ (BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004).

A diferença de estrutura entre a inulina e os frutooligossacarídeos (FOS) tem um grande impacto sobre a sua funcionalidade. A inulina é utilizada principalmente como substituto de gordura, quando adicionada em produtos lácteos com baixo teor de gordura, como queijos frescos, cremosos ou processados, a adição de pequenas percentagens de inulina resulta em textura mais cremosa e sabor mais balanceado (MORRIS; MORRIS, 2012). Enquanto que os frutooligossacarídeos são frequentemente empregados em conjunto com edulcorantes de alto poder adoçante, para substituir o açúcar, resultando em um perfil adoçante bem balanceado (35% de poder de doçura da sacarose) (MORRIS; MORRIS, 2012).

A polidextrose é uma fibra solúvel em água e não-digerível, disponível na forma em pó, inodora, de sabor neutro e com baixo índice glicêmico e reduzido valor energético ($1,0 \text{ kcal g}^{-1}$). É formada sinteticamente por polímeros de glicose, obtida pela policondensação térmica à vácuo da glicose com uma pequena quantidade de sorbitol e ácido cítrico como catalisador, formando cadeias com ligações do tipo 1-6 predominantemente, com massa molar variando de 162 a 20.000 (SRISUVUR et al., 2013; KONAR et al., 2016).

As β -glucanas são polissacarídeos lineares, não ramificados, compostos por unidades de β -glucanas, unidas por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) cuja irregularidade molecular se reflete na sua propriedade de solubilidade em água. As β -glucanas são produzidas por fungos, bactérias e plantas, estando presentes em alta concentração na parede celular das células dos grãos de aveia (*Avena sativa* L.) (LAM; CHEUNG, 2013; ARENA et al., 2016).

Por sua vez, dois trabalhos foram realizados visando reduzir a bioacessibilidade de micotoxinas pela adição de prebióticos. Meca et al. (2012) e Mallebrera et al. (2013) verificaram que fibras alimentares com caráter prebiótico promoviam a redução da bioacessibilidade de beauverecina e que esta redução era dependente do tipo de prebiótico.

3.4 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS EM CONJUNTO NA DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS

Atualmente, existe uma forte tendência do mercado em comercializar produtos com caráter simbiótico, que podem ser definidos como àqueles que contêm probiótico e prebiótico (KOLIDA; GIBSON, 2010). Nesse caso o componente prebiótico promove seletivamente as atividades probióticas, incluindo a sua sobrevivência e colonização intestinal, bem como a sua proliferação (ARENA et al., 2016).

A associação do efeito das BAL com caráter probiótico e dos prebióticos na redução da bioacessibilidade das aflatoxinas AFB₁ e AFM₁ poderia alavancar ainda mais a utilização destes ingredientes na indústria alimentícia. Porém, nenhum estudo com micotoxinas, envolvendo probióticos e prebióticos, é encontrado na literatura científica na área de leite e derivados, que representa um enorme potencial de aplicação destes ingredientes na indústria de alimentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Padrões e reagentes químicos

Os padrões das micotoxinas AFB₁ e AFM₁ e as enzimas para a determinação da digestibilidade *in vitro* foram adquiridas da *Sigma Chemical Company*® (St. Louis, MO, Estados Unidos). O micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi adquirido da *CHR Hansen*®. Todos os solventes utilizados na cromatografia líquida possuíam pureza analítica grau HPLC e a água utilizada foi ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (Osmose 10 LX, Gehaka, 2010) acoplado a um sistema ultrapurificador de água (Master System P&D TOC, MS 2000, Gehaka). Os solventes cromatográficos e água foram desgaseificados por 15 min usando banho ultrassom (Elma, Elmasonic, Alemanha). O leite ultra alta temperatura (UAT) integral foi adquirido no comércio local e os prebióticos oligofrutose (Raftilose P95, Orafti®), inulina (Raftiline GR, Orafti®), polidextrose (Litesse, DuPont-Danisco®) e β-glucana (ProamOatTM, Tate & Lyle®) foram gentilmente cedidos pelas empresas especializadas.

4.2 Preparo da solução padrão de AFB₁ e AFM₁ e quantificação

O preparo das soluções padrão das micotoxinas AFB₁ e AFM₁ bem como a determinação da concentração destas seguiram o proposto por Scaglioni et al. (2014). Para o preparo da solução padrão de AFM₁, 10 µg foram diluídos em 10 mL de solução benzeno:acetonitrila (98:2 v.v⁻¹), posteriormente divididos em 10 frascos âmbar e evaporados em corrente de N₂ à 45 °C (Evaporador Tecnal, TE – 019, Brasil). Quanto a AFB₁, 1 mg foi diluído em 100 mL de solução benzeno:acetonitrila (98:2 v.v⁻¹), dividido em 10 frascos âmbar e evaporados em corrente de N₂ a 45°C.

Os frascos secos foram devidamente vedados e armazenados sob temperatura de congelamento (-20 °C).

Para verificar a real concentração das aflatoxinas, um frasco de cada padrão foi diluído com acetonitrila P. A. e metanol P. A. para AFM₁ e AFB₁, respectivamente, e quantificados em espectrofotômetro de UV-VIS (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido), nos comprimentos de onda de 350 nm para AFM₁ e 360 nm para AFB₁ (SCAGLIONI et al., 2014).

A concentração final da solução padrão foi calculada pela Equação 01.

$$\mu gAF mL^{-1} = \frac{A \times MW \times 1000}{\epsilon} \quad (01)$$

Onde:

A = absorvância

MW = peso molecular do composto, AFM₁=328, AFB₁=312

ϵ = absortividade molar, AFM₁=18900, AFB₁=21800

Para obter a solução de trabalho empregada na contaminação das amostras de leite integral, os padrões de AFM₁ e AFB₁ secos foram ressuspensos em solução de benzeno:acetonitrila (98:2 v.v⁻¹) (SCAGLIONI et al., 2014) até a concentração de interesse para as análises e, a seguir, colocados em banho de ultrassom (ElmasonicP, Elma, Singen, Alemanha) por 10 minutos a temperatura ambiente (25° ± 2 °C), para garantir a homogeneização das aflatoxinas.

4.3. Condições de cultura e estimativa da concentração bacteriana

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (CHR Hansen®) foi ativada na proporção de 1% (m v⁻¹) em frasco contendo 100 mL de Caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Germany) com 0,05% L-cisteína e incubado a 37 ±1 °C em estufa bacteriológica (Fanem, Orion® 502, São Paulo, Brasil) até atingir o máximo de concentração bacteriana, estimado através de curva de calibração de

densidade ótica *versus* contagem microbiana (EL KHOURI; ATOUI; YAGUI, 2011; KABAK; OZBEY, 2012a).

A contagem das colônias foi realizada em duplicata, por plaqueamento em profundidade. Após a diluição seriada do caldo MRS inoculou-se 1 mL das diluições (10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9}) em placas de Petri estéreis, adicionando em seguida o ágar MRS, sendo as placas acondicionadas invertidas em jarra de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose (ANAEROBAC, PROBAC, BRASIL), e então incubadas a 37 ± 1 °C por 48 horas. Foram selecionadas para contagem as placas com 25 a 250 colônias, sendo os cálculos devidamente corrigidos conforme a diluição e os resultados expressos em UFC mL⁻¹ (BOVO et al., 2013).

Para estimar a concentração bacteriana do *L. acidophilus* La-5 no caldo MRS (1% m.v¹), foi utilizada a técnica de leitura da densidade ótica. Após o crescimento da cultura bacteriana em caldo MRS por 15 horas a 37 ± 1 °C, foi criada uma curva de calibração correlacionando-se a medida da absorbância a 600 nm do caldo diluído em água peptonada (espectrofotômetro UV-Vis duplo feixe com varredura, Lambda XLS, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), com o logaritmo da concentração bacteriana obtido através da contagem de colônias por plaqueamento em profundidade (BOVO et al., 2013).

A partir desses dados, foi gerada a equação para calcular a concentração bacteriana no meio e o volume de caldo de cultura necessário para obter a concentração desejada no leite.

Para avaliar a capacidade do *L. acidophilus* La-5 em remover as micotoxinas estudadas, cada inóculo foi ajustado e mantido na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹, que se refere a concentração em que os probióticos devem estar presentes, por porção de alimento, conforme indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999).

4.4 Ações do micro-organismo probiótico e dos prebióticos na descontaminação das aflatoxinas

Para avaliar o efeito do probiótico e dos diferentes prebióticos na

descontaminação e bioacessibilidade de AFB₁ e AFM₁ em leite integral, foi empregado um delineamento do tipo *Plackett-Burman* com 12 ensaios e 3 pontos centrais, conforme descrito nas Tabelas 3 e 4, para cada uma das aflatoxinas estudadas.

Tabela 3 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento *Plackett-Burman*.

Variáveis /Níveis	AFM ₁ /AFB ₁ (µg.L ⁻¹)	Tempo (horas)	Inulina (%)	B-glucana (%)	Oligofrutose (%)	Polidextrose (%)
-1	1,00/ 3,25	0	0	0	0	0
0	1,50/ 4,90	3	0,38	0,38	0,38	0,38
+1	2,00/ 6,50	6	0,75	0,75	0,75	0,75

A concentração dos prebióticos no nível superior (0,75% m.v⁻¹) está baseada na Lista de Alegações de Propriedades Funcionais e de Saúde da ANVISA para que estes compostos exerçam ação benéfica ao organismo humano (BRASIL, 1999).

Tabela 4 - Matriz do planejamento *Plackett-Burman* de 12 ensaios, com 3 pontos centrais e os controles.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	x ₄ ^d	x ₅ ^e	x ₆ ^f
1	+1 (2/6,5)	-1 (0)	+1 (0,75)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
2	+1 (2/6,5)	+1 (6)	-1 (0)	+1 (0,75)	-1 (0)	-1 (0)
3	-1 (3,25)	+1 (6)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)	-1 (0)
4	+1 (2/6,5)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)
5	+1 (2/6,5)	+1 (6)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)
6	+1 (2/6,5)	+1 (6)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)
7	-1 (1/3,25)	+1 (6)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)	+1 (0,75)
8	-1 (1/3,25)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (0)
9	-1 (1/3,25)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)	+1 (0,75)
10	+1 (2/6,5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,75)	+1 (0,75)
11	-1 (1/3,25)	+1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,75)
12	-1 (1/3,25)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
13	0 (1,5/4,9)	0 (3)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)
14	0 (1,5/4,9)	0 (3)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)
15	0 (1,5/4,9)	0 (3)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)	0 (0,38)
CP	0(4,9/1,5)	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-	-

^a Concentração de micotoxina (µg.L⁻¹); ^b Tempo (h); ^c Prebiótico inulina (%); ^d Prebiótico Oligofrutose (%); ^e Prebiótico Beta-glucana (%); ^f Prebiótico Polidextrose (%); CP: controle positivo; CN: controle negativo.

Além dos 12 ensaios gerados pelo planejamento e os 3 pontos centrais, foram realizados ensaios controles, sendo eles leite integral (Controle Negativo) e leite integral contaminado com as aflatoxinas na concentração de 1,5 e 4,9 µg.L⁻¹

para AFM₁ e AFB₁, respectivamente (Controle Positivo).

Para a realização dos ensaios, os padrões de AFM₁ e AFB₁ secos foram ressuspensos em solução de benzeno:acetonitrila (98:2 v.v⁻¹), até obter a concentração desejada para as contaminações (Tabela 3), colocados em banho de ultrassom (ElmasonicP, Elma, Singen-Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente (25° ± 2°C) para homogeneização e transferidos para erlenmeyer de 250 mL. O erlenmeyer foi então seco em estufa (45° ± 1°C), para evaporar toda solução de benzeno:acetonitrila. A seguir, foi adicionado 100 mL de leite integral e levado os frascos para banho ultrassom por 5 minutos a temperatura ambiente (25° ± 2°C), com o objetivo de obter uma solução homogênea.

Finalizada a etapa de contaminação, procedeu-se a adição dos prebióticos, na concentração e ordem descritos na Tabela 4, e da biomassa de *L. acidophilus* La-5, na concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹. Para tal, o probiótico foi previamente incubado em caldo MRS (1% m.v⁻¹) com 0,05% (m.v⁻¹) de L-cisteína por 9 h a 37 ± 1 °C e quantificado através de leitura de absorbância (em triplicata) em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Waltham, São Paulo). Para a estimativa da concentração bacteriana utilizou-se a curva de crescimento do micro-organismo, determinando desta forma o volume de caldo MRS a ser coletado, que foi submetido à centrifugação (CT-5000R, Cientec, Piracicaba, SP, Brasil) a 3000 rpm por 5 minutos a 25 °C de acordo com Pispan, Hewitt e Stapley (2013), a fim de obter a concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹.

Por fim, os ensaios foram incubados em estufa Incubadora B.O.D (403-3D, Nova Ética, Brasil), a 37 ± 1 °C, pelos tempos estabelecidos no planejamento experimental (Tabela 4).

4.5 Capacidade de remoção das aflatoxinas pelo probiótico e prebióticos

Para avaliar a capacidade de remoção de micotoxinas foi utilizada metodologia adaptada de El Khouri, Atoui e Yaghi (2011). Para tal, 15 mL de cada tratamento foram coletados e submetidos ao processo de extração e quantificação das aflatoxinas descrito no item 4.2.6.

O percentual de remoção das aflatoxinas foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{Concentração esperada } (\mu \text{ g. L}^{-1}) - \text{Concentração real } (\mu \text{ g. L}^{-1})}{\text{Concentração real } (\mu \text{ g. L}^{-1})} \times 100 \quad (02)$$

4.6 Análises de digestibilidade *in vitro*

Os tratamentos (Tabela 4) foram submetidos à análise de digestibilidade *in vitro*, segundo procedimento adaptado proposto por Kabak e Ozbey (2012a) e Versantvoort et al (2005). A digestão *in vitro* consiste em simular as condições de digestão no ser humano, sendo utilizada para determinar bioacessibilidade das aflatoxinas das amostras de leite previamente contaminadas e a eficácia do *L. acidophilus* La-5 e dos prebióticos em reduzir a quantidade disponível da AFM₁ e AFB₁ para absorção intestinal.

No modelo de digestão utilizado para este estudo, 4,5 mL de leite de cada tratamento foram coletados em triplicata para análise. Todos sucos digestivos foram aquecidos a 37 °C antes da utilização.

O processo de digestão foi iniciado por adição de 6 mL de saliva nos tubos contendo 4,5 mL de leite e incubando durante 5 min a 37 ± 1 °C. Em seguida, foi adicionado 12 mL de suco gástrico e a mistura foi agitada em shaker por 2 h (55 rpm a 37 ± 2 °C). A próxima etapa consistiu na adição simultânea de 12 mL de suco duodenal, 6 mL de solução de bile e 2 mL de NaHCO₃ (1M) e a mistura foi novamente agitada por mais 2 h (55 rpm, 37° ± 2 °C). Ao final do processo de digestibilidade *in vitro*, os tubos foram centrifugados durante 5 min a 5340 rpm, obtendo-se o sobrenadante no qual foi determinada a concentração das aflatoxinas após a liofilização do mesmo.

O esquema de representação do modelo de digestão *in vitro* é apresentado na Figura 3 e a composição dos sucos digestivos na Tabela 5.

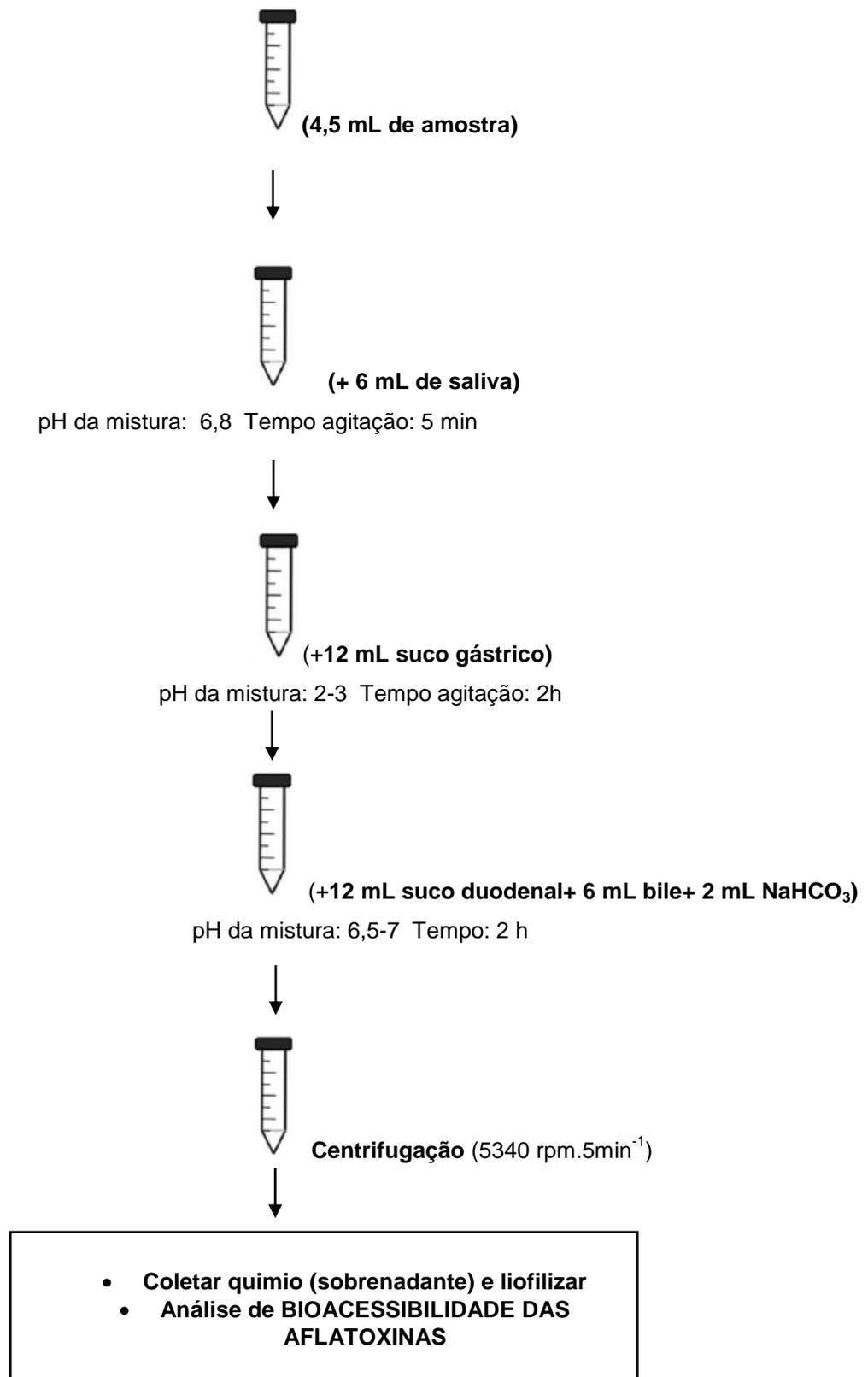


Figura 3 - Representação do modelo de digestão *in vitro*.
Fonte: Adaptado de VERSANTVOORT et al., (2005)

Tabela 5 - Constituintes dos sucos gástricos do modelo de digestibilidade *in vitro*.

	Saliva	Suco gástrico	Suco duodenal	Suco bile
Solução inorgânica	10 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹ 10 mL KSCN 20 g.L ⁻¹ 10 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹ 10 mL NaSO ₄ 57 g.L ⁻¹ 1,7 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹ 20 mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹	15,7 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹ 3,0 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g.L ⁻¹ 9,2 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹ 18 mL CaCl ₂ :2H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹ 10 mL NH ₄ Cl 30,6 g.L ⁻¹ 6,5 mL HCl 37% g.g ⁻¹	40 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹ 40 mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹ 10 mL KH ₂ PO ₄ 8 g.L ⁻¹ 6,3 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹ 10 mL MgCl ₂ 5 g.L ⁻¹ 0,18 mL HCl 37% g/g	30 mL NaCl 175,3 g.L ⁻¹ 68,3 mL NaHCO ₃ 84,7 g.L ⁻¹ 4,2 mL KCl 89,6 g.L ⁻¹ 0,15 mL HCl 37% g.g ⁻¹
Solução orgânica	8 mL ureia 25 g.L ⁻¹	10 mL glicose 65 g.L ⁻¹ 10 mL ácido glucurônico 2 g.L ⁻¹ 3,4 mL ureia 25 g.L ⁻¹ 10 mL glucosamina hidrocloreada 33 g.L ⁻¹	4 mL ureia 25 g.L ⁻¹	10 mL ureia 25 g.L ⁻¹
Adicionar após mistura das soluções orgânica e inorgânica	290 mg α-amilase 15 mg ácido úrico 25 mg mucina	1 g BSA 2,5 g pepsina 3 g mucina	9 mL CaCl ₂ :H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹ 1 g BSA 9 g pancreatina 1,5 g lipase	30 g bile 10 mL CaCl ₂ :H ₂ O 22,2 g.L ⁻¹ 1,8 g BSA
pH	6,8±0,2	1,30±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

Fonte: Adaptado de VERSANTVOORT et al., (2005). As soluções orgânica e inorgânica foram aumentadas para 500 mL com água destilada. Após misturar e homogeneizar as soluções orgânica e inorgânica, foram adicionados e dissolvidos mais alguns constituintes. Quando necessário fez-se o ajuste do pH.

A bioacessibilidade dos compostos foi calculada a partir da Equação 03:

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \frac{\text{composto obtido do quimo} (\mu\text{g. L}^1)}{\text{composto obtido da amostra antes da digestão} (\mu\text{g. L}^1)} \times 100 \quad (03)$$

4.7 Extração e concentração das aflatoxinas

As AFM₁ e AFB₁ foram extraídas e purificadas conforme método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) descrito por Sartori et al. (2015) e com algumas modificações descritas na figura 4.

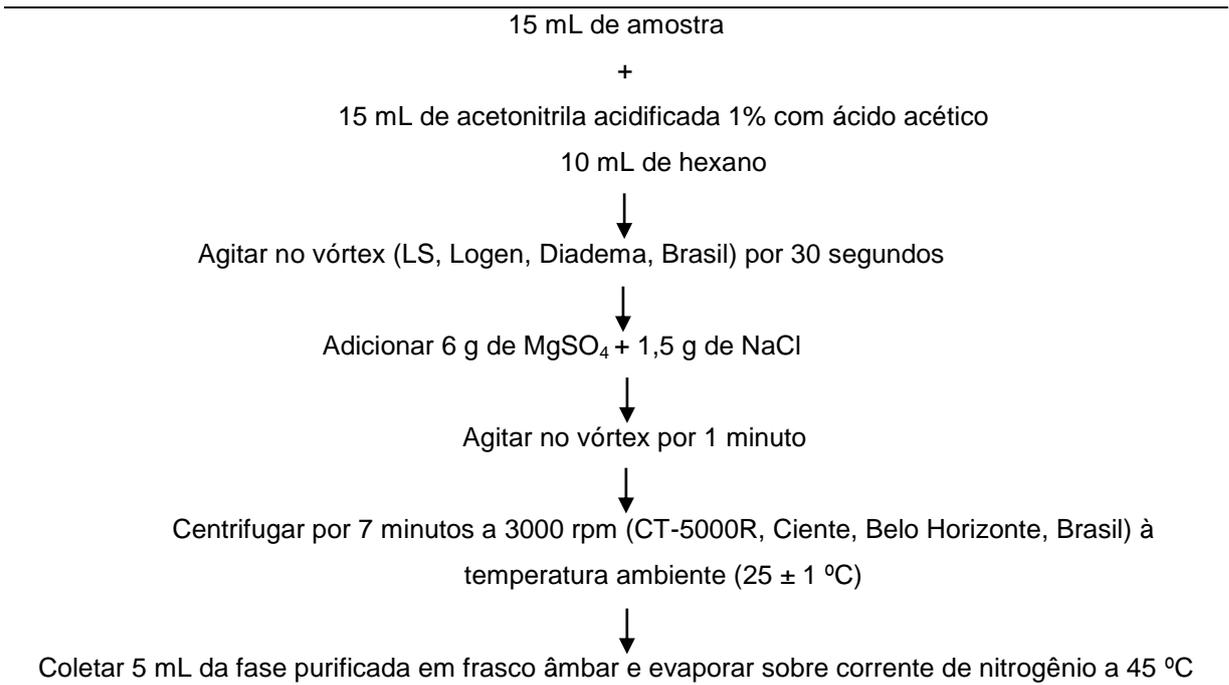


Figura 4- Esquema de extração QuEChERS de AFB₁ e AFM₁.
Fonte: adaptado de Sartori et al., (2015).

Para a quantificação, a amostra seca foi ressuspensa em 500 µL de solução de acetonitrila:metanol:água acidificada a 1% com ácido acético (10: 35:55), centrifugada a 6000 rpm e submetida a determinação cromatográfica.

4.8 Quantificação e identificação por cromatografia à líquido de ultra alta eficiência - UHPLC

Para a separação e quantificação foi utilizado cromatógrafo à líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) acoplado de detector de fluorescência (UHPLC-FL) (*Dionex*

Corporation, Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) e os dados foram processados no software *Chromeleon 7.2*. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 Acclaim PA2, 5 µm Analítica (4,6 x 250 mm), com vazão de fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 35 °C. A fase móvel foi composta por acetonitrila:metanol:água acidificada a 1% com ácido acético (35:10:55), filtrada e desgaseificada antes da sua inclusão no aparelho. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 360 nm e 450 nm, respectivamente, e o volume de injeção da amostra foi de 20 µL. O tempo das corridas cromatográficas foi de 10 minutos.

A metodologia foi validada a partir da avaliação dos parâmetros seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), porcentagem de recuperação (%R) e repetibilidade (desvio padrão relativo percentual) (%RSD ou % CV), conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003). Todas as quantificações foram realizadas em triplicata. Os limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD) foram calculados a partir das curvas de calibração pelo método da relação sinal-ruído, por meio da comparação entre a medição dos sinais de um branco (solução diluente dos padrões) e dos padrões em baixas concentrações no mesmo tempo de retenção. Foi estabelecida relação sinal-ruído de 3:1 para o LOD e 10:1 para o LOQ. Foram construídas duas curvas de calibração: (a) padrões diluídos em fase móvel e (b) concentrações conhecidas dos analitos na matriz (leite). Em (a), a linearidade foi determinada por meio da construção de curvas de calibração na faixa de 0,3 a 20 µg L⁻¹ para a AFM₁ e 1,0 a 20 µg L⁻¹ para AFB₁. Foram utilizados seis níveis para a construção de cada curva de calibração com as seguintes concentrações: 0,3; 1,0; 5,0; 7,0; 14,0 e 20,0 µg L⁻¹ para AFM₁ e 1,0; 3,0; 7,0; 9,0; 14,0 e 20,0 µg L⁻¹ para AFB₁, a partir da solução padrão das aflatoxinas. Para a construção da curva de calibração na matriz (b) foram também utilizados seis níveis com as seguintes concentrações para AFM₁: 0,3; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg L⁻¹ e para AFB₁: 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg L⁻¹. O primeiro nível foi alterado para as diferentes aflatoxinas conforme os limites de quantificação previamente estabelecidos para cada uma.

4.9 Validação do método QuEChERS para determinação das aflatoxinas AFB₁ e AFM₁

Para avaliar a porcentagem de recuperação (%R) do método, alíquotas de 15 mL de amostra foram fortificadas (em triplicata) com 3 diferentes níveis, para AFB₁ (10, 5 e 1 µg.L⁻¹) e para AFM₁ (5, 3 e 1 µg.L⁻¹). Após fortificação, as amostras foram ultrassonificadas por 15 min a 37 °C e foram submetidas à extração pelo método de QuEChERS (descrito no item 4.7) e posterior injeção em UHPLC para identificação e quantificação.

O método foi validado para extração de AFM₁ e AFB₁ em leite UAT homogeneizado, leite fermentado e fluido biológico, através da estimativa do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, linearidade e recuperação (%R), conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003). A porcentagem de recuperação foi calculada através da Equação 4.

$$\%R = \frac{C1 - C2}{C3} * 100 \quad (04)$$

Em que:

%R = porcentagem de recuperação

C1= concentração determinada na amostra fortificada;

C2= concentração determinada na amostra não fortificada;

C3= concentração do padrão utilizado para a fortificação.

Também foram calculados o desvio padrão relativo percentual (RSD%) e o coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação (BRASIL, 2003).

4.10 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

Os espectrogramas das amostras na região do infravermelho foram obtidos com o FTIR (*Frontier Spectrum 100*, PerkinElmer, Waltham, EUA) utilizando o modo

de refletância total atenuada (UATR), no intervalo de número de onda de 4000-600 cm^{-1} , com resolução de 4 pontos por cm^{-1} . As amostras foram liofilizadas (Liofilizador Labconco, modelo Bulk Tray Dryer) e inseridas sobre o leitor do equipamento para caracterização por meio do espectro gerado em computador. Os espectros e dados obtidos por infravermelho foram analisados pelo *software OriginPro 8.5* para verificação de possível interação. Posteriormente ao ajuste das linhas de base espectrais, as estruturas secundárias das proteínas em estudo, na ausência e na presença da AFB₁ ou AFM₁, foram avaliadas por meio da deconvolução da região de interesse (1700-1600 cm^{-1} , correspondente à região da Amida I), com o uso da segunda derivativa e do *curve-fitting* (ajuste das curvas). Os picos foram ajustados e a área medida por função Gaussiana.

4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e quando detectado diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de probabilidade ao Teste de Tukey *studentized*, utilizando o programa computacional Software STATISTICA 11. Todos os ensaios foram reproduzidos no Software STATISTICA 11 também para a análise dos efeitos das variáveis do Planejamento *Plackett-Burman* proposto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA

A curva de concentração bacteriana (Figura 5) foi construída através da correlação entre as medidas de absorvância obtidas e do plaqueamento em profundidade do *L. acidophilus*. A partir dos dados obtidos, gerou-se a equação linear: $y = 4,25x + 8,8744$, que foi utilizada para o cálculo da concentração bacteriana no meio e, posteriormente, o cálculo do volume de meio com o cultivo de bactéria utilizado para alcançar uma concentração de células de, aproximadamente, 10^8 UFC.mL⁻¹, concentração utilizada no trabalho devido ao fato de que de acordo com a Lista de Alegações de Propriedades Funcionais e de Saúde, para que o probiótico exerça efeito benéfico ele deve estar presente na concentração de 10^8 a 10^9 UFC/porção (BRASIL, 1999).

Os dados se ajustaram de forma adequada a equação gerada, uma vez que o valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9949.

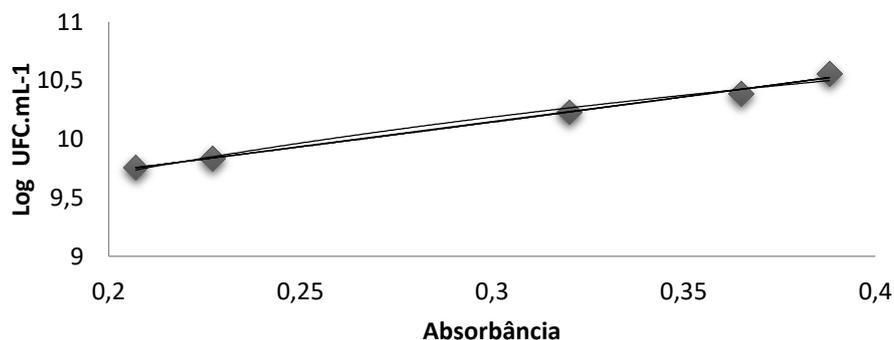


Figura 5 - Curva de concentração bacteriana para a cepa probiótica *L. acidophilus*.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE AFB₁ e AFM₁

Cada amostra foi fortificada com uma concentração conhecida de AFB₁ e AFM₁ (co-cromatografia) e comparada com a amostra padrão (amostra sem contaminação), determinando-se assim a sua seletividade. Não foram observados sinais interferentes no tempo de retenção registrado da AFB₁ (~7,6 min) e AFM₁ (~4,8). A linearidade da curva de calibração foi verificada nos intervalos de concentração estudados com coeficientes de determinação satisfatórios ($R^2 = 0,99768$ para AFB₁ e $R^2=0,99964$ para AFM₁), evidenciando dessa forma o ajuste ideal dos dados à linha de regressão. As curvas de regressão linear para AFB₁ e AFM₁ foram $y= 96,9x + 0,39$ e $y=225,73 x - 24$.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir dos limites de detecção (LOD_i) e quantificação (LOQ_i) previamente determinados para o instrumento para a AFB₁ (0,3 e 1,0 µg.L⁻¹, respectivamente) e AFM₁ (0,1 e 0,3 µg.L⁻¹, respectivamente) (BRASIL, 2003). A repetibilidade do método foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo percentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação (%R) do método sintetizados na Tabela 6.

Os valores de recuperação (%R) variaram de 60,86 a 108,61% e a precisão foi comprovada a partir dos valores de RSD(%) que não ultrapassaram os 18,76%, adequando-se aos padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

Os ensaios foram submetidos a extração das aflatoxinas e quantificação por cromatografia de alta eficiência com obtenção de cromatogramas (Figuras 6, 7, 8, 9). Os compostos foram identificados baseados no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando soluções padrão que promoviam o aumento de sinal do composto. A quantificação foi realizada por normalização externa com base nas curvas de calibração, aonde o sinal foi a área do pico cromatográfico.

Tabela 6 - Valores de precisão, LOD e LOQ para a determinação de AFB₁ e AFM₁ em leite, leite fermentado e fluido biológico.

	<i>Fortificação AFB₁</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>Recuperação</i> (R%)	<i>CV</i> (%)	<i>LOD</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>LOQ</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>Fortificação AFM₁</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>Recuperação</i> (R%)	<i>CV</i> (%)	<i>LOD</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>LOQ</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Leite	1,0	77,32	11,21			1,0	93,65	3,89		
	5,0	82,46	17,53	0,03	0,1	3,0	82,29	3,57	0,01	0,03
	10,0	60,86	0,95			5,0	72,26	18,76		
Leite Fermentado	1,0	81,07	14,82			1,0	84,74	3,25		
	5,0	76,65	6,64	0,03	0,1	3,0	99,57	4,71	0,01	0,03
	10,0	62,58	2,72			5,0	85,74	0,96		
Fluido Biológico	1,0	108,61	8,82			1,0	96,24	3,97		
	5,0	88,73	9,14	0,1	0,3	3,0	86,55	3,90	0,03	0,1
	10,0	75,74	2,69			5,0	90,88	0,52		

Repetibilidade (n=3)

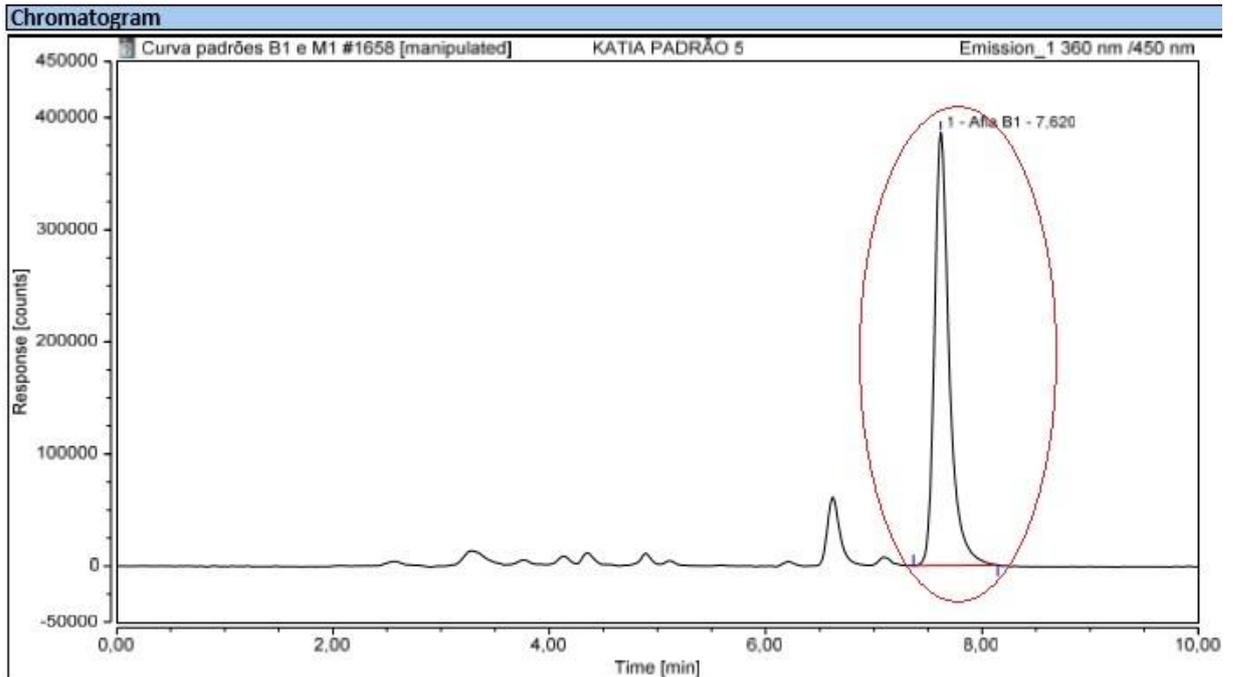


Figura 6 - Cromatograma representativo do pico padrão gerado pela aflatoxina AFB₁

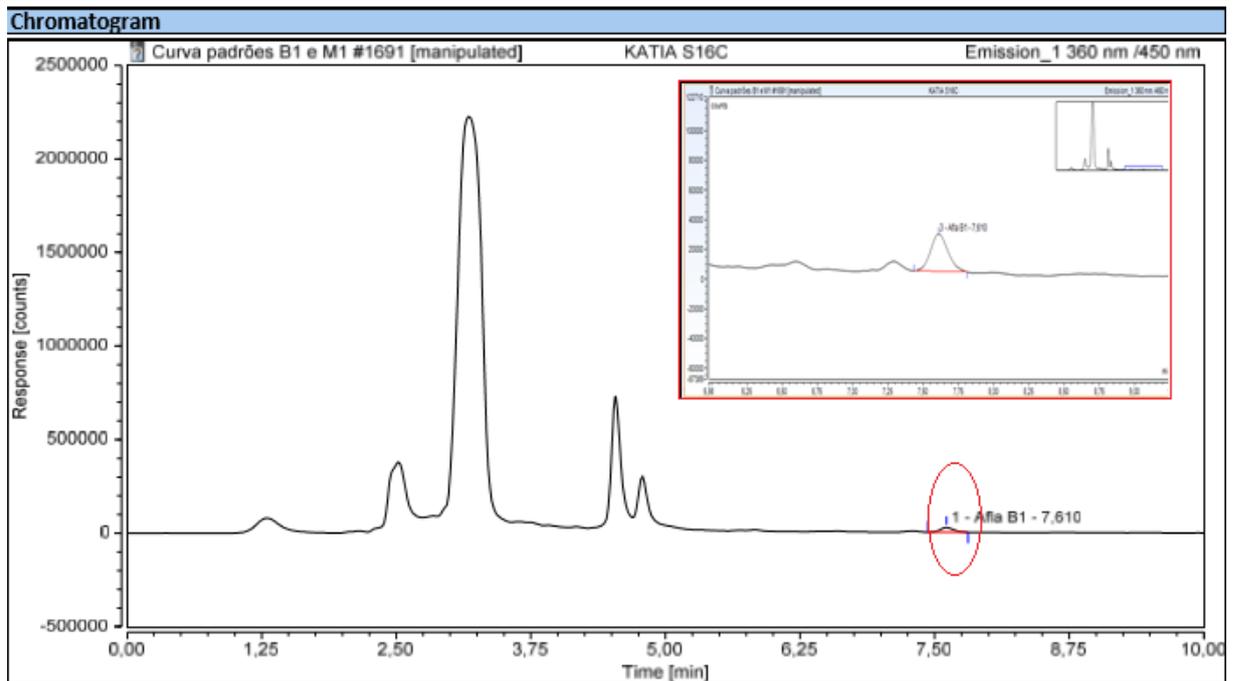


Figura 7 - Cromatograma representativo do pico da amostra Controle Positivo com AFB₁

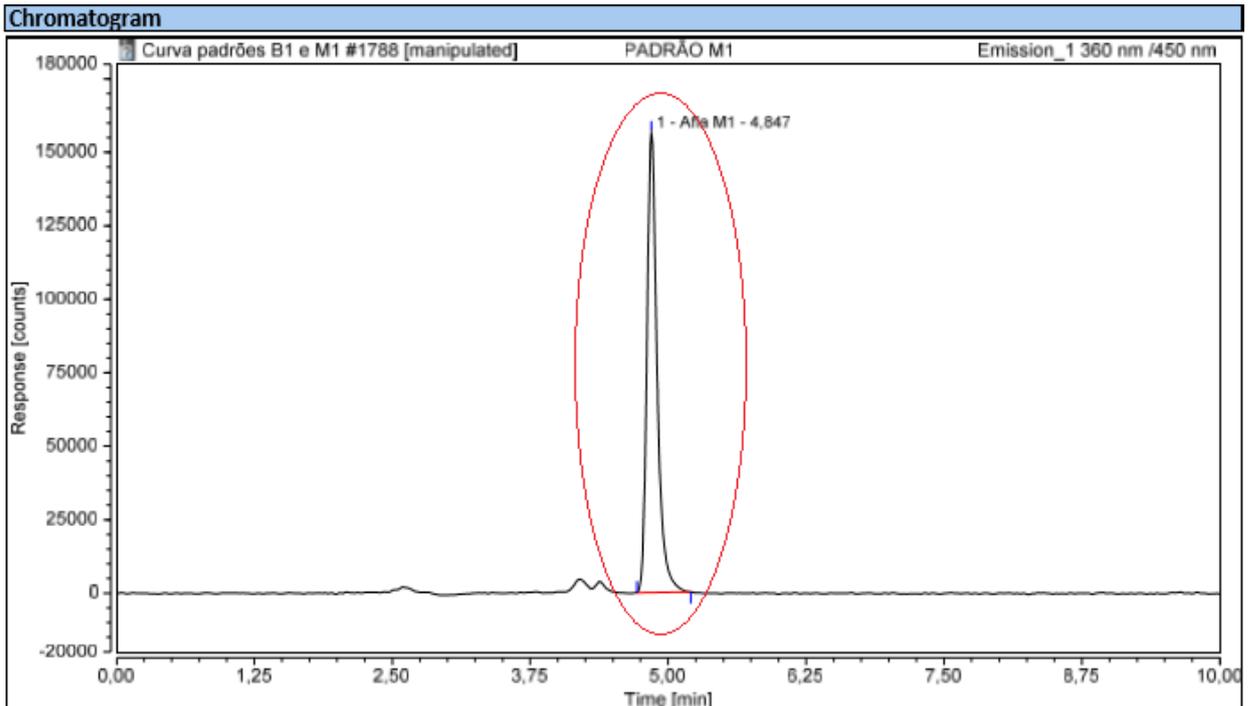


Figura 8 - Cromatograma representativo do pico padrão gerado pela aflatoxina AFM₁

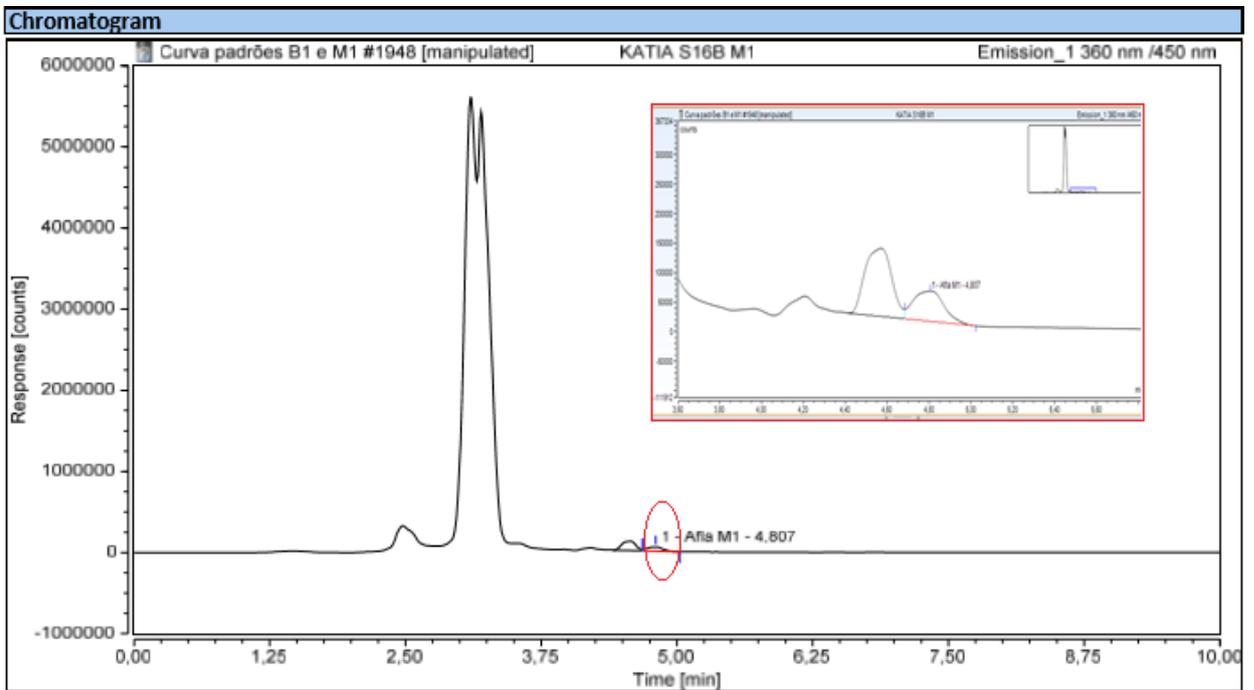


Figura 9 - Cromatograma representativo do pico da amostra Controle Positivo com AFM₁

5.3 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE REDUÇÃO E DA BIOACESSIBILIDADE DE AFB₁ E AFM₁ EM LEITE POR *Lactobacillus acidophilus* E PREBIÓTICOS

5.3.1 Avaliação do percentual de redução de AFB₁ e AFM₁ em leite por *Lactobacillus acidophilus* e prebióticos

Devido à capacidade de certas estirpes bacterianas de se ligarem às micotoxinas, as LAB são sugeridas como um potencial método biológico para reduzir a toxicidade das aflatoxinas ou impedir a sua absorção pelo organismo humano (AHLBERG et al., 2015). Dentre estas, o *L. acidophilus* tem se destacado em inúmeros estudos; porém, na sua maior parte em sistemas modelo e não em alimentos (EL NEZAMI et al., 1998; HASKARD et al., 2001).

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que em todos os ensaios houve um impacto positivo sobre a redução das duas aflatoxinas, cujo percentual de redução variou entre 13,53 a 35,53% para AFB₁ e 17,61 a 71,52% para AFM₁.

Para as contaminações com AFB₁, o percentual de redução para o ensaio contendo somente o *L. acidophilus* (Ensaio 12) foi de 34,96%. Até o momento não existem dados na literatura que relatem a redução de AFB₁ por BAL numa matriz láctea, uma vez que, até pouco tempo, acreditava-se que toda a AFLB₁ era convertida em AFLM₁ e que somente esta estaria presente no leite (BRITZI et al., 2013). Porém, estudos mais recentes têm demonstrado que a AFB₁ também pode ser encontrada no leite e derivados lácteos (CARVAJAL et al., 2003; GURBAY et al., 2010; SCAGLIONI et al., 2014).

Embora não existam trabalhos relatando o poder descontaminante das BAL em leite ou derivados lácteos, existem trabalhos evidenciando o poder de ligação e inibição dessas bactérias sobre a AFB₁ em solução tampão. O maior tempo de incubação dos ensaios deste estudo foi de 6 h, uma vez que este é o tempo médio de fermentação para produção de iogurte.

Tabela 7 - Matriz de planejamento *Plackett-Burman* com as variáveis independentes e resposta (variável dependente) de redução (%) das aflatoxinas AFB₁ e AFM₁.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	x ₄ ^d	x ₅ ^e	x ₆ ^f	% Redução	
							AFB ₁	AFM ₁
1	+1(6,5/2,0)	-1(0)	+1(0,75)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	24,55±0,14 ^d	61,22±0,00 ^{ab}
2	+1(6,5/2,0)	+1(6)	-1(0)	+1(0,75)	-1(0)	-1(0)	13,53±0,06 ^e	56,43±0,09 ^{bc}
3	-1(3,25/1,0)	+1(6)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	-1(0)	32,60±0,05 ^{ab}	29,19±0,00 ^{etg}
4	+1(6,5/2,0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	26,26±0,09 ^{bcd}	67,42±0,07 ^{ab}
5	+1(6,5/2,0)	+1(6)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	29,95±0,13 ^{abcd}	31,07±0,06 ^{de}
6	+1(6,5/2,0)	+1(6)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	24,26±0,10 ^d	26,10±0,07 ^{tg}
7	-1(3,25/1,0)	+1(6)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	24,11±0,13 ^d	27,02±0,03 ^{etg}
8	-1(3,25/1,0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	32,96±0,11 ^{ab}	23,00±0,07 ^{tg}
9	-1(3,25/1,0)	-1(0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	+1(0,75)	27,24±0,04 ^{bcd}	17,65±0,02 ^g
10	+1(6,5/2,0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	35,53±0,18 ^a	34,37±0,04 ^{def}
11	-1(3,25/1,0)	+1(6)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(0,75)	31,78±0,11 ^{abc}	30,32±0,01 ^{etg}
12	-1(3,25/1,0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	34,96±0,05 ^a	71,52±0,06 ^a
13	0(4,9/1,5)	0(3)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	33,76±0,40 ^{ab}	45,46±0,03 ^{cd}
14	0(4,9/1,5)	0(3)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	33,20±0,76 ^{ab}	45,41±0,03 ^{cd}
15	0(4,9/1,5)	0(3)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	33,13±0,12 ^{ab}	46,20±0,03 ^{cd}
CP	0(4,9/1,5)	-	-	-	-	-	2,64±0,28	4,6±0,03
CN	-	-	-	-	-	-	ND	ND

Nota: a Concentração de micotoxina AFB₁/AFM₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$); b Tempo (h); c Prebiótico inulina (%); d Prebiótico Oligofrutose (%); e Prebiótico β -glucana (%); f Prebiótico Polidextrose (%); CP: controle positivo (amostra de leite fortificada com a micotoxina somente); CN: controle negativo (amostra somente de leite sem fortificação). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

O resultado obtido no Ensaio 12 (tempo zero de incubação) para AFB₁ foi superior ao encontrado por Peltonen et al (2001), para as linhagens de *L. acidophilus*, E-94507 e CSCC 536, onde o poder de remoção foi relativamente baixo, 18,2 e 20,7%, respectivamente, em 24 h de incubação. Porém o resultado do nosso estudo foi menor do que o obtido por El-Nezami et al (1998) e Haskard et al. (2001), ressaltando que estes estudos foram realizados em soluções tampões. El-Nezami et al (1998) obtiveram valores de remoção de até 77% para AFB₁ utilizando *L. acidophilus* ATCC 4356 incubado durante 72 h. Haskard et al. (2001) também avaliaram a capacidade de ligação de AFB₁ por *L. acidophilus* com 1 h de incubação, mostrando uma remoção de 48,3 e 59,7% para *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. acidophilus* LC1 respectivamente. Os autores sugerem que o fato das aflatoxinas estarem associadas à matriz alimentícia, em especial a caseína do leite, provavelmente seja o principal motivo para os diferentes percentuais de redução encontrados em leite e soluções modelo (BOVO et al., 2013; CAVALLARIN et al., 2014).

Neste estudo o micro-organismo mostrou ser mais eficaz e promissor agindo individualmente do que na maioria tratamentos adicionados de um ou mais prebióticos. Embora o Ensaio 10, o qual foi fortificado com a maior concentração de aflatoxina do planejamento e foi coletado para análise no tempo zero de incubação, com adição dos prebióticos β -glucana e polidextrose, tenha obtido maior valor de redução (35,54%), o mesmo não diferiu significativamente do Ensaio 12 (34,96%). Ainda quando comparamos o Ensaio 12 com os ensaios dos pontos centrais (13,14,15), onde se têm a associação de todos os prebióticos, os percentuais de redução obtidos por estes ensaios ficaram bem próximos e não diferiram significativamente do percentual de redução do *L. acidophilus* isolado.

Analisando-se os resultados da Tabela 7 foi possível calcular os efeitos das seis variáveis estudadas sobre o percentual de redução de AFB₁, os quais estão apresentados na Tabela 8.

Considerando o nível de significância de 5%, nenhum dos fatores estudados foi significativo. Assim, o uso de qualquer valor dentro da faixa estudada resultou em reduções de AFB₁ estatisticamente semelhantes

Tabela 8 - Efeito dos fatores estudados no planejamento *Plackett-Burman* sobre o percentual de redução de AFB₁ numa matriz láctea.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p* - valor
Média	29,19	1,36	21,50	>10 ⁻⁵
Concentração AFB ₁ (µg.L ⁻¹)	-4,93	3,03	-1,62	0,14
Tempo (h)	-4,21	3,03	-1,39	0,20
Inulina (m.v ⁻¹)	-1,38	3,03	-0,45	0,66
Oligofrutose (m.v ⁻¹)	-4,94	3,03	-1,63	0,14
β-glucana (m.v ⁻¹)	4,56	3,03	1,50	0,17
Polidextrose (m.v ⁻¹)	0,11	3,03	0,0	0,97

* p≤0,05.

Levando em consideração as variáveis concentração da micotoxina e tempo, o encontrado neste estudo está de acordo com o relatado por Kabak e Var (2008), que utilizaram 4 cepas de *Lactobacillus spp.* e 2 cepas de *Bifidobacterium spp.* num estudo sobre a redução de AFB₁ em tampão fosfato salino, onde foi verificado que o nível de contaminação e o período de incubação não interferia nos resultados obtidos. El-Nezami et al (2008) também indicaram que não houve diferença significativa entre diferentes tempos de incubação na remoção de AFB₁ em PBS por estirpes de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias. Por sua vez, a remoção de AFB₁ não foi aumentada com o aumento da concentração da mesma. Porém, em contradição, um estudo realizado por Serrano-Niño et al. (2015), demonstrou que a quantidade de AFB₁ ligada a estirpes microbianas aumentou significativamente (p<0,05) quando o tempo de incubação foi estendido de zero para 4 e 12 h, embora o processo de ligação toxina-micro-organismo já tenha sido percebido imediatamente (0 h).

O fato da variável tempo neste estudo não ter sido estatisticamente significativa dentro da faixa estudada está de acordo com a teoria apresentada por outros autores de que a ligação da aflatoxina com células microbianas é um processo rápido e ocorre durante os primeiros minutos de contato, elucidando que a redução se dá devido à adsorção física da micotoxina a um componente da parede celular do micro-organismo (peptideoglicano e oligossacarídeos) e não por biodegradação (BOVO et al., 2013, CORASSIN et al., 2013; SERRANO-NINO et al., 2013).

Embora a adição dos prebióticos não tenha promovido reduções significativas, inulina e oligofrutose tiveram um efeito negativo na percentagem de redução, ou seja, um aumento na concentração desses prebióticos dentro da faixa estudada não implica em maior percentual de redução. Por sua vez, o contrário é válido para os prebióticos β -glucana e polidextrose que demonstraram um efeito positivo na resposta. Quando se analisa o percentual de redução da AFB₁ nos ensaios onde se teve a adição somente de um tipo de prebiótico, constata-se que os Ensaios 1 e 2, os quais tiveram a inclusão somente de inulina e oligofrutose, respectivamente, resultaram em menor percentual de redução (24,55 e 13,53%) quando comparados ao Ensaio 11 (31,78%) com polidextrose.

Analisando-se os percentuais de redução de AFM₁, observa-se que eles foram ligeiramente maiores do que os encontrados para AFB₁ em alguns ensaios. O percentual de redução para o ensaio contendo somente o *L. acidophilus* (Ensaio 12) foi visivelmente maior para AFM₁ (71,52%). Da mesma forma que para AFB₁, o micro-organismo mostrou ser mais eficaz e promissor agindo individualmente do que em conjunto com um ou mais prebióticos. O valor de redução encontrado neste trabalho para AFM₁ é semelhante ao encontrado por Becker-Algeri (2016) utilizando o *L. acidophilus* em leite fortificado com a aflatoxina (2 $\mu\text{g. L}^{-1}$) (73,7%), e maior do que o encontrado por Elsanhoty et al (2014) também em fortificação (50 $\mu\text{g. L}^{-1}$) no leite e com a mesma espécie de probiótico (51,4%), e por Kabak e Var (2008), os quais encontraram um poder de redução variando de 9,55-22,70% para 3 cepas de *L. acidophilus* (NCC 12; NCC36; NCC 68).

Assim como para a AFB₁, o poder de ligação e inibição das BAL com a AFM₁ está relacionada com a composição da parede celular da bactéria (polissacarídeos, peptidoglicanos, ácido lipoteicóico ou ácido teicóico) (CORASSIN et al., 2013; EL-NEZAMI et al., 1998; SHETTY; JESPERSEN, 2006; SERRANO-NIÑO et al, 2015).

Analisando-se os resultados da Tabela 7 foi possível calcular os efeitos das seis variáveis estudadas sobre o percentual de redução da AFM₁, os quais estão apresentados na Tabela 9.

Considerando o nível de significância de 5%, os fatores concentração de AFM₁ ($\mu\text{g.L}^{-1}$), tempo de incubação, e os prebióticos β -glucana e polidextrose foram significativos no percentual de redução, considerando-se as faixas estudadas.

Tabela 9 - Efeito dos fatores estudados no planejamento *Plackett-Burman* sobre o percentual de redução de AFM₁ numa matriz láctea.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p* - valor
Média	39,73	2,46	16,09	>10 ⁻⁵
Concentração AFM ₁ (µg.L ⁻¹)	14,33	5,52	2,59	0,03*
Tempo (h)	-14,00	5,52	-2,53	0,03*
Inulina (m.v ⁻¹)	-1,82	5,52	-0,33	0,74
Oligofrutose (m.v ⁻¹)	-5,17	5,52	-0,93	0,37
β-glucana (m.v ⁻¹)	-25,21	5,52	-4,56	0,01*
Polidextrose (m.v ⁻¹)	-13,59	5,52	-2,46	0,03*

* p≤0,05.

Elencando a teoria de que o processo de ligação entre aflatoxina e micro-organismo é um processo rápido, e enfatizando o já encontrado para AFB₁ neste estudo, o tempo de incubação teve um efeito negativo, ou seja, quanto maior o tempo de incubação dentro da faixa estudada (0-6 h), menor o percentual de redução de AFM₁. Observando-se a Tabela 7 pode-se verificar que o ensaio mais promissor, com 71,52% de remoção da aflatoxina, foi realizado no menor tempo de incubação. Porém, o mesmo contradiz o encontrado por El Khouri, Atoui e Yaghi (2011), onde estes observaram melhores percentuais de redução com o aumento do tempo de incubação. A remoção de AFM₁ em iogurte utilizando as culturas combinadas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* foi de 26,1% em 2 h e aumentou com o tempo para atingir 68% em 14 h. Por outro lado, Kabak e Var (2008) não verificaram diferenças significativas (p> 0,05) no percentual de remoção de AFM₁ nos diferentes períodos de incubação para o *L. acidophilus* NCC 36 (22,23 - 23,47 e 22,24% de AFM₁ a partir de solução de PBS dentro de 0, 4 e 24 h, respectivamente).

Para AFM₁, a variável concentração da aflatoxina teve um efeito positivo e significativo, logo, quanto maior a concentração dentro da faixa estudada (1,0 a 2,0 µg.L⁻¹), maior o percentual de remoção de AFM₁. Este comportamento é semelhante ao relatado por Lee et al. (2003), que afirmam que a concentração da toxina no meio influencia a taxa de adsorção da mesma, concluindo que quanto maior a sua concentração no meio, maior a taxa de remoção. Ismail et al (2017) também verificaram que a concentração de AFM₁ afeta significativamente os potenciais de

redução das BAL, porém melhores resultados foram obtidos numa menor concentração ($0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$). Em contraste, Kabak e Var (2008) em seu trabalho relatam que a concentração de toxina não teve efeito significativo sobre a remoção AFM₁ em leite por BAL .

Entre os quatro prebióticos utilizados neste estudo, somente a β -glucana e a polidextrose foram significativos, porém apresentaram um efeito negativo no percentual de redução. Portanto, um aumento na concentração desses prebióticos dentro da faixa estudada não implicou em maiores respostas de percentual de redução da AFM₁ e sim, no contrário. Logo os ensaios adicionados desses prebióticos tiveram um desempenho menor na redução de AFM₁. No Ensaio 11 (Polidextrose+*L.acidophilus*) observou-se 30,32% de redução da aflatoxina, enquanto que nos ensaios 01 (Inulina+*L.acidophilus*) e 02 (Oligofrutose+*L.acidophilus*) os resultados foram de 61,22 e 56,43% de redução da AFM₁, respectivamente. Embora a inulina e a oligofrutose não tenham tido efeitos significativos, os mesmos foram negativos dentro da faixa estudada assim como para β -glucana e a Polidextrose. Apesar de que a adição de prebióticos não tenha potencializado o efeito do *L. acidophilus*, uma vez QUE todos os ensaios contendo o probiótico e os prebióticos em conjunto apresentaram um desempenho menor quando comparado com o ensaio adicionado somente do *L. acidophilus* isolado, a percentagem de redução foi satisfatória e positiva em todos os ensaios que usaram a combinação do probiótico com os prebióticos.

Não há trabalhos publicados na literatura científica que tenham investigado o estudo da influência do uso de prebióticos sobre a redução de AFB₁ ou AFM₁ em leite e derivados lácteos. A remoção microbiana de AFB₁ e AFM₁ é um campo promissor a ser investigado; no entanto, a heterogeneidade das condições testadas e os micro-organismos estudados levam a dificuldades na comparação dos resultados (VERHEECKE et al., 2016).

5.3.2 Avaliação da bioacessibilidade de AFM₁ e AFB₁ pela ação de probiótico e prebióticos

A inibição da micotoxina no trato digestório por adsorção de agentes tais como micro-organismos pode ser uma estratégia promissora para proteger contra o

efeito tóxico destes contaminantes alimentares (FIRMIN et al.,2010). Por consequência, há atualmente um grande interesse na utilização de prebióticos como ingredientes alimentares funcionais para manipular a composição da microbiota do cólon, uma vez que são ingredientes não digeríveis e que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no cólon (GIBSON et al., 2004).

Para alcançar qualquer efeito em um tecido específico ou órgão, as micotoxinas devem estar bioacessíveis, termo que se refere à tendência do composto de ser extraído a partir da matriz alimentar, e então se tornar disponível para absorção pelas células intestinais (FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2009). Portanto, para que o risco de ingestão possa ser estimado e avaliado quanto a bioacessibilidade no sistema digestivo, todos os ensaios foram submetidos a um modelo de digestão *in vitro* estático para estimar a quantidade de AFB₁ e AFM₁ que fica disponível para absorção.

Todos os ensaios promoveram redução na bioacessibilidade de AFB₁ e AFM₁, cujo percentual de bioacessibilidade quando comparado com o Controle Positivo, variou entre 23,68 a 72,67% para AFB₁ e 0,00% para AFM₁. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

A bioacessibilidade da AFB₁ na amostra de leite que não foi adicionada do probiótico e dos prebióticos foi de 95,04%, ou seja, houve liberação de 95,04% da toxina da matriz para o fluido biológico. Atualmente, não há dados publicados na literatura sobre a bioacessibilidade da AFB₁ em leites e derivados; porém, foram relatados valores consideráveis e semelhantes a este estudo em certos alimentos. Kabak e Ozbey (2012a) estudaram a bioacessibilidade de AFB₁ a partir de várias matrizes alimentares secas (amendoim, pistache, avelã, figos secos, páprica, trigo e milho), onde a mesma variou de 85,1-98,1. Kabak et al. (2009) encontrou uma bioacessibilidade para AFB₁ de 86% em pistache e para alimentos infantis artificialmente contaminados, entre 88% e 94%, dependendo do nível de contaminação. Versantvoort et al (2005) também constatou 94% da micotoxina disponível para absorção em amendoins após processo de digestibilidade *in vitro*. A diferença de bioacessibilidade encontrada para as micotoxinas depende de vários fatores, tais como o tipo de matriz alimentar, nível de contaminação e tipo de contaminação (fortificação ou contaminação natural) (KABAK et al., 2009).

Tabela 10 - Matriz de planejamento *Plackett-Burman* com as variáveis independentes e resposta (variável dependente) de bioacessibilidade (%) das aflatoxinas AFB₁ e AFM₁.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	x ₄ ^d	x ₅ ^e	x ₆ ^f	% Bioacessibilidade	
							AFB ₁	AFM ₁
1	+1(6,5/2,0)	-1(0)	+1(0,75)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	34,58±0,08 ^{cdef}	<LOQ
2	+1(6,5/2,0)	+1(6)	-1(0)	+1(0,75)	-1(0)	-1(0)	26,08±0,16 ^f	<LOQ
3	-1(3,25/1,0)	+1(6)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	-1(0)	43,89±0,10 ^{cd}	<LOQ
4	+1(6,5/2,0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	35,66±0,03 ^{cdef}	<LOQ
5	+1(6,5/2,0)	+1(6)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	31,13±0,04 ^{ef}	<LOQ
6	+1(6,5/2,0)	+1(6)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	23,68±0,18 ^f	<LOQ
7	-1(3,25/1,0)	+1(6)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	+1(0,75)	35,33±0,08 ^{def}	<LOQ
8	-1(3,25/1,0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	+1(0,75)	-1(0)	48,10±0,06 ^c	<LOQ
9	-1(3,25/1,0)	-1(0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	+1(0,75)	61,67±0,02 ^b	<LOQ
10	+1(6,5/2,0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(0,75)	+1(0,75)	35,42±0,008 ^{def}	<LOQ
11	-1(3,25/1,0)	+1(6)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	+1(0,75)	41,57±0,005 ^{cde}	<LOQ
12	-1(3,25/1,0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	72,67,14±0,29 ^b	<LOQ
13	0(4,9/1,5)	0(3)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	32,21±0,020 ^{def}	<LOQ
14	0(4,9/1,5)	0(3)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	31,88±0,03 ^{def}	<LOQ
15	0(4,9/1,5)	0(3)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	0(0,38)	31,90±0,04 ^{def}	<LOQ
CP	0(4,9/1,5)	-	-	-	-	-	95,04±0,38 ^a	91,90
CN	-	-	-	-	-	-	ND	ND

Nota: ^a Concentração de micotoxina AFB₁/AFM₁ (µg.L⁻¹); ^b Tempo (h); ^c Prebiótico inulina (%); ^d Prebiótico Oligofrutose (%); ^e Prebiótico β-glucana (%); ^f Prebiótico Polidextrose (%); CP: controle positivo (amostra de leite fortificada com a micotoxina somente); CN: controle negativo (amostra somente de leite sem fortificação). <LOQ: abaixo do limite de quantificação; ND: não detectado. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (α<0,0

A adição do *L. acidophilus* isolado ou em conjunto com os prebióticos promoveu a redução da bioacessibilidade em todos os ensaios (Tabela 10), com valores de bioacessibilidade variando entre 23,68 e 72,67% quando comparados com o controle. O uso do *L. acidophilus* isolado (Ensaio 12) promoveu uma redução de 22,37% na bioacessibilidade da AFB₁. Valores semelhantes foram encontrados por Kabak e Ozbey (2012a), onde os mesmos relataram que a adição de bactérias probióticas (*B.longum*, *L.rhamnosus*, *B.species* 420, *L.acidophilus*, *L.acidophilus* NCFM150B, *L.casei* Shirota) em matriz alimentar seca reduz a bioacessibilidade de 13,5-31,9% dependendo da cepa utilizada. Por sua vez, Kabak et al. (2009) a partir fórmulas infantis artificialmente contaminadas, relataram uma redução entre 21% e 37% de AFB₁ com a adição de *L. acidophilus* NCC 12, dependendo do nível de contaminação. Além de diferentes sítios de ligação, o complexo aflatoxina-LAB parece ser extremamente específico para cada cepa. BAL têm propriedades diferentes com diferentes composições de parede celular, mesmo dentro da mesma espécie o que justifica as diferentes percentagens de redução encontradas pelos mesmos gêneros ou mesmo espécies (AHLBERT et al.,2015).

O maior nível de redução de AFB₁ disponível para absorção foi obtido no ensaio 6 (6,5 µg.L⁻¹, 6 h, *L. acidophilus*, inulina, β-glucana e polidextrose), com 71,36% de redução na bioacessibilidade da AFB₁ quando comparada com o Controle positivo. Estes resultados demonstram a capacidade de redução de AFB₁ pelo *L.acidophilus* isolado ou combinado com os prebióticos, evidenciando desta forma o poder de ligação do probiótico com a toxina e também a capacidade de retenção da AFB₁ pelos prebióticos, conseqüentemente, a diminuição do risco de absorção. De alguma forma os prebióticos podem ter potencializado o efeito do probiótico e criado uma barreira contra a absorção da AFB₁, uma vez que a redução de bioacessibilidade do micro-organismo isolado foi menor do que em conjunto com as fibras solúveis estudadas.

Analisando-se os resultados da Tabela 10 foi possível calcular os efeitos das seis variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 11 para o percentual de bioacessibilidade de AFB₁.

Tabela 11 - Efeito dos fatores estudados no planejamento *Plackett-Burman* sobre a porcentagem de bioacessibilidade de AFB₁ numa matriz láctea.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p* - valor
Média	39,05	1,88	20,76	>10 ⁻⁵
Concentração AFB ₁ (µg.L ⁻¹)	-19,44	4,20	-4,62	0,00*
Tempo (h)	-14,40	4,20	-3,42	0,01*
Inulina (m.v ⁻¹)	-7,88	4,20	-1,87	0,09**
Oligofrutose (m.v ⁻¹)	-2,30	4,20	-0,54	0,59
β-glucana (m.v ⁻¹)	-0,33	4,20	-0,079	0,93
Polidextrose (m.v ⁻¹)	-3,85	4,20	-0,91	0,38

* p≤0,05 e **p≤0,10.

Levando em consideração o nível de significância de 5%, os fatores concentração de micotoxinas e tempo de incubação foram significativos nesse estudo. Porém, seus efeitos foram negativos, o que significa que quanto maior a concentração de AFB₁ e o tempo de incubação, dentro da faixa estudada, menor foi a bioacessibilidade, ou seja, maior a redução de toxina disponível para absorção no intestino. De acordo com Kabak et al. (2009), a redução da bioacessibilidade é dependente do nível de contaminação, enfatizando o encontrado neste trabalho, maior percentual de redução nas maiores concentrações de AFB₁.

A adição dos prebióticos não apresentou efeito significativo (p> 0,10); com exceção da adição de inulina, a qual apresentou efeito negativo, ou seja, o acréscimo na concentração da mesma, dentro da faixa estudada, diminuiu a bioacessibilidade. Embora não tenham sido significativos dentro da faixa estudada, os demais prebióticos também apresentaram um efeito negativo sobre a bioacessibilidade. Este resultado é similar ao encontrado por Mallebrera et al. (2013), que relatam a diminuição da bioacessibilidade de beauvericina (BEA) em sistema modelo quando se utilizou uma concentração maior de compostos prebióticos. Acredita-se que o mecanismo relacionado com a redução da BEA pelos prebióticos seja um mecanismo de adsorção/retenção, semelhante ao fenômeno já evidenciado para os polifenóis, proteínas e minerais, através de ligações não covalentes.

Quando comparado com Meca et al (2012), a redução de bioacessibilidade evidenciada por eles com a adição de compostos prebióticos (β-glucana, quitosana,

frutooligossacarídeo (FOS), inulina, pectina e galactomanana) foi maior, variando de 96 a 99%, enquanto a encontrada neste trabalho foi de 35,11 à 75,08%; porém, o sistema alimentar utilizado por eles foi pão crocante de trigo contaminado com 5 e 25 mg.L⁻¹ da micotoxina BEA. Mallebrera et al. (2013) também relataram percentuais maiores de redução de BEA com o uso de prebióticos (galactomanana, glucomanano, fibra cítrica, fibra de bambu, fibra de cenoura, fibra de torta, β -glucana, celulose), entre 60 à 80%, mas neste caso foi usado um sistema modelo e não uma matriz alimentar.

Mallebrera et al (2013) reportaram uma bioacessibilidade para a BEA de 25,8 e 33,2% com a adição de 1 e 5%, respectivamente de β -glucana. Dados estes semelhantes aos encontrados neste estudo para os ensaios contendo a β -glucana, no qual a bioacessibilidade de AFB₁ variou de 24,26 a 35,53%.

Para a bioacessibilidade da AFM₁ em amostra de leite fortificada, somente com a toxina (1,5 μ g.L⁻¹), sem adição de probiótico e prebióticos, observou-se 91,90% do composto sendo liberado para matriz alimentícia. Kabak e Ozbey (2012b) já relataram valores semelhantes de bioacessibilidade para AFM₁ em amostras de leite artificialmente e naturalmente contaminadas, com uma variação de 80,5 a 83,8% e de 81,7 a 86,3%, respectivamente, dependendo do nível de contaminação. Enquanto que Serrano-Niño (2013) obtiveram uma bioacessibilidade de 100% para AFM₁, uma vez que não detectaram diminuição da concentração inicial desta aflatoxina no Controle Positivo.

Em comparação com estudos que relatam a capacidade que as bactérias probióticas têm de se ligar as aflatoxinas em solução, são escassos os que relatam a capacidade destas bactérias em reduzir a bioacessibilidade de AFM₁ num modelo digestivo *in vitro*. Neste estudo, para todos os ensaios a bioacessibilidade da AFM₁ foi reduzida 100% em relação a contaminação inicial. Valor este superior a outros encontrados por estudos que já comprovaram a habilidade das BAL em reduzir os níveis de bioacessibilidade de AFM₁ em leites contaminados. Becker-Algeri (2016) utilizando a mesma espécie de BAL (*L.acidophilus*) alcançaram uma redução de 58,8%, já Kabak e Ozbey (2012b) relataram reduções menores, variando de 15,5 a 31,6% na bioacessibilidade de AFM₁ com o uso de bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Das bactérias testadas, o *L.acidophilus* NCFM 150B demonstrou maior eficiência como ligante de AFM₁. Já Serrano-Niño et al (2013) observaram reduções na bioacessibilidade de 22,7 a 45,2% dependendo do tipo de

probiótico. O *L.acidophilus* NRRL B-4495 foi a cepa que apresentou a menor capacidade de redução na bioacessibilidade da AFM₁.

Pelo fato de todos os ensaios terem reduzido completamente a AFM₁ não havendo diferença significativa entre eles, não foi possível realizar a análise dos efeitos estudados.

São necessárias mais investigações a respeito da capacidade de alimentos simbióticos reduzirem a bioacessibilidade das aflatoxinas AFB₁ e AFM₁ em leite.

5.3.3 Análise do ensaio com maior potencial de descontaminação

Para a escolha do ensaio com maior potencial de descontaminação das aflatoxinas AFM₁ e AFB₁ em leite, é preciso analisar como um todo os efeitos estudados que foram significativos tanto para redução como para a bioacessibilidade destas aflatoxinas.

De uma forma geral, para redução das aflatoxinas, nenhum fator foi significativo dentro da faixa estudada para AFB₁; porém, para AFM₁ tem-se como significativo a concentração de toxina (efeito positivo), o tempo de incubação e os prebióticos β -glucana e polidextrose (efeitos negativos). Já para a bioacessibilidade da AFB₁, foram significativos a concentração da toxina, o tempo de incubação e o prebiótico inulina (efeitos negativos).

Logo, conclui-se que em relação a concentração de toxina, quando em concentrações significativas, tende a aumentar o percentual de redução para AFM₁ e diminuir o percentual de bioacessibilidade para AFB₁.

Quando analisamos o fator tempo de incubação, temos que para redução de AFM₁ quanto maior o período de incubação dentro da faixa estudada (0 – 6 h) menor será a remoção da aflatoxina. Em contradição, para a bioacessibilidade de AFB₁, os melhores resultados são obtidos num maior tempo de incubação. Porém, quando analisamos a Tabela 7, podemos observar que alguns ensaios com tempo de incubação zero, não diferiram estatisticamente do ensaio 6 (6 h) o qual teve o menor percentual de bioacessibilidade.

Os prebióticos β -glucana e polidextrose apresentaram efeitos negativos na remoção de AFM₁, logo, ao aumentar a concentração de de 0 a 0,75%, obtêm-se uma menor porcentagem de redução da aflatoxina. Portanto, o uso dos prebióticos neste caso não é vantajoso, em adição, o probiótico utilizado de forma isolada e não em conjunto, é mais promissor na redução de AFM₁. Porém, quando se trata de bioacessibilidade da AFB₁, com o acréscimo do prebiótico inulina verificou-se a tendência de diminuição da bioacessibilidade da mesma.

Portanto o ensaio mais eficiente com base nas informações descritas acima, foi o realizado com maior concentração de AFM₁ (2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e AFB₁ (6,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), tempo de incubação 0 h, por ser economicamente mais viável e não alterar as características do produto, e adição do prebiótico inulina (0,75%), embora o mesmo não tenha sido significativo para redução de AFM₁ e AFB₁, o mesmo potencializa a ação do *L. acidophilus* na bioacessibilidade. Este parâmetro, do ponto de vista de riscos à saúde, é mais importante, pois nem sempre toda aflatoxina presente está disponível para absorção. O ensaio que mais se adequa a esses critérios é o ensaio 01.

Estudos suplementares são necessários para contribuição de cada variável sobre a capacidade de ligação do probiótico e dos prebióticos, utilizando níveis de contaminação, tempo de incubação, temperatura e tipo de aflatoxinas.

A bioacessibilidade está fortemente relacionada com a composição alimentar, pois as micotoxinas tendem a formar complexos com a matriz alimentar e a formação deste complexo depende da quantidade de micro e macronutrientes contidos nos alimentos, tais como fibras, açúcares, proteínas, minerais, etc, e essa diferença de composição pode afetar a solubilidade do composto, ou a sua liberação da matriz alimentar (KABAK et al., 2009).

A estabilidade do complexo micro-organismo-micotoxina no trato digestório é essencial para a aplicação prática desta tecnologia, a qual é fortemente dependente da concentração do micro-organismo. Por conseguinte, o complexo formado tem de resistir ao stress ambiental causado pelo trato digestório, tais como um pH baixo e a presença de bile (AHLBERG et al., 2015). Com a adição dos prebióticos essa ligação aflu-micro-organismo provavelmente tenha sido favorecida e tido sua estabilidade aumentada, além do mais, autores atribuem aos prebióticos propriedades adsorventes (MECA et al., 2012) capazes assim de capturar toxinas e de reduzir a presença desses compostos tóxicos no trato gastrointestinal, o que

justificaria os níveis menores de bioacessibilidade encontrados nos ensaios contendo os prebióticos em conjunto com o probiótico, quando comparados ao ensaio que teve somente adição do *L.acidophilus*. Na literatura científica não há dados sobre a redução da bioacessibilidade da AFB₁ e AFM₁ em alimentos empregando prebióticos como materiais adsorventes.

5.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a análise de FTIR dos ensaios contaminadas com AFM₁ e AFB₁ foram obtidos espectros normalizados na região 4000-500cm¹ com resolução de 4 pontos por cm⁻¹, utilizando o modo de refletância total atenuada (UATR) com diamante negro. A análise foi realizada com o intuito de verificar a interação probiótico-prebiótico-aflatoxina e se o probiótico e os prebióticos interferem na interação entre aflatoxina e proteína do leite.

Apenas alguns estudos investigaram os mecanismos relacionados com formação *in vitro* de complexos químicos entre toxinas e agentes descontaminantes (materiais inorgânicos, parede celular de levedura e bactérias) (DENG E SZCZERBA, 2011; SERRANO-NIÑO et al.,2015). Sendo que nenhum estudo é encontrado na literatura científica na área de leites relacionando os possíveis mecanismos de interação entre AFM₁ e AFB₁, probiótico e prebióticos que utilizaram o FTIR.

Deng e Szczerba (2011) através de dados de modelagem computacional e espectroscopia de infravermelho, revelaram que grupamentos carbonila (C=O) desempenham um importante papel na ligação entre a AFB₁ e esmectite (mineral de argila). Já Serrano-Niño et al (2015) isolaram o ácido teicóico da parede celular de 14 estirpes de *Lactobacillus* e caracterizaram seus componentes afim de verificar o possível mecanismo de ligação envolvido com a AFB₁ em solução. Com base na análise composicional, sugeriram que o mecanismo de interação acontecesse entre a glicose e glicerol do ácido teicóico das cepas de *Lactobacillus* avaliadas com os grupos hidroxil (OH) e com o oxigênio das carbonilas (C=O) da AFB₁.

Não existem trabalhos na literatura científica que trazem os possíveis grupamentos envolvidos na ligação dos prebióticos com as aflatoxinas.

Considerando os dois grupamentos: Hidroxila (OH) que absorve em um comprimento de onda 3200-3600 cm^{-1} e Carbonila (C=O) o qual tem seu pico de absorção em 1600-1800 cm^{-1} , possivelmente relacionados com a interação aflatoxina-probiótico, foi realizado o FTIR afim de verificar alguma interação nestes comprimentos de onda.

As análises de FTIR da mesma forma que para descontaminação e bioacessibilidade foram realizadas com um controle negativo (leite puro) e um controle positivo (leite contaminado com as aflatoxinas), e com todos os ensaios do planejamento. Foram identificados os principais picos gerados e os mesmos foram comparados em relação ao comprimento de onda para verificar qualquer modificação como deslocamento de pico ou diferença na intensidade do mesmo.

Uma vez que todos os ensaios não diferiram entre si em relação a absorção dos picos, para melhor visualização dos mesmos, na Figura 10 estão representadas os espectros das análises de FTIR feitas com: Controle Negativo (leite puro), Controle Positivo (leite fortificado com AFB₁), e os ensaios 12 e 13, adicionados do probiótico isolado e em conjunto com os prebióticos, respectivamente. Os demais ensaios estão representados na Figura 11.

Jaisval et al (2016) também analisaram amostras de leite puro e contaminado com AFM₁ (0,02 - 0,1 μL^{-1}), os espectros foram gerados utilizando também a técnica FTIR-UATR, onde os mesmos revelaram diferenças significativas entre as amostras puras e contaminadas com AFM₁ nas regiões 1800-650 cm^{-1} e 3689-3499 cm^{-1} . Uma absorbância progressivamente maior foi observada com aumento da concentração de AFM₁ nas amostras de leite. O mesmo não foi observado neste estudo onde através das Figuras 10 e 11 pode-se observar que os ensaios contendo somente o leite ou o leite fortificado com AFB₁ não diferiram entre si e nem dos ensaios que tiveram a adição dos prebióticos e do probiótico considerando o comprimento de absorção do pico e sua intensidade.

Em relação às análises de FTIR realizadas com os ensaios da AFM₁, da mesma forma que para AFB₁, não foi encontrada diferença de absorção e intensidade dos principais picos gerados entre o Controle Negativo (leite puro) e o Controle Positivo (leite fortificado com AFM₁) (Figura 12).

Além disso, tem-se que os picos em destaque e seus devidos comprimentos de onda foram os mesmos encontrados para os ensaios com AFB₁ (Figura 14). Com exceção aos ensaios 1,2,3 (Figura 13), os quais tiveram um efeito batocrômico (deslocamento das bandas de absorção para um comprimento de onda maior) nos picos 1550cm⁻¹ e 1037cm⁻¹, e um efeito hipsocrômico (deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda menor) na região do grupamento hidroxila (OH) (3265 cm⁻¹). Além dos deslocamentos de pico relatados, é observado um efeito hiper-crômico (aumento da intensidade da banda de absorção) na região do grupamento carbonila (C=O) (1700-1600cm⁻¹).

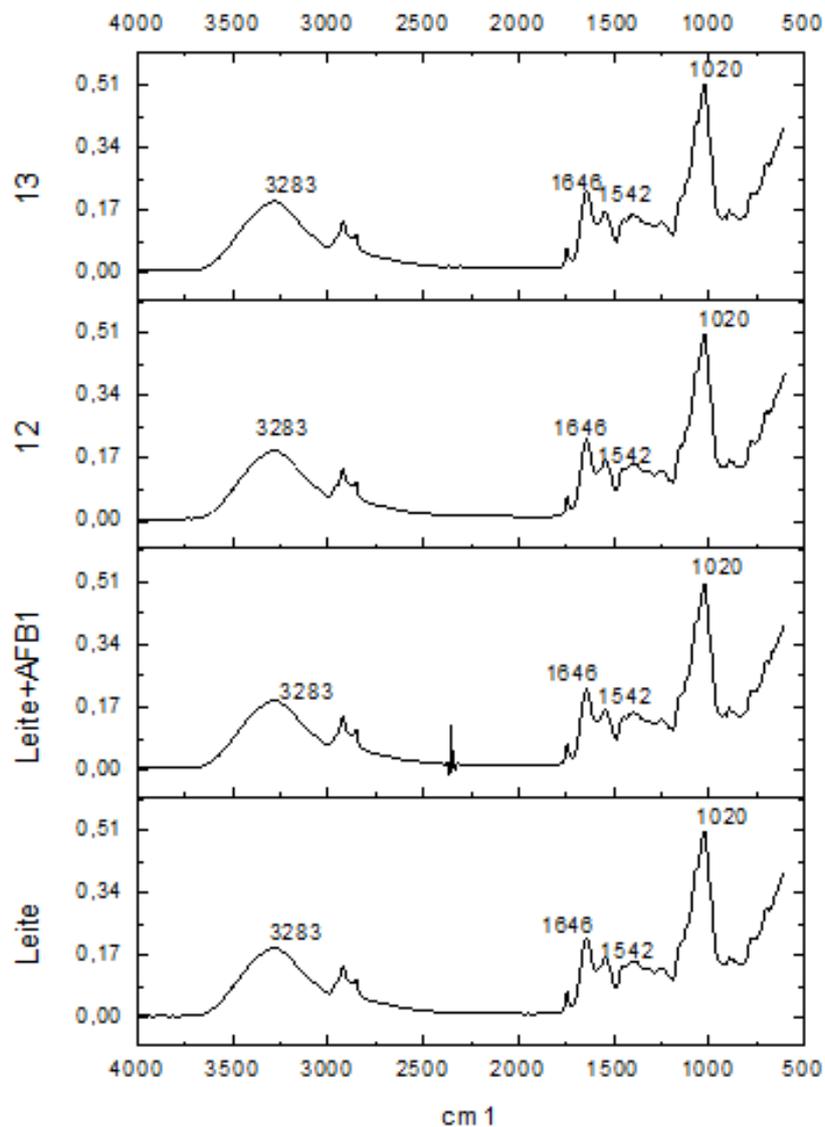


Figura 10- Análise de FTIR do Leite puro, Leite fortificado com AFB₁ (4,9 µL⁻¹) e os ensaios 12 (contendo probiótico) e 13 (contendo probiótico e prebióticos).

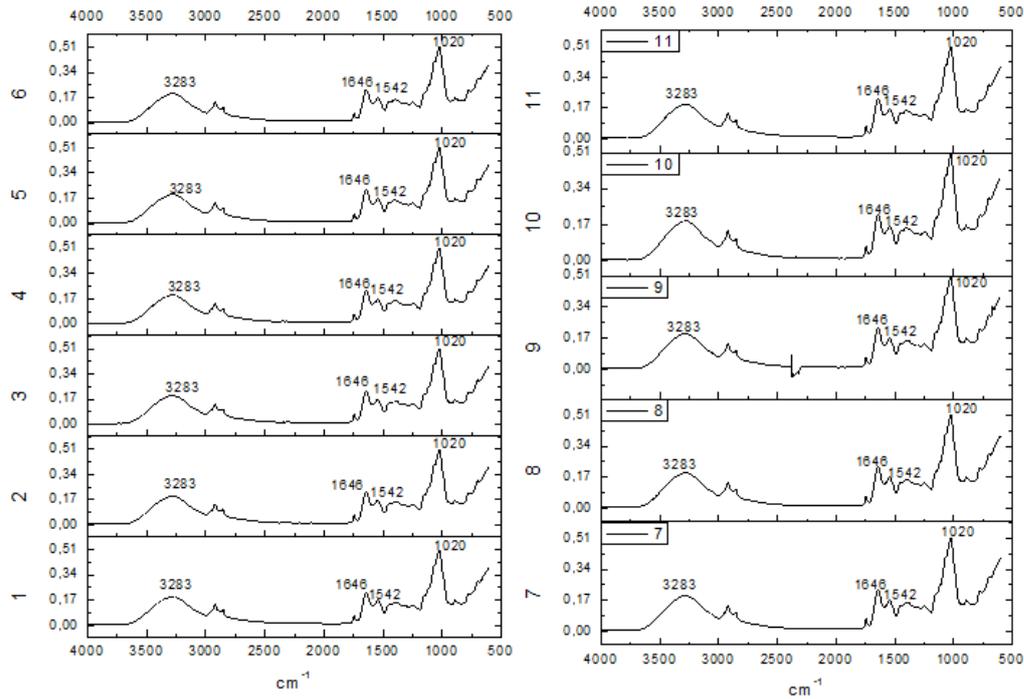


Figura 11 - Análise de FTIR dos ensaios fortificados com AFB₁ e adição do probiótico e prebióticos em conjunto.

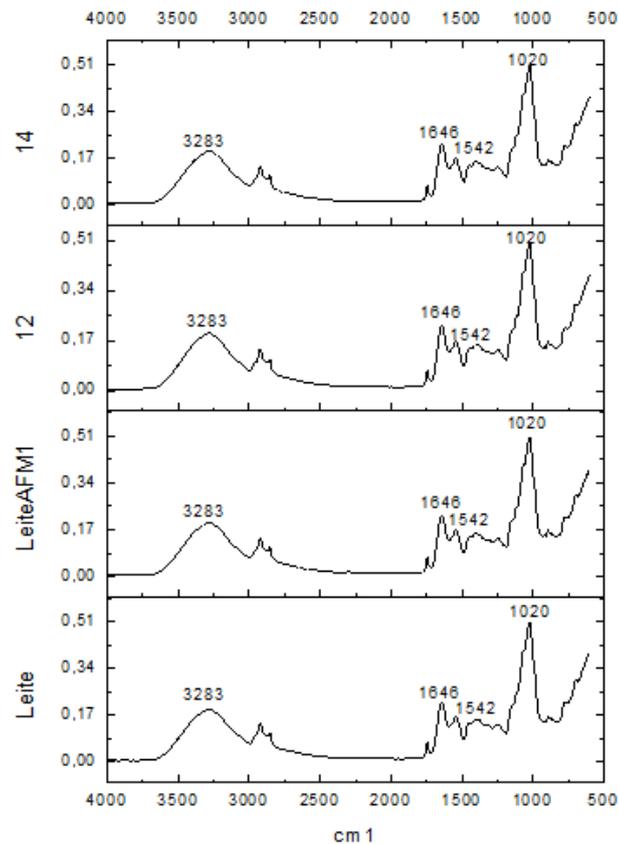


Figura 12 - Análise de FTIR do Leite puro, Leite fortificado com AFM₁ (1,5. μL^{-1}) e os ensaios 12 (contendo probiótico) e 14 (contendo probiótico e prebióticos).

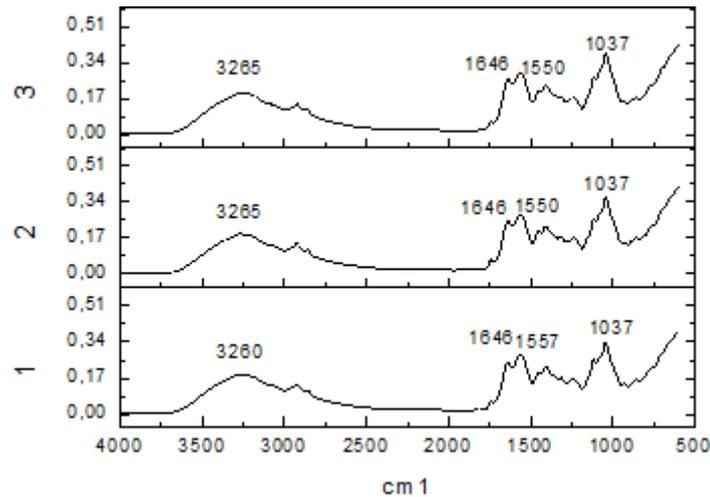


Figura 13 - Análise de FTIR dos ensaios 1,2,3 fortificados com AFM₁.

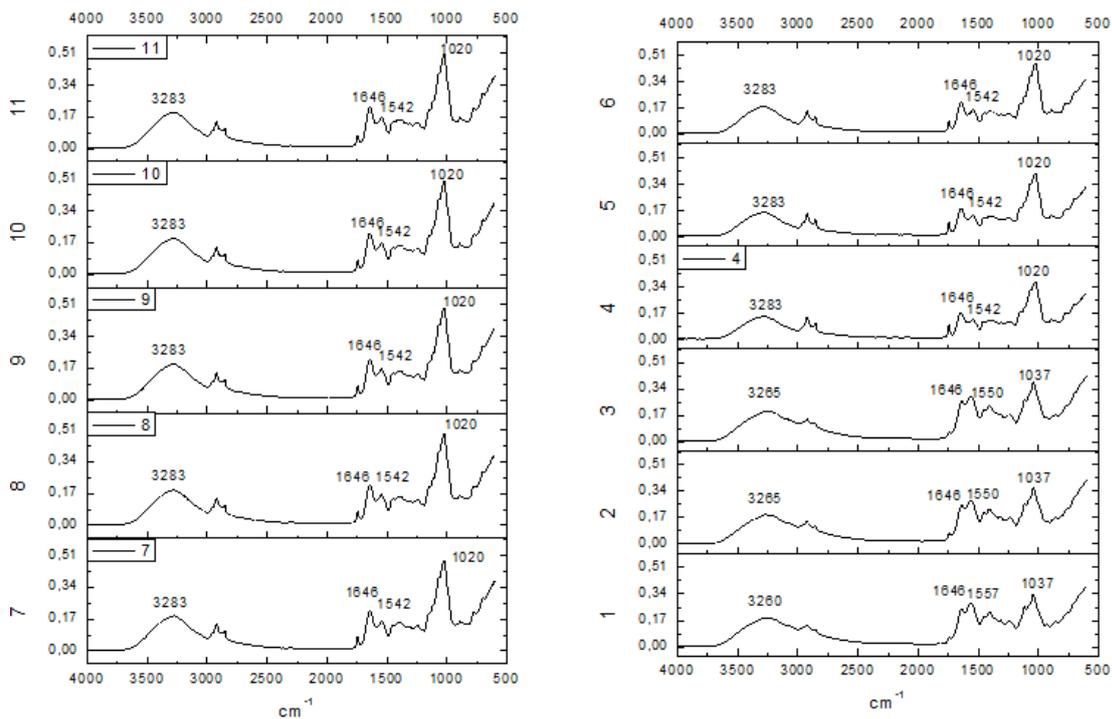


Figura 14 - Análise de FTIR dos ensaios contaminados com AFM₁ e probiótico e prebióticos em conjunto.

Como não foi possível verificar diferenças nos picos característicos das ligações envolvidas na interação aflatoxina-probiótico-prebiótico, utilizou-se a análise da estrutura secundária das proteínas do leite, para verificar se o probiótico e os prebióticos interferem na interação entre aflatoxina e proteína do leite.

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é uma das técnicas mais antigas e bem estabelecidas no estudo de proteínas, fornecendo dados principalmente referentes às estruturas secundárias (α -hélice, β -folha, β -volta e randômicas) dessas moléculas (Li et al., 2013). Na região do infravermelho, as frequências de bandas devido às vibrações amida I, II e III são sensíveis à estrutura secundária das proteínas e a banda da amida I é a mais sensível às alterações na estrutura secundária proteica (Liu et al., 2008). A posição da banda da amida I ocorre na região entre 1600-1700 cm^{-1} , atribuída principalmente ao estiramento C=O.

Os espectros FTIR de banda amida I (1600-1700 cm^{-1}) foram investigados para verificar possíveis alterações de estrutura secundária das proteínas do leite quando fortificadas com AFB₁ e AFM₁ juntamente com adição do probiótico e prebióticos, o que poderia ser um indicativo de interação ou modificação dá mesma.

Sendo assim, os resultados da análise da estrutura secundária amida I estão listados nas Tabela 12 e 13. O cálculo da porcentagem de cada componente da amida I corresponde as áreas relativas dos picos formados na banda em análise, que servem para estimar a fracção dos elementos secundários estruturais da molécula proteína.

Tabela 12 - Análise das estruturas secundárias do leite, leite contaminado com AFB₁ e dos ensaios com associação do probiótico e prebióticos (1-13).

Componentes amida I (cm^{-1})	β -folha (1638–1612) %	Randômicas (1648–1641) %	α -hélice (1658–1653) %	β -volta (1678–1662) %	β -anti (1691–1682) %
Leite puro	37,21	14,58	18,87	18,07	11,25
Leite + AFB ₁	41,98	20,20	9,94	16,97	10,89
Ensaio 1	32,21	29,57	14,61	3,0	15,04
Ensaio 2	30,86	21,33	19,00	21,73	7,06
Ensaio 3	32,42	20,79	17,70	20,00	9,06
Ensaio 4	32,83	19,49	18,82	17,21	11,72
Ensaio 5	33,60	19,11	18,34	19,53	9,39
Ensaio 6	34,18	18,97	17,65	20,29	8,90
Ensaio 7	33,77	18,23	19,16	21,79	7,02
Ensaio 8	33,01	19,03	14,92	26,82	6,19
Ensaio 9	33,19	19,03	18,95	16,65	12,16
Ensaio 10	31,21	20,72	18,85	18,21	10,98
Ensaio 11	31,28	20,61	19,40	16,80	11,80
Ensaio 12	31,59	21,43	18,14	22,43	6,40
Ensaio 13	28,27	16,69	20,35	26,55	9,12

Tabela 13 - Análise das estruturas secundárias do leite, leite contaminado com AFM₁ e dos ensaios com associação do probiótico e prebióticos (1-13).

Componentes amida I (cm⁻¹)	β-folha (1638–1612) %	Randômicas (1648–1641) %	α-hélice (1658–1653) %	β-volta (1678–1662) %	β-anti (1691–1682) %
Leite puro	37,74	17,76	15,68	18,63	10,08
Leite + AFM ₁	40,81	22,02	8,34	16,87	11,92
Ensaio 1	30,64	31,16	17,83	16,65	3,69
Ensaio 2	29,91	33,42	17,41	10,20	9,03
Ensaio 3	29,28	33,99	18,71	10,56	7,43
Ensaio 4	32,92	19,14	17,90	20,08	9,93
Ensaio 5	31,60	25,07	17,76	17,55	8,00
Ensaio 6	37,57	20,08	23,24	17,58	1,50
Ensaio 7	33,11	18,33	19,20	22,00	7,34
Ensaio 8	33,16	18,98	17,86	14,87	15,12
Ensaio 9	37,93	13,57	18,38	14,13	15,77
Ensaio 10	35,05	16,29	15,54	21,96	11,14
Ensaio 11	35,52	15,10	25,60	19,04	4,72
Ensaio 12	37,00	15,33	17,22	21,44	8,99
Ensaio 13	31,97	19,59	19,53	16,72	12,16

De uma forma geral, tanto para AFB₁ quanto para AFM₁ a principal mudança na estrutura da amida I foi observada na estrutura β-folha. Ao comparar o ensaio de leite fortificado com a aflatoxina em relação aos demais ensaios do delineamento que foram realizados com adição do probiótico *L.acidophilus* e dos prebióticos, observou-se uma diminuição no percentual da estrutura β-folha em todos os ensaios. Essemine et al. (2011), ao avaliarem a ligação entre a proteína do leite β-lactoglobulina com poliaminas também observaram a redução da β-folha de 57 para 51-55% após a interação do complexo formado, indicando um possível desdobramento parcial da proteína. Da mesma forma, Hu et al. (2016) ao investigar e comparar a morfologia e estrutura da α-caseína, aplicando pressão hidrostática elevada, ultra violeta e infra vermelho, também perceberam mudanças ocorridas na estrutura β perante tratamento empregado. Possivelmente, esta estrutura seja mais sensível e proeminente do que as demais, portanto susceptível a interação com as aflatoxinas e passível de sofrer modificações com a adição do probiótico e prebióticos.

Portanto, essa diminuição na percentagem da estrutura proteica secundária β-folha nos tratamentos adicionados do probiótico em relação ao tratamento contendo somente a aflatoxina e leite, sugere a ocorrência de um deslocamento da aflatoxina que está ligada a fração proteica do leite para a parede do probiótico. Em adição,

Chavarría et al (2017) trazem que a caseína, umas das proteínas do leite que possuem elevada afinidade para se ligarem com AFM₁ e AFB₁, sofrem alterações estruturais com a adição de bactérias lácticas, o que diminui a sua capacidade de se ligar a essas aflatoxinas.

E ainda ao analisar os ensaios 1,2,3 (Figura 13) realizados com AFM₁ observa-se que os mesmos tiveram um aumento notável da porcentagem das estruturas randômicas quando comparados com os demais ensaios. Tal explicação provavelmente seja porque estes ensaios foram os que tiveram um aumento de intensidade de absorção do pico que abrange esta estrutura (1641-1648 cm⁻¹), sugerindo assim modificações na estrutura da mesma, possivelmente pelo desligamento em parte da aflatoxina da proteína.

7 CONCLUSÕES

Está é a primeira vez em que a redução e bioacessibilidade da AFB₁ e AFM₁ na presença do probiótico *L.acidophilus* e de prebióticos foi investigada usando uma matriz alimentar láctea.

O uso de *L.acidophilus* isolado e em conjunto com os prebióticos inulina, oligofrutose, β-glucana e polidextrose nas amostras de leite contaminadas com AFB₁ e AFM₁ promoveu a redução dos teores destas aflatoxinas em todos os ensaios. Os níveis de redução variaram de 13,53 e 35,53% para AFB₁ e para AFM₁ a variação foi entre 17,61 e 71,52%, quando comparados com o controle.

O percentual de redução para o ensaio contendo somente o *L. acidophilus* (Ensaio 12) foi visivelmente maior para AFM₁ (71,52%) quando comparado com AFB₁ (34,96%). Neste estudo a adição dos prebióticos não potencializou o efeito do probiótico, uma vez que o micro-organismo mostrou ser mais eficaz e promissor agindo individualmente do que a maioria dos tratamentos adicionados de um ou mais prebióticos.

O uso do probiótico e dos prebióticos também promoveu a redução do percentual de bioacessibilidade da AFB₁ e AFM₁ em todos os ensaios. Os níveis de bioacessibilidade variaram de 26,08 a 72,67% para AFB₁ e 0% para AFM₁ quando comparados com o controle. Por sua vez, para AFB₁, o *L.acidophilus* adicionado isoladamente demonstrou um pior desempenho na redução da bioacessibilidade quando comparado com os ensaios onde se teve adição conjunta dos prebióticos.

Com base na avaliação conjunta de todos os efeitos estudados na redução da contaminação e bioacessibilidade da AFB₁ e AFM₁ em leite, o melhor ensaio deste estudo é o 1, com maior concentração de AFM₁ (2,0 µg.L⁻¹) e AFB₁ (6,5 µg.L⁻¹), tempo de incubação 0 h e adição do probiótico e prebiótico Inulina (0,75%).

A análise de FTIR detectou uma diminuição na percentagem (7 - 33%) da estrutura proteica secundária β-folha nos tratamentos adicionados do probiótico e prebióticos em relação ao tratamento contendo somente a aflatoxina e leite, o que sugere a ocorrência de um deslocamento da aflatoxina que está ligada a fração proteica do leite para a parede do probiótico.

Logo a exploração do potencial descontaminante dos micro-organismos probióticos isolados ou em conjunto dos prebióticos frente aos contaminantes

químicos abrirá uma nova abordagem biotecnológica, alavancando ainda mais a sua aplicação na indústria alimentícia. Entretanto, mais estudos adicionais são necessários para investigar os mecanismos envolvidos na remoção destas aflatoxinas.

8 REFERÊNCIAS

- ABOULFAZLI, F.; SHORI, A.B.; BABA, A.S. Effects of the replacement of cow milk with vegetable milk on probiotics and nutritional profile of fermented ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, v.70,p.261–270, 2016.
- ABRAR, M.; ANJUM, F.M.; BUTT, M.S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M.A.; SAEED, F.; WAGAS, K. Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, toxicity and remedies. **Critical Reviews in Food Science**, v. 53,p. 862–874, 2013.
- AHLBERG, S.H.; JOUTSJOKI, V.; KORHONEN, H.J. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. **International Journal Food Microbiology**, v.207, p.87-102, 2015.
- ALBERTS, J.F.; GELDERBLOMB, W.C.A.; BOTHA, A.; VAN ZYL W.H. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. **International Journal Food Microbiology**, v.135, p.47-52, 2009.
- AL-SHERAJI, S.H.; ISMAIL, A.; MANAP, M.Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R.M.; HASSAN, F.A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v.5, p.1542-1553, 2013.
- APOLINARIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.L.; BELTRAO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v.101,p. 368–378,2014.
- ARENA, M.P.; RUSSO, P.; CAPOZZI, V.; RASCÓN, A.; FELIS, G.E.; SPANO, G.; FIOCCO, D. Combinations of cereal β -glucans and probiotics can enhance the anti-inflammatory activity on host cells by a synergistic effect. **Journal of Functional Foods**, v.23, p.12-23, 2016.
- BAHRAMI, R.; SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z. Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. **Food Control**, v.62, p.250-256, 2016.
- BARANYI, N.; KOCSUBÉ, S.; VARGA, J. Aflatoxins: Climate change and biodegradation. **Current Opinion in Food Science**, v.5, p.60-66, 2015.
- BARŁOWSKA, J.; SZWAJKOWSKA, M.;LITWINCZUK, Z.; KROL, J. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.291-302, 2011.
- BECKER-ALGERI, T.A. **Ação de micro-organismos prebióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite**. 2016. 197 p. Tese (Doutorado

em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS.

BECKER-ALGERI, T.A.; CASTAGNARO, D.; BORTOLI, K.; SOUZA, C.; DRUNKLER, D.A.; FURLONG, E.B. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: a review. **Journal of food Science**, v.81, 544-552, 2016.

BHAKTA, J.N.; OHNISHI, K.; MUNEKAGE, Y.; IWASAKI, K.; WEI, M.Q. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, p.1193–1206, 2012.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p. 170–175, 2004.

BILANDŽIĆ, N.; ĐOKIĆ, M.; SEDAK, M.; SOLOMUN, B.; VARENINA, I.; KNEŽEVIĆ, Z.; BENIĆ, M. Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia. **Food Chemistry**, v.127, p.63–66, 2011.

BILANDŽIĆ N, VARENINA I, KOLANOVIĆ BS, BOŽIĆ D, ĐOKIĆ M, SEDAK M, TANKOVIĆ S, POTOČNJAK D, CVETNIĆ Z. Monitoring of aflatoxin M₁ in raw milk during four seasons in Croatia. **Food Control**, v.54, p.331-337, 2015.

BOVO, F. **Avaliação da eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M1**. 2011. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2230-2234, 2013.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. **Food Bioprocess Technology**, v.6, p.2230–2234, 2013.

BOVO, F.; CORASSIN C.H.; OLIVEIRA C.A.F. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. UNOPAR Científica. **Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 2, p. 15-21,2010.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada nº.7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.

BRITZI, M. FRIEDMAN, S. MIRON, J. SOLOMON, R. CUNEAH, O. SHIMSHONI, J. A. SOBACK, S. ASHKENAZI, R. ARMER, S. SHLOSBERG, A. Article Carry-Over of Aflatoxin B1 to Aflatoxin M1 in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late- Lactation. **Revista Toxins**, v.5, p.173-183, 2013.

CAMPAGNOLLO B.F.; GANEV, K.C.; KHANEGHAN, A.M.; PORTELA, J.B.; CRUZ, A.G.; GRANATO, D.; CORASSIN, C.H.; OLIVEIRA, C.A.F.; SANT'ANA, A.S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. **Food Control**, v. 68, p. 310-329, 2016.

CARVAJAL M, ROJO F, MÉNDEZ I.; BOLAÑOS A. Aflatoxin B1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives & Contaminants**, v.20, p.1077-1086, 2003.

CAVALLARIN, L.; ANTONIAZZI, S.; GIACCONE, D.; TABACCO, E.; BORREANI, G. Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. **Food Control**, v.38, p. 174–177, 2014.

CHAVARRÍA, G.; MOLINA, A.; LEIVA, A.; MÉNDEZ, G.; WONG-GONZÁLEZ, E.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; GRANADOS-CHINCHILLA, F. Distribution, stability, and protein interactions of Aflatoxin M1 in fresh cheese. **Food Control**, v.73, p.581-586, 2017.

CHAVES, K.S.; GIGANTE, M.L.. Prato cheese as suitable carrier for *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium* Bb12. **International Dairy Journal**, v. 52, p.10-18, 2016.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. **Codex committee on food additives and contaminants 33rd session**, Hague, The Netherlands, 2001.

CORASSIN, C.H.; BOVO, F.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.A.F. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. **Food Control**, v.31, n.1, 2013

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol Letters**, v.27, p.19-28, 2002.

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v.21, n.4, 2010.

DENG, Y. SZCZERBA, M. Computational evaluation of bonding between aflatoxin B1 and smectite. **Applied Clay Science**, v.54, p.26-33, 2011.

DUARTE, S.C.; ALMEIDA, A.M., TEIXEIRA, A.S., PEREIRA, A.L., FALCÃO, A.C., PENA, A. LINO. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal Exposure. **Food Control**, v. 30, n.2, p.411-417, 2013.

EL-KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, v.22, n.10, p.1695-1699, 2011.

EL-NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 321-326, 1998.

ELSANHOTY, R.M.; SALAM, S;A.; RAMADAN, M.F.; BADR, F.H. Detoxification of aflatoxin M1 in yogurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, v.43, p. 129–134, 2014.

ESSEMINE, J.; HASNI, I.; CARPENTIER, R.; THOMAS, T. J.; TAJMIR-RIahi, H.A. Binding of biogenic and synthetic polyamines to β -lactoglobulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.201–209, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. European commission, regulation (EC) no. 1881 (2006): 19 of December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal**, L364, 5–24, 2006.

FALLAH, A.A; RAHNAMA, M; JAFARI, T; SAEI-DEHKORDI, S. S. Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. **Food Control**, v.22, p.1653-1656.

FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria–Joint**. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina, 2001.

FERNANDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LERIDA, I.; PEREZ-GALVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v.29, p.751–760, 2009.

FIRMIN, S.; GANDIA, P.; MORGAVI, D.; HOUIN, G.; JOUANY, J.; BERTIN, G.; BOUDRA, H. Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. **Food Additives and Contaminants**, v.27, p.1153–1160, 2010.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; CERAIN, A. L.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of mycotoxins in animal milk: a review. **Food Control**, v.53, p.163–176, 2015.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.; PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; BOUCOURT, R.; BALCÁZAR,

J.L.; NICOLI, J. R.; MOREIRA-SILVA, J.; RODRIGUEZ, Z.; FUERTES, H.; NUÑEZ, O.; ALBELO, N.; HALAIHEL, N. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. **Research in Veterinary Science**, v.108, p.125–132, 2016.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research**, v.17, p.259–275, 2004.

GIBSON, G.R.; SCOTT, K.P.; RASTALL, R.A.; TUOHY, K.M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A. ET AL. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science Technology**, v.7, p. 1–19, 2010.

GUO, L.Y.; ZHENG, N.; ZHANG, Y.D.; DU, R.H.; ZHRNG, B.Q.; WANG, J.Q.A. Survey of seasonal variations of aflatoxin M1 in raw milk in Tangshan region of China during 2012–2014. **Food Control**, v.69, p.30-35, 2016.

GURBAY, A.; SABUNCUOGLU, A.; GIRGIN, G.; SAHIN, G.; YIGIT, S.; YURDAKOK, M.; TEKINALP, G. Exposure of newborns to AFLAM1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.314-319, 2010.

HASKARD, C. A.; EL-NEZAMI, H. S.; KANKAANPAA, P. E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. T. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3086-3091, 2001.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, L. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, 3:421, 2012.

HU, G.; ZHENG, Z.; LIUB, Z.; DENG, Y.; ZHAO, Y.; Structure and IgE-binding properties of α -casein treated by high hydrostatic pressure, UV-C, and far-IR radiations. **Food Chemistry**, v. 204, p. 46–55, 2016.

IHA, M.H.; BARBOSA, C.B.; OKADA, I.A.; TRUKSESS, M.W. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p.1971–1974, 2011.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2013.

International Agency of Research on Cancer- IARC, **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, WHO, Lyon, 2002 v. 82.

IQBAL, S.Z.; JINAP, S.; PIROUZ, A.A.; FAIZAL, A.A.R.; Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.46, n.1, p.110-119, 2015.

ISMAIL, A.; RIAZ, M.; LEVIN, R.E.; AKHTAR, S. GONG, Y.Y.; HAMEED, A. Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan. **Food Control**, v.60, p.461-465, 2016.

JAISVAL, P.; JHA, S.N.; KAUR, J.; BORAH, A.; RAMYA, H.G. Detection of aflatoxin M1 in milk using spectroscopy and multivariate analyses. **Food Chemistry**, Available online 29 July 2016: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.150>

KABAK, B.; OZBEY, F. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 21-31, 2012a.

KABAK, B., OZBEY, F. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. **Food Control**, v. 28, p. 338-344, 2012b.

KABAK, B.; VAR, I. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.43, p.617-624, 2008.

KABAK, B.; BRANDON, E.F.A.; VAR, I.; BLOKLAND, M.; SIPS, A.J.A.M. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin b1 and ochratoxin a using an in vitro digestion model under fed conditions. **Journal Environment. Science Health**, v.44, p.472–480, 2009.

KHANIKI, G.R.J. Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concerns: A Review. **International Journal Dairy Science**, v.2, p.104-115, 2007.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in Health and Disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

KONAR, N.; TOKER, O.M.; OBA, S.; SAGDIC, O. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v.49, p.35-44, 2016.

KOS, J.; LEVI, J.; ĐURAGI, O.; KOKI, B.; MILADINOVI, I. Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. **Food Control**, v.38, p. 41–46, 2014.

LAM, K.L.; CHEUNG, P.C.K. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber**, v.2, p.45-64, 2013.

LEE, J.; HER, J.Y.; LEE, K.G. Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. **Food Chemistry**, v.189, p.45-51, 2015.

LI, M.; MAA, Y.. NGADI, M. O. Binding of curcumin to b-lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. **Food Chemistry**, v. 141, p.1504-1511, 2013.

LIU, Y., YANG, Z., DU, J., Yao, X., Lei, R., Zheng, X. Interaction of curcumin with intravenous immunoglobulin: A fluorescence quenching and Fourier transformation infrared spectroscopy study. **Immunobiology**, v. 213, p. 651-661, 2008.

MAGNUSSON, J.; STRÖM, K.; ROOS, S.; SJÖGREN, J.; & SCHNÜRER, J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.219, p.129–135, 2003.

MALLEBRERA, B.; MECA, G. ; MANYES, L.; MAÑES, J.; FONT, G. Influence of pro- and prebiotics on gastric, duodenal and colonic bioaccessibility of the mycotoxin beauvericin. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, p. 141–149, 2013.

MERCOSUL/GMC. **Resolution 25/02**. Mercosul technical regulation about maximum tolerable limits for aflatoxin in milk, peanuts, and corn. 2002.

MECA, G.; MENEGHELLI, G.; RITIENE, A.; MAÑES, J.; FONT, G. Influence of different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1362–1368, 2012.

MICHLING, N.; SIGNORINI, M.; GAGGIOTTI, M.; CHERICATTI, C.; BASÍLICO, J.C.; REPETTI, M.R.; BELDOMENICO, H.R. Risk factors associated with the presence of aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina. **Food Control**, v.64, p.151-156, 2016.

MORRIS, C.; MORRIS, G. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v.133, p.237-248, 2012.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal Food Science**, v.71, n.5, p.51-65, 2006.

NACHTMANN, C.; GALLINA, S.; RASTELLI, M.; FERRO, G.L.; DECASTELLI, L. Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk in Italy. **Food Control**, v. 18,p. 623–629, 2007.

OATLEY, J.T.; RARICK, M.D.; JI GE.; LINZ JE. Binding of aflatoxinB1 to bifidobacteria in vitro. **Journal Food Protection**, v.63, n.8, p.1133-6, 2000.

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; JÚNIOR, J. C. B.; SILVA, W. A. Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from MinasGerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 90-92, 2013.

ORTIZ-MARTINEZ, R.; VALDIVIA-FLORES, A.; QUEZADA-TRISTAN, T.; LUNA-LÓPEZ, M.C. Contamination of white cheese with aflatoxin M1. **Toxicology letters**, v.221, p.63, 2013

PASSONE, M.A.; ROSSO, L.C.; CIANCIO, A.; ETCHEVERRY, M. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. **International Journal Food Microbiology**, v.138, p. 276–281, 2010.

PELTONEN, K.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2152-2156, 2001.

PIERIDES, M.; EL-NEZAMI, H.; PELTONEN, K.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. **Journal Food Protection**, v.63,p.645-50, 2000.

PINEIRO, M.; ASP, N.G.; REID, G.; MACFARLANE, S.; MORELLI, L.; BRUNSER, O. FAO Technical meeting on Prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.42, 156–159, 2008

PISPAN, S.; HEWITT, C.J.; STAPLEY, A.G.F. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v.91 , p.362 - 369, 2013.

REID, G. The growth potential for dairy probiotics. **International Dairy Journal**, v.49, p.16-22, 2015.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic Field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SANTOS, J.S.; OKANO, W.; ARRAIS, B. C. D.; COSTABEBER, I.H.; SANTANA, E. H. W. Aflatoxina M1 em Produtos Lácteos e Uso de Bactérias Ácido Lácticas para Biocontrole em Leite. **UNICIÊNCIAS**, v. 18, n. 1, 2014.

SARDIÑAS, N.; VÁZQUEZ, C.; GIL-SERNA, J.; GÓNZALEZ-JAÉN, M.T.; PATIÑO, B. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR Green quantitative PCR. **International Journal Food Microbiology**, v.145, p. 121–125, 2011.

SARLAK. Z.; ROUHI, M.; MOHAMMADI, R.; KHAKSAR, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; SOHRABVANDI, S.; GARAVAND, F. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). **Food Control**, v.71, p.152-159, 2017.

SARTORI, A. V.; MATOS, J. S.; MORAES, M. H. P.; N´OBREGA, A. W. Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem Mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2321–30, 2015.

SCAGLIONI, P.; BECKER-ALGERI T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in milk. **Analytica Chimica Acta**, v.829, p.68-74, 2014

SERRANO-NIÑO, J.C.; CAVAZOS-GARDUÑO, A.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; APPLGATE, B.; FERRUZZI, M.G.; MARTIN-GONZÁLEZ, M.F.S.; GARCÍA, H.S. et al. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin

M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, v.31, p. 202–207, 2013.

SERRANO-NIÑO, J. C.; CAVAZOS-GARDUÑO, A.; CANTÚ-CORNELIO, F.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; GARCÍA, H. S. *In vitro* reduced availability of aflatoxin B1 and Acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from *Lactobacillus* strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 1334-1341, 2015.

SETTACHAIMONGKON, S.; VAN VALENBERG, H.J.F.; WINATA, V.; WANG, X.; NOUT, R.M.J.; VAN HOOIJDONK, T.C.M.; ZWIETERING, M.H.; SMID, E.J. Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite formation in set-yoghurt. **Food Microbiology**, v.49, p.104-115, 2015.

SHAKER, E.M.; ELSHARKAWY, E.E. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in raw buffalo milk from agroindustrial areas in Assiut, Egypt. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.39, p.433-440, 2015.

SHARMA, A.; CATANANTE, G.; HAYAT, A.; ISTAMBOULIE, G.; REJEB, I.B.; BHAND, S.; MARTY, J.L. Development of structure switching aptamer assay for detection of aflatoxin M1 in milk sample. **Talanta**, v.158, p.35-41, 2016.

SHCHERBAKOVA, L.; STATSYUK, N.; MIKITYUK, O.; NAZAROVA, T.; DZHAVAKHIYA, V. Aflatoxin B1 degradation by metabolites of *Phoma glomerata* PG41 isolated from natural substrate colonized by aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. **Jundishapur Journal Microbiology**, v.8, p.243-224, 2015.

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

SHOAIB, M.; SHEHZAD, A.; OMAR, MUKANA.; RAKHA, A.; RAZA, H.; SHARIF, H.R.; SHAKEEL, A.; ANSARI, A.; NIAZI, S. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate polymers**, v.147, p.444-454, 2016.

SHORI, A.B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods and their viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.423–431, 2015.

SILVA, M.V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI, M, Jr. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Parana State, Brazil. **Food Control**, v. 53, p.222-225, 2015.

SKRBIC, B. ZIVANCEV, J. ANTIC, I. GODULA, M. Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. **Food Control**, v.40, p.113-119, 2014.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, p. 1417–1435, 2013.

SRISUVOR, N.; CHINPRAHAST, N.; PRAKITCHAIWATTANA, S.S. Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with probiotic-cultured banana purée. **LWT - Food Science and Technology**, v.51, p.30-36, 2013.

VERHEECKE, C.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F. Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances. International. **Journal of Food Microbiology**, v.237, p.1–9, 2016.

VERSANTVOORT, C. H. M. OOMEN, A.G., KAMP, E.V., ROMPELBERG, C.J.M. SIPS, A.J.A, "Applicability of an in Vitro Digestion Model in Assessing the Bioaccessibility of Mycotoxins from Food," **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p. 31-40, 2005.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15, p. 129-144, 2011.

ZHANG, YH.; XU, D.; LIU, Jia-Qi.; ZHAO, Xin-Huai. Enhanced degradation of five organophosphorus pesticides in skimmed milk by lactic acid bacteria and its potential relationship with phosphatase production. **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.173-178, 2014.

ZHENG, N.; SUN, P.; WANG, J.Q.; ZHEN, Y.P.; HAN, R.W.; XU, X.M. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. **Food Control**, v.29, n.1, p.198-201, 2013.

WANG, Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. **Food Research International**, v.42, p. 8–12, 2009.

WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v.41, n.1, p.1-7, 2009.