

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

TESE

**Fumonisina B₁ em alimentos para equinos: interações em sistemas
de digestão *in vitro* com *Saccharomyces cerevisiae***

Fernanda Melo Pereira Taran

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**FUMONISINA B₁ EM ALIMENTOS PARA EQUINOS: INTERAÇÕES
EM SISTEMAS DE DIGESTÃO *IN VITRO* COM *Saccharomyces cerevisiae***

FERNANDA MELO PEREIRA TARAN

Sob a orientação do Professor
Fernando Queiroz de Almeida

e Coorientação do Professor
Armando Albino Dias Venâncio e
Vinicius Pimentel Silva

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências no Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de
concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Janeiro de 2016

636.0896015

T176f

T

Taran, Fernanda Melo Pereira, 1985-

Fumonisina B₁ em alimentos para eqüinos: interações em sistemas de digestão *in vitro* com *Saccharomyces cerevisiae* / Fernanda Melo Pereira Taran - 2016.

74 f.: il.

Orientador: Fernando Queiroz de Almeida.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Inclui bibliografias.

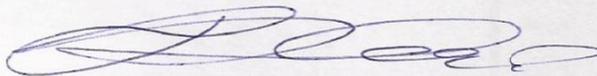
1. Micotoxinas - Teses. 2. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses. 3. Fermentação - Teses. 4. Enzimas - Teses. 5. Digestão - Teses. 6. Eqüino - Teses. I. Almeida, Fernando Queiroz de, 1959-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

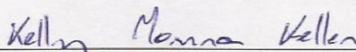
FERNANDA MELO PEREIRA TARAN

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

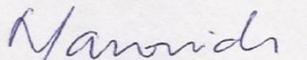
TESE APROVADA EM 06/01/2016



Fernando Queiroz de Almeida. Dr. UFRRJ
(Orientador)



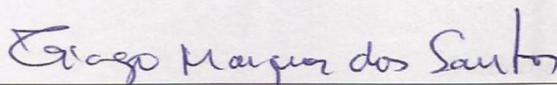
Kelly Moura Keller. Dr^a. UFMG



Marcos Aronovich. Dr. PESAGRO



Carlos Alberto da Rocha Rosa. Dr. UFRRJ



Tiago Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Leni Melo Pereira Taran e Sergio Taran,
Ao meu irmão Sergio,
E ao meu companheiro Gabriel Ito,
Pelo carinho, dedicação e confiança em meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por me guiar em luz e proteção no meu caminho.

Aos meus pais Leni e Sergio Taran pelo amor incondicional, pelas sábias orientações, o apoio e paciência nas escolhas feitas durante a minha vida.

Às minhas queridas tias Lourdes, Terezinha e Dinorá (*in memorian*) e aos meus tios Celso e Shinobu, por todo carinho e apoio recebido.

Ao meu irmão Sérgio, às minhas primas e primos, que além de parentes, são verdadeiros amigos.

Ao meu companheiro Gabriel, por todo o amor, amizade e respeito dedicado ao longo de todos esses anos.

Ao meu orientador Fernando Queiroz de Almeida, pela oportunidade do Doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela confiança depositada em meu trabalho durante esses anos, além das oportunidades e o aprendizado profissional e pessoal que me foi concedido.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo espaço destinado às aulas, estudos e laboratórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro através de bolsa de estudo.

À FCT-CAPES pela oportunidade de intercâmbio acadêmico com a Universidade do Minho (UMINHO), Portugal.

Ao professor Carlos Alberto da Rocha Rosa (Shalako) que concedeu essa associação entre as equipes da UFRRJ e UMINHO, onde fui apresentada ao mundo das micotoxinas.

Ao professor Armando Albino Dias Venâncio, que aceitou me receber como aluna de Doutorado Sanduíche na Universidade do Minho, Portugal e fazer parte de sua equipe no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar (LCTA) contribuindo com o desenvolvimento dessa tese e experiência profissional durante esse período.

Às pesquisadoras do LCTA, Thalita, Tina, Ana Sofia Pereira, Ana Sofia Carvalho e Ana Guimarães, que me ensinaram as práticas laboratoriais, além da paciência, conversas entre o trabalho.

Em especial, agradeço ao Luis Abrunhosa que foi uma das pessoas mais importantes para a realização desse trabalho na UMINHO, Portugal, através do seu conhecimento, dedicação e amizade.

À querida professora Ana Sofia Santos da Universidade de Trás-os-Montes, Portugal, que me recebeu de braços abertos e acolheu com toda sua ajuda para conseguir executar as ideias envolvidas nesse trabalho, além da maravilhosa amizade que surgiu durante esse processo.

Aos professores Luis Miguel Ferreira e Miguel Rodrigues e a equipe especial do laboratório da UTAD (Nita, Da. Carminda, Da. Inês e Ana) pela ajuda, parceria e os excelentes momentos de conversa e alegria. A participação, amizade e apoio da Maria Alejandra Pietro, com seu conhecimento e prática em microbiologia, de grande importância para esse trabalho.

À Universidade do Minho e Universidade de Trás-os-Montes, em Portugal, pela estrutura de trabalho e vínculo com a UFRRJ.

Ao professor Vinicius Pimentel Silva, que me recebeu e participou desde o início do meu doutorado em Seropédica.

Ao Dr. Otniel Freitas da Embrapa Agroindústria de Alimentos – CTAA, que concedeu as amostras de milho contaminadas, essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Às empresas que disponibilizaram as cepas de levedura utilizadas: Lallemand Animal Nutrition e Lesaffre Feed Additives.

Às amizades desenvolvidas e fortalecidas em Portugal: Josi, Karol e Tania.

À toda equipe do Equilab, dentre muitas pessoas que por aqui passaram e estão chegando, das quais tive o privilégio em trabalhar junto, trocar conhecimentos e desenvolver amizades: Fernanda Godoi, Chiara, Jean, Juliana, Bruna, Luana e todos alunos de iniciação científica. Em especial deixo minha eterna gratidão aos amigos-irmãos que aqui conheci: Marcos Barreto, Aline Tonussi e Ana Cláudia.

Aos alunos, professores e funcionários da Pós-graduação, pela ajuda, momentos de conversas entre os corredores e confraternizações.

À minha amiga-irmã externa de muitas batalhas: Iaçanã. E a todos os amigos (não menos importantes), que mesmo distante acompanham toda a minha jornada com os pensamentos positivos.

Ao meu amigo, vizinho, Henrique Trevisan, por toda parceria, ajuda e conversas nesses anos.

Por fim, agradeço a oportunidade de ter convivido e trabalhado com os cavalos: Coelha, Fiona, Palatina e Sherek, que deixaram um dos grandes ensinamentos da vida, o amor incondicional.

*“Tu escolhes, recolhes, eleges,
atras, buscas, expulsas, modificas tudo
aquilo que te rodeia a existência.
Teus pensamentos e vontades são a chave
de teus atos e atitudes.
São as fontes de atração e repulsão
na tua jornada vivência” (Chico Xavier)*

BIOGRAFIA

Fernanda Melo Pereira, filha de Sergio Taran e Leni Melo Pereira Taran nasceu no dia 31 de julho de 1985, na cidade de São Paulo - SP. Ingressou na Escola Técnica Estadual Getúlio Vargas em Janeiro de 2000, onde se formou em Técnico em Edificações no ano de 2002.

Iniciou sua graduação no Curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Ilha Solteira, SP, em 2004, onde realizou atividades de estágios em manejo racional, nutrição e reprodução de equinos, manejo zootécnico de animais de grande porte e produção de aves e suínos. Graduou-se em Zootecnia no ano de 2008.

No ano de 2009 ingressou no Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal pela Universidade de São Paulo - FMVZ/USP, Pirassununga, SP, sob orientação do professor Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, onde desenvolveu o projeto de dissertação "Avaliação do uso de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para equinos", concluindo Mestrado no ano de 2011.

Em 2012 vinculou-se ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, RJ, no Curso de Doutorado, sob orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida. Realizou o Doutorado Sanduíche na Universidade do Minho - UMINHO, Braga, Portugal, em 2014, onde executou os ensaios experimentais do projeto de tese.

RESUMO GERAL

TARAN, Fernanda Melo Pereira. **Fumonisina B₁ em alimentos para equinos: interações em sistemas de digestão *in vitro* com *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. 74p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Objetivou-se avaliar a capacidade adsorvente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SC) para micotoxina Fumonisina B₁ (FB₁), a biodisponibilidade da micotoxina e avaliar a influência da micotoxina na digestão dos nutrientes do milho em digestão enzimática *in vitro*, na produção cumulativa de gases e nos parâmetros químicos e microbianos após fermentação *in vitro*. A pesquisa foi conduzida em três ensaios experimentais. No ensaio 1 foi avaliada a adsorção *in vitro* de FB₁ por *Saccharomyces cerevisiae* em pH 2 e 6,8, com quatro cepas de levedura (1, 2, 3 e 4) e cinco concentrações de 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸, 5x10⁸ and 1x10⁹ UFC.mL⁻¹. No ensaio 2 foi avaliada a digestão enzimática *in vitro* com milhos contaminados de forma natural ou artificial com FB₁. No ensaio 3 foi avaliada a fermentação *in vitro* com milho naturalmente contaminado (29,01 µg.g⁻¹ de FB₁), com e sem adição de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi utilizada a técnica de produção de gases e análises de pH, ácidos graxos voláteis (AGVs), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e perfil microbiano. Em todos os ensaios foi realizada a quantificação de FB₁ por CLAE. Os resultados de adsorção do ensaio 1 foram submetidos à análise de regressão em função da concentração de *S. cerevisiae* e cepas de levedura. Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores médios comparados pelo teste SNK (P<0,05). A adsorção *in vitro* pela cepa 4 de *S. cerevisiae* demonstrou ser estável tanto em pH 2 e 6,8, sendo os valores de remoção de FB₁ em solução de 38% para a concentração 1x10⁹ UFC.mL⁻¹, superior às demais cepas de levedura avaliadas. No processo de digestão enzimática *in vitro*, a FB₁ não interferiu na digestão dos nutrientes do milho. Além disso, a FB₁ demonstrou ser altamente solúvel no meio, visto a baixa recuperação no resíduo do milho, inferior a 12%. A *S. cerevisiae* (cepa 4) foi capaz de adsorver FB₁ após digestão enzimática *in vitro* ácida e neutra, em média de 14%. Na fermentação *in vitro*, a adição de *S. cerevisiae* promoveu aumento na produção cumulativa de gases até 24h, bem como aumentou a concentração de ácido valérico+isovalérico, ácido butírico, N-NH₃ e bactérias celulolíticas. A quantidade de FB₁ recuperada em solução após fermentação *in vitro* foi inferior a 5%, similar entre os tratamentos com e sem inclusão de *S. cerevisiae*. A adsorção de FB₁ por *S. cerevisiae* demonstra ser cepa-dependente. Os processos de digestão *in vitro* parecem transformar a molécula de FB₁ em produtos derivados. A inclusão de *S. cerevisiae* demonstrou ser eficaz na digestão de equinos com presença de FB₁.

Palavras-chave: digestão enzimática, fermentação, micotoxina

GENERAL ABSTRACT

TARAN, Fernanda Melo Pereira. **Fumonisin B₁ in horse nutrition: digestive interactions *in vitro* systems and the effect of *Saccharomyces cerevisiae* as adsorbent.** 2016. 74p. Thesis (Doctor in Animal Science). Animal Science Institute. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Was evaluated the adsorbent capacity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to mycotoxin Fumonisin B₁ (FB₁), the bioavailability of mycotoxins and evaluate the influence of mycotoxin in the digestion of corn nutrients in enzymatic digestion *in vitro*, the cumulative gas production and chemical and microbial *in vitro* parameters after fermentation. The research was conducted in three experimental trials. In trial 1 the FB₁ adsorption was evaluated *in vitro* by *Saccharomyces cerevisiae* at pH 2 and 6.8, with four yeast strains (1, 2, 3 and 4) and five concentrations of 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 and 1×10^9 CFU .mL⁻¹. In trial 2 was assessed *in vitro* enzymatic digestion of maize contaminated with FB₁ with or without *S. cerevisiae*. In trial 3 was evaluated *in vitro* fermentation with naturally contaminated maize (29.01 µg.g⁻¹ FB₁) with and without the addition of *Saccharomyces cerevisiae*. It used the gas production technique and pH, volatile fatty acids (VFA), ammonia (NH₃) and microbial profile were measured. In all trials the quantification of FB₁ was performed by HPLC. The results of the *in vitro* adsorption were subjected to a regression analysis based on the *S. cerevisiae* concentration and yeast strains. All results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and mean values compared by SNK test (P<0.05). The *in vitro* adsorption by *S. cerevisiae* (strain 4) demonstrated to be stable in both pH 2 and 6.8 and the values of FB₁ removal was 35% in solution for the concentration 1×10^9 CFU.mL⁻¹, greater than other yeast strains used. In the process of *in vitro* enzymatic digestion, FB₁ did not influenced in the corn nutrients digestion. Furthermore, FB₁ proved to be highly soluble in the medium due to the low recovery in the residue of maize, less than 12%. The *S. cerevisiae* (strain 4) was able to adsorb FB₁ after neutral and acidic *in vitro* enzymatic digestion, on average 14%. In *in vitro* fermentation, the addition of *S. cerevisiae* promoted an increase in cumulative gas production up to 24 hours, and increased the concentration of valeric + isovaleric acid, butyric acid, N-NH₃ and cellulolytic bacteria. The amount of FB₁ recovered after fermentation process was less than 5% in solution, similar among treatments with and without inclusion of *S. cerevisiae*. The FB₁ adsorption by *S. cerevisiae* has been demonstrated to be strain-dependent. The *in vitro* digestion processes can transform FB₁ molecule into derivative products. The inclusion of *S. cerevisiae* shown to be effective in *in vitro* digestion of equine with presence of FB₁.

Keywords: enzymatic digestion, fermentation, mycotoxin

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

	Página
Tabela 1. Quantidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e percentual (%) de FB_1 adsorvida pelas quatro cepas de <i>S. cerevisiae</i> (1, 2, 3 e 4) avaliadas em cinco diferentes concentrações (1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL ⁻¹), em solução tampão com pH 2.....	32
Tabela 2. Quantidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e percentual (%) de FB_1 adsorvida pelas quatro cepas de <i>S. cerevisiae</i> (1, 2, 3 e 4) avaliadas em cinco diferentes concentrações (1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL ⁻¹), em solução tampão com pH 6.8.	32

CAPÍTULO II

	Página
Tabela 1. Composição química das amostras de substratos de milho.....	45
Tabela 2. Valores absolutos em percentual da digestão ácida <i>in vitro</i> (2 h) dos nutrientes dos substratos milho, milho+ FB_1 e milho+ FB_1 +SC.....	47
Tabela 3. Valores absolutos em percentual da digestão sequencial <i>in vitro</i> (6 h) dos nutrientes dos substratos milho, milho+ FB_1 e milho+ FB_1 +SC.....	47
Tabela 4. Quantidade absoluta de FB_1 (μg) em solução após processo de digestão ácida <i>in vitro</i> do milho, milho+ FB_1 , milho+ FB_1 +SC, FB_1 e FB_1 +SC.....	48
Tabela 5. Quantidade absoluta de FB_1 (μg) no resíduo sólido após processo de digestão ácida <i>in vitro</i> do milho, milho+ FB_1 e milho+ FB_1 +SC.....	48
Tabela 6. Quantidade absoluta de FB_1 (μg) em solução após processo de digestão sequencial <i>in vitro</i> do milho, milho+ FB_1 , milho+ FB_1 +SC, FB_1 e FB_1 +SC.....	48

Tabela 7. Quantidade absoluta de FB ₁ (µg) no resíduo sólido após processo de digestão sequencial <i>in vitro</i> do milho, milho+FB ₁ e milho+FB ₁ +SC, no resíduo.....	49
Tabela 8. Valores médios de FB ₁ (µg) após processo de digestão ácida <i>in vitro</i> do milho naturalmente contaminados com FB ₁ (3,21 e 29,01 µg.g ⁻¹), com ou sem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1x10 ⁹ UFC.mL ⁻¹), em solução e no resíduo sólido.....	49
Tabela 9. Valores médios de FB ₁ (µg) após processo de digestão sequencial <i>in vitro</i> do milho naturalmente contaminados com FB ₁ (3,21 e 29,01 µg.g ⁻¹), com ou sem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1x10 ⁹ UFC.mL ⁻¹), em solução e no resíduo sólido.....	50

CAPÍTULO III

	Página
Tabela 1. Produção cumulativa de gases (mL.g ⁻¹ MO) após 12, 24 e 48 horas de fermentação <i>in vitro</i> do milho e milho+ <i>S. cerevisiae</i> , naturalmente contaminados com FB ₁	64
Tabela 2. Valores médios de ácidos graxos voláteis (mmol/ml), nitrogênio amoniacal (mg/100mL) e valores médios de pH após 48h de fermentação <i>in vitro</i> do milho e milho+ <i>S. cerevisiae</i> , naturalmente contaminados com FB ₁	65
Tabela 3. Perfil microbiano após 48h de fermentação <i>in vitro</i> do milho e milho+ <i>S. cerevisiae</i> , naturalmente contaminados com FB ₁	66
Tabela 4. Valores médios de FB ₁ (µg) em solução após 48h de fermentação <i>in vitro</i> do milho e milho+ <i>S. cerevisiae</i> , naturalmente contaminados com FB ₁	66

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Página

Figura 1. Efeito da concentração de *S. cerevisiae* na adsorção de fumonisina B₁ e equação de regressão linear para as cepas 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D), em pH 2..... 33

Figura 2. Efeito da concentração de *S. cerevisiae* na adsorção de fumonisina B₁ e equação de regressão linear para as cepas 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D), em pH 6,8..... 34

CAPÍTULO III

Figura 1. Curvas de fermentação *in vitro* do substrato milho e milho acrescido de *S. cerevisiae* durante o período de 48 horas..... 65

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	01
2 REVISÃO GERAL	02
2.1 Micotoxinas: Considerações Gerais	02
2.2 Aspectos Legais e Industriais das Micotoxinas na Cadeia Produtiva dos Equinos.....	04
2.3 Ação das Micotoxinas nos Equinos.....	05
2.3.1 Ação das Fumonisininas nos Equinos	06
2.4 Absorção e Metabolismo das Micotoxinas.....	09
2.4.1 Fumonisina B ₁	10
2.5 Microrganismos Adsorventes de Micotoxinas	12
2.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO I - ADSORÇÃO <i>IN VITRO</i> DE FUMONISINA B₁ POR <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Local	30
2.2 Delineamento Experimental	45
2.3 Cepas de Levedura.....	30
2.4 Preparo das Leveduras em Soluções Tampão em pH 2 e 6.8.....	30
2.5 Capacidade de Adsorção <i>in vitro</i>	30
2.6 Análise de Micotoxina FB ₁	31
2.7 Análises Estatísticas	31
3 RESULTADOS	31
4 DISCUSSÃO	34
5 CONCLUSÕES	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II - DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> DE MILHO CONTAMINADO COM FUMONISINA B₁ E INCLUSÃO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Local	44
2.2 Cepa de Levedura	44
2.3 Delineamento Experimental	44
2.4 Procedimentos Experimentais	45
2.5 Análises Bromatológicas	45
2.6 Análise de Micotoxina FB ₁	45
2.7 Análises Estatísticas	46
3 RESULTADOS	46
3.1 Ensaio I.....	46
3.2 Ensaio II.....	49

4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES.....	53
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO III - EFEITO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NA FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM FB₁.....	57
RESUMO	58
ABSTRACT	59
1 INTRODUÇÃO	60
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Local	61
2.2 Cepa de Levedura	61
2.3 Delineamento Experimental	61
2.4 Procedimento Experimental	61
2.5 Mensuração de pH	62
2.6 Ácidos Graxos Voláteis	62
2.7 Nitrogênio Amoniacal	62
2.8 Análise Microbiana.....	63
2.9 Análise de Micotoxina FB ₁	63
2.10 Análises Estatísticas	64
3 RESULTADOS	64
4 DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÕES.....	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	74

1 INTRODUÇÃO GERAL

As micotoxinas são compostos químicos tóxicos provenientes do metabolismo secundário de fungos filamentosos e conhecidas pelos danos causados à saúde humana e animal. Devido à diversidade dos efeitos tóxicos e de propriedades sinérgicas, as micotoxinas são consideradas grande fator de risco ao consumo alimentar, bem como estão associadas a perdas econômicas em todo mundo, uma vez que são encontradas em grãos, subprodutos de grãos de cereais e forragens.

As micotoxinas podem ser formadas tanto no campo, antes, durante e após a colheita, no transporte, processamento e armazenagem, quando as condições ambientais são favoráveis ao seu desenvolvimento. Os animais submetidos ao consumo de alimentos contaminados estão sujeitos às micotoxicoses, cuja gravidade está relacionada com a toxidez da micotoxina, dose administrada, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, além de efeitos sinérgicos associados a outros compostos aos quais foram expostos. Os principais efeitos estão associados à redução no crescimento e eficiência reprodutiva, imunossupressão, neuropatias, alterações carcinogênicas e, em muitos casos, levando a morte.

Os equinos são animais herbívoros monogástricos com fermentação no intestino grosso, que além de consumirem forragens são tradicionalmente alimentados com grãos de cereais, como milho, aveia, trigo e cevada. Contudo, dentre o pouco conhecimento descrito na espécie equina sobre os efeitos de intoxicação por micotoxinas, estão geralmente relacionados à contaminação por grãos e subprodutos de milho, principalmente por fumonisinas.

Dentre as micotoxinas de interesse para a espécie equina, a fumonisina B₁ (FB₁) produzida por *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*), é responsável por causar leucoencefalomalácia equina (LEME), principal doença relacionada com micotoxinas nesta espécie, que envolve alterações do sistema nervoso central, evoluindo até a morte. Entretanto o conhecimento aprofundado sobre a contaminação natural por fungos e micotoxinas na alimentação e processos digestivos de equinos ainda são escassos, normalmente dependentes da extrapolação de observações de outras espécies, como ruminantes e suínos. Além disso, alguns países no mundo são consumidores de produtos de origem equina, como carne e em menor escala, o leite, o que torna de grande importância o conhecimento sobre a influência das micotoxinas nesta espécie.

Dentre as alternativas utilizadas em prevenir e/ou diminuir os efeitos tóxicos de micotoxinas, *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada como aditivo antimicrobiano, descrita pela eficácia em reduzir a disponibilidade e absorção de micotoxinas em solução através da interação da toxina aos sítios de ligações da parede celular e eliminando através das fezes.

O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade adsorvente *in vitro* da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a micotoxina Fumonisina B₁ sobre a biodisponibilidade da micotoxina e avaliar a influência da micotoxina na digestibilidade dos nutrientes do milho contaminado em digestão enzimática *in vitro*, na produção cumulativa de gases, nos parâmetros químicos e microbianos após fermentação *in vitro*. O texto será apresentado em capítulos denominados: Capítulo I – Adsorção *in vitro* de fumonisina B₁ por *Saccharomyces cerevisiae*; Capítulo II – Digestão *in vitro* de milho contaminado com fumonisina B₁ com adição de *Saccharomyces cerevisiae*; Capítulo III – Fermentação *in vitro* de milho com fumonisina B₁.

2 REVISÃO GERAL

2.1 Micotoxinas: Considerações Gerais

Os fungos constituem um grupo diversificado de seres vivos eucariontes multicelulares, unicelulares (leveduras), quimiorganotróficos e geralmente aeróbios (Webster; Weber, 2007). Através das enzimas, degradam a matéria orgânica de estrutura complexa como polissacarídeos, proteínas, e posteriormente absorvem moléculas na forma estrutural simples como açúcares, aminoácidos, entre outros para o seu desenvolvimento (Webster; Weber, 2007; Zachariasova et al., 2014).

Dentre as diversas funções e características, os fungos apresentam benefícios como relações simbióticas com raízes e plantas na fixação de nutrientes no solo, biossíntese de antibióticos e produtos de alto valor comercial, bem como auxiliam na formação de produtos de consumo na indústria alimentar (pães, queijos, vinhos, etc.). Porém, muitos fungos são parasitas de plantas e responsáveis por causar grandes perdas econômicas na agricultura, além de provocar doenças como micoses, alergias, intoxicações, tanto em humanos como nos animais (Bennett; Klich, 2003; Cast, 2003).

Os fungos filamentosos são capazes de produzir compostos tóxicos provenientes do metabolismo secundário, como as micotoxinas (Bennett; Klich, 2003; Woloshuk; Shim, 2013; Zachariasova et al., 2014). Os fungos que produzem micotoxinas relevantes para a agricultura são organismos fitopatogênicos que infectam plantas no campo e em estufas, e saprófitas que colonizam produtos vegetais pós-colheita (Bath et al., 2010).

As micotoxinas constituem um conjunto heterogêneo de compostos químicos e tóxicos de baixo peso molecular, que podem causar graves efeitos sobre a saúde humana e animal, além de plantas e microrganismos (Pitt, 2000; Bennett; Klich, 2003; Cast, 2003; Shephard, 2008; Woloshuk; Shim, 2013). Tais efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxidez da micotoxina, dose administrada, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo e, dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos (Hussein; Brasel, 2001; Bennett; Klich, 2003; Bhatnagar et al., 2003; Zachariasova et al., 2014).

Cerca de 300 a 400 compostos são reconhecidos como micotoxinas, dos quais cerca de 12 compostos recebem a devida atenção como prejudiciais à saúde humana e animal (Bennett; Klich, 2003). Dentre os principais gêneros de fungos estão os *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Yiannikouris; Jouany, 2002; Cast, 2003; Berthiler et al., 2013; Woloshuk; Shim, 2013). Esses fungos podem produzir micotoxinas, com destaque as aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenonas, patulina, citrina, fumonisinas e tricotecenos (Hussein; Brasel, 2001; Rodríguez-Amaya; Sabino, 2002; Yiannikouris; Jouany, 2002; Cast, 2003; Murphy et al., 2006; Berthiler et al., 2013). Quase todas as micotoxinas são citotóxicas, que resulta na ruptura de membranas celulares e outras estruturas ou interferindo em processos vitais como síntese proteica de RNA ou DNA, imunossupressão, quadros nervosos e hemorrágicos, diminuição da eficiência produtiva e reprodutiva, deficiências metabólicas e bioquímicas, gastroenterites, enfermidades autoimunes, deficiências em vitaminas e/ou minerais, alterações genéticas, teratogenicidade, carcinogenicidade, e morte em alguns casos (Hussein; Brasel, 2001; Yiannikouris; Jouany, 2002; Cast, 2003).

As micotoxinas são formadas no campo durante o período de crescimento da planta, entretanto, bem como durante a colheita, transporte, secagem e/ou armazenamento (Yiannikouris; Jouany, 2002; Cast, 2003; Zachariasova et al., 2014). São necessárias condições favoráveis para o desenvolvimento dos fungos e produção de micotoxinas, como a disponibilidade de água, temperatura, oxigênio, composição química do alimento e pH (Yiannikouris; Jouany, 2002; Cast, 2003; Newman; Raymond, 2005; Woloshuk; Shim, 2013).

Em geral, as micotoxinas presentes na matéria-prima podem ter suas concentrações reduzidas durante os processos tecnológicos de produção de alimentos para consumo animal, por via de fermentação, peletização, extrusão etc. (Teller et al., 2012; Vaclavikova et al., 2013). Contudo, são compostos estáveis e qualquer falha relacionada às práticas de manufatura do produto desde a colheita a estocagem, geralmente levam ao aumento da produção das micotoxinas (Mansfield et al., 2008; Gregori et al., 2013; Teller et al., 2012).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, bem como, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina em determinado substrato. Assim, os efeitos tóxicos das micotoxinas podem estar relacionados à ocorrência de múltiplas micotoxinas, potencializados pelo sinergismo entre elas ou por doenças imunossupressoras, aumentando o risco e preocupação com a saúde humana e produtividade animal (D'Mello et al., 1999; Hussein; Brassel, 2001; Grenier; Oswald, 2011; Streit et al., 2013). Além disso, as micotoxinas bem como seus derivados podem sofrer biotransformações ao longo da digestão produzindo metabólitos tão tóxicos ou mais quanto na forma original (Vendl et al., 2009; Grenier; Oswald, 2011; Streit et al., 2013).

O gênero *Fusarium* é o mais frequentemente encontrado no campo, infectando grãos de cereais e forragens, tanto no período pré como pós-colheita, podendo produzir tricotecenos, zearalenona, ácido fusárico e/ou fumonisinas (Yiannikouris; Jouany, 2002; Streit et al., 2013). Temperaturas entre 20 e 25°C, alta umidade (90% umidade relativa) favorecem o crescimento dos fungos e produção de toxinas (Newman; Raymond, 2005; Méndez; Riet-Correa, 2007).

As fumonisinas produzidas por cepas de *F. verticillioides* (antigo *F. moniliforme*) e *F. proliferatum* estão associadas principalmente ao milho e em menor escala ao trigo (Yiannikouris; Jouany, 2002). Dentre as fumonisinas do grupo B, existem três tipos designadas como B₁, B₂ e B₃, sendo a FB₁ a mais observada e tóxica (Caloni; Cortinovis, 2010). Afetam principalmente suínos, aves e equinos através de lesões no fígado, trato gastrointestinal, sistema nervoso, como exemplo, edema pulmonar em suínos e lesões neurológicas em equinos (leucoencefalomalácia) (Pitt, 2000; Caloni; Cortinovis, 2010; Santos et al., 2013).

As micotoxinas são consideradas atualmente um dos principais contaminantes agrícolas, com estimativa de que 25% das culturas do mundo estejam afetadas, o que prejudica o agronegócio em muitos países, como a exportação, redução de rebanhos e perdas de produção de culturas (Fink-Gremmels, 1999; Cast, 2003). Kuiper-Goodman (1998) classifica as micotoxinas como os principais fatores de risco crônico alimentar, superior aos contaminantes sintéticos, plantas tóxicas, aditivos alimentares ou resíduos de pesticidas.

Streit et al. (2013) ao estudarem a ocorrência de várias micotoxinas em 83 tipos de alimentos ou ingredientes, observaram que todas as amostras continham de sete a 69 destes metabólitos tóxicos, de um total de 139 detectados. Além disso, as chamadas micotoxinas “mascaradas”, micotoxinas que se encontram naturalmente conjugadas com outras moléculas como a glicose, glutationa e ácido glucurônico, foram geralmente detectadas nas amostras, e seus efeitos tóxicos estão relacionados aos processos de digestão, através da hidrólise, as quais são transformadas em derivados tão tóxicos ou mais que a molécula original (Greiner; Oswald, 2011; Streit et al., 2013). Isso ressalta que, muito embora as concentrações individuais dos metabólitos sejam baixas nas amostras na ordem dos µg/kg, deve-se levar em consideração a co-ocorrência das substâncias, o sinergismo e o processo de digestão na formação de toxinas derivadas a fim de avaliar o potencial toxicológico (Streit et al., 2013; Zachariasova et al., 2014).

Nesse sentido, as consequências econômicas da contaminação por micotoxinas são profundas, podendo estar presentes em alimentos na forma original (direta) ou processados (indireta) a partir de matérias-primas contaminadas para o consumo humano, assim como na alimentação animal, que através do metabolismo e biotransformação dos

compostos podem excretar resíduos tóxicos na carne, ovos e leite, além dos prejuízos relacionados à saúde do rebanho (Yiannikouris; Jouany, 2002; Cast, 2003; Zachariasova et al., 2014).

2.2 Aspectos Legais e Industriais das Micotoxinas na Cadeia Produtiva dos Equinos

O Brasil se destaca pela sua produção em diversas áreas do agronegócio, tal como, a produção de grãos de soja e de milho, fontes nutricionais que são a base da alimentação na cadeia de produção animal. Segundo análises de projeção de mercado efetuada pela Comissão Nacional de Abastecimento (Conab), foi prevista safra de milho 2013/14, no total de 75,19 milhões de toneladas (ton) (CONAB, 2014), sendo 66,7% da produção voltada para consumo interno (MAPA, 2013).

A quantidade demandada pelo mercado interno é de aproximadamente 50 milhões de ton, sendo que, o consumo de milho pelas indústrias produtoras de alimentos destinados a alimentação animal em 2013 foi de aproximadamente 38,7 milhões de ton, dos quais 2,6 milhões de toneladas foram destinadas para a produção de rações de equinos, animais de companhia, peixes e camarões (SINDIRAÇÕES, 2014).

O consumo de ração pelo mercado de equinos é pequeno quando comparado com o de aves (35 milhões de ton), suínos (15 milhões de ton) e bovinos (7,5 milhões de ton), entretanto, o agronegócio do cavalo é promissor e pode ser capaz de consumir 1 milhão de ton/anos de concentrado (Lima et al., 2006). Atualmente, dados estimados por Almeida e Silva (2010) descrevem uma população de 5.650.000 animais, ocupando a quarta posição dentre os maiores rebanhos equinos do mundo. Como o país apresenta uma população significativa de equinos confere importante mercado consumidor que pode ter o seu potencial mais intensamente explorado, com crescente interesse pelos fabricantes de ração. Em estudo desenvolvido por Lima et al. (2006) sobre o agronegócio “do cavalo”, foram abordadas duas formas de produção da ração. A primeira é a produção industrial de ração, com mais de 30 empresas produtoras de alimentos comerciais para equinos e, deste modo, dependentes de leis regulatórias para o beneficiamento de seus produtos. A segunda forma abordada foi representada pelas propriedades que optam por confeccionar a sua própria ração farelada, ação popularmente denominada por “bater a ração” (Lima et al., 2006). Neste caso, os proprietários ficam na dependência da qualidade da matéria prima produzida na propriedade ou, na maioria dos casos, na idoneidade do mercado de matérias primas destinadas ao consumo animal. Em ambas as situações observam-se a necessidade da ação direta de políticas de regulamentação quanto à presença de substâncias indesejáveis nas matérias primas.

Atualmente, de acordo com informativos técnicos do setor, o consumo de concentrado aumentou e a produção de rações específica para a linha de equinos passou de 320 mil (Lima et al., 2006) para 580 mil ton em 2013 (SINDIRAÇÕES, 2014). Das *commodities* utilizadas na fabricação de alimentos, o milho é a mais utilizada no Brasil (SINDIRAÇÕES, 2014) e, é uma fonte de energia com boa relação custo/benefício nas dietas dos equinos que, geralmente, sofre intenso processamento industrial para garantir maior digestibilidade do amido (NRC, 2007).

Tendo em vista a importância desse grão na alimentação animal, estudos relacionados à qualidade sanitária da matéria prima se intensificaram principalmente no que diz respeito a contaminações por micotoxinas. A preocupação se concentra no armazenamento dos grãos, isto porque, a deterioração do milho por fungos, com conseqüente produção de micotoxinas, ocorre em um ambiente influenciado pelo homem, no qual podem ocorrer alterações por interação entre fatores físicos, químicos e biológicos (Chulze, 2010). Medidas vêm sendo tomadas no mundo todo para assegurar a qualidade dos alimentos. Segundo Zachariasova et al. (2014), devido à falta de informações científicas, o órgão regulamentador europeu de

segurança alimentar (European Food Safety Authority - EFSA) solicitou que estudos fossem realizados para estabelecer cientificamente os níveis de contaminação por micotoxinas nos alimentos destinados ao consumo animal. Em 2004 estabeleceu-se uma relação de micotoxinas consideradas como substâncias indesejáveis na alimentação animal e, em 2006, uma lei determinou os níveis de referência para a indústria de alimentos (União Europeia, 2006).

Nesse sentido, Zachariasova et al. (2014) avaliaram a presença de 56 tipos de micotoxinas em um conjunto de 343 amostras de alimentos utilizados ou produzidos para fins de alimentação animal, bem como estimaram a susceptibilidade de diferentes espécies animais a possíveis micotoxicoses, baseados no consumo real de matéria seca. Embora o estudo tenha sido amplo, com estimativas de consumo da toxina em relação ao peso vivo, nenhum valor de ingestão foi realizado para a espécie equina, contudo, observaram que as fumonisinas FB₁ e FB₂ foram detectadas predominantemente nas amostras de milho (Zachariasova et al., 2014).

As leis de regulamentação dos níveis máximos tolerados de substâncias indesejáveis nas matérias primas, assim como nos alimentos beneficiados para o consumo animal, variam entre países e blocos comerciais internacionais. Além disso, devido a intensa atividade de comercialização das *commodities*, a legislação de regulamentação é extremamente dinâmica com constantes alterações (Ramos Girona et al., 2011).

Dentre os blocos comerciais com os quais o Brasil mantém relações, aqueles que apresentam a legislação melhor estabelecida no controle de micotoxinas são os países da União Européia, que descrevem níveis máximos toleráveis de aflatoxina AFB₁ de 0,02 mg/Kg para todos os alimentos destinados ao consumo animal (União Européia, 2002, 2003). Enquanto os níveis máximos tolerados das fumonisinas (FB₁+FB₂) em alimentos industrializados (12% de umidade) destinados a alimentação de equinos devem ser de 5 mg/Kg (União Européia, 2006).

No Brasil, a legislação em vigor segue as recomendações do Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabeleceu um limite máximo tolerado para fumonisinas e aflatoxinas (Brasil, 2006), semelhantes ao descrito pela União Européia para a alimentação animal (União Européia, 2003). Além disso, existe um plano de novos limites de tolerância para outras micotoxinas que foi implementado gradativamente, finalizando o processo em 2016 (Brasil, 2011). Existe a preocupação na adequação das leis no controle de qualidade das *commodities* no que diz respeito às micotoxinas. De acordo com Fink-Gremmels e Spronk (2013), ainda existem muitos efeitos não específicos das micotoxinas presentes nos alimentos fornecidos aos equinos, sendo que muitas das informações disponíveis estão incompletas.

Por fim, a expansão do mercado de alimentos para equinos no Brasil atrelada às leis internacionais de livre comércio das *commodities* reverberam na ciência aplicada. Os nutricionistas de equinos do país observaram que em razão do milho fazer parte da dieta da espécie, devem aumentar seus esforços em pesquisas sobre os efeitos de sua possível contaminação e os reflexos que podem ser gerados no processo de digestão. O avanço do conhecimento garantirá a qualidade dos alimentos e a saúde dos equinos.

2.3 Ação das Micotoxinas nos Equinos

As pesquisas com micotoxinas em alimentos destinados ao consumo animal e seus efeitos estão descritos principalmente em suínos, aves e ruminantes (Newman; Raymond, 2005). Em equinos, os estudos sobre diferentes micotoxinas na alimentação são raros e restritos basicamente às fumonisinas (Liesener et al., 2010).

Uma das razões está relacionada a essas espécies (suínos, aves e bovinos) serem criadas para o crescimento e produção de carne, enquanto o sistema de produção de equinos

concentra-se principalmente em produzir animais destinados ao esporte, conformação, temperamento, beleza e/ou durabilidade (Newman; Raymond, 2005) e apenas uma pequena fração dos animais, em maioria animais de descarte, são abatidos com intuito de abastecer o mercado consumidor de carne. Conseqüentemente, o estudo em equinos depende da extrapolação de resultados de outras espécies, sendo principalmente comparados aos ruminantes que são animais herbívoros, no entanto, os equinos apresentam o trato gastrointestinal mais próximo dos suínos em relação ao processo de fermentação no intestino grosso (Newman; Raymond, 2005).

Uma vez que, as principais classes de micotoxinas como as fumonisinas, aflatoxinas, desoxinivalenol, zearalenona e ocratoxinas são encontradas em grãos de cereais, como milho, aveia, trigo e cevada (Liesener et al., 2010; Streit et al., 2013; Zachariasova et al., 2014) comumente utilizados na alimentação de equinos no mundo, torna-se relevante a necessidade de mais informações sobre a influência das micotoxinas nessa espécie. Além disso, alguns países são consumidores de carne de cavalo e de leite (embora o mercado seja pequeno), podendo conter resíduos de toxinas, demonstrando a importância econômica dessa espécie (Liesener et al., 2010).

O conhecimento aprofundado sobre a contaminação natural por fungos e micotoxinas na alimentação e processos digestivos de equinos ainda são escassos, existindo, no entanto, recentes estudos específicos sobre fungos e micotoxinas em alimentos para equinos (Keller et al., 2007; Liesener et al., 2010). Keller et al. (2007) avaliaram a microbiota em alimentos mistos para equinos e a determinação da contaminação natural de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁. Observaram que o gênero mais frequente isolado foi *Aspergillus* (40,54%), *Penicillium* (18,38%) e *Fusarium* (16,22%). Dentre o gênero *Aspergillus* a prevalência foi de *A. flavus* (36%), com valores de AFB₁ de 0,01 a 99,4 µg.Kg⁻¹ e, quanto às concentrações de FB₁ os valores observados foram de 0,01 a 7,49 mg.Kg⁻¹, demonstrando assim que os cavalos estão rotineiramente submetidos à ingestão de micotoxinas.

Em trabalho recente, Liesener et al. (2010) avaliaram 62 amostras de alimentos entre preparados à base de cereais e grãos (milho, aveia e cevada) para seis diferentes grupos de micotoxinas (DON, ZEA, FB₁, toxina T-2, toxina T-2+HT-2, OTA e alcaloides do ergot) e observaram que em todas as amostras foram quantificadas DON, toxina T-2 e T-2+HT-2, em 98% ZEA, em 94% FB₁, em 61% alcaloides do ergot e em 42% OTA. Sendo assim, os autores concluíram que a co-ocorrência de micotoxinas é comum nos alimentos comerciais destinados ao consumo equino, e apesar dos níveis considerados abaixo dos valores críticos ou tóxicos pela *European Food and Safety Authority* (EFSA, 2004abc; 2005; 2011), pouco se sabe sobre os efeitos adversos destas micotoxinas ou sobre sua transição para os tecidos comestíveis, como a carne ou leite na espécie equina. Esse fato torna de grande interesse estudos que permitam avaliar a resposta toxicológica das dietas para equinos de modo a prever a possibilidade de ocorrência de micotoxicoses que podem afetar os parâmetros produtivos desses animais.

2.3.1 Ação das fumonisinas nos equinos

O consumo de grãos e subprodutos de milho em equinos é a principal fonte contaminada com micotoxinas, principalmente a fumonisina, responsável por causar grave intoxicação e doença conhecida como leucoencefalomalácia equina (LEME) (Ross et al., 1991,1993; Câmara et al., 2008; Santos et al., 2013), como também associada a síndrome hepatotóxica (Voss et al., 2007). Em determinadas épocas do ano e regiões, a escassez de forragem nas pastagens acarreta a suplementação dos animais com milho, concentrados que contém milho, rolão/farelo de milho e/ou resíduos da indústria de processamento do grão, o que favorece a ocorrência da doença (Mallmann et al., 1999; Ragsdal; Debey, 2003; Câmara et al., 2008; Santos et al., 2013).

A LEME é causada por fumonisinas, principalmente FB₁, produzidas por *F. verticillioides*, com ação sobre o sistema nervoso central, causando sinais neurológicos súbitos decorrentes de necrose de liquefação da substância branca subcortical cerebral, com morte após evolução clínica de 4 a 72 horas, que pode estender-se por uma a duas semanas (Meireles et al., 1994; Méndez; Riet-Correa, 2007; Câmara et al., 2008; Santos et al., 2013).

O desenvolvimento do fungo e a produção de fumonisinas que são micotoxinas hidrossolúveis estáveis ao calor e resistentes a tratamento alcalino estão relacionados diretamente com a umidade e com a ocorrência de quedas de temperatura que causam choque térmico (Meireles et al., 1994; Méndez; Riet-Correa, 2007; Câmara et al., 2008; Santos et al., 2013).

O mecanismo de ação da FB₁ está relacionada com a biossíntese de esfingolípídeos através da inibição da síntese de ceramida (Wang et al., 1992), acarretando o acúmulo de intermediários bioativos, como esfinganina e outros derivados, bem como a redução do metabolismo esfingolípídeo, que interferem na função de algumas proteínas da membrana (Wang et al., 1992; Smith et al., 2002). Isso ocorre devido aos esfingolípídeos estarem envolvidos em diversos aspectos da regulação celular, sendo a interrupção do complexo esfingolípídeo a base de muitos mecanismos de toxicidade e carcinogenicidade de fumonisinas (Wang et al., 1992; Smith et al., 2002; Marasas et al., 2004).

No Brasil, a LEME foi descrita pela primeira vez em São Paulo por Rego Chaves (1950), entretanto, a relação entre a doença e *F. verticillioides* só foi descrita por Riet-Correa et al. (1982) após três surtos da toxicose no Rio Grande do Sul. Em 1988, Gelderblom et al. (1988) foram responsáveis pela descoberta das fumonisinas na África do Sul, isolando culturas de *F. verticillioides*. Com isso, possibilitou que Marasas et al. (1988) realizassem estudo de LEME em equinos através da indução endovenosa de 0,125 mg.Kg⁻¹ PV de FB₁ durante nove dias. Esses autores constataram os sinais clínicos da doença, como apatia, tremores musculares, paralisia do lábio inferior e língua, convulsões tetânicas e morte, notoriamente após oito dias do início da inoculação. Além disso, foi detectado pequeno aumento das enzimas aspartato transferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) no soro sanguíneo e, na necropsia foram observados edema cerebral acentuado e necrose focal bilateral da medula oblonga.

Kellerman et al. (1999) realizaram experimento que consistiu na indução de LEME por administração via oral de FB₁ a dois equinos, sendo que o primeiro recebeu FB₁ com 50% de pureza em 21 doses de 1,25 a 4 mg.Kg⁻¹ PV durante 33 dias e o segundo animal recebeu FB₁ com 95% de pureza em 20 doses de 1 a 4 mg.Kg⁻¹ PV durante 24 dias. Os autores observaram que entre 24 e 30 dias após o início da indução, ambos os animais desenvolveram sinais neurotóxicos como apatia, alterações no comportamento, incoordenação, paralisia dos lábios e língua e tremores musculares. Ao término do experimento, realizaram a eutanásia e necropsia dos animais, onde observaram lesões características da doença como necrose cavitária ou amolecimento da substância branca em ambos os hemisférios cerebrais.

Além desses, outros autores também confirmaram a influência da FB₁ nos casos de LEME, através da relação de alimentos destinados a alimentação de equinos e surtos de micotoxicoses no Brasil: Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al., 1982; Barros et al., 1994), Santa Catarina (Riet-Correa et al., 1998), Paraná (Hirooka et al., 1988; 1990), São Paulo (Xavier et al., 1991, Meireles et al., 1994; Del Fava et al., 2010), Rio de Janeiro (Rego Chaves, 1950), Minas Gerais (Brito et al., 1982), Mato Grosso (Santos et al., 2013), Mato Grosso do Sul, Goiás (Riet-Correa et al., 1998), Paraíba (Riet-Correa et al., 2003), em muare no Pará (Riet-Correa et al., 2007), equinos e muare em Pernambuco (Câmara et al., 2008), Distrito Federal (Salles-Gomes et al., 2003).

Ross et al. (1991) evidenciaram que a maioria das amostras de rações fornecidas a 45 cavalos com diagnóstico positivo de LEME apresentaram concentração média de 10 mg.Kg⁻¹

de fumonisina, sendo os valores de FB₁ no máximo de 8 mg.Kg⁻¹. Em complemento a esse estudo, Ross et al. (1994) sugeriram que a FB₂ estaria associada à LEME, contudo o único ensaio avaliando essa toxina (75 mg.Kg⁻¹) também continha FB₁ (3 mg.Kg⁻¹), conforme descrito em Newman e Raymond (2005).

Nesse sentido, Wilson et al. (1992) reproduziram experimentalmente a LEME a fim de obter informações sobre a dose mínima tóxica de FB₁ através da alimentação de equinos com rações contendo milho naturalmente contaminados, com concentrações conhecidas. Foram divididos dois grupos, sendo o primeiro com quatro pôneis submetidos ao consumo de <1 a 22 mg.Kg⁻¹ de FB₁ em cinco fases e, um segundo grupo com cinco pôneis submetidos ao consumo de 8 mg.Kg⁻¹ de FB₁ fornecido através da dieta, por 180 dias. Após 225 dias, sendo que nos 55 dias finais a dose foi elevada a 22 mg.Kg⁻¹ de FB₁, um pônei do primeiro grupo teve morte súbita, sendo os sinais clínicos e químicos agudos detectados aos nove dias anteriores à sua morte. O restante dos animais desse grupo apresentou sinais de depressão, apatia, incoordenação, diminuição da cinestesia em sua marcha, confusão, apatia, hipersensibilidade, e agressividade ao final de 146 dias. Esses animais foram eutanasiados, confirmando a presença de lesões cerebrais macroscópicas em todos os animais. No segundo grupo, os animais que consumiram 8 mg.Kg⁻¹ de FB₁, apresentaram sinais clínicos leves, transitórios e foram sacrificados aos 180 dias, no qual foram constatadas lesões cerebrais histopatológicas leves.

Foreman et al. (2004) avaliaram o efeito tóxico de várias doses de FB₁ em equinos, administrando doses de 0; 0,01; 0,05; 0,10 e 0,20 mg.Kg⁻¹ PV de FB₁ em um total de 17 animais, por 28 dias. Foi observado que os animais controle e com dose baixa (0,01 mg.Kg⁻¹) não apresentaram sinais neurológicos alterados ao longo do experimento. No entanto, para as doses de 0,05 a 0,20 mg.Kg⁻¹ PV de FB₁, em média ao fim do sexto dia, os animais que apresentaram alterações neurológicas demonstraram sinais clínicos leves como ataxia dos membros posteriores, dificuldade de locomoção dos membros anteriores, perda de tônus da língua e movimento, evoluindo para sinais clínicos graves como ataxia total dos membros, depressão, hiperestesia, demência intermitente em média do nono dia após início da indução. Além disso, os cavalos com alterações neurológicas apresentaram alta proteína do fluido cerebrospinal (LCR), albumina e IgG, comprovando que as respostas em decorrência à FB₁ são dependentes da dose.

Em estudo mais recente sobre a ocorrência de leucoencefalomalácia em equídeos, Santos et al. (2013) descreveram os aspectos epidemiológicos, clínicos e de suporte ao diagnóstico de um surto ocorrido em três propriedades rurais na região Leste de Mato Grosso, Brasil. A doença acometeu seis equinos e quatro muares de idade e sexos diferentes, sendo constatados em todos os animais sinais clínicos neurológicos associados à LEME, que evoluíram para morte súbita entre 12 e 71% dos casos, com 100% de letalidade. Foram observado focos de necrose na massa branca do cérebro e presença de células Gitter, bem como lesões degenerativas no fígado, através de necrópsia. Neste caso, foi quantificada a presença de 6 mg.Kg⁻¹ de fumonisinas na dieta dos animais, além de relacionar a presença das toxinas a baixa temperatura de 9 a 11°C, atípica na região.

Índices de mortalidade elevada foram descritos por Salles-Gomes et al. (2003), onde 71% dos animais morreram após consumo estimado entre 5 a 10 mg.Kg⁻¹ de FB₁ na ração fornecida, além da sintomatologia clínica relacionadas ao LEME. Sendo assim, o que se pode observar é que o consumo de dietas com níveis entre 5 e 10 mg.Kg⁻¹ de FB₁ na ração são suficientes para causar efeitos nocivos, até a morte em equinos (Ross et al., 1991; Foreman et al., 2004; Salles-Gomes et al., 2010; Santos et al., 2013).

A síndrome hepatotóxica ocorre com menos frequência do que a forma neurotóxica (LEME) e normalmente leva de 5 a 10 dias a partir da data de início dos sinais clínicos até a morte, sendo os sintomas associados à perda de apetite e depressão,

seguida por edema cerebral e icterícia proeminente (Voss et al., 2007). Elevada concentração sérica de bilirrubina e enzimas hepáticas normalmente estão presentes. Na necrópsia, o fígado é frequentemente firme, amarelo, de tamanho reduzido com acentuação do padrão lobular. Além disso, necrose centrolobular moderada a aguda e fibrose periportal pode ser observada histologicamente (Voss et al., 2007). A neurotoxicidade e hepatotoxicidade foram reproduzidas experimentalmente em cavalos, pôneis e burros, através de alimentos naturalmente contaminados (Ross et al., 1993) com FB₁ purificada (Marasas et al., 1988; Kellerman et al., 1990).

Além da LEME e Síndrome Hepatotóxica, em estudos isolados foi documentada cardiotoxicidade após a administração de FB₁ em cavalos (Smith et al., 2002), sendo os sintomas a diminuição da frequência cardíaca, débito cardíaco, contração do ventrículo direito, pressão pulso da artéria coccígea e aumento da resistência vascular sistêmica em cavalos com doença neurológica. Nesse aspecto, foi realizada a associação entre indução por fumonisina, doença neurológica, aumento sérico miocárdial de esfinganina e esfingosina, e diminuição da função cardiovascular em cavalos (Smith et al., 2002; Foreman et al., 2004).

2.4 Absorção e Metabolismo de Micotoxinas

O metabolismo de micotoxinas nos animais está intimamente relacionado às vias de aminoácidos e ácidos graxos, além dos efeitos biológicos estarem associados à quantidade ingerida, tipos de toxinas presentes, duração da exposição e sensibilidade do animal (Theumer; Rubinstein, 2011; Berthiler et al., 2013).

O metabolismo de compostos xenobióticos pode ser dividido em duas fases: 1) processo de transformação enzimática como redução, oxidação e hidrólise; e 2) processo de conjugação como a glicosidação, glicuronidação e sulfatação (Coleman et al., 1997; Zinedine et al., 2007; He et al., 2010; Berthiler et al., 2013). No primeiro processo citocromos P450 microsomal, flavina mono-oxigenases, prostaglandina sintases, amino-oxidases e álcool desidrogenases são as principais enzimas envolvidas na oxidação, enquanto que as reações de redução são controladas pelas epóxido hidrolases, aldeído redutases ou cetona redutases (Yiannikouris; Jouany, 2002). Além disso, os tecidos e fluídos corporais contêm grande número de esterases não-específicas e amidases capazes de hidrolisar moléculas xenobióticas (Galtier, 1999). No segundo processo, as principais enzimas de conjugação são glicuronosil-transferases microsomal, sulfotransferases citosólicas, metiltransferases, aminoacil-transferases, glutatona S-transferases e N-cetil transferases (Galtier, 1999).

Ambos os processos visam detoxificar os compostos tóxicos, contudo, a fase 1 pode conduzir a ativação e, conseqüentemente, aumentar a toxicidade. A fase 2 tem o objetivo de formar compostos solúveis em água (hidrofílicos), facilitando a eliminação da micotoxina através da urina, bile, fezes e/ou leite, reduzindo a toxidez (Yiannikouris; Jouany, 2002; Berthiler et al., 2013). As enzimas estão susceptíveis à ação frequente de diversos compostos xenofóbicos, tanto as localizadas na superfície quanto no interior celular, tendo como consequência a inibição da atividade enzimática, a qual pode ser reversível ou irreversível, dependendo da força da ligação entre a enzima e o inibidor (Theumer; Rubinstein, 2011).

Desta forma, de acordo Theumer e Rubinstein (2011), a dissolução desses compostos nas membranas podem ser moduladas através de distintos mecanismos moleculares e vias bioquímicas, nas quais participam as proteínas associadas às bicamadas lipídicas, sem haver união específica das macromoléculas envolvidas nesse efeito. Além disso, existem efeitos secundários como a indução do estresse oxidativo, que resultam na alteração de biomoléculas como as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, formando radicais livres e envolvendo posterior peroxidação dos lipídeos da membrana como eventos iniciais a geração dos efeitos tóxicos.

A absorção gastrointestinal que controla a entrada dessas toxinas na corrente sanguínea e sua distribuição no organismo pode ocorrer conforme três diferentes processos: difusão simples de compostos polares em fase líquida, difusão de compostos não-iônicos em fase lipídica e transporte ativo (Yiannikouris; Jouany, 2002). Por exemplo, moléculas lipofílicas e de baixo peso molecular como as aflatoxinas e a ZEA são absorvidas basicamente por transporte passivo; a presença de grupos carboxílicos e fenólicos como nas moléculas de OTA e citrina conferem propriedades ácidas e fracamente hidrófilas; e nesse aspecto, a difusão de formas não-iônicas em toda membrana lipídica é a principal via de absorção de micotoxinas em geral (Yiannikouris; Jouany, 2002).

2.4.1 Fumonisina B₁

As fumonisinas constituem um grupo de micotoxinas que contaminam o milho e seus derivados em nível mundial, inclusive em combinação com outras micotoxinas. A FB₁ é a de maior abundância, sendo também a mais tóxica dentre o grupo, representando cerca de 70% da contaminação total dos alimentos e rações naturalmente contaminados, seguidas pela FB₂ e FB₃ (Mallmann et al., 2001; Caloni; Cortinovis, 2010). A FB₁ tem a fórmula empírica C₃₄H₅₉NO₁₅ e consiste de um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbálico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-penta-hidroxiicosano, sendo que os grupos hidroxila dos carbonos 14 e 15 encontram-se esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico (Bezuidenhout et al., 1988).

Além da FB₁, outro composto de relevância é a FB₁-hidrolisada, por ser tão tóxica ou mais em relação a FB₁. Esse composto pertence ao grupo chamado de micotoxinas mascaradas, que são metabólitos de estrutura química alterada na planta, como parte de defesa a compostos xenobióticos (durante processo de detoxificação vegetal), não detectáveis por técnicas analíticas convencionais e que permanecem no tecido vegetal, subestimando a concentração total de micotoxinas devido as suas características físico-químicas (Berthiller et al., 2013).

As micotoxinas mascaradas apresentam variedades na forma conjugada extraível (as quais podem ser detectadas por análise apropriada com estrutura e padrões conhecidos), e na forma não extraível (FB₁-hidrolisada), as quais são ligadas covalentemente ou não covalentemente a carboidratos poliméricos ou proteínas matriciais, necessitando de tratamento químico ou enzimático para serem liberadas (Dall'Asta et al., 2012; Berthiller et al., 2013). Nesse sentido, estudos observaram após a realização de hidrólise alcalina em produtos de milho contaminados, que a quantidade de fumonisina disponível foi muito acima do que o valor esperado estequiometricamente (Kim et al., 2003; Park et al., 2004; Dall'Asta et al., 2010; Dall'Asta et al., 2012).

Na maioria dos animais, a absorção, distribuição e eliminação de FB₁ são rápidas (Riley et al., 2005), uma vez que são altamente hidrofílicas. A reduzida biodisponibilidade da FB₁ é decorrente tanto da baixa absorção, como da elevada taxa de eliminação (Voss et al., 2001; Lino et al., 2004; Stockmann-Juvala; Savolainen, 2010). Nesse sentido, Shephard e Snijam (1999) levantaram o questionamento sobre a reduzida biodisponibilidade em função do transporte através do epitélio intestinal ser limitado, ou ao fato de existir forte associação entre as fumonisinas e o conteúdo do trato intestinal. Embora haja evidências de que possam ser parcialmente metabolizadas no intestino, não há nenhum relato convincente de metabolismo *in vitro* ou *in vivo* por animais, mesmo sabendo que a fumonisina é excretada através da bile (Riley et al., 2005).

Loiseau et al. (2007) citam que a exposição prolongada à FB₁ pode aumentar o fluxo trans-epitelial, uma vez que a FB₁ é polianiónica, pela presença de grupos carboxílicos nos carbonos ¹⁴C e ¹⁵C, podendo interferir na própria absorção ao efetuar ligações com cátions como sódio, potássio e outras moléculas necessárias para o transporte ativo na membrana

intestinal. Os polications são descritos por inibirem o transporte ativo de moléculas como açúcares e aminoácidos através da membrana intestinal de ratos (Elsenhans et al., 1983). Hopmans et al. (1997) verificaram que uma pequena porção de FB₁ é absorvida para a corrente sanguínea na sua forma intacta. No entanto, a absorção aumenta perante hidrólise, onde a molécula perde um grupo de ácido tricarbóxico, fato que explica a maior toxidez da FB₁-hidrolisada ou parcialmente hidrolisada em comparação à FB₁.

O mecanismo de ação das fumonisinas das séries B e homólogos hidrolisados está relacionado com a interferência com o metabolismo de esfingosina e esfinganina, pois são estruturalmente análogos de bases esfingóides, perturbando o metabolismo dos esfingolípídeos, uma vez que pode ocorrer alteração da atividade da enzima citocromo P450, como resultado da inibição da enzima ceramida-sintase, que são elementos chave para a via metabólica da biossíntese *de novo* dos esfingolípídeos e *turnover* dos mesmos (Wang et al., 1992; Smith et al., 2002; Marasas et al., 2004).

A inibição da produção de ceramida (esfinganina N-aciltransferase e esfingosina N-aciltransferase) acarreta no acúmulo de intermediários bioativos, como esfinganina e outros derivados, bem como a redução do metabolismo esfingolípídeo, que interferem na função de algumas proteínas da membrana (Wang et al., 1992; Smith et al., 2002). Isso ocorre devido aos esfingolípídeos estarem envolvidos em diversos aspetos na regulação celular (crescimento, diferenciação e morte celular), sendo a interrupção do complexo esfingolípídeo a base de muitos mecanismos de toxicidade, apoptose e carcinogenicidade de fumonisinas (Wang et al., 1992; Smith et al., 2002; Meyer et al., 2003; Marasas et al., 2004). O aumento da razão esfinganina-esfingosina sugere que o valor desta razão pode ser um biomarcador potencial e preferencial relativo à exposição às FBs (Shephard; Snijam, 1999). Estudos realizados com macrófagos mostraram que a FB₁ altera a função da membrana celular e o empacotamento dos lípídeos. Além de alterar a estrutura das membranas celulares, as fumonisinas promovem a produção de radicais livres e aceleram a reação em cadeia associada com a peroxidação lipídica (Yin et al., 1998; Ferrante et al., 2002).

A FB₁ induz alterações nas vias de sinalização dos esfingolípídeos, levando a alterações nas relações entre morte e regeneração celular. Considerando que o aumento na concentração de ceramida é um importante sinal na indução de morte celular, a inibição da ceramida sintase pelas fumonisinas pode inibir a morte celular em curto prazo, ao passo que a inibição prolongada pode promover a morte celular induzida pelas bases esfingóides livres, se essas bases se acumularem em concentrações tóxicas (Riley et al., 2001), ressaltando a importância da dose-dependência e tempo de exposição à micotoxina. Em equinos esse processo conduz ao aparecimento da leucoencefalomalácia, através da alteração da regulação das artérias responsáveis pelo fluxo sanguíneo no cérebro de equinos, causando lesões na massa branca do cérebro (Santos et al., 2013).

A avaliação da exposição às FBs em animais e humanos é conduzida por diferentes fluidos biológicos (urina, plasma e bile) bem como fezes e tecidos (Prelusky et al., 1996; Chelule et al., 2000; Meyer et al., 2003). Os fatores que determinam a via de eliminação de xenobióticos são o peso molecular e a solubilidade em água. Assim, pesos moleculares mais baixos e de maior hidrossolubilidade favorecem a eliminação por via renal em detrimento da via biliar (Lino et al., 2004). As fumonisinas são eliminadas principalmente através da bile e nas fezes. A excreção fecal resulta de falta de absorção pelo trato gastrointestinal ou pela alta eficiência de eliminação de toxinas ou seus metabólitos através do sistema biliar, hidrolases do fígado e enzimas do intestino que hidrolisam a FB₁ a monoéster e aminopentol, sendo então excretadas nas fezes (Galtier, 1999; Yiannikouris e Jouany, 2002).

No estudo realizado por Prelusky et al. (1996) em suínos aos quais foi administrada por via oral FB₁ marcada com ¹⁴C, foi detectada radioatividade na bile, o que confirma que existe alguma absorção desta toxina. Além disso, os autores observaram que após os três dias

à primeira administração de rações contaminadas houve aumento rápido na eliminação da FB₁, atingindo cerca de 85% no final do período experimental de 33 dias e a eliminação por via urinária contribuiu apenas com 0 a 2,5% do total recuperado. Meyer et al. (2003) também encontraram níveis elevados (358 µg.Kg⁻¹) de FB₁ na bile dos suínos estudados. Os estudos realizados em primatas não-humanos e outros animais permitiram concluir que apenas 1% da dose administrada é absorvida, o que parece explicar o fato de que seja necessária a exposição contínua a doses elevadas (superiores a 5 mg.Kg⁻¹) para obter concentrações tecidulares passíveis de produzirem sintomas de doença (Chelule et al., 2000).

Em geral, a FB₁ tem sido relatada por exercer efeitos tóxicos diretamente nas estruturas, células e funções do intestino (Bouhet et al., 2004), bem como, propriedades de barreira nas células epiteliais e acumular no cólon (Prelusky et al., 1996; Bouhet et al., 2004). Contudo, as informações específicas relacionadas à digestão, absorção, secreção e influência no tecido epitelial ao longo do trato gastrointestinal são escassos na nutrição animal, bem como ausentes na espécie equina.

Lessard et al. (2009) avaliaram o efeito do consumo repetido de extrato de milho rico em fumonisinas (principalmente FB₁ com 1.5 mg.Kg⁻¹ PV) em suínos machos após uma semana de desmame e concluíram que a ingestão constante de fumonisinas tem o potencial de alterar a fisiologia intestinal, arquitetura das vilosidades, as atividades enzimáticas e reduzir o consumo alimentar. No mesmo contexto, Lalles et al. (2010) observaram que o consumo crônico de FB₁ (1.5 mg.kg⁻¹ PV) causa efeito negativo significativo na conversão alimentar, bem como aumento moderado de proteínas do estresse (cicloxigenase-1, chaperonas) no estômago e jejuno, respectivamente, e em grande relevância aumento acentuado na concentração tecidual de α,β-cristalino e cicloxigenase-1 (COX-1) no cólon, demonstrando que o cólon é altamente sensível aos efeitos deletério da FB₁. De acordo Prelusky et al. (1996), as respostas mais acentuadas observadas no cólon de suínos tratados com FB₁, podem estar relacionadas ao maior acúmulo da toxina nesse compartimento, quando comparado ao estômago e intestino delgado.

2.5 Microrganismos Adsorventes de Micotoxinas

Em razão das micotoxinas serem tóxicas tanto para humanos como para os animais, pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de encontrar mecanismos para a descontaminação de toxinas nos alimentos por métodos físicos e químicos (Huwig et al., 2001; Diaz et al, 2004). Embora existam diferentes abordagens disponíveis para a descontaminação de micotoxinas muitas delas não chegam a ser utilizadas devido aos elevados custos ou as dificuldades práticas envolvidas no processo de detoxificação (Shetty; Jespersen, 2006).

De acordo com Huwig et al. (2001) muitos adsorventes físicos são desenvolvidos e disponibilizados como aditivos dietéticos comerciais para animais, no entanto, grande parte destes adsorventes ligam-se a apenas um pequeno grupo de toxinas enquanto demonstram pouca ou nenhuma ligação a outros. Nesse sentido, a descontaminação biológica de micotoxinas através da ação de microrganismos é objetivo de estudo de alguns trabalhos (Shetty; Jespersen, 2006, 2007; Pizzolitto et al., 2011, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias ácido-láticas (BAL) têm sido utilizadas em alimentos funcionais como probióticos e potenciais microrganismos envolvidos na descontaminação de micotoxinas (Shetty; Jespersen, 2007).

Sabe-se que as bactérias ácido-láticas e algumas leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de se ligar às micotoxinas em meio líquido, possivelmente através dos componentes da parede celular, peptidoglicanos e polissacarídeos de BAL (Haskard et al., 2001; Lahtinen et al, 2004), glucomanos de levedura, podendo ser utilizados como potenciais descontaminantes de micotoxinas (Haskard et al., 2000, 2001; Lee

et al., 2003; Shetty; Jespersen, 2006, 2007; Hernandez-Mendoza et al., 2009; Armando et al., 2011; Pizzolitto et al., 2011, 2012).

A inclusão de microorganismos adequados na dieta contaminada poderia então impedir a absorção de micotoxinas durante a passagem no trato gastrointestinal, sendo por fim eliminadas nas fezes (Gratz et al., 2004; Bueno et al., 2007). Estas considerações com ênfase em métodos biológicos, são principalmente descritas na prevenção da absorção de AFLs no trato gastrointestinal de forma a incluir estes microrganismos na dieta e assim prevenir os efeitos da aflatoxicose (Pizzolitto et al., 2011). Trabalhos de pesquisa demonstram a eficiência da *Saccharomyces cerevisiae* em adsorver micotoxinas do gênero *Fusarium* (Raymond et al., 2003; Armando et al., 2013).

Embora pesquisadores venham testando o uso de leveduras e BAL com resultados promissores na habilidade em se ligar com a AFB₁, nenhum mecanismo dessa ação foi elucidado de forma clara e, nesse sentido, a seleção de microrganismos eficientes na remoção de AFB₁ é analisada perante única concentração da toxina, o que pode trazer respostas diferentes uma vez que a eficiência de cada microrganismo pode mudar em relação a quantidade de micotoxina presente (Haskard et al., 2001; Shetty; Jespersen, 2006; Bueno et al., 2007; Hernandez-Mendoza et al., 2009; Pizzolitto et al., 2011). A eficiência dos microrganismos é cepa-dependente, de modo que a remoção de aflatoxina foi de 16 a 40% para as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* RC016, RC012, RC009, RC008, 01, 03, 05, 08 e CECT 1891) e de 13 a 42% para as cepas de BAL (Pizzolitto et al., 2011).

De acordo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Instrução Normativa 15/2009, os probióticos são classificados como aditivos zootécnicos equilibradores da microbiota do trato digestório, e são definidos como cepas de microrganismos vivos viáveis, que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório dos animais, diminuindo o número dos microrganismos patogênicos ou indesejáveis (MAPA, 2009). Os organismos probióticos devem resistir ao trânsito gastrointestinal, à ação ácida do estômago e digestão biliar, além de apresentar propriedades, como a habilidade em aderir-se às células epiteliais do intestino, colonização do trato intestinal, produção de fator antimicrobiano, inibição de patógenos, entre outros (Weese, 2001).

A sobrevivência das cepas probióticas ingeridas nas diferentes porções do trato gastrointestinal pode apresentar variações de um organismo para o outro, uma vez que podem ser inibidas no estômago decorrente do baixo pH, bem como atingir o intestino em concentrações significativas. Nesse contexto, modelos *in vitro* consistem em provas simples, que testam a sensibilidade do microrganismo à presença de ácido, bile e secreções do trato digestivo (Marteau et al., 1997). Em relação a influência do pH e bile sobre os microrganismos probióticos, Gusils et al. (2002) relataram que apenas 16% das bactérias ácido-láticas que estavam sendo testadas como potenciais probióticos para alimentos de suínos, foram capazes de resistir a pH 3 por 3 horas e além disso, 85% das cepas de *L. acidophilus* e *Enterococcus faecium* isoladas das fezes não conseguiram sobreviver a bile 0,1% durante 24 horas. De acordo Kühle et al. (2004), 100% das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* testadas sobreviveram em pH 2,5 por 4 horas, e 65% foram capazes de crescer na presença de bile 0,3%. Demonstra-se assim que as bactérias parecem ser muito mais sensíveis que as leveduras quanto à presença de bile e pH ácido.

Em trabalho realizado por Pizzolitto et al. (2011) em relação à aplicação do modelo de adsorção para as estirpes de levedura e de BAL, foi demonstrado que a *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1891 foi o microrganismo mais eficiente na remoção de AFB₁ e, em geral, também tiveram eficiências mais elevadas às BAL, principalmente porque os valores médios do parâmetro de avaliação de eficiência de adsorção (sítios de ligação total por célula) foram de 20 a 1.000 vezes maior.

Além desses fatores, a ligação da toxina é demonstrada por ser melhor em pH mais ácido (Haskard et al., 2000; Yiannikouris et al., 2004a) e quando as células são tratadas com ácido ou calor (El-Nezami et al., 1998). Yiannikouris et al. (2004a) avaliaram a capacidade de adsorção de β -D-glucanos sobre zearalenona em pH 3,0; 6,0 e 8,0 e observaram que em condições ácidas e neutras ocorreu a maior afinidade (64-77%), enquanto em condições alcalinas a adsorção foi reduzida, demonstrando que a alcalinidade parece impedir a conformação tridimensional ativa de β -D-glucanos e favorecer uma única hélice e/ou estruturas de bobina aleatória.

A análise *in vitro* do processo de adsorção das micotoxinas é intensamente utilizada para avaliar os potenciais agentes descontaminantes de micotoxinas, uma vez que, se um possível adsorvente não consegue ligar-se a uma micotoxina *in vitro*, possivelmente *in vivo* isso não irá ocorrer. Nesse sentido, os ensaios *in vitro* são muito úteis para a identificação e classificação de potenciais produtos adsorventes de micotoxinas, ajudando a determinar os mecanismos e condições favoráveis para a ocorrência da adsorção (Diaz; Smith, 2005).

2.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A parede celular da *S. cerevisiae* apresenta dupla camada de aproximadamente 70 ± 10 nm de espessura, correspondendo a cerca de 30% do peso seco da célula, consistindo numa estrutura multilaminar microfibrilar constituída por polissacarídeos (90%), sendo as mananas e as glucanas os principais polímeros estruturais (De Groot et al., 2005). A sua composição química geral, expressa em percentagem de peso seco consiste em: glucanos (28%), mananos (31%), proteínas (13%), lipídios (8,5%), quitina (1%), quitosano (2%), compostos nitrogenados (2%), fosfato (0,31%), e íons inorgânicos como Ca^{2+} e Mg^{2+} (cerca de 3%) (Brady et al., 1994; Patzak et al., 1997). Esta diversidade de compostos permite a existência de inúmeros sítios de ligação em potencial para a complexação de moléculas (Shetty; Jespersen, 2006).

As leveduras são utilizadas na alimentação e comercialmente seus produtos como a parede celular e células vivas tem sido produzidas especificamente para a alimentação animal, com grande enfoque na indústria de aves (Celyk et al., 2003). Estudos com cepas de *S. cerevisiae* demonstraram ter atividades probióticas promissoras na descontaminação de micotoxinas (Jespersen, 2003; Yiannikouris et al., 2003; 2004bc; Coeuret et al., 2004; Raymond et al., 2003; Shetty; Jespersen, 2006; Bueno et al., 2007; Pizzolitto et al., 2011; Armando et al., 2011; 2013).

Em estudo realizado por Armando et al. (2013) avaliando a capacidade adsorvente de *S. cerevisiae* (10^7 UFC.mL⁻¹) em relação a diferentes concentrações de FB₁ foi observada redução no percentual de FB₁ de acordo a quantidade da micotoxina de 27%, 43%, 68,5% a 78,7% para 1, 2, 20 e 50 μg FB₁.mL⁻¹, respectivamente, ressaltando a promissora capacidade da levedura em reduzir a biodisponibilidade da toxina no trato gastrointestinal, embora o mecanismo de ação ainda não seja esclarecido.

Em estudo com equinos, Raymond et al. (2003) avaliaram a eficácia de adsorção de polímero de glucomananos (GM) em dieta contendo grãos naturalmente contaminados com *Fusarium* (15 mg.Kg⁻¹ DON, 0.8 mg.Kg⁻¹ 15-acetildeoxinivalenol, 9.7 mg.Kg⁻¹ ácido fusárico e 2 mg.kg⁻¹ ZEA) através do consumo alimentar, concentração de imunoglobulina sérica, parâmetros bioquímicos séricos e hematologia. Foi observado redução no consumo alimentar e aumento na concentração de γ -glutamyltransferase sérica de animais submetidos à dieta contaminada, contudo, os animais suplementados com 0,2% GM apresentaram aumento na ingestão de alimento, redução na concentração de γ -glutamyltransferase, demonstrando que o polímero GM previne os efeitos adversos induzidos por micotoxinas.

Em relação a AFB₁, Pizzolitto et al. (2011), através da descontaminação biológica com uso de bactérias e leveduras demonstraram que *Lactobacillus casei*, *Pediococcus entosaceus* e

Saccharomyces cerevisiae CECT 1891 foram capazes de diminuir a concentração *in vitro* de AFB₁, sugerindo que estas espécies ou seus extratos de parede poderiam ser usados como agente probiótico no trato intestinal melhorando parâmetros produtivos em frangos de corte. Shetty e Jespersen (2006) relataram o estudo realizado com diferentes cepas de diferentes espécies de levedura, incluindo a *S. cerevisiae* e *Candida krusei* a fim de testar a ação em presença de aflatoxina (5 µg), isoladas do milho proveniente do Oeste da África, e demonstraram serem capazes de se ligarem a mais de 60% das toxinas presentes em meio tampão fosfato-salino (1 mL). Além disso, a maior parte das cepas de levedura ligaram-se a mais de 15% da AFB₁, sendo a ligação da toxina altamente específica. Armando et al. (2011) avaliaram a capacidade de quatro cepas de *S. cerevisiae* em adsorver AFB₁ utilizando diferentes concentrações da toxina. O percentual de adsorção variou desde 16,4 até 82% para 50 ng.mL⁻¹ de AFB₁; entre 21,3 e 48,7% para 100 ng.mL⁻¹ de AFB₁; e de 20,2 a 65,5% para 500 ng.mL⁻¹ de AFB₁. Estes resultados demonstram que a capacidade de adsorção é cepa-dependente, existindo grande variabilidade de resultados.

O mecanismo envolvido na capacidade de leveduras em prevenir os danos promovidos por AFLs ainda não é totalmente esclarecido e há várias hipóteses que tentam explicar tal habilidade. Um modelo proposto por Yiannikouris et al. (2003), através de ensaios *in vitro* concluiu que a habilidade de leveduras em reduzir efeitos de micotoxinas está relacionada com a capacidade de adsorver essas moléculas nas paredes celulares e com isso limitar a biodisponibilidade ao organismo. A estrutura tridimensional dos polisacarídeos que constituem a parede celular permite a adsorção de diferentes micotoxinas ou seus derivados metabólicos (Jouany et al., 2005; Ringot et al., 2005). Os β-D-glucanos da parede das leveduras são capazes de adsorver diversas micotoxinas (Yiannikouris et al., 2003; 2004ab) enquanto que os α-D-mananos inibem a atividade tóxica das micotoxinas, provavelmente por interagir com os radicais destes compostos (Madrigal-Bujaidar et al., 2002). Yiannikouris et al. (2004b) relataram em estudo as interações fundamentais entre zearalenona e β-D-glucanos, com base em estudos de difração e raios-X. Os autores descreveram que cadeias de β-1,3 D-glucanas parecem favorecer uma associação muito estável intra-helicoidal com zearalenona, juntamente estabilizada por cadeias laterais β-1,6 D-glucanos. Ambas as ligações por pontes de hidrogênio e por força de Van der Waals foram identificadas no complexo e poderiam, assim, serem propostas como interações conduzidas para controlar a associação entre as duas moléculas.

Conforme descrito por Pizzolitto et al. (2011) os resultados obtidos confirmam que os compostos envolvidos na ligação AFB₁ para levedura são componentes da parede celular e que devem manter a sua estrutura, a fim de remover AFB₁ eficazmente. Resultados semelhantes foram relatados por Hernandez-Mendoza et al. (2009), que demonstraram que a parede da célula bacteriana liga-se eficazmente à AFB₁ purificadas. Além disso, a perda da parede celular bacteriana em resposta a tratamentos com enzimas apresentou redução na capacidade de ligar AFB₁ em relação à de células inteiras, o que demonstra a importância da integridade da parede celular para realizar ligações com micotoxinas (Pizzolitto et al., 2011). Com base nos trabalhos disponíveis na literatura, observa-se que os carboidratos da parede celular tanto de bactérias, como de *Saccharomyces cerevisiae* são locais comuns de ligação, para diferentes toxinas e interações.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso Científico em Equideocultura na 1ª Década do Século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 119-129, 2010.

ARMANDO, M.R.; DOGI, C.A.; PIZZOLITTO, R.P.; ESCOBAR, F. PEIRANO, M.S.; SALVANO, M.A. SABINI, L.I.; COMBINA, M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L. R. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.

ARMANDO, M.R.; GALVAGNO, M.A.; DOGI, C.A.; CERRUTTI, P.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L. R. Statistical optimization of culture conditions for biomass production of probiotic gut-borne *Saccharomyces cerevisiae* strain able to reduce fumonisin B1. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.1338-1346, 2013.

BARROS, C.S.L.; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N.; SOUZA, M.A. Leucoencefalomalácia em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, p.101-107, 1994.

BATH, R.; RAI, R.V.; KARIM, A.A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.57-81, 2010.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BERTHILLER, F.; CREWS, C.; DALL'ASTA, C.; SAEGER, S.D.; HAESAERT, G.; KARLOVSKY, P.; STROKA, J. Masked mycotoxins: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p.165-186, 2013.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLUM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, v.11, p.743–745, 1988.

BHATNAGAR, D.; TAKAHASHI, T.; CHANG, P.K.; MATUSIHIMA, K.; YU, J.; ABE, K.; CLEVELAND, T.E.; KOYAMA, Y. Mycotoxins: Current issues in U.S.A. **Meeting the Mycotoxin Menace Book**, 2003. 603 p.

BOUHET, S.; HOURCADE, E.; LOISEAU, N.; FIKRY, A.; MARTINEZ, S.; ROSELLI, M.; GALTIER, P.; MENGHERI, E.; OSWALD, I.P. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicological Science**, v.77, p.165–171, 2004.

BRADY, D.; STOLL, A.D.; STARKE, L.E.; DUNCAN, J.R. Chemical and enzymatic extraction of heavy-metal binding polymers from isolated cell-walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 3, p. 297-302, 1994.

BRASIL. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. **Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, 25 de maio de 2006, Seção 2, p. 5.

BRASIL. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº7, 18 de fevereiro de 2011. **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, 22 de fevereiro de 2011, Seção 1, p. 72.

BRITO, L. A. B.; NOGUEIRA, R. H. G.; PEREIRA, J. J.; CHIQUILOFF, M. A. G.; BIONDINI, J. Leucoencefalomalacia em equino associada à ingestão de milho mofado. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, v.34, p.49-53, 1982.

- BUENO, D.; CASALE, C.; PIZZOLITTO, R.; SALVANO, M.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2148-2154, 2007.
- CALONI, F.; CORTINOVIS, C. Effects of fusariotoxins in the equine species. **Veterinary Journal**, v.186, n.2, p.157-61, 2010.
- CÂMARA A.C.L.; AFONSO J.A.B.; RIET-CORREA F.; DANTAS A.F.M.; MENDONÇA C.L.; COSTA N.A.; DANTAS A.C.; COSTA NETO H.A.; CAMPOS A.N.S.S.; M.I., SOUZA. Leucoencefalomalácia em equídeos no Estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, p.476-479, 2008.
- CAST, 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Council of Agricultural Science and Technology**, Task Force Report N^o. 139. 2003, 199 p.
- CELYK, K.; DENLY, M.; SAVAS, T. Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.615–619, 2003.
- CHELULE, P.K.; GQALENI, N.; CHUTURGOON, A.A.; DUTTON, M.F. The determination of fumonisin B1 in faeces: a short term marker for assessment of exposure. **Biomarkers**, v.5, n.1, p.1-8, 2000.
- CHULZE, S. N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 5, p. 651–665, 2010.
- COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Numbers and strains of Lactobacilli in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.147–156, 2004
- COLEMAN, J.; BLAKE-KALFF, M.; DAVIES, E. Detoxification of xenobiotics by plants; chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, v.2, p.144–1251, 1997.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2013/14 – Brasília, 2014, 92p.
- D’MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MacDONALD, A.M.C. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p.183–205, 1999.
- DALL’ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; BATTILANI, P. Role of maize hybrids and their chemical composition in Fusarium infection and Fumonisin production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.3800–3808, 2012.
- DALL’ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. *In vitro* digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.12042–12047, 2010.
- DE GROOT, P.W.J.; RAM, A.F.; KLIS, F.M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 657-675, 2005.
- DEL FAVA, C.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; NASSAR, A.F.C.; CABRAL, A.D.; TORELLI, C.S.; CUNHA, M.S.; CUNHA, E.M.S. Ocorrência de leucoencefalomalácia (LEME) em equídeos no estado de São Paulo, Brasil: achados anatomopatológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.6, p.488-494, 2010.

- DIAZ, D.E., SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: DIAZ, D.E. (Ed.) **The Mycotoxin Blue Book**. United Kingdom: Nottingham University Press, 2005. p. 323-340.
- DIAZ, D.E.; HAGLER, W.M.; BLACKWELDER, J.T.; HOPKINS, B.A.; ANDERSEN, K.L. Aflatoxin blinders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, n. 2, p. 233-241, 2004.
- EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v.73, p.1-42, 2004a.
- EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A 588 (OTA) as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v.101, p.1-36, 2004b.
- EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v.89, p.1-34, 2004c.
- EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. **The EFSA Journal**, v.235, p.1-32, 2005.
- EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxins in food and feed. **The EFSA Journal**, v.9, n.12, p.1-187, 2011.
- ELSENHANS, B.; BLUME, R.; LEMBCKE, B.E.; CASPARY, W.F. Polycations: a new class of inhibitors for *in vitro* small intestinal transport of sugars and aminoacids in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.727, p.135-143, 1983.
- FERRANTE, M.C.; MELI, R.; MATTACE, R.G.; ESPOSITO, E.; SEVERINO, L.; DI CARLO, G.; LUCISANO, A. Effetts of fumonisin B1 on structure and function of macrophage plasma membrane. **Toxicology Letters**, v.129, p.181-187, 2002.
- FINK-GREMMELS, J.; SPRONK, L. Hygienic quality of feed: implications of feed contamination with moulds and mycotoxins on equine health and performance. In: 6th European Equine Health and Nutrition Congress, 2013, Belgium. **Proceedings of 6th European Equine Health and Nutrition Congress**, 2013, p. 63-74.
- FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v.21, p.115-120, 1999.
- FOREMAN, J.H.; CONSTABLE, P.D.; WAGGONER, A.L.; LEVY, M.; EPPLEY, R.M.; SMITH, G.W.; TUMBLESON, M.E.; HASCHEK, W.M. Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B1 intravenously. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.223-230, 2004.
- GALTIER, P. Biotransformation and fate of mycotoxins. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews**, v.18, p.295-312, 1999.
- GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, M.J.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin—novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1806-1811, 1988.

- GRATZ, S.; MYKKANEN, H.; OUWEHAND, A. C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6306–6308, 2004.
- GREGORI, R.; MERIGGI, P.; PIETRI, A.; FORMENTI, S.; BACCARINI, G.; BATTILANI, P. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. **Food Control**, v.30, p.280-287, 2013.
- GRENIER, B.; OSWALD, I.P. Mycotoxin co-contamination of food and feed: Meta analysis of publications describing toxicological interactions. **World Mycotoxin Journal**, v.4, p.285–313, 2011.
- GUSILS, C.; BUJAZHA, M.; GONZÁLEZ, S. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. **Interciencia**, v. 27, n. 8, p. 409-413, 2002.
- 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**, 67, 3086–3091, 2001.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Chemico-Biological Interactions**, v.128, p.39–49, 2000.
- HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLLAND, G. J. Chemical and biological transformations of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food and Science Technology**, v.21, p.67–76, 2010.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1064-1068, 2009.
- HIROOKA, E. Y.; VIOTTI, N. M. A.; SOARES, L. M. V.; ALFIERI, A. L. Intoxicação em equinos por micotoxinas produzidas por *Fusarium moniliforme* no norte do Paraná. **Semina**, v. 9, p.128-135, 1988.
- HIROOKA, E.Y.; VIOTTI, N.M.A.; MAROCHI, M.A.; ISHII, K.; UENO, Y. Leucoencefalomalácia em equinos no norte do Paraná. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 223-227, 1990.
- HOPMANS, H.C.; HAUCK, C.C.; HENDRICH, S.E.; MURPHY, P.A. Excretion of fumonisin B1-fructose adduct in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2618-2625, 1997.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPEL, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 2, p. 179- 188, 2001.
- JOUANY, J.P.; YIANNINKOURIS, A.; BERTIN, G. How yeast cell wall components can alleviate micotoxicosis in animal production and improve the safety of edible animal products. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, suppl 1., p. 171- 191, 2005.
- KELLER, K.M.; QUEIROZ, B.D.; KELLER, L.A.M.; RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, p. 1037- 1045, 2007.

- KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A.; CAWOOD, M.; COETZER, A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57, n.4, p. 269-275, 1999.
- KIM, E.K.; SCOTT, P.M.; LAU, B.P. Hidden fumonisin in cornflakes. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.161-169, 2003.
- KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.Y.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 29-39, 2004.
- KUIPER-GOODMAN, T. Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. In: Miraglia, M.; Van Egmond, H.; Brera, C.; Gilbert, J. (eds.). **Mycotoxins and phycotoxins—developments in chemistry, toxicology and food safety**. Oxford, United Kingdom, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 1998, p. 25-48.
- LAHTINEN, S. J.; HASKARD, C. A.; OUWEHANDZ, A. C.; SALMINENZ, S. J.; AHOKASY, J. T. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Food Additives and Contaminants**, v.21, p.158–164, 2004.
- LALLES, J.P.; LESSARD, M.; OSWALD, I.P.; DAVID, J.C. Consumption of fumonisin B1 for 9 days induces stress proteins along the gastrointestinal tract of pigs. **Toxicon**, v.55, p.244–249, 2010.
- LEE, Y., EL-NEZAMI, H., HASKARD, C., GRATZ, S., PUONG, K., SALMINEN, S. & MYKKÄNEN, H. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.426-430, 2003.
- LESSARD, M.; BOUDRY, G.; SEVE, B.; OSWALD, I.P.; LALLES, J.P. Intestinal physiology and peptidase activity in male pigs are modulated by consumption of corn culture extracts containing fumonisins. **Journal of Nutrition**, v.139, p.1303–1307, 2009.
- LIESENER, K.; CURTUI, V.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAUER, E.; USLEBER, E. Mycotoxins in horse feed. **Mycotoxin Research**, v. 26, p.23–30, 2010.
- LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. 1 Ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006, 250p.
- LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Evaluation of fumonisins exposure: biomarkers. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p. 5-15, 2004.
- LOISEAU, N.; DEBRAUWER, L.; SAMBOU, T.; BOUHET, S.; MILLER, J.D.; MARTIN, P.G.; VIADERE, J.L.; PINTON, P.; PUEL, O.; PINEAU, T.; TULLIEZ, J.; GALTIER, P.; OSWALD, I.P. Fumonisin B1 exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage. **Biochemical and Pharmacology**, v.74, n.1, p.144-152, 2007.
- MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; DILKIN, P. Leucoencefalomalácia equina associada à ingestão de milho contaminado por fumonisina B1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 3, p. 249-252, 1999.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Fumonisin B1 levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p. 41-45, 2001.
- MANSFIELD, M.A.; JONES, A.D., KULDAU, G.A. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. **Phytopathology**, v.98, p.330-336, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023**. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília, 2013, 96 p.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 15, de 26 de maio de 2009**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em 15 de abril de 2014.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOM, W.C.A.; COETZER, J.A.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p.197-203, 1988.

MARASAS, W.F.O.; RILEY, R.T.; HENDRICKS, K.A.; STEVENS, V.L.; SADLER, T.W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S.A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLOM, W.C.A.; ALLEGOOD, J.; MARTÍNEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J.D.; STARR, L.; SULLARDS, M.; ROMAN, A.V.; VOSS, K.A.; WANG, E.; MERRILL, A.H. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. **Journal of Nutrition**, v.134, p.711–716, 2004.

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENNAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effects of bile. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1031-1037, 1997.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MEIRELES, M. A.; CORRÊA, B.; FISCHMAN, O.; GAMBALÉ, W.; PAULA, C. R.; CHACON-RECHE, N. O.; POZZI, C. R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathology**, v. 127, p.183-188, 1994.

MÉNDEZ, M.C.; F.; RIET-CORREA. Intoxicações por Plantas e Micotoxinas. In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Lemos, R.A.A.; Borges, J.R.J. (Eds). **Doenças dos Ruminantes e Equinos**, v.2, p.99-222, 2007.

MEYER, K.; MOHR, K.; BAUER, J.; HORN, P.; KOVÁCS, M. Residue formation of fumonisin B1 in porcine tissues. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.7, p.639-647, 2003.

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

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of horses**. 6.ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007, 341p.

NEWMAN, K.E.; RAYMOND, S.L. Effects of mycotoxins in horses. In: Diaz, D.E. (Ed.) **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham University Press. 2005, p.57–76.

PARK, J.W.; SCOTT, P.M.; LAU, B.P.; LEWIS, D.A. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, v.21, p.1168-1178, 2004.

- PATZAK, M.; DOSTALEK, P.; FOGARTY, R.V.; SAFARIK, I.; TOBIN, J.M. Development of magnetic biosorbents for metal uptake. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 7, 483-487, 1997.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p.184-92, 2000.
- PIZZOLITTO R.P.; BUENO D.J.; ARMANDO M.R.; CAVAGLIERI L.; DALCERO A.M.; SALVANO M.A. Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Intech Open Access Publisher**, p.1-20, 2011.
- PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M.; Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-ocurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v.4156, p.214-221, 2012.
- PRELUSKY, D.B.; MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.2, p.155-162, 1996.
- RAGSDAL, J.M.; B.M., DEBEY. Equine leucoencephalomalacia linked to contaminated corn. **Kansas University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service**, v. 6, n. 2, p.1-6, 2003.
- RAMOS GIRONA, A.J.; ROSA, C.A.R.; CAVAGLIERI, L.R.; GUEDES, C.A. Legislação e impacto econômico de las micotoxinas. In: RAMOS, A.J (Ed). **Micotoxinas Y Micotoxinos**, 1 ed. AMV Ediciones, 2011, Cap.18, -462p.
- RAYMOND, S.L.; SMITH, T.K.; SWAMY, H.V.L.N. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2123–2130, 2003.
- REGO CHAVES, L. Doença de sintomatologia nervosa causada pela intoxicação pelo milho. **Revista Medicina Veterinária**, v. 10, p. 199-217, 1950.
- RIET-CORREA, F.; MEIRELES, M. A.; SOARES, J. M.; MACHADO, J. J.; ZAMBRANO, A. F. Leucoencefalomalácia associada à ingestão de milho mofado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, p.27-30, 1982.
- RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; AZEVEDO, E. O.; MEDEIROS, R. M. T.; SIMÕES, S. V. D.; DANTAS, A. A.; ALVES, J. C.; NOBRE, V. M. T.; ATHAYLDE, A. C.; GOMES, A. A.; LIMA, E. F. Doenças de ruminantes e equinos no semi-árido da Paraíba. **Semi-Árido em Foco**, v.1, p.2-86, 2003.
- RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; RIET-CORREA, F. Leucoencephalomalacia in mules in Northern Brazil, In: PANTER, K. E.; WIERENGA, T. L.; PFISTER, J. A. **Poisonous plants: global research and solutions**. CABI Publishing, p. 256-262, 2007.
- RILEY, R.T.; PESTKA, J.; DIAZ, D.E. Mycotoxins: metabolism, mechanisms and biochemical markers. **The mycotoxin blue book**, p. 279-294, 2005.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-11, 2002.
- ROSS, P.F.; LEDET, A.E.; OWENS, D.L.; RICE, L.G.; NELSON, H.A.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M. Experimental equine leucoencephalomalacia, toxic hepatitis, and

encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, n.1, p.69-74, 1993.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; REAGOR, J.C.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; HARLIN, K.A.; RICHARD, J.L.; COLVIN, B.M.; BANTON, M.I. Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.238-241, 1991.

SALLES-GOMES, T.L.; ALMEIDA, P.E.; MOREIRA, M.; CANOLA, J.C.; CANOLA, P.A.; SOUZA, H.A. Surto de leucoencefalomálcia equina provocada por ração comercial com concentração de fumonisina inferior a 10 ppm. **ARS Veterinária**, v.19, n.3, p.267-271, 2003.

SANTOS, C.E.P.; SOUTO, F.S.M.; SANTURIO, J.M.; MARQUES, L.C. Leucoencefalomálcia em equídeos da região Leste de Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1119-1124, 2013.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants**, v.25, n.2, p.146-151, 2008.

SHEPHARD, G.S.; P.W., SNIJMAN. Elimination and excretion of a single dose of a mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p.111-116, 1999.

SHETTY, P.H.; HALD, B.Y.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 41-46, 2007.

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

SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Boletim informativo do setor de alimentação animal/ maio 2014. Consultado em 14/05/2014 em: http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2014/05/boletim-informativo-do-setor_vs-portugues_site-08052014.pdf

SMITH, G.W.; CONSTABLE, P.D.; FOREMAN, J.H.; EPPLEY, R.M.; WAGGONER, A.L.; TUMBLESON, M.E.; HASCHEK, W.M. Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B1 in horses. **American Journal of Veterinary Research**, V.63, p.538-545, 2002.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K.,. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Human & Experimental Toxicology**, v.27, p.799-809, 2010.

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I.P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed – focus on Europe. **Toxins**, v.4, p.788-809, 2012.

TELLER, R.S.; SCHMIDT, R.J.; WHITLOW, L.W.; KUNG, L.JR. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1428-1436, 2012.

THEUMER, M.G.; RUBINSTEIN, H.R. Interacciones de las micotoxinas. In: RAMOS, A.J. (ed). **Mycotoxinas y micotoxicosis**. 1ed. 2011, p.373-394.

TRENHOLM, H.L.; FOSTER, B.C.; CHARMLEY, L.L.; THOMPSON, B.K.; HARTIN, K.E.; COPPOCK, R.W.; ALBASSAM, M.A. Effects of feeding diets containing *Fusarium* (naturally) contaminated wheat or pure deoxynivalenol (DON) in growing pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, p.361–369, 1994.

UNIÃO EUROPÉIA – UE Directiva 2006/576/CE - Recomendação da Comissão de 17 de Agosto de 2006 sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 229, p.7, 2006.

UNIÃO EUROPÉIA – UE Directiva 2002/32/CE do parlamento europeu e do Conselho de 7 de Maio de 2002 relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais, **Jornal Oficial da União Europeia**, L 140, p. 10, 30/5/2002.

UNIÃO EUROPÉIA – UE Directiva 2003/100/CE da Comissão de 31 de outubro de 2003 que altera o anexo I da Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 285, p. 33, 1/11/2003.

VACLAVIKOVA, M.; MALACHOVA, A.; VEPRIKOVA, Z.; DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; HAJLSLOVA, J. 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making. **Food Chemistry**, v.136, p.170-757, 2013.

VENDL, O.; BERTHILLER, F.; CREWS, C.; KRŠKA, R. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone and their major masked metabolites in cereal-based food by LC675 MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, p.1347–1354, 2009.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview of rodent toxicities: Liver, and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.259–266, 2001.

VOSS, K.A.; SMITH, G.W.; HASCHEK, W.M. Fumonisins: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.299–325, 2007.

WANG, E.; ROSS, P.; WILSON, T.; RILEY, R.; MERRILLI, A. Increases in Serum Shingosine and Shinganine and Decreases in Complex Sphingolipids in Ponies Given Feed Containing Fumonisins, Mycotoxins Produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Nutrition**, v. 122, p.1706 – 1716, 1992

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**, 3 ed. Cambridge University Press, 2007, 867p.

WEESE, J.A. Review of probiotics: Are they really “Functional Foods”? **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners (AAEP)**, v. 47, p. 27-31, 2001.

WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; OWENS, D.L.; RICE, L.G.; JENKINS, S.J.; NELSON H.A. Experimental production of ELEM, a study to determine the minimum toxic dose in ponies. **Mycopathology**, v.117, p.115-120, 1992.

WOLOSHUK, C.P.; SHIM, W.B. Aflatoxins, fumonisins and trichothecenes: a convergence of knowledge. **FEMS Microbiology Letters**, v.37, p.94-109, 2013.

- XAVIER, J.G.; BRUNNER, C.H.M.; SAKAMOTO, M.; CORREA, B.; FERNANDES, W. R.; DIAS, J. L. C. Equine leucoencephalomalacia: report of five cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 28, p.185-189, 1991.
- YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Influence of pH on complexing of model beta-d-glucans with zearalenone. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2741-6, 2004a.
- YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties towards Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3666-3673, 2004b.
- YIANNIKOURIS, A.; FRANCOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1195-1200, 2004c.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v.51, p.81-99, 2002.
- YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C.G.; FRANCOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J.P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 10, p. 783- 789, 2003.
- YIN, J.J.; SMITH, M.J.; EPPLEY, R.M.; PAGE, S.W.; SPHON, J.A. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1371, p.134-142, 1998.
- ZACHARIASOVA, M.; DZUMAN, Z.; VEPRIKOVA, Z.; HAJKOVA, K.; JIRU, M.; VACLAVIKOVA, M.; POSPICHALOVA, M.; FLORIAN, M.; HAJLSLOVA, J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.193, p. 124-140, 2014.
- ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.1, p.1-18, 2007.

CAPÍTULO I

ADSORÇÃO *IN VITRO* DE FUMONISINA B₁ POR *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

Avaliou-se a adsorção *in vitro* de fumonisina B₁ (FB₁) através do uso de diferentes cepas e concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* em condições que simulam o trato digestivo de equinos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x5, com quatro cepas de levedura (1, 2, 3 e 4) e cinco concentrações para cada cepa de 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸, 5x10⁸ e 1x10⁹ UFC.mL⁻¹, sob pH 2 e 6,8 com três repetições por tratamento. Os ensaios de adsorção *in vitro* foram conduzidos em microtubos contendo solução tamponada de micotoxina e levedura a 39 °C. A concentração de FB₁ foi de 5 µg.mL⁻¹. As amostras do sobrenadante contendo as fumonisinas não adsorvidas foram analisadas e quantificadas por CLAE. Os resultados foram submetidos à análise de regressão em função da concentração de levedura e cepas de levedura. Observou-se, tanto em pH 2 como a 6,8, interação significativa entre concentração de FB₁ e cepa de levedura (P<0,001). No pH 2, as cepas de levedura não diferiram em relação a quantidade de FB₁ adsorvida nas concentrações de 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸ UFC.mL⁻¹, apenas apresentaram efeito significativo para as concentrações mais elevadas de 5x10⁸ e 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ (P<0,001). Em pH 6,8, as diferenças ocorreram para as concentrações de 1x10⁸, 5x10⁸ e 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ (P<0,001), não apresentando efeito significativo nas concentrações mais baixas (1x10⁷ e 5x10⁷ UFC.mL⁻¹). Na concentração mais elevada de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹, a cepa 4 (SC-47) demonstrou maior capacidade para adsorver FB₁, 39,4% e 37,5% em pH 2,0 e 6,8, respectivamente. Além disso, foram observadas respostas lineares na capacidade de adsorção em todas as cepas avaliadas sob condições de pH ácido e neutro. Os resultados demonstram que a capacidade de adsorção de FB₁ pela *S. cerevisiae* é cepa-dependente e que o valor de pH pode influenciar na quantidade de FB₁ removida da solução de acordo a cepa utilizada.

Palavras-chave: capacidade adsorvente, levedura, micotoxina.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vitro* adsorption of fumonisin B1 (FB₁) through the use of different strains and concentrations of *Saccharomyces cerevisiae* in conditions simulating the digestive tract of horses. The experimental design was completely randomized in a factorial 4x5 with four yeast strains (1, 2, 3 and 4) and five concentrations for each strain of 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 and 1×10^9 CFU.mL⁻¹ at pH 2 and 6.8 with three replicates per treatment. *In vitro* adsorption experiments were carried out in microcentrifuge tubes containing buffered solution mycotoxin and yeast at 39 ° C. The concentration of FB₁ was 5 µg.mL⁻¹. The supernatant of samples containing fumonisin not adsorbed were analyzed and quantified by CLAE. The results of the *in vitro* adsorption were subjected to a regression analysis based on the *S. cerevisiae* concentration and yeast strains. It was observed at pH 2 and 6.8 a significant interaction between *S. cerevisiae* concentration and yeast strain (P <0.001). At pH 2, the the amount of FB₁ adsorbed by different yeast strains did not differ with 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 CFU.mL⁻¹, only showed effects for the highest concentrations of 5×10^8 and 1×10^9 CFU.mL⁻¹ (P<0.001). At pH 6.8, the differences occurred to concentration of 1×10^8 , 5×10^8 and 1×10^9 CFU.mL⁻¹ (P<0.001), but had no effect on lower concentrations (5×10^7 and 1×10^7 celulas.mL⁻¹). At the highest concentration of 1×10^9 CFU.mL⁻¹, strain 4 (SC-47) demonstrated a greater capacity to adsorb FB₁, 39.4% and 37.5% at pH 2.0 and 6.8, respectively. In addition, linear responses were observed in the adsorption capacity in all strains evaluated under conditions of acidic and neutral pH. The results demonstrate that the ability of *S. cerevisiae* to adsorb FB₁ is strain-dependent and the pH value may influence the amount of FB₁ removed from the solution according to the strain used.

Keywords: adsorbent capacity, yeast, mycotoxin.

1 INTRODUÇÃO

As fumonisinas são grupos de micotoxinas produzidas por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* associadas principalmente aos grãos e ou sub-produtos de grãos de milho (Zachariasova et al., 2014). Dentre as fumonisinas da série B, a fumonisina designada B₁ (FB₁) é a forma mais abundante e tóxica encontrada nas matérias-primas (Caloni; Cortinovis, 2010). Estão relacionadas à ocorrência de problemas graves na produção animal, afetando principalmente o trato respiratório de aves (Pitt, 2000), causando edema pulmonar em suínos (Harrison et al., 1990), distúrbios neurológicos em equinos (Caloni; Cortinovis, 2010) e associadas ao aumento do risco de câncer esofágico em humanos (IARC, 2002). Em equinos, a FB₁ é responsável por causar grave intoxicação e doença conhecida como Leucoencefalomalácia equina (LEME) (Caloni; Cortinovis, 2010) e está associada à síndrome hepatotóxica (Voss et al., 2007), levando a morte.

Considerando a toxidez da fumonisina, estratégias para prevenir, eliminar, inativar ou reduzir a presença nos alimentos são necessárias. Embora alguns mecanismos de descontaminação por métodos químicos e físicos sejam utilizados, devido aos seus custos elevados ou inviabilidade prática dos processos, a maioria dessas técnicas acabam não sendo utilizadas (Huwig et al., 2001; Shetty; Jespersen, 2006). Uma estratégia promissora em eliminar ou reduzir a presença de FB₁ em solução é a utilização de microrganismos como aditivo antimicotoxina. A inclusão desses organismos na dieta pode diminuir o efeito tóxico da micotoxina, através do complexo FB₁-microrganismo, reduzindo a disponibilidade e absorção da toxina no trato gastrointestinal, sendo eliminada através das fezes (Gratz et al., 2004; Bueno et al., 2007; Pizzolitto et al., 2012).

Leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias ácido-láticas (BAL) têm demonstrado excelente capacidade de adsorção *in vitro* de micotoxinas em meio líquido, através dos componentes da parede celular, podendo ser eficazes na descontaminação de micotoxinas. Porém, a maioria das pesquisas são voltadas para a prevenção de distúrbios causados pela alfatoxina B₁ (AFB₁) (El-Nezami et al., 1998; Haskard et al., 2000, 2001; Lee et al., 2003; Shetty; Jespersen, 2006, 2007; Bueno et al., 2007; Hernandez-Mendoza et al., 2009; Armando et al., 2011; Pizzolitto et al., 2011; Fruhauf et al., 2012; Pereyra et al., 2012), zearalenona (ZEA) e alguns tricotecenos (El-Nezami et al., 2002a,b; Yiannikouris et al., 2003, 2004a,b; Niderkorn et al., 2006, 2007; Fruhauf et al., 2012; Pereyra et al., 2012), sendo restritas as publicações que estudam as fumonisinas (Pizzolitto et al., 2012; Armando et al., 2013).

Dentre esses microrganismos, *S. cerevisiae* demonstra ser mais eficaz em sobreviver às diferentes condições do trato gastrointestinal, resistente ao pH ácido e à presença de bile (Gusil et al., 2002; Kühle et al., 2005), além de promover melhores resultados na capacidade de adsorção de micotoxinas (Shetty; Jespersen, 2006; Bueno et al., 2007; Pizzolitto et al., 2011, 2012). O mecanismo de ação da *S. cerevisiae* na remoção de FB₁ é descrito como um fenômeno físico através de ligações não-covalentes, bem como interações hidrofóbicas na superfície do microrganismo, sem ocorrer metabolismo (Pizzolitto et al., 2012). De acordo esses autores, a remoção de FB₁ pelo microrganismo é um processo rápido, sem ocorrer modificação da molécula de FB₁, podendo ser reversível, onde a ligação depende tanto da concentração da toxina como do microrganismo utilizado. Além disso, a interação entre toxina e agente adsorvente pode sofrer influência do pH da solução (Haskard et al., 2000; Yiannikouris et al., 2003, 2004a; Pereyra et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a capacidade de adsorção de FB₁ por diferentes cepas e concentrações de *S. cerevisiae*, simulando as condições orgânicas de pH e temperatura encontrados no trato digestório de equinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar (LCTA) do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal

2.2 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5. Os ensaios foram conduzidos em solução sob pH 2 e pH 6,8, utilizando quatro cepas de levedura (1, 2, 3 e 4), cinco concentrações de cada cepa de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL⁻¹ e três repetições em cada tratamento. A FB₁ (Sigma-Aldrich, Química, S.L., Sintra, Portugal) foi utilizada na concentração de 5 µg.mL⁻¹.

2.3 Cepas de Levedura

As cepas de leveduras utilizadas foram: Cepa 1: Procreatin 7[®], Lesaffre Feed Additives, Lille, França; Cepa 2: cepa LL08, isolada do rúmen de bovino; Cepa 3: Levucell[®] cepa CNCM I-1077, Lallemand Animal Nutrition, Goiânia, Brasil; Cepa 4: Biosaf[®] cepa SC-47, Lesaffre Feed Additives, Lille, França;

As leveduras foram cultivadas em meio de cultura YPD (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de dextrose em 1 L de água destilada) em frascos de Erlenmeyer a 30 °C por 48 h em incubadora com agitação orbital a 200 rpm. Após esse processo, os cultivos foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos e os *pellets* contendo as células de levedura foram lavados 3 vezes com solução de 84% tampão fosfato-salino (PBS: 8 g NaCl, 1,2 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl em 1 L de H₂O, pH 7,4), 15% álcool etílico e 1% ácido acético, centrifugados e submetidos ao processo de liofilização. Uma alíquota de 10 mg de cada cultivo de levedura foi ressuscitado em 10 mL de PBS. O total de células por unidade de volume foi estimado através da câmara de Neubauer (UFC.mL⁻¹).

2.4 Preparo das Soluções Tampão em pH 2 e 6,8

Uma alíquota de cada cultivo de levedura foi ressuscitado em solução tampão a pH 2 (50 mL de cloreto de potássio 0,2 mol.L⁻¹ e 13 mL de ácido clorídrico 0,2 mol.L⁻¹ em 250 mL de água destilada) (Pereyra et al., 2012) e em solução tampão a pH 6,8 (51 mL de fosfato de sódio dihidrogênio 0,2 mol.L⁻¹ e 49 mL de fosfato de sódio bibásico heptahidratado 0,2 mol.L⁻¹ em 200 mL de água destilada) (Stoll; Blanchard, 1990) de forma a se obterem concentrações de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL⁻¹.

2.5 Capacidade de Adsorção *in vitro*

Foi utilizada a metodologia descrita por Bueno et al. (2007) e Pereyra et al. (2012). Uma alíquota de 500 µL de solução de levedura foi adicionada em cada microtubo contendo 500 µL de solução tampão com 10 µg.mL⁻¹ de FB₁. Além disso, foi incluído o teste de controle negativo (solução tampão pH 2,0 e pH 6,8 com FB₁ e sem levedura). Os microtubos foram mantidos a 39 °C com agitação mecânica por 1 h e em seguida centrifugados a 5000 rpm por 15 min. O sobrenadante contendo a FB₁ não adsorvida foi coletado e armazenado a

-20 °C. As amostras armazenadas foram posteriormente submetidas à análise por cromatografia líquida de alta precisão (CLAE).

A quantidade de FB₁ adsorvida foi calculada através da diferença entre a toxina do tubo controle e a toxina residual em solução (µg.mL⁻¹). A percentagem de FB₁ nas amostras foi calculada de acordo a seguinte equação (Bueno et al., 2007):

$\text{Toxina}_{\text{ads}} (\%) = [1 - (\text{Toxina}_{\text{res}}/\text{Toxina}_{\text{c}})] \times 100$, sendo $\text{Toxina}_{\text{ads}}$ = quantidade de toxina adsorvida em %, Toxina_{c} = concentração da toxina em solução do controle (µg.mL⁻¹) e $\text{Toxina}_{\text{res}}$ = concentração de toxina residual (µg.mL⁻¹).

2.6 Análise de Micotoxina FB₁

As amostras do sobrenadante contendo as fumonisinas não adsorvidas foram submetidas à análise por CLAE com detecção por fluorescência. As fumonisinas foram submetidas a um processo de derivatização, que foi realizado com orto-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA em 1 mL de metanol, 5 mL de sódio tetraborato a 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol) (Sanchis et al., 1995). Misturou-se 150 µL de amostra com 150 µL de solução de OPA, mantendo-se em repouso à temperatura ambiente durante 2 min e em seguida procedeu-se à sua injeção no CLAE.

Para a detecção e quantificação por CLAE, foi utilizada uma fase móvel composta por metanol e fosfato de sódio dihidrogênio 0,1 M (77:23, v/v) com pH corrigido para 3,35 com ácido orto-fosfórico. Foi utilizada uma coluna C18 YMC-Pack ODS-AQ (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) e um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Os parâmetros do detector de fluorescência foram Ex: 335 nm, Em: 440 nm e *gain*: 100. Foram elaboradas curvas de calibração utilizando padrões de FB₁ (1, 5 e 10 µg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich), de modo que o sinal lido pelo detector seja transposto para unidades de concentração na amostra.

2.7 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados usando o programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (2003). Os dados foram submetidos à análise de regressão em função da concentração de levedura e cepas de levedura (P<0,05). As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls (SNK) a 5% de significância.

3 RESULTADOS

No presente estudo, todas as cepas de *S. cerevisiae* avaliadas foram capazes de remover FB₁ da solução, tanto em pH ácido (2,0) como neutro (6,8). Além disso, foi observada interação significativa entre as concentrações de levedura e cepas de levedura (P<0,001) (Tabelas 1 e 2).

Em relação às concentrações de levedura, observou-se diferença entre as cepas nas concentrações mais elevadas de 0,5x10⁹ e 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ (Tabela 1). Contudo, nas concentrações de 1x10⁷, 5x10⁷ e 1x10⁸ UFC.mL⁻¹ as diferenças não foram observadas (P>0,05). As maiores reduções de FB₁ foram observadas na concentração mais elevada de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹, sendo que a cepa 4 removeu maior quantidade de FB₁ da solução, seguida pela cepa 1, 3 e 2, nos valores de 2,64, 2,37, 1,56 e 1,19 UFC.mL⁻¹, respectivamente. Sob condição ácida, o percentual de FB₁ adsorvida aumentou gradualmente com o aumento da concentração do microrganismo, variando entre 0,9 a 35,3% (Cepa 1), de 2,5 a 17,7% (Cepa 2), de 1,5 a 23,3% (Cepa 3) e de 2,2 a 39,4% (Cepa 4).

Tabela 1. Quantidade ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e percentual (%) de FB_1 adsorvida pelas quatro cepas de *S. cerevisiae* (1, 2, 3 e 4) avaliadas em cinco diferentes concentrações (1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL⁻¹), em solução tampão com pH 2.

<i>S. cerevisiae</i> ¹	Concentração de <i>S. cerevisiae</i> (UFC.mL ⁻¹)										Valor de P	
	1×10^7		5×10^7		1×10^8		5×10^8		1×10^9		L ²	Q ²
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%		
Cepa 1	0,90 ^A	0,9	0,29 ^A	4,3	0,52 ^D	7,7	1,62 ^D	24,1	2,37 ^C	35,3	<0,001	<0,001
Cepa 2	0,17 ^A	2,5	0,38 ^A	5,7	0,51 ^C	7,6	0,85 ^C	12,6	1,19 ^C	17,7	<0,001	0,0362
Cepa 3	1,50 ^A	1,5	0,32 ^A	4,7	0,57 ^A	8,6	1,17 ^B	17,5	1,56 ^B	23,3	<0,001	0,0014
Cepa 4	2,20 ^A	2,2	0,36 ^A	5,4	0,54 ^B	8,0	1,68 ^A	25,1	2,64 ^A	39,4	<0,001	0,0140

^{A,B} Letras diferentes seguidas na coluna diferem pelo teste de SNK a 5%

¹ Cepa 1: Procreatin 7; Cepa 2: cepa LL08; Cepa 3: Levucell[®] cepa CNCM I-1077; Cepa 4: Biosaf[®] cepa SC-47.

² Regressão linear (L) e quadrática (Q) em função das concentrações de levedura

Na solução em pH 6,8, observou-se diferença entre as cepas nas concentrações de 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL⁻¹ de *S. cerevisiae*, porém não houve efeito em relação as concentrações inferiores de 1×10^7 e 5×10^7 UFC.mL⁻¹ (Tabela 2). Tal como ocorreu em pH 2, na concentração de 1×10^9 UFC.mL⁻¹ a cepa 4 apresentou maior habilidade em adsorver FB_1 quando comparada com as demais cepas analisadas com valor de $2,74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em relação a $1,79 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (cepa 3), $1,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (cepa 2) e $1,14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (cepa 1). Nesta concentração, o valor percentual de FB_1 adsorvida para as cepas 1, 2 e 3 foi de 15,6%, 15,7% e 24,5%, respectivamente, enquanto que com a cepa 4 foi de 37,5%, similar ao resultado obtido em pH 2 de 39,4%.

Tabela 2. Quantidade ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e percentual (%) de FB_1 adsorvida pelas quatro cepas de *S. cerevisiae* (1, 2, 3 e 4) avaliadas em cinco diferentes concentrações (1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 UFC.mL⁻¹), em solução tampão com pH 6,8.

<i>S. cerevisiae</i> ¹	Concentração de <i>S. cerevisiae</i> (UFC.mL ⁻¹)										Valor de P	
	1×10^7		5×10^7		1×10^8		5×10^8		1×10^9		L ²	Q ²
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%		
Cepa 1	0,05 ^A	0,6	0,20 ^A	2,8	0,31 ^D	4,2	0,70 ^D	8,6	1,14 ^C	15,6	<0,001	0,125
Cepa 2	0,10 ^A	1,4	0,26 ^A	3,6	0,50 ^C	6,9	1,01 ^C	13,9	1,15 ^C	15,7	<0,001	<0,001
Cepa 3	0,01 ^A	0,2	0,12 ^A	1,6	1,10 ^A	8,9	1,39 ^B	19,1	1,79 ^B	24,5	<0,001	<0,001
Cepa 4	0,10 ^A	1,3	0,29 ^A	4,0	0,91 ^B	12,5	2,02 ^A	27,7	2,74 ^A	37,5	<0,001	<0,001

^{A,B} Letras diferentes seguidas na coluna diferem pelo teste de SNK a 5%

¹ Cepa 1: Procreatin 7; Cepa 2: cepa LL08; Cepa 3: Levucell[®] cepa CNCM I-1077; Cepa 4: Biosaf[®] cepa SC-47.

² Regressão linear (L) e quadrática (Q) em função das concentrações de levedura

Com o aumento da concentração de células de *S. cerevisiae* foi observado aumento na quantidade de FB_1 removida da solução, porém sem ocorrer saturação dentro da amplitude avaliada. Dessa forma optou-se por realizar o ajuste de modelo linear para as quatro cepas em função das concentrações em células/mL, tanto em pH 2 e 6,8 (Figuras 1 e 2). Além disso, observando-se o coeficiente angular da reta (β) das equações das diferentes cepas, pode-se observar que em pH 2 as cepas 1 e 4 apresentam valores semelhantes, sendo aproximadamente duas vezes maiores do que as cepas 2 e 3. Em pH 6,8 a cepa 4 apresentou valor de β três vezes superior as cepas 1 e 2 e uma vez e meia acima da cepa 3.

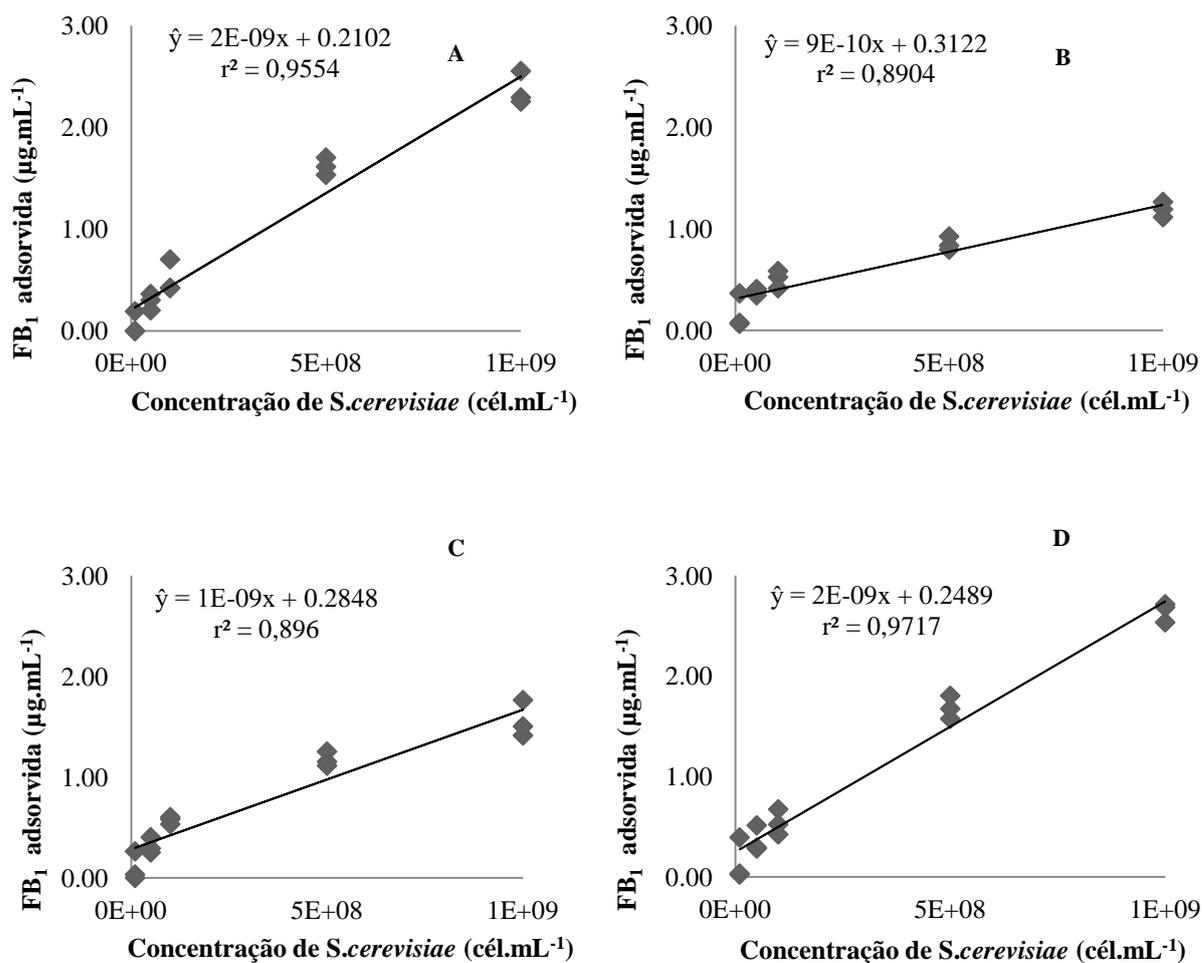


Figura 1. Efeito da concentração de *S. cerevisiae* na adsorção de fumonisina B₁ e equação de regressão linear para as cepas 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D), em pH 2.

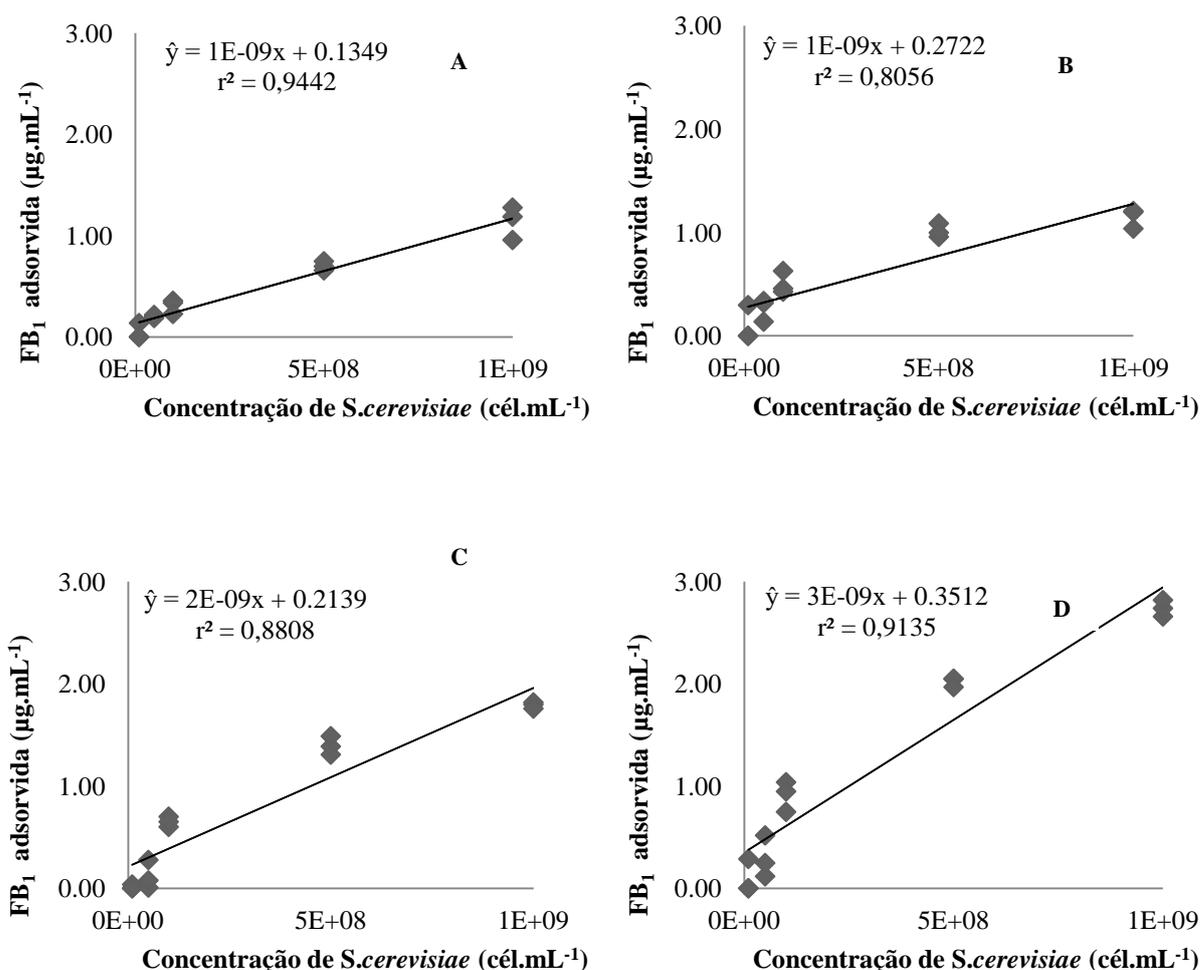


Figura 2. Efeito da concentração de *S. cerevisiae* na adsorção de fumonisina B₁ e equação de regressão linear para as cepas 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D), em pH 6,8.

4 DISCUSSÃO

A eficiência de microrganismos, tais como leveduras e bactérias ácido-láticas, em ligar-se à FB₁ dependem mais de um fenômeno quantitativo (existência de ampla área de superfície e de sítios de ligação) do que de um fenômeno qualitativo (estrutura química envolvida na interação) (Pizzolitto et al., 2012). Esse mecanismo ocorre na estrutura da parede celular dos microrganismos e assemelha-se ao observado com micotoxinas como a zearalenona (ZEA), ocratoxina (OTA) e aflatoxina B₁ (Yannikouris et al., 2003, 2004a,b; Shetty; Jespersen, 2006; Bueno et al., 2007; Armando et al., 2011, 2012, 2013).

Shetty e Jespersen (2006) relataram a capacidade de *S. cerevisiae* e *Candida krusei* em se ligarem a mais de 60% da quantidade total de AFB₁ presente em meio tampão fosfato-salino. Em estudo comparando BALs com *S. cerevisiae*, foi demonstrado que a *S. cerevisiae* foi mais eficiente na adsorção de AFB₁ e apresentaram 100 a 1000 vezes maior quantidade de sítios de ligação em comparação as BAL (Bueno et al., 2007). Nesse sentido, observa-se que diferentes cepas de *S. cerevisiae* são eficientes na remoção de toxinas e, portanto, podem ser

utilizadas na indústria como aditivos antimicotoxina, sem efeitos prejudiciais ao animal e humano.

No intervalo de concentrações estudado, para ambos os valores de pH 2 e 6,8, observou-se ajuste linear positivo para a interação FB_1 -*Saccharomyces cerevisiae* com o aumento das concentrações ($UFC.mL^{-1}$) sem ocorrer transição para platô e saturação. Esses resultados estão de acordo com Shetty et al. (2007) que também não observaram saturação na remoção de AFB_1 por *S. cerevisiae*, relacionando com a alta eficiência das cepas utilizadas. Bueno et al. (2007) descreveram comportamento linear em relação a baixo valor de AFB_1 ($5 \mu g.mL^{-1}$) e ausência de saturação variando as concentrações de *S. cerevisiae* em $10^7 UFC.mL^{-1}$. Lee et al. (2003) descreveram relação linear na adsorção de AFB_1 , sendo a quantidade de toxina utilizada o fator limitante perante número de sítios de ligação na superfície do microrganismo indefinidos. Por outro lado, autores descrevem que mesmo havendo o aumento da quantidade de células no meio e consequente aumento na toxina adsorvida, a remoção total da toxina nunca ocorre devido ao processo alcançar um equilíbrio entre toxinas adsorvidas (sítios de ligação ocupados) e toxinas livres (sítios livres) (Bueno et al., 2007; Pizzolito et al., 2011, 2012).

Em estudo recente realizado por Pizzolito et al. (2012) utilizando cepa de *S. cerevisiae* (CECT 1891), observaram que a eliminação de FB_1 no meio foi altamente dependente da concentração de microrganismo, sendo essa relação linear em baixas concentrações com transição para um platô com o aumento da concentração de células. Esses autores obtiveram aproximadamente 95% de remoção de FB_1 na concentração de $1 \times 10^9 UFC.mL^{-1}$. Embora as concentrações de microrganismo utilizadas sejam similares entre os trabalhos, a remoção de FB_1 máxima observada no presente estudo foi de 39,4% em pH 2 e de 37,5% em pH 6,8 na concentração de $1 \times 10^9 UFC.mL^{-1}$, com a cepa 4.

Na concentração mínima de células de *S. cerevisiae* ($1 \times 10^7 UFC.mL^{-1}$) a quantidade de FB_1 adsorvida foi inferior a 2,5% em ambas as condições de pH. Esses resultados são discrepantes ao estudo de Pizzolito et al. (2012) que quantificaram 50% de FB_1 removida na quantidade mínima de $1 \times 10^7 UFC.mL^{-1}$ e Armando et al. (2013) que encontraram redução de 43% de FB_1 da solução para a quantidade de $5 \mu g.mL^{-1}$ ao utilizarem a cepa de *S. cerevisiae* RC016. Esses resultados ressaltam que a interação é cepa-dependente e que a composição da parede celular e o número de sítios de ligação livres podem determinar a quantidade de toxina removida.

Conforme descrito em Jouany et al. (2005), a estrutura da parede celular é dinâmica e pode ser modulada de acordo as estirpes de levedura, condições de cultivo, pH, temperatura, taxa de oxigenação e concentração no meio. É constituída por cerca de 80-90% de polissacarídeos, sendo os principais compostos em ordem: β -D-glucanos (camada interna) e mananos (camada externa). Nesse aspecto, o mecanismo de ação das *S. cerevisiae* ocorre pela interação com a parede celular, através das cadeias de β -D-glucanos que possuem alta afinidade para micotoxinas, sendo caracterizado como o principal composto na formação do complexo adsorvente (Yannikouris et al., 2003, 2004a,b, 2006). Contudo, esses autores destacam que além da composição da parede celular, a transição de pH é capaz de provocar mudanças na estrutura tridimensional da molécula que estão relacionados ao tipo de ligação química envolvida, promovendo respostas diferentes de adsorção.

Yannikouris et al. (2006) observaram que os extratos de β -D-glucanos de quatro cepas de *S. cerevisiae* adsorveram quantidades diferentes de toxina e o fato foi atribuído a variação na composição específica de frações alcalinas solúveis e insolúveis de cada cepa. Além disso, observaram que a afinidade com os adsorventes para a AFB_1 e OTA foi alta em pH 6, similar em pH 3 e 6 para a deoxinivalenol (DON) e ausente em pH 8 para essas micotoxinas, porém eficiente para a patulina (PAT) (Yannikouris et al., 2006). Para ZEA, as condições ácidas e

neutras demonstraram excelentes taxas de afinidade, decrescendo em pH alcalino (Yannikouris et al., 2004a).

Informações como estas, referente às FB₁ sob diferentes condições de pH são escassas e/ou inexistentes. Nos trabalhos que avaliaram adsorção de FB₁ *in vitro*, o processo foi realizado em única condição de solução fosfato-salino sob pH 7,4 (Pizzolitto et al., 2012) e pH 7,3 (Armando et al., 2013). E conforme descrito previamente, às respostas obtidas por esses autores em relação às quantidades de FB₁ adsorvida em concentrações similares de células de microrganismos foram discrepantes ao atual estudo.

Nesse sentido, em relação à interação de FB₁-*Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que os valores em cada concentração de levedura para as cepas 2, 3 e 4 foram similares em condições ácida (pH 2) e neutra (pH 6,8). Apenas a cepa 1 em pH 6,8 apresentou valores inferiores de adsorção com uma taxa aproximada de redução de 50% em relação ao pH 2, na maioria das concentrações. A cepa 4 nas condições de acidez e neutralidade demonstrou maior capacidade de adsorção de FB₁ em meio líquido, com o aumento crescente da quantidade de células do microrganismo.

Esse fato pode ser observado pela diferença no coeficiente angular da reta (β), onde quanto menor a inclinação da reta, menor a eficiência na resposta. A cepa 4 apresentou alta inclinação da curva em relação as demais cepas avaliadas, mesmo após transição de pH, mostrando um potencial crescente na remoção de FB₁ com o aumento da concentração de microrganismos (UFC.mL⁻¹). Em pH 2, as cepas 2 e 3 tiveram os menores coeficientes angulares. A cepa 1 embora tenha apresentado valor similar à cepa 4 em condição ácida, em pH neutro o valor de β observado foi reduzido pela metade, sugerindo que o complexo adsorvente formado não se mantém estável a esse pH. Em pH 6,8, as cepas 1 e 2 foram menos eficiente em relação a cepa 3, que por sua vez demonstrou menos eficiência à cepa 4. Com esses resultados é possível inferir que a boa capacidade em adsorver FB₁ tanto em pH ácido e neutro depende da cepa utilizada.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em foi realizado pode-se observar que a capacidade de adsorção *in vitro* de FB₁ pela *S. cerevisiae* é cepa-dependente. A variação no pH de ácido para neutro promove redução na quantidade de FB₁ adsorvida dependendo da cepa utilizada. A cepa de levedura SC-47 pode ser utilizada como aditivo antimicotoxina em dieta de equinos devido sua estabilidade e habilidade m adsorver a FB₁ em condições ácidas e neutras. Contudo, mais estudos envolvendo a FB₁ e diferentes cepas, bem como, variando as concentrações do microrganismo e toxina deve ser realizado para obter maiores informações. A avaliação da estrutura da parede celular de diferentes cepas em diferentes condições de pH podem melhor elucidar o mecanismo de ação sobre a interação FB₁-*Saccharomyces cerevisiae*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMANDO, M.R.; DOGI, C.A.; PIZZOLITTO, R.P.; ESCOBAR, F. PEIRANO, M.S.; SALVANO, M.A. SABINI, L.I.; COMBINA, M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.

- ARMANDO, M.R.; GALVAGNO, M.A.; DOGI, C.A.; CERRUTTI, P.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Statistical optimization of culture conditions for biomass production of probiotic gut-borne *Saccharomyces cerevisiae* strain able to reduce fumonisin B₁. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.1338-1346, 2013.
- ARMANDO, M.R.; PIZZOLITTO, R.P.; DOGI, C.A.; CRISTOFOLINI, A.; MERKIS, C.; POLONI, V.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p.256-264, 2012.
- BUENO, D.; CASALE, C.; PIZZOLITTO, R.; SALVANO, M.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2148-2154, 2007.
- CALONI, F.; CORTINOVIS, C. Effects of fusariotoxins in the equine species. **Veterinary Journal**, v.186, n.2, p.157-61, 2010.
- EL-NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. **Journal of Food Protection**, v.61, p.466–468, 1998.
- EL-NEZAMI, H.; POLYCHRONAKI, N.; SALMINEN, S.; MYKKANEN, H. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3545-3549, 2002a.
- EL-NEZAMI, H.S.; CHREVATIDIS, A.; AURIOLA, S.; SALMINEN, S.; MYKKANEN, H. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.680-686, 2002b.
- FRUHAUF, S.; SCHWARTZ, H.; OTTNER, F.; KRŠKA, R.; VEKIRU, E. Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B₁ and zearalenone. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 29, n. 2, p. 217-231, 2012.
- GRATZ, S.; MYKKANEN, H.; OUWEHAND, A.C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B₁ *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6306-6308, 2004.
- GUSILS, C.; BUJAZHA, M.; GONZÁLEZ, S. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. **Interciencia**, v. 27, n. 8, p. 409-413, 2002.
- HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, n.3, p.217-221, 1990.
- 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**, 67, 3086–3091, 2001.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Chemico-Biological Interactions**, v.128, p.39-49, 2000.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A., GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1064-1068, 2009.

- HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, n.2, p.179-188, 2001.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Herbal Medicines, some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. **International Agency for Research on Cancer**, v.82, p.301-366, 2002.
- JOUANY, J.P.; YIANNINKOURIS, A.; BERTIN, G. How yeast cell wall components can alleviate micotoxicosis in animal production and improve the safety of edible animal products. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.14, suppl.1, p.171-191, 2005.
- KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.Y.; JESPERSEN, L. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, n.1, p.29-39, 2004.
- LEE, Y., EL-NEZAMI, H., HASKARD, C., GRATZ, S., PUONG, K., SALMINEN, S.; MYKKÄNEN, H. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.426-430, 2003.
- NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.849-856, 2006.
- NIDERKORN, V.; MORGAVI, D.P.; PUJOS, E.; TISSANDIER, A.; BOUDRA, H. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins *in vitro* simulated corn silage model. **Food Additives and Contaminants**, v.24, p.406-415, 2007.
- PEREYRA, C.M.; CAVAGLIERI, L.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A. The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B₁ and zearalenone by yeast cell wall. **Journal of Applied Microbiology**. v.114, p.655-662, 2012.
- PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p.184-92, 2000.
- PIZZOLITTO R.P.; BUENO D.J.; ARMANDO M.R.; CAVAGLIERI L.; DALCERO A.M.; SALVANO M.A. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Intech Open Access Publisher**, p.1-20, 2011.
- PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M.; Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v.4156, p.214-221, 2012.
- SANCHIS, V.; ABADIAS, M.; ONCINS, L.; SALA, N.; VINAS, I.; CANELA, R. Fumonisin B₁ and B₂ and Toxigenic *Fusarium* Strains in Feeds from the Spanish Market. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.37-44. 1995.
- SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p.48-55, 2006.
- STOLL, V.; BLANCHARD, J.S. Buffers: principles and practice. In: DEUSTSCHER, M.P. (ed.). **Methods in Enzymology. Volume 182. Guide to protein purification**, 1990, California. Academic Press, Inc., 1990, p.24-38.
- VOSS, K.A.; SMITH, G.W.; HASCHEK, W.M. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.299-325, 2007.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties towards Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.11, p.3666-3673, 2004b.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Influence of pH on complexing of model beta-d-glucans with zearalenone. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2741-2746, 2004a.

YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C.G.; FRANCOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J.P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v.25, n.10, p.783-789, 2003.

YIANNIKOURIS, A.; ANDRÉ, G.; POUGHON, L.; FRANÇOIS, J.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.P. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1147-1155, 2006.

ZACHARIASOVA. M.; DZUMAN, Z.; VEPRIKOVA, Z.; HAJKOVA, K.; JIRU, M.; VACLAVIKOVA, M.; POSPICALOVA, M.; FLORIAN, M.; HAJSLOVA, J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.193, p. 124-140, 2014.

CAPÍTULO II

DIGESTÃO *IN VITRO* DE MILHO CONTAMINADO COM FUMONISINA B₁ COM ADIÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

Avaliou-se a influência da FB₁ na digestão dos nutrientes do milho contaminado com a micotoxina e verificou-se se as reações enzimáticas e o pH influenciam na biodisponibilidade da FB₁ e na capacidade adsorvente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 em ensaios de digestão *in vitro*. Foram conduzidos dois ensaios. No ensaio I foi realizada a digestão *in vitro* com milho artificialmente contaminado com 5 µg.mL⁻¹ de FB₁. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (milho, milho+FB₁, milho+FB₁+SC, FB₁ e FB₁+SC) e cinco repetições. No ensaio II foi realizada a digestão *in vitro* com duas amostras de milho naturalmente contaminado com FB₁. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, sendo os tratamentos compostos por Milho A (3,23 µg.g⁻¹ de FB₁) e Milho B (29,01 µg.g⁻¹ de FB₁), com e sem adição de *S. cerevisiae* SC-47 (1x10⁹ UFC.mL⁻¹) e cinco repetições. Foi utilizada a técnica de digestão *in vitro*, dividida em duas fases: digestão ácida (pH 2) e digestão sequencial ácida+neutra (pH 6,8). As amostras de milho *in natura* e os tratamentos do ensaio I (milho, milho+FB₁ e milho+FB₁+SC) foram submetidos à análise bromatológica (MS, PB, FDN, amido e MO) para estimativa da digestão dos nutrientes. O conteúdo de FB₁ da solução e resíduo após digestão foi quantificado em CLAE. Os resultados foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados pelo teste de SNK (P<0,05). Foram observadas diferenças na digestão de MS, amido e MO, com aumento de 3% em pH 2 e de 4% em pH 6,8 para milho+FB₁+SC sobre os demais tratamentos, que não diferiram entre si. Além disso, em pH 6,8 a digestão da PB foi 8% superior nos milhos contaminados com FB₁. A quantidade de FB₁ recuperada após digestão em pH ácido e neutro foi superior nos tratamentos sem milho (FB₁ e FB₁+SC) em relação ao milho contaminado sem e com inclusão de *S. cerevisiae* (milho e milho+SC). Houve redução de 18% e 8% de FB₁ em solução com milho+SC e 10% e 8% com FB₁+SC, respectivamente em pH 2 e 6,8. No ensaio II, o efeito da adição de *S. cerevisiae* foi observado no substrato de milho B com redução de 14% em pH 2,0 e 9% em pH 6,8. A recuperação de FB₁ no resíduo em todas as amostras de milho contaminado foi baixa, inferior a 9%. A presença de FB₁ e *S. cerevisiae* não demonstra influenciar na digestão dos nutrientes. A *S. cerevisiae* apresentou habilidade em remover FB₁ em concentrações mais elevadas em ambas as condições de pH, podendo ser utilizada como aditivo antimicotoxina na alimentação de equinos.

Palavras-chave: digestão enzimática, micotoxina, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Was evaluated the influence of FB₁ in the digestion of nutrients from corn contaminated with mycotoxin, the enzymatic reactions and pH influence in the bioavailability of FB₁ and the adsorbent capacity of *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 by *in vitro* digestion assay. Two experiments were conducted. The trial I was conducted the *in vitro* digestion of corn artificially contaminated with 5 µg.mL⁻¹ of FB₁. The design was completely randomized with five treatments (corn, corn+FB₁, corn+FB₁+SC, FB₁ and FB₁+ SC) and five repetitions. In trial II *in vitro* digestion was performed with two samples of corn naturally contaminated with FB₁. The design was completely randomized in a 2x2 factorial design, with treatments consisting of Corn A (3.23 µg.g⁻¹ FB₁) and Corn B (29.01 µg.g⁻¹ FB₁) with and without the addition of *S. cerevisiae* SC-47 (1x10⁹ CFU.mL⁻¹) and five replications. *In vitro* digestion technique was used divided into two stages: acid digestion (pH 2) and acidic neutral+sequential digestion (pH 6.8). The corn samples *in natura* and treatments of trial I (corn, corn+FB₁ and corn+FB₁+SC) were submitted to chemical analysis (DM, CP, aNDFom, starch and OM) to estimate the digestion of nutrients. The FB₁ in solution and residue after digestion was quantified by HPLC. The results were submitted to variance analysis and the averages compared by SNK test (P<0.05). Differences were observed in DM, starch and OM digestion with an increase of 3% at pH 2 and 4% at pH 6.8 for corn+FB₁+SC in relation to the other treatments, which did not differ each other. Furthermore, at pH 6.8 the CP digestion was 8% higher to corn contaminated with FB₁. The amount of FB₁ recovered after acidic and neutral digestion was higher in the treatments without corn (FB₁ and FB₁+SC) rather than corn contaminated with or without inclusion of *S. cerevisiae* (corn+FB₁ and corn+FB₁+SC). There was reduction of 18% and 8% FB₁ in solution with corn+SC and 10% and 8% FB₁+SC, respectively at pH 2 and 6.8. In trial II, the effect of the addition of *S. cerevisiae* was observed only in corn B with reduction of 14% at pH 2.0 and 9% at pH 6.8. The recovery FB₁ at residue in all contaminated corn samples was low, less than 9%. The presence of FB₁ and *S. cerevisiae* shows not influence the digestion of nutrients. The *S. cerevisiae* showed ability to remove FB₁ to higher FB₁ concentrations at both pH conditions, can be used as anti-mycotoxin additive in the horse nutrition.

Keywords: enzymatic digestion, mycotoxin, *Saccharomyces cerevisiae*

1 INTRODUÇÃO

As fumonisinas (FB) são um grupo de toxinas hidrofílicas produzidas através do metabolismo secundário de fungos filamentosos por espécies de *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*). Dentre os análogos de FB da série B, a fumonisina B₁ (FB₁) é a mais frequente e tóxica, representando cerca de 70% da contaminação natural de alimentos e rações (Yiannikouris; Jouany, 2002; Caloni; Cortinovis, 2010).

Em equinos, a FB₁ absorvida pode ocasionar grave intoxicação, com ação no sistema nervoso central, doença conhecida como Leucoencefalomalácia equina (LEME), associada à síndrome hepatotóxica, levando à morte (Voss et al., 2007; Caloni; Cortinovis, 2010). O consumo de grãos e/ou derivados de milho é a principal fonte contaminada com a toxina, especialmente em determinadas épocas do ano e regiões onde a escassez de forragem exige a suplementação destes animais com alimentos concentrados (Mallmann et al., 1999; Ragsdal; Debey, 2003; Câmara et al., 2008; Santos et al., 2013). A ingestão de 5 µg.g⁻¹ de FB₁ é suficiente em causar danos à saúde e mortalidade em equinos (Ross et al, 1991; Salles-Gomes et al., 2010).

Estratégias em reduzir a contaminação por micotoxinas envolvem práticas adequadas de agricultura no campo, na colheita, transporte e armazenamento em condições frescas e secas (Jouany, 2007). Contudo, a eliminação completa não é possível, sendo necessário alternativas para reduzir a biodisponibilidade das toxinas através de aditivos antimicotoxina (AAM) no sistema digestivo animal. Esses compostos devem ser atóxicos, com alta capacidade de adsorção, em baixas quantidades de inclusão, sem afetar os nutrientes da dieta e resistir às diferentes condições encontradas no trato digestório (Dawson et al., 2001; Fruhauf et al., 2012).

Uma alternativa promissora é o uso de microrganismos como AAM. Estudos *in vitro*, em meio líquido, demonstram que *Saccharomyces cerevisiae* (SC) são microrganismos eficazes em adsorver diferentes micotoxinas (Haskard et al., 2000, 2001; Lee et al., 2003; Shetty; Jespersen, 2006, 2007; Hernandez-Mendoza et al., 2009; Armando et al., 2011, 2012, 2013; Pizzolitto et al., 2011, 2012) e resistir às mudanças de pH e ação da bile (Kühle et al., 2005). O uso de *S. cerevisiae* envolve a redução da disponibilidade e absorção da toxina, com consequente aumento da eliminação através das fezes (Gratz et al., 2004; Bueno et al., 2007; Pizzolitto et al., 2012). O mecanismo de ação das SC em relação à FB₁ não é completamente elucidado, mas demonstra ser principalmente um processo físico, através de ligações não-covalentes com compostos da parede celular e ausência de metabolismo (Pizzolitto et al., 2012).

Embora a fumonisina B₁ seja a micotoxina de maior relevância descrita para equinos, os estudos publicados são baseados em relatos da doença em propriedades ou testes clínicos com diferentes dosagens da toxina. Efeitos relacionados ao impacto na digestão, bem como a ação de microrganismos adsorventes para eliminar ou reduzir a toxicidade da fumonisina B₁ nessa espécie, são raros ou ausentes. Os ensaios *in vitro* são técnicas eficazes em avaliar potenciais produtos adsorventes de toxina, permitindo explorar os mecanismos e condições favoráveis para a remoção dos compostos prévios aos estudos *in vivo* (Diaz; Smith, 2005). Além disso, ensaios *in vitro* permitem simular condições do sistema digestivo de diferentes espécies, uma vez que experimentos *in vivo* são difíceis de serem realizados devido aos danos à saúde do animal e o tempo necessário para avaliação.

O objetivo do presente estudo foi simular as condições do trato digestório dos equinos *in vitro* e avaliar a influência da micotoxina FB₁ na digestão dos nutrientes do milho, verificar se as reações enzimáticas e pH influenciam na biodisponibilidade da toxina e na capacidade

adsorvente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com milhos artificialmente e naturalmente contaminados com FB₁

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar (LCTA) da Universidade do Minho em Braga, Portugal

2.2 Cepa de levedura

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no presente estudo foi determinada através de ensaio prévio de adsorção *in vitro* de fumonisina B₁ em condições que simularam as condições orgânicas de pH e temperatura dos equinos (pH 2,0 e 6,8, à 39 °C) com quatro cepas: Cepa 1: Procreatin 7[®], Lesaffre Feed Aditivies, Lille, França; Cepa 2: cepa LL08, isolada do rúmen de bovino; Cepa 3: Levucell[®] cepa CNCM I-1077, Lallemand Animal Nutrition, Goiânia, Brasil; Cepa 4: Biosaf[®] cepa SC-47, Lesaffre Feed Aditivies, Lille, França. Uma alíquota de cada cultivo de levedura foi ressuspensão em solução tampão com 5 µg.mL⁻¹ de FB₁ a pH 2 (50 mL de cloreto de potássio 0.2 mol.L⁻¹ e 13 mL de ácido clorídrico 0.2 mol.L⁻¹ em 250 mL de água destilada) (Pereyra et al., 2012) e pH 6.8 (51 mL de fosfato de sódio dihidrogênio 0.2 mol.L⁻¹ e 49 mL de fosfato de sódio bibásico heptahidratado 0.2 mol.L⁻¹ em 200 mL de água destilada) (Stoll; Blanchard, 1990) de forma a obter concentrações de 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸, 5x10⁸ e 1x10⁹ UFC.mL⁻¹. Procedeu-se o ensaio de adsorção *in vitro* segundo metodologia descrita Bueno et al. (2007) e Pereyra et al. (2012) à 39 °C, por 1h em agitação. A cepa *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 na concentração de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ em ambas condições de pH ácido e neutro foi capaz de adsorver cerca de 38% da FB₁ em solução, superior as demais cepas avaliadas (Capítulo I), sendo selecionada para ser utilizada no presente estudo.

2.3. Delineamento Experimental

Foram conduzidos dois ensaios. O ensaio I: Digestão *in vitro* com milho artificialmente contaminado com FB₁ foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram: 1 - milho sem contaminação; 2 -milho com fumonisina B₁ (milho+FB₁); 3 - milho com fumonisina B₁ e *Saccharomyces cerevisiae* (milho+FB₁+SC); 4 - solução com fumonisina B₁ (FB₁); 5 - solução com fumonisina B₁ e *Saccharomyces cerevisiae* (FB₁+SC). A quantidade de FB₁ dos resíduos sólidos pós-digestão foram quantificados e comparados em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições, sendo os tratamentos: 1 - milho; 2 - milho+FB₁; 3 - milho+FB₁+SC. O tratamento solução com fumonisina B₁ (FB₁) foi utilizado como referência para o cálculo da quantidade de FB₁ detectada em solução e resíduo sólido. Neste ensaio foi utilizada amostra de milho moído em peneira de 1 mm e a contaminação artificial foi realizada na concentração de 5 µg.g⁻¹ de FB₁ (Sigma-Aldrich, Química, S.L., Sintra, Portugal).

O ensaio II: Digestão *in vitro* com duas amostras de milho naturalmente contaminados com FB₁ foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, sendo os tratamentos: Milho A - naturalmente contaminado com 3,23 µg.g⁻¹ de FB₁ e Milho B - naturalmente contaminado com 29,01 µg.g⁻¹ de FB₁, com e sem adição de levedura *S. cerevisiae* (milho A; milho A+SC; milho B; e milho B+SC), com cinco repetições em cada

tratamento. Os milhos A e B utilizados foram moídos em peneira de 0,5 mm. A composição química dos substratos de milho dos ensaios I e II está descritos na Tabela 1.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi a cepa SC-47 na concentração de 1×10^9 UFC.mL⁻¹.

Tabela 1. Composição química das amostras de substratos de milho.

Composição* (% MS)	Milho ¹	Milho A ²	Milho B ²
Matéria seca	82,9	92,9	95,1
Matéria orgânica	98,4	98,4	98,7
Matéria mineral	1,5	1,6	1,3
Proteína bruta	10,0	8,7	7,5
Fibra em detergente neutro	14,8	7,6	8,4
Amido	87,5	73,4	78,2

¹ Milho isento de contaminação utilizado no ensaio I.

² Milho A: naturalmente contaminado com $3,23 \mu\text{g.g}^{-1}$ de FB₁; Milho B: naturalmente contaminado com $29,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ de FB₁; utilizados no ensaio II.

2.4 Procedimento Experimental

Foi utilizada a técnica de digestão *in vitro* modificada da metodologia descrita por Abdouli e Ben Attia (2007). Para a contaminação artificial do milho foi adicionado 1 mL de solução com metanol contendo 5 μg de FB₁ para cada 1 g de milho. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 40 °C por 6 h. Foram inseridos 5 g de amostra de milho por frasco, em ambos os ensaios I e II.

Foram preparadas soluções digestivas: Solução digestiva com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de pepsina em solução de HCl a 0,1 N com pH ajustado para 2,0 à 39 °C; Solução digestiva com pancreatina: solução-tampão fosfato a 0,1 M (51% fosfato monobásico 0,2 M, 49% fosfato dibásico 0,2 M), acrescido de 20 g.L^{-1} de pancreatina com pH ajustado para 6,8 à 39 °C. A digestão contendo α -amilase foi realizada de acordo as indicações de atividade enzimática de 3000 U.g^{-1} de substrato sugerida por Richards et al. (2003), sendo utilizada pancreatina (Pancreatina NF, 75 U amilase, 6 U lipase, 75 U protease, Sigma Aldrich).

Para a digestão ácida, adicionou-se 40 mL de solução com pepsina para cada 1 g de matéria seca (MS) de amostra, em Erlenmeyers de 1 litro. Em seguida, os Erlenmeyers foram mantidos em banho-maria por duas horas a 39 °C. Realizou-se uma homogeneização manual a cada hora. Para a digestão sequencial (pH 6,8), após o processo de digestão ácida, adicionou-se 2 mL de solução tampão fosfato com pancreatina para cada 1 g de amostra. Ajustou-se o pH da solução para 6,8 com solução de NaOH a 1M. O procedimento continuou por quatro horas, mantendo a frequência de homogeneização. Ao final do tempo de cada digestão *in vitro* (ácida e ácida+neutra), retirou-se uma alíquota de 20 mL do sobrenadante para posterior extração da FB₁ e análise em CLAE. Para o ensaio I, o resíduo sólido foi filtrado em tecido de náilon com 45 μm de porosidade, onde foram colocados em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h e armazenados a -20 °C para posterior extração, quantificação de FB₁ em CLAE e análises bromatológicas.

2.5 Análises Bromatológicas

Foram realizadas análises nas amostras de milhos *in natura* e dos resíduos da digestão *in vitro* do ensaio I. Foi realizada a determinação dos percentuais de matéria seca (MS) através da estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h, matéria mineral (MM) e matéria orgânica (MO) após a queima em mufla (550 °C por 6 h), e proteína bruta (PB) com base no

teor de nitrogênio utilizando o método micro-Kjeldahl (AOAC, 1990). As análises da fibra em detergente neutro analisados com amilase termoestável e expressos exclusivo de cinzas residuais (aFDN_{mo}) foram realizadas segundo Robertson e Van Soest (1981) e Van Soest et al. (1991).

2.6. Análise de Micotoxina FB₁

As amostras coletadas da solução e resíduo dos ensaios I e II foram submetidas à análise em CLAE. As amostras de milho *in natura* e dos resíduos da digestão enzimática do ensaio I foram inicialmente submetidas à extração utilizando o método de Sydenham et al. (1996). Uma alíquota (5 g) foi homogeneizada em 25 mL de metanol:água (3:1, v/v) durante 3 min, centrifugada a 5000 rpm por 15 min e 20 mL de sobrenadante foram submetidos à purificação através de coluna de troca aniônica SAX (HyperSepTM SAX Cartridges, Thermo ScientificTM) de acordo Sanchis et al. (1995).

Os 20 mL de solução de cada amostra foram filtrados em papel filtro de 0,45 µm e foi adicionado metanol na razão de 3:1 de volume de amostra. O pH das soluções foram ajustados em pH acima de 5,8 com solução de NaOH 1M. Cada coluna SAX foi previamente acondicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:H₂O (3:1, v/v) a um caudal de 1 mL.min⁻¹. Em seguida, foram inseridos 10 mL ou mais de amostra, mantendo caudal baixo de 1 a 2 gotas por segundo (1 mL.min⁻¹). Em seguida, lavou-se com 8 mL de metanol/H₂O (3:1, v/v) e 3 mL de metanol. Elui-se as FB₁ retida na coluna com 10 mL de solução metanol:ácido acético (99:1, v/v), evaporou-se o solvente com nitrogênio a 40 °C e ressuspendeu-se em 0,5 mL de metanol. As amostras foram acondicionadas em freezer -20 °C para posterior análise em CLAE.

Para a detecção e quantificação em HPLC, inicialmente as fumonisinas foram submetidas a um processo de derivatização, que foi realizado com orto-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA em 1 mL de metanol, 5 mL de sódio tetraborato a 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol) (Sanchis et al., 1995). Misturou-se 150 µL de amostra com 150 µL de solução de OPA, agitou-se, manteve-se em repouso à temperatura ambiente durante 2 min e em seguida injetou-se no CLAE.

Foi utilizada solução de fase móvel de metanol e fosfato de sódio di-hidrogênio 0,1 M (77:23, v/v) com pH corrigido para 3,35 com ácido orto-fosfórico. Foi utilizada uma coluna C18 YMC-Pack ODS-AQ (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) e detector de fluorescência a Ex: 335 nm e Em: 440 nm. Foram elaboradas curvas de calibração utilizando padrões para FB₁ (1, 5 e 10 µg.mL⁻¹), de modo que o sinal lido pelo detector fosse transposto para unidades de concentração na amostra.

2.7. Análises Estatísticas

Foi utilizado o programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (2003). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores médios comparados pelo teste de Student Newman Kews (SNK), a 5% de probabilidade. No ensaio II a concentração de toxina, levedura e sua interação foram incluídas no modelo e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Kews (SNK), a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1. Ensaio I

Não houve efeito na digestão da PB e aFDN_{mo}. Foram observadas diferenças na digestão da MS (P<0,01), Amido (P=0,005) e MO (P<0,01), sendo que o tratamento

milho+FB₁+SC apresentou valores superiores em relação ao milho e milho+FB₁, que não diferiram entre si. O tratamento milho+FB₁+SC teve aumento de aproximadamente 3% na digestão desses nutrientes (Tabela 2).

Tabela 2. Valores absolutos em percentual da digestão ácida *in vitro* (2 h) dos nutrientes dos substratos milho, milho+FB₁ e milho+FB₁+SC.

Nutrientes	Tratamentos (%)			EPM	P
	Milho	Milho+FB ₁ ¹	Milho+FB ₁ +SC ²		
Matéria seca	3,8±0,3 ^B	3,9±0,2 ^B	6,1±0,3 ^A	0,305	<0,001
Matéria orgânica	2,6±0,4 ^B	2,7±0,3 ^B	5,0±0,3 ^A	0,328	<0,001
Proteína bruta	34,5±3,3	36,8±4,8	36,4±3,2	1,043	ns
Fibra em detergente neutro	34,7±1,2	34,0±1,6	34,2±1,0	0,350	ns
Amido	10,2±1,6 ^B	9,8±1,5 ^B	13,5±0,7 ^A	0,587	0,005

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

¹ Milho artificialmente contaminado com 5 µg.g⁻¹ de FB₁.

² Milho artificialmente contaminado com 5 µg.g⁻¹ de FB₁, acrescido de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ de *S. cerevisiae*, cepa SC-47.

Na digestão neutra *in vitro* (pH 6,8), apenas não ocorreu diferença na digestão da aFDN_{mo} (Tabela 3). Na digestão da MS (P<0,01), amido (P=0,02) e MO (P=0,01), o maior valor observado foi com milho+FB₁+SC em comparação ao milho e milho+FB₁, que por sua vez, apresentaram resultados semelhantes. Além disso, ocorreu efeito na PB (P=0,028), sendo o valor do tratamento milho aproximadamente 8% inferior ao milho+FB₁ e milho+FB₁+SC.

Tabela 3. Valores absolutos em percentual da digestão sequencial *in vitro* (6 h) dos nutrientes dos substratos milho, milho+FB₁ e milho+FB₁+SC.

Nutrientes*	Tratamentos (%)			EPM	P
	Milho	Milho+FB ₁ ¹	Milho+FB ₁ +SC ²		
Matéria seca	39,0±2,5 ^B	39,8±0,5 ^B	43,9±0,2 ^A	0,693	<0,001
Matéria orgânica	38,5±2,5 ^B	39,4±0,5 ^B	43,5±0,3 ^A	0,704	0,001
Preteína bruta	50,3±2,7 ^B	58,7±3,6 ^A	58,3±2,6 ^A	1,001	0,028
Fibra em detergente neutro	33,3±0,8	34,1±2,2	35,1±0,2	0,395	0,192
Amido	45,7±3,0 ^B	47,6±1,2 ^B	51,2±2,7 ^A	0,859	0,020

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

¹ Milho artificialmente contaminado com 5 µg.g⁻¹ de FB₁.

² Milho artificialmente contaminado com 5 µg.g⁻¹ de FB₁, acrescido de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ de *S. cerevisiae*, cepa SC-47.

Houve diferença na quantidade de FB₁ recuperada em solução após digestão ácida (P<0,001) (Tabela 4). Não foi detectada FB₁ no milho isento de contaminação. O tratamento FB₁ apresentou o maior valor detectado de FB₁, seguido por FB₁+SC, milho+FB₁ e milho+FB₁+SC, na quantidade de 18,3, 16,9, 14,0 e 10,7 µg, respectivamente. Além disso, pode-se observar que houve influência do uso de *S. cerevisiae* na redução do teor de FB₁ em solução de 18% para o milho+FB₁+SC em comparação ao Milho+FB₁ e de 8% para FB₁+SC em relação a FB₁.

Tabela 4. Quantidade absoluta de FB₁ (µg) em solução após processo de digestão ácida *in vitro* do milho, milho+FB₁, milho+FB₁+SC, FB₁ e FB₁+SC.

Milho		Milho+FB ₁		Milho+FB ₁ +SC		FB ₁		FB ₁ +SC		P
(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	
0 ^E	0	14,0±0,3 ^C	77	10,7±0,9 ^D	59	18,3±1,0 ^A	100	16,9±0,9 ^B	92	<0,001

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

Nos resíduos sólidos após digestão ácida, o tratamento composto por milho+FB₁+SC apresentou maior quantidade de FB₁ em relação ao tratamento sem adição de levedura (P<0,001) (Tabela 5). O teor de 9% de FB₁ (milho+FB₁+SC) pode estar associado à presença do resíduo de levedura que permaneceu aderido ao resíduo de milho, após o processo de filtragem, visto que o tratamento sem adição de levedura (milho+FB₁) apresentou valor baixo, 1% de toxina detectada. A quantidade total recuperada de FB₁ em solução e resíduo sólido para os tratamentos com substrato de milho foram de 78% (milho+FB₁) e 71% (milho+FB₁+SC).

Tabela 5. Quantidade absoluta de FB₁ (µg) no resíduo sólido após processo de digestão ácida *in vitro* do milho, milho+FB₁ e milho+FB₁+SC.

Milho		Milho+FB ₁		Milho+FB ₁ +SC		P
(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	
0 ^C	0	0,3±0,1 ^B	1,5	2,2±0,3 ^A	12	<0,001

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

Houve efeito nos valores de FB₁ em solução após o processo de digestão neutra *in vitro* (P<0,001) (Tabela 6). O tratamento milho não apresentou valores detectáveis de FB₁, seguido pelos valores crescentes dos tratamentos milho+FB₁+SC, milho+FB₁, FB₁+SC e FB₁. Similar ao pH 2,0, houve diferença significativa entre os tratamentos com adição de levedura, sendo a redução de 8% para FB₁+SC em relação a FB₁ e de 10% para milho+FB₁+SC em comparação ao milho+FB₁.

Tabela 6. Quantidade absoluta de FB₁ (µg) em solução após processo de digestão sequencial *in vitro* do milho, milho+FB₁, milho+FB₁+SC, FB₁ e FB₁+SC.

Milho		Milho+FB ₁		Milho+FB ₁ +SC		FB ₁		FB ₁ +SC		P
(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	
0 ^D	0	14,2±1,3 ^B	61	12,0±1,2 ^C	51	23,3±1,6 ^A	100	21,4±1,5 ^A	92	<0,001

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

Em relação aos valores de FB₁ nos resíduos após digestão neutra (Tabela 7), embora tenha ocorrido efeito (P<0,001), não pode ser associado à inclusão da levedura, uma vez que o tratamento milho+FB₁+SC apresentou menor valor de toxina. Por outro lado, em ambos os tratamentos, assim como em pH ácido, os valores de FB₁ recuperados foram baixos, confirmando a característica hidrossolúvel da toxina. De acordo os resultados, a quantidade total detectada de FB₁ em solução e resíduo sólido foi de 64% e 52,5% para os tratamentos compostos por milho+FB₁ e milho+FB₁+SC, respectivamente.

Tabela 7. Quantidade absoluta de FB₁ (µg) no resíduo sólido após processo de digestão sequencial *in vitro* do milho, milho+FB1 e milho+FB1+SC, no resíduo.

Milho		Milho+FB1		Milho+FB1+SC		P
(µg)	%	(µg)	%	(µg)	%	
0 ^C	0	0,6±0,1 ^A	3	0,4±0,1 ^B	1,5	<0,001

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

3.2. Ensaio II

Houve interação significativa entre concentração e levedura ($P < 0,001$) para solução e resíduo após digestão ácida *in vitro* (Tabela 8). Em relação ao Milho A ($3,23 \mu\text{g.g}^{-1}$), os valores em solução de FB₁ não diferiram com a adição de *S. cerevisiae*. Contudo, os valores de FB₁ após extração no resíduo sólido foram elevados na presença de *S. cerevisiae* (Milho A+SC). Os valores observados foram de 1,64 e 2,07 µg de FB₁ para Milho A e Milho A+SC no resíduo sólido, respectivamente. No total, o valor de FB₁ detectado em solução e resíduo sólido foi equivalente a 90% e 81%, respectivamente.

Os resultados de substrato de Milho B ($29,01 \mu\text{g.g}^{-1}$) demonstraram efeito da adição de *S. cerevisiae*, com valores de 130,6 µg (Milho B) e de 110,3 µg (Milho B+SC). O acréscimo de *S. cerevisiae* promoveu adsorção de FB₁ em solução de 14%. No resíduo sólido de Milho B, foram observados valores não detectáveis de FB₁, enquanto que no tratamento Milho B+SC o valor foi de 1,6 µg. O total detectado de FB₁ em solução e resíduo sólido foi de 130,6 µg para Milho B sem levedura e de 111,9 µg no Milho B com *S. cerevisiae*, equivalentes a 90% e 77%, respectivamente.

Tabela 8. Valores médios de FB₁ (µg) após processo de digestão ácida *in vitro* do milho naturalmente contaminados com FB₁ ($3,21$ e $29,01 \mu\text{g.g}^{-1}$), com ou sem *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^9 UFC.mL⁻¹), em solução e no resíduo sólido.

	Solução				Resíduo			
	0	%	SC	%	0	%	SC	%
Milho A ¹	12,7±1,2 ^{Ab}	79	10,7±0,5 ^{Ab}	67	1,6±0,1 ^{Ff}	11	2,1±0,3 ^{Gf}	14
Milho B ¹	130,6±1,6 ^{Aa}	90	110,3±3,8 ^{Ba}	76	0 ^{Gg}	0	1,6±0,4 ^{Fg}	1

¹ Milho A = $3,21 \mu\text{g.g}^{-1}$, total de 16,05 µg por frasco; Milho B = $29,01 \mu\text{g.g}^{-1}$, total de 145,05 µg por frasco.

^{A,B,F,G} Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

^{a,b,f,g} Letras minúsculas diferentes seguidas na coluna diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

Houve interação entre concentração e levedura após digestão sequencial *in vitro* ($P < 0,001$) em solução e resíduo sólido (Tabela 9). Referente ao Milho A, não houve diferença com a adição de *S. cerevisiae*, sendo quantificado o total de 16,1 µg de FB₁ no Milho A e 13,1 µg de FB₁ no Milho A+SC. Não foram detectados valores de FB₁ no resíduo sólido de Milho A. No Milho A com *S. cerevisiae* o valor foi de 1,4 µg, sendo no total em solução e resíduo sólido detectados 14,5 µg equivalente a 89%.

No Milho B em solução foi observada diferença entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo o menor valor de FB₁ quantificada com a adição de *S. cerevisiae*. Os valores recuperados foram de 136,7 µg no Milho B e de 122,9 µg no Milho B+SC. A redução de FB₁ em solução foi de 9% com adição de *S. cerevisiae*. Contudo em relação aos valores obtidos no resíduo sólido, não houve diferença entre os tratamentos, sendo os valores de 1,0 e de 1,2 µg de FB₁, respectivamente para Milho B e Milho B+SC. No total, o valor de recuperação através da análise em CLAE foi de 137,7 µg para Milho B e de 124,2 µg de FB₁ no Milho B+SC, que equivalem a 95% e 86% respectivamente.

Tabela 9. Valores médios de FB₁ (µg) após processo de digestão sequencial *in vitro* do milho naturalmente contaminados com FB₁ (3,21 e 29,01 µg.g⁻¹), com ou sem *Saccharomyces cerevisiae* (1x10⁹ UFC.mL⁻¹), em solução e no resíduo sólido.

	Solução				Resíduo			
	0	%	SC	%	0	%	SC	%
Milho A ¹	16,1±0,1 ^{Ab}	100	13,1±1,3 ^{Ab}	81	0 ^{Gg}	0	1,4±0,1 ^{Ff}	8
Milho B ¹	136,7±4,4 ^{Aa}	94	122,9±2,8 ^{Ba}	85	1,0±0,3 ^{Gf}	1	1,2±0,2 ^{Gf}	1

¹ Milho A = 3,21 µg.g⁻¹, total de 16,05µg por frasco; Milho B = 29,01µg.g⁻¹, total de 145,05µg por frasco.

A,B,F,G Letras maiúsculas diferentes seguidas na linha diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

a,b,f,g Letras minúsculas diferentes seguidas na coluna diferem pelo teste de SNK a 5% de significância.

4. DISCUSSÃO

Avaliações *in vitro* com a presença de milho podem ser usadas como método exploratório aos efeitos de micotoxina, pois fornecem bons conhecimentos da afinidade à micotoxina sob simulação de condições *in vivo* em curto período de tempo e baixo custo (Pereyra et al., 2012). Nesse sentido, avaliou-se o comportamento da FB₁ em condições que se assemelham à digestão enzimática de equinos em sistema *in vitro* e observou-se a *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 como aditivo antimicotoxina para esta espécie. Na técnica de digestão enzimática *in vitro* utilizada, o pH, as principais enzimas e tempo médio de retenção no estômago e intestino delgado foram reproduzidos em simulação simplificada das condições fisiológicas do trato gastrointestinal de equinos durante o processo de digestão pré-cecal.

Os valores de digestão dos nutrientes do milho artificialmente contaminado com FB₁ tanto em pH ácido e neutro tiveram aumento para MS, amido e MO com acréscimo de *S. cerevisiae*. Contudo, o efeito não está associado à presença de FB₁ ao substrato, uma vez que não foi observada diferença entre o milho contaminado e milho sem contaminação, demonstrando não haver influência da micotoxina na digestão *in vitro* dos nutrientes do milho. Em pH 6.8, além da diferença na digestão dos nutrientes MS, MO e amido, similar em pH ácido, ocorreu efeito na digestão da PB com aumento de aproximadamente 8% na presença de FB₁ e *S. cerevisiae* em relação ao substrato de milho sem contaminação. Como não foi observada diferença com a adição de *S. cerevisiae*, não é possível associar o efeito observado à capacidade adsorvente da levedura. Nesse aspecto, os maiores valores de digestibilidade com acréscimo de *S. cerevisiae* podem ser relacionados com a capacidade da levedura em utilizar compostos de carbono como fonte de alimento para o seu desenvolvimento, através do metabolismo fermentativo (Kruckeberg; Dickinson, 2004). A cepa SC-47 utilizada foi composta de células viáveis. Esses resultados possibilitam afirmar que tanto em pH ácido e neutro a toxina FB₁ não afeta a digestão *in vitro* dos nutrientes do milho.

Através do ensaio com contaminação artificial de FB₁ observou-se que a matriz do milho influencia na quantificação de FB₁ em solução. Os tratamentos com milho contaminado apresentaram menor quantidade de FB₁ detectada em solução em relação aos tratamentos isentos de substrato, em ambas condições de pH. Observando os valores de FB₁ detectados em solução e resíduo sólido cerca de 78% foi detectado após digestão ácida e 64% após digestão sequencial. Uma vez que os tratamentos foram realizados simultaneamente e sob

mesmas condições em pH ácido e ácido+neutro, a presença do milho foi o fator diferencial para esses resultados.

No entanto, no ensaio II, nas amostras de milho naturalmente contaminados com FB₁, os valores da toxina após processo de digestão *in vitro* ácida e neutra em solução foram altos, próximos ou igual ao total de 100%. A diferença entre os dois ensaios foi relacionada à composição bromatológica das amostras de milho e a moagem em que esses substratos foram submetidos. As fumonisinas concentram-se principalmente no pericarpo e no gérmen do grão (Brera et al., 2004). Desta forma, o processo de moagem a seco pode ocasionar a redistribuição de micotoxinas em frações, sem causar destruição de toxinas (Bullerman et al., 2007). Sendo assim, as diferentes respostas de acordo com os dois ensaios realizados sugerem a hipótese de que além da presença, a composição química e/ou processamento físico (granulometria) do grão de milho utilizado pode interferir na biodisponibilidade da toxina em solução.

Além disso, as fumonisinas podem estar presentes na forma livre extraível (original, FB₁-hidrolisada ou parcialmente hidrolisada), na forma ligada que envolve ligação covalente à matriz (através de grupos aminas ou ácidos carboxílicos) e envolvendo ligações covalentes através da complexação da toxina com macronutrientes da matriz (ex: amido, proteínas) (Dall'Asta et al., 2010; Scott, 2012). Fumonisinas associadas à matriz, tais como FB₁-hidrolisadas ou formas ligadas, chamadas de micotoxinas mascaradas, muitas vezes não são detectadas por métodos analíticos tradicionais, subestimando a concentração total de micotoxina na amostra, sendo necessário tratamentos químicos ou enzimáticos para serem liberadas (Berthiler et al., 2013). Nesse aspecto, o processamento e mecanismos de mascaramento devem ser levados em consideração na avaliação de alimentos sem algum tipo de tratamento prévio (Dall'Asta et al., 2010; Berthiler et al., 2013).

Szábo-Fodor et al. (2014) observaram que a digestão *in vitro* foi capaz de destruir a complexação ou interação que ocorre entre fumonisinas e macromoléculas de milho (amilose, amilopectina e proteínas) através da ação enzimática, liberando as formas mascaradas, com aumento de 60%. Essa afirmação está de acordo Dall'Asta et al. (2010) que também observaram aumento na quantidade de FB₁ total após processo de digestão *in vitro*, com ausência de FB₁-hidrolisada ou parcialmente-hidrolisada, superior aos tratamentos com hidrólise alcalina. Neste experimento, esse fato pode ser observado no ensaio II com os milhos naturalmente contaminados, onde a recuperação de FB₁ na solução apresentou valores elevados, acima de 90%.

No entanto, a transformação da fumonisina pode ocorrer de forma a decrescer a toxidez, sendo chamado de processo de detoxificação (Berthiler et al., 2013). Esse processo pode ser considerado desde que não ocorra liberação da toxina a partir da matriz durante o processamento de alimentos ou sistema digestivo (Berthiler et al., 2013). No ensaio I parte da FB₁ inicial inserida para o tratamento milho+FB₁ não foi detectada, numa razão de 22 e 35%, nos pH 2 e 6,8, respectivamente, não estando associada ao resíduo sólido. Dessa forma, para permitir a classificação em fumonisina mascaradas ou processo de detoxificação estudos envolvendo a composição do milho, o processo de moagem a seco em diferentes tamanhos de partículas, transformação e liberação em sistema digestivo para equinos devem ser conduzidos para melhor elucidar sobre a biodisponibilidade da FB₁ em solução e a interação com a matriz do milho.

Em relação ao efeito adsorvente da *S. cerevisiae*, ocorreu variação nas respostas na presença do milho com diferentes concentrações de FB₁. Na concentração de 3,21 µg.g⁻¹ de FB₁ (Milho A) tanto em pH 2 e 6,8 não ocorreu diferença com e sem adição de *S. cerevisiae*. Por outro lado, nas concentrações mais elevadas de 5 µg.g⁻¹ (milho artificialmente contaminado) e 29,01 µg.g⁻¹ (Milho B), houve efeito adsorvente da *S. cerevisiae*, com redução da toxina no meio de 18% e 14% em pH 2 e de 10% e 9% em pH 6,8, respectivamente. Esses

resultados estão de acordo com estudos *in vitro* de adsorção de micotoxinas por *Saccharomyces cerevisiae*, onde o efeito é descrito por ser dependente da concentração da toxina (Bueno et al 2007; Shetty et al., 2007; Pizzolitto et al., 2011, 2012; Armando et al., 2013). A modificação na concentração da toxina pode alterar a eficiência do microrganismo no processo de adsorção, sendo que um determinado microrganismo pode ser mais efetivo em determinada concentração do que o outro. Pizzolitto et al. (2011) demonstraram que quando a concentração de AFB₁ foi de 0,05 µg.mL⁻¹ a *S. cerevisiae* RC016 foi a cepas mais eficaz, porém a *S. cerevisiae* 08 e CECT1891 foram melhores quando a concentração aumentou para 0,1 µg.mL⁻¹, enquanto na presença de 0,5 µg.mL⁻¹ a cepa RC016 foi mais eficiente.

Pizzolitto et al. (2012), avaliaram a remoção de FB₁ pela *S. cerevisiae* em relação a crescentes doses de toxina (3.125 a 100 µg.mL⁻¹) e observaram aumento na remoção de FB₁, sem haver redução percentual, demonstrando alta capacidade de adsorção, em torno de 60% para todas as concentrações testadas. Armando et al. (2013) demonstraram alta eficiência da SC em remover FB₁ nas quatro concentrações utilizadas (1, 5, 20 e 50 µg.mL⁻¹), aumentando significativamente a capacidade de adsorção com o aumento da concentração inicial de toxina na taxa de 27%, 43%, 68.5% a 78.7%, respectivamente. Através dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se verificar que a *Saccharomyces cerevisiae* (SC-47) apresentou habilidade em reduzir a disponibilidade da toxina em solução na presença do milho tanto em pH 2 e 6,8 quando as concentrações de FB₁ foram mais elevadas, podendo ser considerado um aditivo antimicotoxina em dietas de equinos.

Os estudos de adsorção de toxinas geralmente são realizados através de ensaio *in vitro*, com solução tampão de acordo com o pH desejado, onde uma quantidade de micotoxina é reagida com uma quantidade de adsorvente conhecida. Normalmente os resultados obtidos com esse processo demonstram percentuais altos na remoção da toxina em solução (Haskard et al., 2000, 2001; Lee et al., 2003; Shetty; Jespersen, 2006, 2007; Hernandez-Mendoza et al., 2009; Armando et al, 2011, 2012, 2013; Pizzolitto et al., 2011, 2012). Porém, a avaliação do efeito adsorvente em simulação das condições do trato gastrointestinal e na presença de substratos podem promover respostas diferentes.

De acordo Fruhauf et al. (2012) a toxina zearalenona (ZEA) teve baixa taxa de adsorção para alguns aditivos antimicotoxina (AAM) em suco gástrico, sendo associado a presença de compostos do meio que interferem na adsorção da toxina, uma vez que na ausência de AAM 31% da ZEA foi removida. Além disso, esses autores também citam que os componentes do suco gástrico podem ligar-se ao AAM e reduzir a capacidade do produto em adsorver micotoxinas. Pereyra et al. (2012) observaram influência da matriz sólida de milho na adsorção de toxinas, onde o substrato inibiu a adsorção de AFB₁, oposto do que ocorreu na ausência desse sólido; e para ZEA os valores adsorvidos foram reduzidos.

Dawson et al (2001) observaram que a eficácia na ligação de aditivo antimicotoxina composto por derivado de glucomanano da parede celular de levedura à aflatoxina B₁ foi influenciada pelo pH e concentração de fosfato-tampão em solução, sendo a máxima adsorção em pH 4,0 e concentração de 0,5 M de fosfato. No presente estudo a digestão *in vitro* sequencial ocorreu em pH 6,8 e com concentração de 0,1 M de fosfato-tampão, o que demonstra reduzir a adsorção de FB₁ pela *S. cerevisiae*, aumentando a quantidade de FB₁ recuperada.

De acordo os resultados de FB₁ extraída do resíduo sólido, em geral, tanto para milho artificialmente e naturalmente contaminado os valores quantificados foram baixos em relação ao total inserido. Isso demonstra que a maior parte da FB₁ é solubilizada, confirmando a característica hidrofílica da toxina. Os maiores valores associados ao resíduo foram para os tratamentos com inclusão de *S. cerevisiae*. Apenas no ensaio I o tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* foi inferior ao milho sem levedura e no ensaio II não houve

diferença para o milho naturalmente contaminado com $29.01 \mu\text{g.g}^{-1}$, com e sem adição de *S. cerevisiae*, em pH 6,8.

A variação nas respostas pode ter ocorrido em função do processo de filtragem realizado ao final da digestão *in vitro* em ambas condições de pH, uma vez que esse estudo simulou a digestão enzimática *in vitro* de equinos e o processo de filtragem através de tecido de náilon com porosidade específica (45 μm) foi necessária para calcular a diferença entre os nutrientes digeridos e não digeridos pela ação das enzimas (Abdoulli; Ben Attia, 2007). Contudo, a característica hidrofílica da FB_1 impossibilitou a realização de lavagem dos resíduos obtidos no intuito de separar as partículas de levedura das partículas de milho e quantificar a FB_1 de forma individual. Neste caso a levedura pode ter sido eluída com a solução ou ter ficado parcialmente retida no filtro.

Pizzolitto et al. (2012) testaram a estabilidade do complexo de FB_1 -*Saccharomyces cerevisiae* através de ensaio de “liberação” da toxina e verificaram que as sucessivas lavagens com solvente ocasionaram o aumento de 20-25% de FB_1 na solução, demonstrando ser um processo reversível. Para a quantificação de FB_1 no resíduo neste trabalho, as amostras foram submetidas à extração com metanol:água (70:30, v/v). Isso possibilita afirmar que houve diferença com a inclusão de levedura já que a recuperação de FB_1 foi em geral baixa para os tratamentos isentos de *S. cerevisiae*, tanto na contaminação artificial ou natural da toxina. A maior parte da toxina detectada ficou associada à levedura presente no resíduo sólido do milho+ FB_1 +SC e Milho B+SC em pH 2 e nos resíduos de milho A+SC em ambos valores de pH, o que confirma a capacidade da *S. cerevisiae* em ligar-se à FB_1 em solução.

5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo a fumonisina B_1 não afetou a digestão dos nutrientes do milho após processo de digestão ácida e neutra, sendo altamente solúvel e baixa adesão ao substrato na forma original da molécula. A composição química do milho e/ou tamanho de partícula após processamento físico (moagem a seco) interfere na biodisponibilidade da FB_1 em solução, sugerindo que avaliações devem ser realizadas para esclarecer a influência na liberação da toxina em sistema digestivo de equinos. A *Saccharomyces cerevisiae* apresentou habilidade em remover FB_1 em concentrações mais elevadas em ambas as condições de pH, podendo ser utilizada como aditivo antimicotoxina na alimentação dos equinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULLI, H.; BEN ATTIA, S. Evaluation of two-stage *in vitro* technique for estimating digestibility of equine feeds using horse faeces as the source of microbial inoculum. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, p.155-162, 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 15th ed. AOAC, Washington, DC, USA, 1990.

ARMANDO, M.R.; DOGI, C.A.; PIZZOLITTO, R.P.; ESCOBAR, F. PEIRANO, M.S.; SALVANO, M.A. SABINI, L.I.; COMBINA, M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B_1 binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.

- ARMANDO, M.R.; GALVAGNO, M.A.; DOGI, C.A.; CERRUTTI, P.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Statistical optimization of culture conditions for biomass production of probiotic gut-borne *Saccharomyces cerevisiae* strain able to reduce fumonisin B₁. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.1338—1346, 2013.
- ARMANDO, M.R.; PIZZOLITTO, R.P.; DOGI, C.A.; CRISTOFOLINI, A.; MERKIS, C.; POLONI, V.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p.256–264, 2012.
- BERTHILLER, F.; CREWS, C.; DALL'ASTA, C.; SAEGER, S.D.; HAESAERT, G.; KARLOVSKY, P.; OSWALD, I.P.; SEEFELDER, W.; SPEIJERS, G.; STROKA, J. Masked mycotoxins: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p.165-186, 2013.
- BRERA, C.; DEBEGNACH, F.; GROSSI, S.; MIRAGLIA, M. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B₁ in dry milling corn fractions. **Journal of Food Protection**, v.67, n6, p.1261–1266, 2004.
- BUENO, D.; CASALE, C.; PIZZOLITTO, R.; SALVANO, M.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2148-2154, 2007.
- BULLERMAN, L.B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n1, p.140-146, 2007.
- CALONI, F.; CORTINOVIS, C. Effects of fusariotoxins in the equine species. **Veterinary Journal**, v.186, n.2, p.157-61, 2010.
- CÂMARA A.C.L.; AFONSO J.A.B.; RIET-CORREA F.; DANTAS A.F.M.; MENDONÇA C.L.; COSTA N.A.; DANTAS A.C.; COSTA NETO H.A.; CAMPOS A.N.S.S.; M.I., SOUZA. Leucoencefalomalácia em equídeos no Estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, p.476-479, 2008.
- DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. *In vitro* digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.12042–12047, 2010.
- DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (eds). **Science and technology in the feed industry**. Nottingham University Press UK., p.16-181, 2001.
- DIAZ, D.E.; SMITH, T.K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: DIAZ, D.E. (Ed.) **The Mycotoxin Blue Book**. United Kingdom: Nottingham University Press, 2005. p. 323-340.
- FRUHAUF, S.; SCHWARTZ, H.; OTTNER, F.; KRŠKA, R.; VEKIRU, E. Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B₁ and zearalenone. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.29, n.2, p.217-231, 2012.
- GRATZ, S.; MYKKANEN, H.; OUWEHAND, A. C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B₁ in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6306–6308, 2004.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Chemico-Biological Interactions**, v.128, p.39–49, 2000.

- 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**, 67, 3086–3091, 2001.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A., GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1064-1068, 2009.
- KRUCKEBERG, A.L.; DICKINSON, J.R. Carbon metabolism. In: DICKINSON, J.R.; SCHWEIZER (eds). **Metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. CRC press, 2004, p.42-103.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; DILKIN, P. Leucoencefalomalácia equina associada à ingestão de milho contaminado por fumonisina B₁. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 3, p. 249-252, 1999.
- PEREYRA, C.M., CAVAGLIERI, L.R., CHIACCHIERA, S.M., DALCERO, A. The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B₁ and zearalenone by yeast cell wall. **Journal of Applied Microbiology**. v.114, p. 655-662, 2012.
- PIZZOLITTO, R.P.; BUENO, D.J.; ARMANDO, M.R.; CAVAGLIERI, L.; DALCERO, A.M.; SALVANO, M.A. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Intech online publishers**, p.1-20, 2011.
- PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M.; Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v.4156, p.214-221, 2012.
- RAGSDAL, J.M.; DEBEY, B.M. Equine leucoencephalomalacia linked to contaminated corn. **Kansas University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service**, v. 6, n. 2, p.1-6, 2003.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis. In: JAMES, W.P.T.; THEANDER, O. (EDS.). **The Analysis of Dietary Fibre in Food**, p. 123–158. 1981.
- ROSS, P.F.; RICE, L.G.; REAGOR, J.C.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; HARLIN, K.A.; RICHARD, J.L.; COLVIN, B.M.; BANTON, M.I. Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leucoencephalomalacia cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.238–241, 1991.
- SALLES-GOMES, T.L.; ALMEIDA, P.E.; MOREIRA, M.; CANOLA, J.C.; CANOLA, P.A.; SOUZA, H.A. Surto de leucoencefalomalácia equina provocada por ração comercial com concentração de fumonisina inferior a 10 ppm. **ARS Veterinária**, v.19, n.3, p.267-271, 2003.
- SANCHIS, V.; ABADIAS, M.; ONCINS, L.; SALA, N.; VINAS, I.; CANELA, R. Fumonisins B₁ and B₂ and Toxigenic *Fusarium* Strains in Feeds from the Spanish Market. **International Journal of Food Microbiology**, V.27, p.37-44. 1995.
- SANTOS, C.E.P.; SOUTO, F.S.M.; SANTURIO, J.M.; MARQUES, L.C. Leucoencefalomalácia em equídeos da região Leste de Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1119-1124, 2013.
- SCOTT, P.M. Recent research on fumonisins: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.29, n.2, p.242-248, 2012.

- SHETTY, P.H.; HALD, B.Y.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 41-46, 2007.
- SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p.48-55, 2006.
- STOLL, V.; BLANCHARD, J.S. Buffers: principles and practice. In: Deutscher, M.P. (ed.). **Methods in enzymology. Volume 182 Guide to protein purification**. 1990. California: Academic Press, Inc. p 24-38.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; VAN SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn. **Journal of AOAC International** v.79, p.688-696, 1996.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; VAN SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn. **Journal of AOAC International** v.79, p.688-696, 1996.
- SZABÓ-FODOR, J.; DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; KACHLEK, M.; SZÉCSI, Á.; SZABÓ, A.; KOVÁCS, M. Determination of the amount of bioaccessible fumonisin B₁ in different matrices after *in vitro* digestion. **World Mycotoxin Journal**, v.8, n.3, p.61-267, 2014.
- THEUMER, M.G.; RUBINSTEIN, H.R. Interacciones de las micotoxinas. In: RAMOS, A.J. (ed). *Mycotoxinas y micotoxicosis*. 1ed. 2011. p.373-394.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON J.P.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.P.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. v.74, p.3583-3597, 1991.
- VOSS, K.A.; SMITH, G.W.; HASCHEK, W.M. Fumonisins: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.299-325, 2007.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v.51, p.81-99, 2002.

CAPÍTULO III

EFEITO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM FB₁

RESUMO

Avaliou-se através da fermentação *in vitro* o efeito da fumonisina B₁ (FB₁) proveniente do milho sobre a produção cumulativa de gases, parâmetros de fermentação, perfil microbiano e a capacidade adsorvente da levedura de *S. cerevisiae* SC-47. O delineamento foi em blocos casualizados com dois tratamentos, sendo os tratamentos: milho e milho com *S. cerevisiae*, com cinco repetições. Foi utilizado o milho naturalmente contaminado com FB₁ na concentração de 29,01 µg.g⁻¹. Foi realizada a fermentação *in vitro* por 48h e mensurações da produção de gases durante o processo de incubação. Ao término da fermentação, foram realizadas análises de ácidos graxos voláteis (AGVs), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), pH, perfil microbiano (bactérias celulolíticas, ácido láticas, anaeróbias totais, *Streptococci* e *Lactobacilli*) e quantificação de FB₁ em solução por CLAE. Os valores de produção cumulativa de gases, AGVs, N-NH₃, pH, perfil microbiano e FB₁ em solução foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. A adição de *S. cerevisiae* ao milho promoveu aumento dos valores de produção cumulativa de gases em 12 e 24 horas de fermentação. Não foram observadas diferenças em relação à produção de ácido acético, propiônico, relação acetato:propionato e valores de pH da solução. Ocorreu efeito para produção de ácido butírico (P<0,001), ác. isovalérico+valérico (P=0,029) e concentração de N-NH₃ (P=0,004) com o acréscimo de *S. cerevisiae*. No perfil microbiano, o efeito foi observado no aumento da população celulolítica (P=0,017) em presença da *S. cerevisiae*. Não ocorreu efeito da adição de *S. cerevisiae* na concentração de FB₁, sendo a quantidade recuperada de 5% em solução. Os efeitos observados não foram associados à capacidade adsorvente da *S. cerevisiae*. Os resultados demonstram ocorrer metabolismo da FB₁ pelos microrganismos fermentadores. Além disso, a adição de levedura ao milho contaminado promoveu benefícios na fermentação proteolítica e desenvolvimento de bactérias celulolíticas.

Palavras-chave: micotoxina, microbiota, produção de gases

ABSTRACT

This study aimed to evaluate through *in vitro* fermentation the effect of fumonisin B₁ (FB₁) from the corn on the cumulative gas production, fermentation parameters, microbial profile and the adsorbent capacity of *S. cerevisiae*. The design was a randomized complete block with two treatments. Treatment: Corn and Corn with *S. cerevisiae*, with five repetitions. Corn naturally contaminated with FB₁ at the concentration of 29.01 µg.g⁻¹ was used. *In vitro* fermentation was conducted up to 48 hours and a measurement of gas production during the incubation process was carried out. At the end of fermentation, were conducted of volatile fatty acids (VFA), ammonia (N-NH₃), pH, microbial profile (cellulolytic bacteria, lactic acid, total anaerobic, *Streptococci* and *Lactobacilli*) analyzes and quantification of FB₁ in solution by HPLC. The cumulative gas production values, VFA, N-NH₃, pH, microbial population and FB₁ in solution were subjected to analysis of variance (ANOVA) and compared by SNK test at 5% probability. The addition of *S. cerevisiae* promoted the increase of cumulative gas production values at 12 and 24 hours of fermentation. No differences were observed in the production of acetic acid, propionic acid, the acetate: propionate ratio and pH values in solution. There was effect in the butyric acid production (P<0.001), valeric+isovaleric acid (P=0.029) and N-NH₃ concentration (P=0.004) with the inclusion of *S. cerevisiae*. On microbial profile, the effect was observed in increased cellulolytic population (p=0.017) with addition of *S. cerevisiae*. No effect was observed with the inclusion of *S. cerevisiae* in the concentration of FB₁ and the recovered amount was 5% in solution. The effects observed were not associated with adsorbent capacity of *S. cerevisiae*. The results demonstrate that there is metabolism of FB₁ by fermenting microorganisms. Furthermore, the addition of *S. cerevisiae* to corn contaminated promoted benefit in proteolytic fermentation and development of cellulolytic bacteria.

Keywords: mycotoxin, microbiota, gas production

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas produzidas por *Fusarium* são formadas durante a maturação a campo ou imediatamente pós-colheita, no transporte, secagem e/ou armazenamento, em função de condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo e síntese de toxinas (Yiannikouris; Jouany, 2002; Woloshuk; Shim, 2013). Dentre essas micotoxinas, as fumonisinas produzidas por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* estão associadas principalmente a amostras de milho e seus derivados (Zachariasova et al., 2014). São designadas como B₁, B₂ e B₃, sendo a fumonisina B₁ (FB₁) a de maior ocorrência e tóxica (Caloni; Cortinovis, 2010).

Em equinos, a fumonisina é responsável por causar lesões neurológicas, conhecida como leucoencefalomalácia equina (LEME) (Caloni; Cortinovis, 2010), além de estar relacionada à síndrome hepatóxica (Voss et al., 2007), levando à morte. A intoxicação por essa micotoxina é proveniente em geral do consumo de grãos e/ou subprodutos de milho, principalmente em épocas de escassez de forragem, onde a suplementação através de alimento concentrado é realizada, favorecendo a doença em determinadas regiões (Liesener et al., 2010). O consumo de 5 µg/g de FB₁ é suficiente em promover efeitos deletérios e mortalidade em equinos (Ross et al, 1991; Salles-Gomes et al., 2010).

O processo de absorção, distribuição e excreção da FB₁ pelo organismo são rápidos, devido à característica hidrofílica da toxina (Riley et al., 2005). Apresenta baixa biodisponibilidade devido à reduzida absorção e alta taxa de eliminação (Voss et al., 2001; Lino et al., 2004; Stockmann-Juvala; Savolainen, 2010) em função de limitado transporte epitelial no intestino ou por existir associação entre as fumonisinas e compostos do conteúdo do trato digestório (Shephard; Snijam, 1999).

A principal via de eliminação da fumonisina é através da excreção biliar e fezes (Galtier, 1999; Yiannikouris; Jouany, 2002). Consequentemente, a FB₁ exerce efeitos nocivos à parede celular e funções do intestino (Bouhet et al., 2007), propriedades de barreira nas células epiteliais, além de acumular no cólon (Prelusky et al., 1996; Bouhet et al., 2007). Os equinos apresentam ceco e cólon desenvolvidos para ocorrer o processo de fermentação de alimentos fibrosos e nutrientes que escapam da digestão proximal, através de microrganismos simbióticos. Uma vez que a principal forma de eliminação da fumonisina B₁ está ligada à passagem por esse compartimento, informações sobre o efeito na microbiota e danos à saúde do animal tornam-se necessários.

Como estratégia em promover a supressão ou redução da biodisponibilidade de toxinas ao organismo, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada como promissor aditivo antimicotoxina, em meio líquido (Shetty; Jespersen, 2006; Bueno et al., 2007; Pizzolito et al., 2011, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eficaz em resistir às variadas condições de pH e presença de bile do trato gastrointestinal (Gusils et al., 2002; Kühle et al., 2005). O mecanismo de ação em adsorver FB₁ envolve principalmente fenômeno físico com remoção da toxina através de ligações não covalentes e interações hidrofóbicas à parede celular, eliminando através das fezes (Pizzolito et al., 2012). *S. cerevisiae* foi descrita em remover 95% da FB₁ em solução com concentração de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ (Pizzolito et al., 2012).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da micotoxina de milho *in natura* naturalmente contaminado com fumonisina B₁ sobre a produção cumulativa de gases, pH, ácidos graxos voláteis (AGVs), N-NH₃, perfil microbiano e a capacidade adsorvente da levedura de *S. cerevisiae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar (LCTA) da Universidade do Minho, em Braga e no Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV) da Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal.

2.2 Cepa de levedura

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no presente estudo foi determinada através de ensaio prévio de adsorção *in vitro* de fumonisina B₁ em condições que simularam as condições orgânicas de pH e temperatura dos equinos (pH 2,0 e 6,8, à 39 °C) com quatro cepas: Cepa 1: Procreatin 7[®], Lesaffre Feed Aditivies, Lille, França; Cepa 2: cepa LL08, isolada do rúmen de bovino; Cepa 3: Levucell[®] cepa CNCM I-1077, Lallemand Animal Nutrition, Goiânia, Brasil; Cepa 4: Biosaf[®] cepa SC-47, Lesaffre Feed Aditivies, Lille, França. Uma alíquota de cada cultivo de levedura foi ressuspenso em solução tampão com 5 µg.mL⁻¹ de FB₁ a pH 2 (50 mL de cloreto de potássio 0.2 mol.L⁻¹ e 13 mL de ácido clorídrico 0.2 mol.L⁻¹ em 250 mL de água destilada) (Pereyra et al., 2012) e pH 6.8 (51 mL de fosfato de sódio dihidrogênio 0.2 mol.L⁻¹ e 49 mL de fosfato de sódio bibásico heptahidratado 0.2 mol.L⁻¹ em 200 mL de água destilada) (Stoll & Blanchard, 1990) de forma a obter concentrações de 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸, 5x10⁸ e 1x10⁹ UFC.mL⁻¹. Procedeu-se o ensaio de adsorção *in vitro* segundo metodologia descrita Bueno et al. (2007) e Pereyra et al. (2012). A cepa *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 na concentração de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ em ambas condições de pH ácido e neutro foi capaz de adsorver cerca de 38% da FB₁ em solução, superior as demais cepas avaliadas (Capítulo I), sendo selecionada para ser utilizada no presente estudo.

2.3 Delineamento Experimental

O delineamento foi em blocos casualizados com dois tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram: milho e milho com *S. cerevisiae* (milho+S. *cerevisiae*). Utilizou-se milho naturalmente contaminado com FB₁ na concentração de 29,01 µg.g⁻¹. Os blocos foram representados pelo número de vezes que foram realizadas as fermentações *in vitro*, totalizando cinco ensaios, em função de limitação do equipamento que continha 12 frascos para incubação. Foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 na concentração de 1x10⁹ UFC.mL⁻¹.

2.4 Procedimento Experimental

A fermentação *in vitro* foi realizada de acordo com Cone et al. (1996). Em cada frasco foi adicionado 0,45 g de amostra e no tratamento com a presença de levedura foi adicionada a quantidade em peso equivalente de 0,015 g à concentração de 1x10⁹ células.mL⁻¹. Foi preparada solução tampão nutritiva segundo Menke et al. (1979) modificada por Steingass (1983). A solução consistiu de 10,0 g/L NaHCO₃; 1,43 g/L de Na₂HPO₄; 1,55 g/L KH₂PO₄; 0,15 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,52 g/L Na₂S; 0,017 g/L CaCl₂.2H₂O; 0,015 g/L MnCl₂.4H₂O; 0,002 g/L COCl₃.6H₂O; 0,012 g/L FeCl₃.6H₂O e 0,125 mg/L de resazurina.

Foi utilizado como inóculo fezes de pelo menos dois equinos alimentados com volumoso:concentrado na proporção de 50:50. As fezes foram coletadas 2 horas após a refeição da manhã em recipiente estéril e pré-aquecido a 39 °C, em anaerobiose. Em seguida foi realizada a homogeneização das fezes com a solução nutritiva na relação peso:peso (75% de solução: 25% de fezes) em liquidificador durante um minuto com constante borrifação de

CO₂ e o material ficou em repouso durante 1h à 39 °C, em anaerobiose e agitação. Após esse período, o material foi filtrado em oito camadas de gases.

As incubações foram realizadas em frascos de 250 mL (Schott, Mainz, Alemanha) utilizando 60 mL da solução com inóculo fecal. Foi feita a desoxigenação do frasco por meio da inserção de CO₂ e, imediatamente, os mesmos foram lacrados com tampas. Os frascos foram colocados em banho-Maria e mantidos a temperatura de 39 °C. As tampas foram conectadas a transdutor de coleta automática de pressão e o tempo zero foi marcado até 48 horas. As amostras foram incubadas em quadruplicata, sendo realizadas incubações apenas com inóculo (branco) para fins de cálculo.

Os resultados armazenados através do Software Gasintv.exe foram transferidos para um computador e os valores fixos de quantidade de pressão foram calculados em volume de gases produzidos, de acordo a seguinte fórmula: $P1 \cdot V1 = P2 \cdot V2$, sendo P1: Pressão da válvula aberta; V1: Volume de gás produzido; P2: Pressão da válvula fechada; e V2: Volume da garrafa de 250mL.

2.5 Mensuração de pH

As mensurações de pH da solução final de cada frasco após 48 horas de fermentação *in vitro* foram realizadas através de medidor digital (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, pH 530, Weilheim, Alemanha).

2.6 Ácidos Graxos Voláteis (AGVs)

Os conteúdos de cada frasco após 48 horas de fermentação *in vitro* foram submetidos à centrifugação a 500 rpm por 5 min a 4°C. Após esse processo foi retirada uma alíquota de 5 mL do sobrenadante a foi adicionado 0,5 mL de solução de ácido píválico (4 g de ácido para 100 mL de água destilada, pH 7) e homogeneizado. Retirou-se 4 mL da mistura anterior e adicionou-se 1 mL de solução de ácido fosfórico 25% a 1M (28,82 g H₃PO₄ em 1L de água destilada) e submeteu-se a centrifugação a 20000 rpm por 20 min a 4 °C. No final do processo, foi retirada uma alíquota do sobrenadante e armazenado a -20 °C para posterior análise por cromatografia gasosa. As concentrações de AGVs foram analisadas por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-141 B, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama e coluna capilar (SUPELCO Nukol 30 m × 0.25 milímetros ID, 0.25 m de película, Bellefonte, EUA), usando ácido píválico (0,4 M) como o padrão interno (Czerkawski, 1976). A área para cada AGV (acetato, proprionato, butirato, isovalerato e valerato) foram comparados com padrão interno.

2.7 Nitrogênio Amoniacal (NH₃-N)

Os conteúdos de cada frasco após 48 horas de fermentação *in vitro* foram submetidos à centrifugação a 500 rpm por 5 min a 4 °C. Em seguida, submeteu-se uma alíquota de 5 mL a centrifugação a 20000 rpm por 20 min a 4 °C. No final do processo, uma amostra do sobrenadante foi retirada e armazenada a -20 °C para posterior análise através da metodologia descrita por Conway (1950).

Foi utilizada placa de Conway, onde na célula central adicionou-se 2 mL de ácido bórico 1% (10 g H₃BO₃, 200 mL de álcool etílico 95%, 10 mL de indicador: 0,033 g bromo cresol verde + 0,066 g de vermelho de metilo em 100 mL etanol 95%; completou-se para 100 mL de água destilada), no compartimento exterior adicionou-se 1 mL da amostra e 1 mL de solução de carbonato de potássio 50% em posição oposta. A célula de Conway foi coberta com placa de vidro, rodando suavemente para garantir aderência. Em seguida agitou-se suavemente de modo a misturar a amostra com a solução de carbonato de cálcio. Foi realizado em cada série, três ensaios brancos utilizando 1 mL de solução padrão de oxalato de amônio 1% (507,6 mg de oxalato de amônio, 5 mL de ácido sulfúrico em 500 mL de água destilada),

1 mL de solução carbonato de potássio e na região central 2 mL de ácido bórico a 1%. As placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 2,5h e após esse processo foi titulado a célula central com ácido sulfúrico a 0,02N.

O cálculo para quantidade de N-NH₃ (mg/100mL) foi realizado de acordo com a fórmula: $NH_3-N = V_o/V_t \times 20$, sendo V_o = Volume de ácido sulfúrico 0,02N gasto no ensaio em branco (mL) e V_t = Volume de ácido sulfúrico 0,02N gasto na amostra em estudo (mL).

2.8 Análise Microbiana

Ao término de cada ensaio de fermentação *in vitro*, foi realizada contagem microbiana para cada amostra obtida. Foram utilizados *roll tubes* e placas de Petri em triplicatas sob condição de anaerobiose com nove diluições sequenciais para cada tratamento. Bactérias anaeróbias totais, celulolíticas e bactérias que utilizam ácido-lático foram cultivadas em *roll tubes*. *Streptococcus spp.* e *Lactobacillus spp.* foram cultivados em placas de Petri. Utilizou-se o método de número mais provável de MacGrady para estimar a população microbiana. Para as placas de Petri foi realizado a contagem do número de unidades formadoras de colônia (log₁₀ UFC).

Bactérias aneróbias totais foram incubadas em meio não-seletivo modificado livre de O₂ e acrescido de CO₂ em cada tubo (Leedle; Hespell, 1980; Julliand et al., 1999) e a contagem foi estimada após 48h à 39 °C em diluições de 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹ mL de inóculo.

Bactérias que utilizam ácido-lático foram incubadas em meio seletivo descrito por Mackie e Health (1979) em anaerobiose e o número de bactérias viáveis foram estimados após 48h à 39 °C em diluições de 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹ mL de inóculo.

Bactérias celulolíticas foram cultivadas em meio de crescimento modificado, com filtro de papel de celulose (6 x 1 cm) como substrato, por 15 dias à 39 °C em diluições de 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ mL de inóculo (Julliand et al., 1999).

Streptococcus spp. e *Lactobacillus spp.* foram cultivados em placas de bile esculina azida agar e rogosa agar, respectivamente e incubados por 48h à 39 °C em condição de anaerobiose utilizando o sistemas de jarros anaeróbios (Don Witley Scientific Limited, United Kingdom). Para *Streptococcus spp.* foram utilizadas diluições de 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ mL de inóculo e para *Lactobacillus spp.* de 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ mL de inóculo.

2.9 Análise de Micotoxina FB₁

Após processo de fermentação *in vitro* as amostras foram submetidas à limpeza em coluna de troca ânionica SAX (HyperSepTM SAX Cartridges, Thermo ScientificTM), de acordo Sanchis et al. (1995). As amostras primeiramente foram submetidas à centrifugação a 5000 rpm por 15 min. Em seguida, foram filtrados 20 mL de solução em papel filtro de 0,45 µm e foi adicionado metanol na razão de 3:1 de volume de amostra. O valor de pH das soluções foi ajustado acima de 5,8 com solução de NaOH 1M. Cada coluna SAX foi previamente acondicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:H₂O (3:1, v/v) com caudal de 1mL/min. Em seguida, foram inseridos pelo menos 10 mL de amostra. Posteriormente, lavou-se com 8 mL de metanol/H₂O (3:1, v/v) e 3 mL de metanol. Elui-se as FB₁ retidas na coluna com 10 mL de solução metanol/ácido acético (99:1, v/v), evaporou-se o solvente com nitrogênio a 40 °C e ressuspendeu-se em 0,5 mL de metanol. Acondicionou-se em freezer -20 °C para posterior análise em HPLC.

As fumonisinas foram submetidas a processo de derivatização, que foi realizado com orto-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA em 1 mL de metanol, 5 mL de sódio tetraborato a 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoethanol) (Sanchis et al., 1995). Misturou-se 150 µL de amostra com 150 µL de solução de OPA, agitou-se e manteve-se em repouso à temperatura ambiente durante 2 min, em seguida injectou-se no HPLC.

Para a detecção e quantificação em HPLC, foi utilizada solução de fase móvel de metanol e fosfato de sódio dihidrogênio 0,1 M (77: 23, v/v) com pH corrigido para 3,35 com ácido orto-fosfórico. Foi utilizada uma coluna C18 YMC-Pack ODS-AQ (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) e detector de fluorescência a Ex: 335 nm e Em: 440 nm. Foram elaboradas curvas de calibração utilizando padrões para FB₁, de modo que o sinal lido pelo detector seja transposto para unidades de concentração na amostra.

2.10 Análises Estatísticas

Os valores de pH e população microbiana foram transformados em Log e verificados de acordo o teste de normalidade de Lilliefors e teste de homogeneidade das variâncias de Cochran e Bartlet. Os resultados de produção cumulativa de gases, AGVs, NH₃-N, pH, população microbiana e FB₁ em solução foram submetidos à análise variância (ANOVA) e comparados pelo teste de SNK, a 5% de probabilidade. Os valores de pH foram transformados em Log e verificados de acordo o teste de normalidade de Lilliefors e teste de homogeneidade das variâncias de Cochran e Bartlet. Foi utilizado o programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (2003).

3 RESULTADOS

Em relação à leitura de volume de gases produzidos em 12, 24 e 48 horas, observou-se efeito da adição da levedura nos tempos de 12 e 24 horas de incubação, sendo os valores de 82,65 e 147,05 mL.g⁻¹ MO, respectivamente, superiores ao substrato milho (Tabela 1). No tempo de 48 horas, não houve diferença na produção cumulativa de gases, com valor de 146,61 mL.g⁻¹ MO para o milho e 150,65 mL.g⁻¹ MO para milho com *S. cerevisiae*. Além disso, observou-se perfil similar das curvas para ambos os tratamentos utilizados, onde o início da curva apresentou menor produção de gases, seguido de crescente produção até aproximadamente 24 horas e formação de platô até atingir às 48 horas da fermentação (Figura 1).

Tabela 1. Produção cumulativa de gases (mL.g⁻¹ MO) após 12, 24 e 48 horas de fermentação *in vitro* do milho e milho+*S. cerevisiae*¹, naturalmente contaminados com FB₁.

Tempo	Milho	Milho+ <i>S. cerevisiae</i>	EPM	Valor de P*
12 h	75,9±27,6	82,7±29,3	2,374	0,004
24 h	144,9±55,5	147,0±55,7	3,219	0,035
48 h	146,6±54,0	150,7±53,9	2,249	ns

* Nível de significância P <0.05; ns = não significativo

¹ *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SC-47 (1x10⁹ UFC.mL⁻¹).

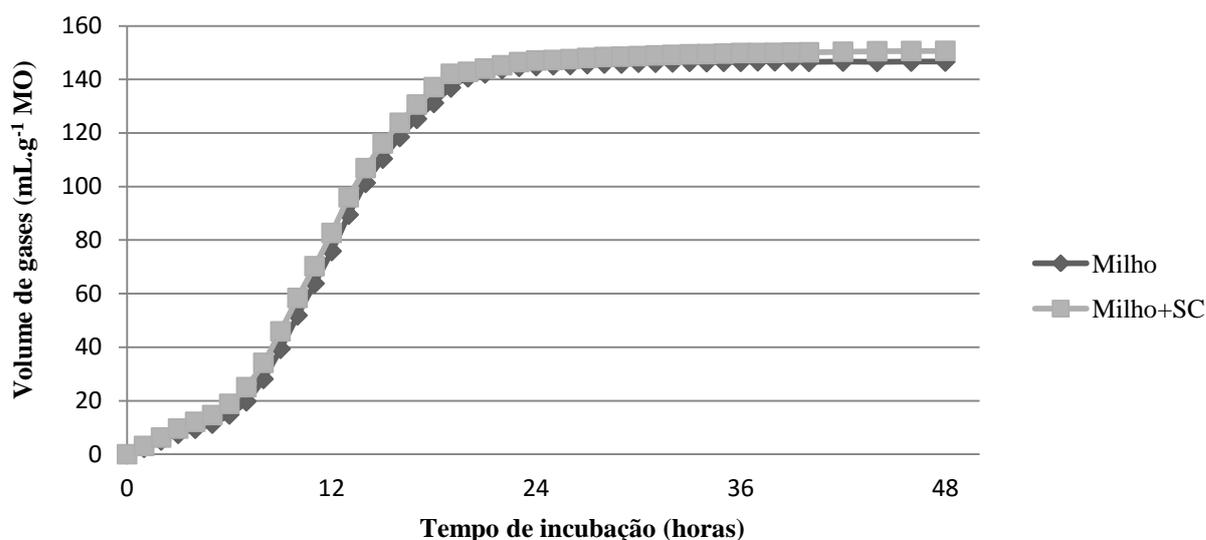


Figura 1. Curvas de produção de gases *in vitro* do substrato milho e milho acrescido de *S. cerevisiae* por 48 horas.

Não foram observadas diferenças na concentração de ácido acético, propiônico e a relação acetato:propionato (Tabela 2). Houve efeito na produção de ácido butírico ($P < 0,001$), sendo os valores de 0,40 e 0,47 mmol/mL na solução de milho e milho+*S. cerevisiae*, respectivamente. Foi observado efeito na produção de ácido isovalérico+valérico ($P = 0,029$), com valores de 0,17 mmol/mL no milho e de 0,19 mmol/mL com adição de *S. cerevisiae*. Em relação à produção de N-NH₃ foi observado efeito ($P = 0,004$) da inclusão de *S. cerevisiae*, com valor de 15,29 mg/100mL em relação ao tratamento sem levedura de 14,19 mg/100mL. Não ocorreu diferença no valor de pH entre a solução de milho e milho+*S. cerevisiae*, com valor médio de 6,55.

Tabela 2. Valores médios de ácidos graxos voláteis (mmol/ml), nitrogênio amoniacal (mg/100mL) e valores médios de pH após 48h de fermentação *in vitro* do milho e milho+*S. cerevisiae*, naturalmente contaminados com FB₁.

AGV ² (mmol/ml)	Milho	Milho+ <i>S. cerevisiae</i>	EPM	Valor de P*
Ác. acético	4,14±1,06	4,11±0,72	0,129	ns
Ác. propiônico	1,99±0,35	1,95±0,35	0,050	ns
Ác. butírico	0,40±0,13	0,47±0,15	0,020	<0,001
Ác. Isovalérico + Ác. valérico	0,17±0,11	0,19±0,12	0,016	0,029
Acetato:Propionato	2,17±0,85	2,23±0,85	0,122	ns
N-NH ₃ ³ (mg/100mL)	14,19±2,43	15,29±2,69	0,395	0,004
pH	6,55±0,08	6,55±0,07	0,11	ns

*S²: significância $P < 0,05$; ns = não significativo

¹ *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SC-47 (1×10^9 UFC.mL⁻¹).

² AGV = Ácidos Graxos Voláteis.

³ N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal.

Em relação à contagem de microrganismos, não foram observados efeitos sobre as populações de bactérias que utilizam ácido lático, anaeróbias totais, *Streptococci* e *Lactobacilli* (Tabela 3). Houve efeito da adição de *S. cerevisiae* no aumento da população celulolítica ($P = 0,017$), com valor de 5,25 Log₁₀ UFC/mL, quando comparado ao tratamento milho na concentração de 4,77 Log₁₀ UFC/mL.

Tabela 3. Perfil microbiano após 48h de fermentação *in vitro* do milho e milho+*S. cerevisiae*¹, naturalmente contaminados com FB₁.

	<i>Log</i> ₁₀ UFC mL ⁻¹		EPM	Valor de <i>P</i> [*]
	Milho	Milho+ <i>S. cerevisiae</i>		
Bactérias celulolíticas	4,77±0,22	5,25±0,49	0,054	0,017
Bactérias que utilizam ácido láctico	7,73±0,93	7,67±1,00	0,192	ns
Bactérias anaeróbias totais	7,72±0,23	7,77±0,31	0,091	ns
<i>Streptococci</i>	6,08±0,28	6,06±0,46	0,076	ns
<i>Lactobacilli</i>	7,58±0,22	7,69±0,25	0,048	ns

* Nível de significância *P* <0,05; ns = não significativo

¹ *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SC-47 (1x10⁹ UFC.mL⁻¹).

Não foi observada diferença com a inclusão de *S. cerevisiae* na quantidade de FB₁ após fermentação *in vitro*, com valor de 0,60 µg semelhante aos tratamentos, sendo a recuperação final em solução de 5% (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios de FB₁ (µg) em solução após 48h de fermentação *in vitro* do milho e milho+*S. cerevisiae*¹, naturalmente contaminados com FB₁.

FB ₁ ² (µg)	Milho		Milho+ <i>S. cerevisiae</i>		Valor de <i>P</i> [*]
	(µg)	%	(µg)	%	
13	0,60±0,58	5	0,60±0,50	5	ns

* Nível de significância *P* <0,05; ns = não significativo

¹ *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SC-47 (1x10⁹ UFC.mL⁻¹)

² Valor de FB₁ referente a 450mg de substrato de milho/frasco, concentração de 29,10 µg.g⁻¹

4 DISCUSSÃO

Os equinos apresentam uma estrutura anatômica do intestino grosso que resulta em prolongado tempo de permanência da digesta para ação de microrganismos, representando cerca de 80% de todo tempo médio de retenção, variando entre 15h e 56h (Julliard et al., 2008). A população microbiana é constituída principalmente de bactérias anaeróbias totais, bactérias fibrolíticas, microrganismos amilolíticos e proteolíticos (ex: *Streptococci*, *Lactobacilli*) e bactérias que utilizam ácido láctico (Julliard et al., 2001; Medina et al., 2002; de Fombelle et al., 2003; Julliard et al., 2008). São responsáveis pela produção de ácidos graxos voláteis através da fermentação de nutrientes que escapam da digestão pré-cecal e material fibroso, englobando a principal fonte de energia para esses animais (Julliard et al., 2008). Produtos adicionais da ação microbiana incluem lactato (bactérias ácido lácticas), produção de gases (CO₂ e metano), além da síntese de aminoácidos e vitaminas do complexo B e K (NRC, 2007).

Na fermentação *in vitro* realizada foi utilizado inóculo fecal descrito por apresentar maior proporção de bactérias ácido lácticas em relação ao conteúdo cecal, o qual apresenta maior proporção de bactérias fibrolíticas (de Fombelle et al., 2003; Santos et al., 2011). Os efeitos observados estão associados à fermentação proteolítica com aumento na produção de ácidos graxos de cadeia ramificada (ácido isovalérico+valérico) e N-NH₃, com suplementação de *S. cerevisiae*. Nesse aspecto, a produção de ácido isovalérico e valérico está associada à

fermentação da proteína, assim como a produção de N-NH₃ em função da proteína oriunda do milho *in natura*.

Em estudo realizado por Srichana et al. (2009) em cultura *in vitro* para ruminantes, observaram que o aumento da concentração de fumonisina (0, 100 e 200 µg.g⁻¹) reduziu a concentração N-NH₃ e produção de AGV de cadeia ramificada, sem haver efeito nos AGV de cadeia curta (acetato, butirato e propionato), sugerindo inibição de bactérias proteolíticas. Nesse aspecto, o presente estudo demonstrou que a adição de *S. cerevisiae* contribuiu para o aumento nas respostas relacionadas à fermentação proteolítica quando comparado ao milho isento de levedura. Embora os resultados de FB₁ em solução não demonstrem associação com o efeito adsorvente de toxina pela levedura, a *S. cerevisiae* foi capaz de melhorar a ação de bactérias que degradam proteína.

Houve desenvolvimento da população celulolítica com o tratamento milho acrescido de *S. cerevisiae*. Esse fato está relacionado com bactérias fibrolíticas utilizarem a amônia como principal fonte de nitrogênio e AGV de cadeias ramificadas serem necessários ao seu desenvolvimento (Walker & Drouillard, 2012), contribuindo para o aumento da população. Além disso, esse efeito pode estar associado ao aumento da produção de gases até 24h de incubação para o milho com *S. cerevisiae*, embora fossem necessárias análises do perfil microbiano para outros pontos da curva para confirmar essa informação. A diminuição na produção de gases após o período de 24 a 48 horas é devido à redução de substrato disponível para fermentação microbiana, não havendo diferença entre os tratamentos, uma vez que o milho foi à única fonte de alimento utilizado.

A suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* em equinos é descrita por ter capacidade de sobreviver através do trato digestivo e alcançar o ceco e cólon, estimulando a atividade de bactérias celulolíticas, melhorando a digestão da fibra e síntese de proteína microbiana (Medina et al, 2002;. Jouany et al. , 2008, 2009). Nesse sentido, a *S. cerevisiae* exerceu efeito probiótico relacionado ao aumento da degradação de proteína por bactérias proteolíticas beneficiando o desenvolvimento de bactérias celulolíticas. Daly et al. (2012) verificaram que a população de *Lachnospiraceae*, um dos maiores grupos de bactérias do intestino grosso de equinos, composto por microrganismos fibrolíticos e sacarolíticos (*Clostridium* spp., *Butyrivibrio* spp., *Ruminococcus* spp. e *Eubacterium* spp.) foi significativamente maior em equinos alimentados com dieta concentrada. O aumento da concentração de ácido butírico está relacionado com o aumento da fermentação por grupos de bactérias fibrolíticas e proteolíticas, tais como *Clostridium* spp. e *Butyrivibrio* spp.

Contudo, não ocorreu diferença em relação à quantidade recuperada de FB₁ em solução de milho sem e com inclusão de *S. cerevisiae*, o que não permite associar os efeitos observados à capacidade da *S. cerevisiae* em adsorver toxina. Aproximadamente 95% da fumonisina B₁ em solução após fermentação não foi detectada via quantificação em CLAE, o que levanta hipótese de ter ocorrido biotransformação (detoxificação) através dos microrganismos fermentadores.

O metabolismo de compostos xenobioticos envolve duas fases distintas, sendo a fase I processo de transformação enzimática (redução, oxidação e hidrólises) e fase II processo de conjugação (glicosidação, glicuronidação e sulfatação) (Coleman et al., 1997; Zinedine et al., 2007; Berthiler et al., 2009; He et al., 2010). Ambos os processos visam detoxificar os compostos tóxicos, contudo, na fase I pode ocorrer a ativação e conseqüentemente formação de metabólitos tão tóxicos ou mais que a forma original da molécula (Coleman et al., 1997). Na fase II ocorre a formação de compostos solúveis em água (hidrofílicos), facilitando a eliminação da micotoxina através da urina, bile, fezes e/ou leite, reduzindo a toxidez (Yiannikouris; Jouany, 2002; Berthiler et al., 2013). Microrganismos usados em processos de fermentação podem transformar micotoxinas em derivados que não são detectáveis por

métodos analíticos convencionais, subestimando os teores recuperados na análise (Berthiler et al., 2013).

No presente estudo, os metabólitos derivados da FB₁ não foram mensurados, porém de acordo as informações da literatura, uma vez que a fermentação ocorreu em sistema *in vitro* e a maior parte da toxina intacta não foi recuperada em solução, pode-se inferir que os microrganismos fermentadores de equinos são capazes de metabolizar fumonisina B₁.

Fodor et al. (2007) através de modelo *in vitro* em simulação a microbiota cecal de suínos, verificou após 48h de incubação que a quantidade de FB₁ intacta decresceu, enquanto FB₁ hidrolizada aumentou inversamente em cerca de 46%, sem haver conversão em aminopentol. Esses autores sugeriram que no intestino grosso de mamíferos o processo metabólico envolvido é referente à remoção de ácido propano-1,2,3-tricarboxilílico por ação de esterase. Shephard et al. (1995) trabalharam com macacos, observaram que o principal produto formado nas fezes foi a forma parcialmente hidrolizada, ocorrendo metabolização no intestino grosso, visto que esse composto não é detectado através da excreção biliar. Em ruminantes, as informações relacionadas com a biodegradação ruminal são contraditórias, descritas em maioria como sendo eliminada sem metabolização nas fezes (Smith; Thakur 1996; Caloni et al., 2000) observaram redução de 12 a 18% da fumonisina em solução sem ocorrer a formação de metabólitos hidrolizados após 24h de fermentação *in vitro*, não relacionando com efetivo processo de biodegradação. Por outro lado, em análises *in vivo* de ovelhas e bovinos, Rice e Ross (1994) observaram de 60 a 90% de desaparecimento de FB₁, sendo excretada como aminopolióis e aminopentol (compostos altamente tóxicos) através das fezes. Devido à ausência de informações em equinos, análises devem ser realizadas a fim de avaliar quais possíveis produtos derivados da FB₁ podem ser formados e se esses compostos são capazes de influenciar na microbiota, devido a possível toxicidade.

Outra hipótese sugerida em relação ao desaparecimento da fumonisina B₁ em solução seria relacionada à adsorção da toxina por bactérias ácido lácticas. Esses microrganismos apresentam habilidade em remover diversas micoxinas em solução (El-Nezami et al., 1998; Haskard et al., 2000, 2001; Lee et al., 2003; Niderkon et al. 2006; Shetty; Jespersen, 2006, 2007; Bueno et al., 2007; Hernandez-Mendoza et al., 2009; Pizzolitto et al., 2011, 2012). Em relação a fumonisina B₁, Niderkon et al. (2006) avaliaram a capacidade em adsorver a toxina através de bactérias fermentativas viáveis encontradas em bovinos (10^{10} UFC.mL⁻¹), tais como: bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc mesenteroides*) e bactérias ácido propiônicas (*Propionibacterium*) sob pH 4 e verificaram remoção de até 82% da solução, sem haver formação de produtos de degradação como a fumonisina-hidrolisada. Porém, esses mesmos autores observaram que a elevação do pH para 6, 7.4 e 7.8, decresceu drasticamente a adsorção pelas bactérias, variando entre 0 e 18% o valor de remoção. Pizzolitto et al. (2012) obtiveram remoção de FB₁ em solução por *Lactobacillus acidophilus*, sob pH 7.2 em torno de 20% de FB₁. A elevação do pH em neutro ou alcalino demonstra afetar a capacidade de bactérias ácido lácticas em adsorver FB₁. Neste aspecto, o processo de fermentação *in vitro* iniciou-se sob pH 6.8 e após 48 horas o valor foi de 6,55, o que favorece a hipótese de ocorrer processo metabólico por microrganismos fermentadores ao invés de adsorção.

No presente estudo, não é possível esclarecer o mecanismo envolvido no desaparecimento da toxina em meio líquido, contudo os resultados sugerem que há ação de bactérias sobre a presença de fumonisina B₁ na câmara fermentativa.

5 CONCLUSÕES

A inclusão de *S. cerevisiae* promoveu aumento da fermentação proteolítica, contribuindo para o desenvolvimento de bactérias celulolíticas. A fumonisina B₁ após o processo de fermentação *in vitro* foi de baixa recuperação, não conferindo a redução em solução ao efeito adsorvente da *S. cerevisiae*. O desaparecimento da fumonisina B₁ está associado com processo de detoxificação por microrganismos fermentadores. Análises sobre a ocorrência de produtos derivados da fumonisina B₁ após processo de fermentação devem ser realizadas. Estudos devem ser elaborados para elucidar os efeitos da fumonisina B₁ na microbiota do ceco e cólon de equinos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHILLER, F.; CREWS, C.; DALL'ASTA, C.; SAEGER, S.D.; HAESAERT, G.; KARLOVSKY, P.; STROKA, J. Masked mycotoxins: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p.165-186, 2013.
- BOUHET, S.; HOURCADE, E.; LOISEAU, N.; FIKRY, A.; MARTINEZ, S.; ROSELLI, M.; GALTIER, P.; MENGHERI, E.; OSWALD, I.P. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicological Science**, v.77, p.165–171, 2004.
- BUENO, D.; CASALE, C.; PIZZOLITTO, R.; SALVANO, M.; OLIVER, G. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2148-2154, 2007.
- CALONI, F.; CORTINOVIS, C. Effects of fusariotoxins in the equine species. **Veterinary Journal**, v.186, n.2, p.157-61, 2010.
- CALONI, F.; SPOTTI, M.; AUERBACH, H.; DEN CAMP, H.O.; HREMMELS, J.F.; POMPA, G. *In Vitro* metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microflora. **Veterinary Research Communications**, v.24, p.379-387, 2000.
- COLEMAN, J.; BLAKE-KALFF, M.; DAVIES, E. Detoxification of xenobiotics by plants; chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, v.2, p.144–1251, 1997.
- CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VISSCHER, G.J.W.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, p.113–128, 1996.
- CONWAY, E.J. **Microdiffusion. Analysis and volumetric error**. 2nd Edition, Crosby Lockwood and Son, London. 1950.
- CZERKAWSKI, J.W. The use of pivalic acid as a reference substance in measurements of production of volatile fatty acids by rumen micro-organisms *in vitro*. **British Journal Nutrition**, v.36, p.311–315, 1976.
- DALY, K.; PROUDMAN, C.J.; DUNCAN, S.H.; FLINT, H.J.; DYER, J.; SHIRAZI-BEECHEY, S.P. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine

- in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition**, v.107, n.07, p.989-995, 2012.
- de FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHET, A.G.; JACOTOT, E.; JACOTOT, C.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. **Animal Science**. v.77, p.293-304, 2003.
- EL-NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. **Journal of Food Protection**, v.61, p.466–468, 1998.
- FODOR, J.; MEYER, K.; GOTTSCHALK, C.; MAMET, R.; KAMETLER, L.; BAUER, J.; KOVACS, M. *In vitro* microbial metabolism of fumonisin B₁. **Food additives and contaminants**, v.24, n.4, p.416-420, 2007.
- GALTIER, P. Biotransformation and fate of mycotoxins. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews**, v.18, p.295–312, 1999.
- GUSILS, C.; BUJAZHA, M.; GONZÁLEZ, S. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. **Interciencia**, v.27, n.8, p.409-413, 2002.
- 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.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Chemico-Biological Interactions**, v.128, p.39–49, 2000.
- HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLLAND, G. J. Chemical and biological transformations of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food and Science Technology**, v.21, p.67–76, 2010.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1064-1068, 2009.
- JOUANY, J.P.; GOBERT, J.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. **Journal of Animal Science**. v.86, p.39-347. 2008.
- JOUANY, J.P.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. **Journal of Animal Science**. v.86, p.39-347. 2009.
- JULLIAND V.; PHILLIPSON, C.; GOACHET, A.G.; RALSTON, S. Physiology of intake and digestion in equine animals. In: Nutrition of the Exercising Horse. **European Association for Animal Production 125**. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2008, p.53-70.
- JULLIAND, V.; FOMBELLE, A.; DROUGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: 3: effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.21, n.11, p. 543-546. 2001.

- JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L.; FONTY, G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and environmental microbiology**, v.65, n.8, p.3738-3741, 1999.
- KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.Y.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, n.1, p.29-39, 2004.
- LEE, Y.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.; GRATZ, S.; PUONG, K.; SALMINEN, S.; MYKKÄNEN, H. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.426-430, 2003.
- LEEDLE, J.A.; HESPELL, R.B. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.4, p. 709-719, 1980.
- LIESENER, K.; CURTUI, V.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAUER, E.; USLEBER, E. Mycotoxins in horse feed. **Mycotoxin Research**, v.26, p.23–30, 2010.
- MACKIE, R.I.; HEATH S. Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. **Applied and environmental microbiology**, v.38, n.3, p. 416-421, 1979.
- MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2600-2609, 2002.
- MENKE, K.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v.93, p.217–222, 1979.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of horses. 6.ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007. 341p.
- NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.4, p.849-856, 2006.
- PIZZOLITTO R.P.; BUENO D.J.; ARMANDO M.R.; CAVAGLIERI L.; DALCERO A.M.; SALVANO M.A. Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*: a useful model to determine the most efficient microorganism. **Intech online publishers**, p1-20, 2011.
- PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M.; Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v.4156, p.214-221, 2012.
- PRELUSKY, D.B.; MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.2, p.155-162, 1996.
- RICE, L.G.; ROSS, P.F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. **Journal of Food Protection**®, v.57, n.6, p.536-540, 1994.
- RILEY, R. T.; ENONGENE, E.; VOSS, K. A.; NORRED, W. P.; MEREDITH, F. I.; SHARMA, R. P.; SPITSBERGEN, J.; WILLIAMS, D. E.; CARLSON, D. B.; MERRILL, A.

- H. JR. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.301–308, 2005.
- ROSS, P.F.; RICE, L.G.; REAGOR, J.C.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; HARLIN, K.A.; RICHARD, J.L.; COLVIN, B.M.; BANTON, M.I. Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.238–241, 1991.
- SALLES-GOMES, T.L.; ALMEIDA, P.E.; MOREIRA, M.; CANOLA, J.C.; CANOLA, P.A.; SOUZA, H.A. Surto de leucoencefalomálicia equina provocada por ração comercial com concentração de fumonisina inferior a 10 ppm. **ARS Veterinária**, v.19, n.3, p.267-271, 2003.
- SANCHIS, V.; ABADIAS, M.; ONCINS, L.; SALA, N.; VINAS, I.; CANELA, R. Fumonisin B₁ and B₂ and Toxigenic *Fusarium* Strains in Feeds from the Spanish Market. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.37-44. 1995.
- SANTOS, A.S.; RODRIGUES, M.A.M.; BESSA, R.J.B.; FERREIRA, L.M.; MARTIN-ROSSET, W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. **Animal**, v.5, n.01, p.48-56, 2011
- SHEPARD, G.S.; P.W., SNIJMAN. Elimination and excretion of a single dose of a mycotoxin fumonisin B₂ in a non-human primate. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.111-116, 1999.
- SHEPARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SAVARD, M.E. Fate of a single dose of [14C]-labelled fumonizin B₁ in vervet monkeys. **Natural Toxins**, v.3, p. 145–150, 1995.
- SHETTY, P.H.; HALD, B.Y; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.1, p.41-46, 2007.
- SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p.48–55, 2006.
- SMITH, J.S.; THAKUR, R.A. Occurrence and fate of fumonisins in beef. **In: Fumonisin in Food**. Springer US, 1996. p.39-55.
- SRICHANA, D.; ROTTINGHAUS, G.E.; SRICHANA, P.; PORTER, J.H.; KERLEY, M.S.; LEDOUX, D.R.; ELLERSIECK, M.R.. Effect of fumonisin on growth of ruminal bacteria in batch culture. **Thammasat International Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 2, 2009.
- VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview of rodent toxicities: Liver, and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.259–266, 2001.
- VOSS, K.A.; SMITH, G.W.; HASCHEK, W.M. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.299–325, 2007.
- WALKER, C.E.; DROUILLARD, J.S. Effects of catecholamines on gut microflora and potential for beta-adrenergic agonists to impact ruminal fermentation. **The Open Agriculture Journal**, v. 6, p. 57-66, 2012.

WOLOSHUK, C.P.; SHIM, W.B. Aflatoxins, fumonisins and trichothecenes: a convergence of knowledge. **FEMS Microbiology Letters**, v.37, p.94-109, 2013.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**. v.51, p.81-99, 2002.

ZACHARIASOVA, M.; DZUMAN, Z.; VEPRIKOVA, Z.; HAJKOVA, K.; JIRU, M.; VACLAVIKOVA, M.; POSPICHALOVA, M.; FLORIAN, M.; HAJLSLOVA, J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.193, p. 124-140, 2014.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.1, p.1-18, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A habilidade da *Saccharomyces cerevisiae* em adsorver fumonisina B₁ em sistema *in vitro* demonstrou ser cepa-dependente, ressaltando a importância em se avaliar a estrutura da parede celular e relacionar com o mecanismo de adsorção pela levedura.

A elevação do pH 2 para 6.8 através do ensaio de adsorção *in vitro* reduziu a quantidade de FB₁ adsorvida para a cepa Procreatin 7[®], confirmando que a estabilidade da ligação entre FB₁ e *S. cerevisiae* varia de acordo a cepa, podendo a ligação ser influenciada pelo pH neutro.

Em simulação *in vitro* da digestão proximal de equinos, a presença de fumonisina B₁ não afetou a digestão dos nutrientes do milho. Porém, a composição química e moagem das amostras de milho parecem influenciar na biodisponibilidade da FB₁ em solução, visto que a quantidade da micotoxina detectada para o milho moído a 1 mm foi de 57% e dos milhos moídos a 0,5 mm foi superior a 80% após digestão ácida e neutra.

A *Saccharomyces cerevisiae* SC-47 exerceu adsorção similar nas diferentes condições de pH em ensaio *in vitro* em torno de 38%. Contudo, na digestão *in vitro* ácida e neutra com presença de enzimas, embora a *S. cerevisiae* tenha adsorvido FB₁ da solução, o teor de remoção foi em média 65% inferior quando realizada apenas em solução tampão. Pode ocorrer influência da ação enzimática no processo de adsorção da levedura, sendo necessárias avaliações nesse sentido.

A fumonisina B₁ foi de baixa recuperação através do resíduo do milho, o que caracteriza alta solubilidade no meio. Além disso, o tempo permanecido em processo de digestão contribui para o aumento de FB₁ biodisponível em solução, uma vez que após 6 horas do processo de digestão *in vitro*, a quantidade da micotoxina quantificada foi superior em amostras de milho naturalmente contaminado, em relação ao período de 2 horas de digestão.

De acordo os valores de FB₁ quantificados após digestão *in vitro*, onde parte da micotoxina não foi detectada em solução ou no resíduo na forma intacta da molécula, observou-se que pode ocorrer biotransformação em produtos derivados de FB₁, através das reações enzimáticas. Estudos devem ser realizados para verificar quais compostos podem ser formados e se esses produtos são tão tóxicos ou mais que a molécula original.

Na fermentação *in vitro*, a maior parte da micotoxina inicial proveniente do milho não foi recuperada em solução. Além disso, o desaparecimento não foi associado à capacidade adsorvente da *S. cerevisiae*, uma vez que os valores de FB₁ quantificados foram similares entre o milho com e sem adição da levedura. Em função da presença de bactérias fermentadoras e a baixa recuperação da micotoxina em solução, observou-se a possibilidade de haver detoxificação de FB₁ por microrganismos. Análises relacionadas aos produtos derivados da biotransformação da FB₁ devem ser realizadas a fim de avaliar o mecanismo envolvido no desaparecimento da molécula intacta de FB₁.

A não ocorrência de adsorção de FB₁ pela *S. cerevisiae* no processo de fermentação *in vitro* foi descrita em função da baixa recuperação de FB₁ em solução e ausência de diferença entre os tratamentos com milho contaminado. Porém, a adição da *S. cerevisiae* contribuiu para a fermentação proteolítica, o qual promoveu o desenvolvimento da população celulolítica.

Dessa forma mais pesquisas devem ser desenvolvidas a fim de avaliar o impacto da FB₁ na microbiota e os benefícios da *S. cerevisiae* em melhorar os processos fermentativos na ocorrência da micotoxina na solução.