

Eficiência de Bactérias Ácido-Láticas para Descontaminação de Aflatoxina M₁ em Solução Tampão Fosfato

Efficiency of Lactic Acid Bacteria for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Solution

Fernanda Bovo^a; Carlos Humberto Corassin^a; Estela Kobashigawa^b; Roice Eliana Rosim^a;
Carlos Augusto Fernandes de Oliveira^{c*}

^aFaculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Universidade de São Paulo, SP, Brasil

^bDepartamento de Nutrição e Produção Animal Universidade de São Paulo, SP, Brasil

^cDepartamento de Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, SP, Brasil

*E-mail: carlosaf@usp.br

Recebido: 07 de fevereiro de 2011; Aceito: 13 de maio de 2011.

Resumo

A presença de aflatoxina M₁ (AFM₁), substância altamente tóxica encontrada em leite e derivados, pode trazer sérias consequências à saúde humana, principalmente para crianças, cuja sensibilidade é notável e potencialmente maior que em adultos. Assim, a busca por métodos de descontaminação que apresentem eficiência, especificidade e custo-benefício se faz necessária. O objetivo do presente trabalho foi investigar a capacidade de seis espécies de bactérias ácido-láticas em remover a AFM₁ em tampão fosfato salino contaminado. Foram avaliadas as células viáveis e termicamente inviáveis de cada bactéria a 37 °C, pelos tempos de contato de 15 minutos e 24 horas. Todas as cepas bacterianas apresentaram capacidade relativamente baixa de remoção de AFM₁ do meio, variando de 8,14% a 17,42%, sendo que as células inviáveis se mostraram mais eficientes em ambos os tempos analisados. *Enterococcus avium* CTC483 apresentou a maior capacidade de remoção, enquanto *Lactobacillus rhamnosus* PN270 mostrou-se menos eficiente. Pode-se observar também que o processo de remoção da AFM₁ por estas bactérias é reversível, já que parte da toxina voltou para a solução após o processo de lavagem (29,01% a 81,61%). Portanto, é de elevada importância a pesquisa de novas cepas bacterianas que sejam capazes de remover a AFM₁ de forma eficiente, reduzindo a exposição humana e animal a esse contaminante.

Palavras-chave: Aflatoxina M₁. Descontaminação. Leite.

Abstract

The presence of aflatoxin M₁ (AFM₁), a highly toxic compound found in milk and dairy products, can cause serious consequences to human health, especially for children, whose vulnerability is considerable and potentially greater than in adults. Thus, the search for efficient, specific and cost-effective decontamination methods is required. The aim of this study was to investigate the ability of six species of lactic acid bacteria to remove AFM₁ in contaminated phosphate buffered saline. It was evaluated viable and heat-killed bacteria cells at 37 °C with contact times of 15 minutes and 24 hours. All bacterial strains showed relatively low capacity to remove the AFM₁ from the environment, ranging from 8.14% to 17.42%. Heat-killed cells were more efficient in both analyzed periods. *Enterococcus avium* CTC483 presented the highest removal value while *Lactobacillus rhamnosus* PN270 presented the lowest capacity to remove AFM₁. It was also observed that the removal of AFM₁ by bacteria is reversible, since part of the toxin returned to solution after the washing process (29.01% to 81.61%). Therefore, it is very important the search for new bacterial strains that are able to remove efficiently the AFM₁, reducing the human and animal exposure to this toxic contaminant.

Keywords: Aflatoxin M₁. Decontamination. Milk.

1 Introdução

As aflatoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas principalmente pelos fungos filamentosos¹ *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, assim como *A. nominus*, *A. tamaritii* e *A. pseudotamaritii*². Elas apresentam efeitos tóxicos em humanos e animais, como efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e imunossupressivos³, os quais são influenciados pela variação da espécie, sexo, idade, estado nutricional, além da dose e do período de exposição do organismo à toxina⁴. As aflatoxinas apresentam ocorrência mundial, principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical, sendo as espécies de *Aspergillus* capazes de crescer em ampla variedade de substratos, como cereais, especiarias, oleaginosas e frutas secas, e sob diversas

condições ambientais, principalmente em clima quente e úmido^{5,6}.

São conhecidos, atualmente, 18 análogos de aflatoxina, sendo a aflatoxina B₁ (AFB₁) a mais prevalente e a mais tóxica⁷. Quando a AFB₁ é ingerida por animais domésticos, entre eles o gado leiteiro, através do consumo de rações contaminadas, esta sofre biotransformação hepática convertendo-se em aflatoxina M₁ (AFM₁), que é excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais^{8,9}. Creppy¹⁰ relata que da totalidade de AFB₁ ingerida através da ração, aproximadamente 0,3% a 6,2% é transformada em AFM₁ no leite, dependendo de fatores nutricionais e fisiológicos, como regime de alimentação, taxa de ingestão, sanidade do animal, capacidade de biotransformação hepática, presença de infecções mamárias, período de lactação e produção de leite¹¹.

A presença de AFM₁ em leite e derivados pode trazer sérias consequências à saúde humana, já que o leite é o principal nutriente para o crescimento de crianças, cuja sensibilidade é notável e potencialmente maior que em adultos¹². A ingestão diária média ID_M de AFM₁ estimada em países europeus é de 0,11 ng/kg de peso corpóreo (p.c.)/dia¹³. Oliveira *et al.*¹⁴ observaram a ID_M de AFM₁ igual a 3,7 ng/kg p.c./dia, para crianças da rede escolar pública da cidade de São Paulo. A legislação brasileira estabelece que os limites máximos de AFM₁ admissíveis no leite fluido, leite em pó e queijos são 0,5 µg/L, 5,0 µg/kg e 2,5 µg/kg, respectivamente¹⁵. Diversos estudos demonstram a ocorrência frequente de AFM₁ em leite e derivados no Brasil. No Estado de São Paulo, Gonzalez *et al.*¹⁶ pesquisaram a ocorrência de AFM₁ em 43 amostras de leite pasteurizado, observando 11 (25,6%) delas com concentrações acima de 0,5 µg/L.

Portanto, faz-se necessária a busca por métodos de descontaminação que apresentem eficiência, especificidade e custo-benefício, que sejam ambientalmente corretos e possam ser produzidos em larga-escala¹⁷. A biodegradação de aflatoxinas utilizando microrganismos oferece uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação dessas toxinas em alimentos e rações, mantendo sua qualidade e segurança¹⁸. Em revisão detalhada sobre o assunto, Bovo *et al.*¹⁹ explicam a capacidade das bactérias ácido-láticas (BAL) em remover eficientemente a AFB₁ e AFM₁ de meios contaminados. Diversos estudos têm sido realizados a fim de se conhecer a habilidade de remoção de aflatoxinas por esse tipo de bactéria²⁰⁻²³. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a capacidade de algumas espécies de bactérias ácido-láticas em remover a AFM₁ em tampão fosfato salino contaminado.

2 Material e Métodos

2.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Nos testes de remoção de AFM₁ em solução tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, pH 7,3) foram utilizadas 6 cepas de bactérias ácido-láticas gentilmente doadas pelo TECNOLAT – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de Campinas/SP (CTC204 – *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, CTC483 – *Enterococcus avium*, PN16 – *Lactobacillus paracasei*, PN270 – *Lactobacillus rhamnosus*, TR260 – *Lactobacillus plantarum*, TR285 – *Pediococcus pentosaceus*). Todas as cepas bacterianas foram recebidas na forma liofilizada, reativadas em caldo MRS - Man, Rogosa & Sharpe (Acumedia® - Lansing, MI, USA) e conservadas a temperatura de -80 °C na presença de 20% de glicerol (Synth® - Diadema, SP, Brasil). As bactérias foram incubadas em caldo MRS a temperatura de 37 °C por 24 horas, sendo subcultivadas repetidas vezes até que alcançassem concentração elevada de células. A pureza das cepas foi examinada através de cultivo em ágar MRS (Acumedia® - Lansing, MI, USA) para verificação das colônias formadas e por coloração de Gram.

2.2 Estimativa da concentração bacteriana

Para realizar a estimativa da concentração de cada cepa bacteriana, foi construída uma curva relacionando-se a densidade óptica do caldo de bactérias com 24 horas de crescimento a 37 °C, medida em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC (Shanghai Lengguang Technology Co. Ltda – Shanghai, China) a 600 nm, e o logaritmo da concentração bacteriana obtido através da contagem de colônias por plaqueamento em profundidade²⁴.

2.3 Ensaio de remoção de AFM₁ em meio aquoso

Foi utilizado padrão de AFM₁ (Supelco™ - Bellefonte, PA, USA), dissolvido em acetoneitrila e calibrado espectrofotometricamente através da técnica preconizada por Scott²⁵. A solução padrão foi diluída de maneira a obter uma solução de trabalho contendo 0,15µg AFM₁/mL em PBS. Acetoneitrila foi completamente evaporada por injeção direta de nitrogênio em banho a 45 °C. Todos os procedimentos de manipulação da AFM₁ foram realizados em capela de exaustão com fluxo de segurança.

Cada cepa bacteriana foi incubada em caldo MRS a 37 °C por 24 horas e o crescimento interrompido por imersão em banho contendo água e gelo por 3 minutos. Um volume do caldo com a cultura de bactérias correspondendo a 5 x 10⁹ UFC foi centrifugado (Microcentrifuga CT-14000, Cientec – Piracicaba, SP, Brasil) a 1.800g por 15 minutos. Os *pellets* formados foram lavados com água ultrapura (Milli-Q - Millipore® - Billerica, MA, USA) estéril, ressuspensos em 1,5 mL da solução de aflatoxina M₁ em PBS e incubados a 37 °C por 15 minutos e 24 horas. Após a incubação, as células foram novamente centrifugadas a 1.800g por 15 minutos e o sobrenadante obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para cada cepa bacteriana, um controle negativo (células bacterianas suspensas em PBS), um controle positivo (AFM₁ em PBS) e um controle neutro (PBS) foram incubados e analisados. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Os ensaios também foram realizados com as células bacterianas inviabilizadas. Para isso, após a incubação em caldo MRS a 37 °C por 24 horas, a cultura de bactérias foi mantida em banho a 100 °C por uma hora. A seguir, foi utilizado o mesmo procedimento descrito para as células viáveis.

2.4 Quantificação da AFM₁ através de CLAE

Para a quantificação da AFM₁, os sobrenadantes das culturas foram centrifugados a 1.800g por 15 minutos e diretamente injetados no sistema CLAE. Foi utilizado um equipamento constituído de detector de fluorescência RF-10A XL (Shimadzu® - Tóquio, Japão), coluna Sinergy Fusion 4µm C₁₈ 4,6 X 150 mm (Phenomenex® - Torrance, CA, USA) e amostrador automático SIL-10AF (Shimadzu®). A fase móvel utilizada foi água:acetoneitrila:metanol (60:20:20),

fluxo de 1 mL/min, e detecção com comprimento de onda de excitação de 366 nm e emissão de 428 nm. O limite de detecção da técnica foi 0,01 ng/mL, considerando-se a concentração mínima de AFM₁ necessária para gerar um pico cromatográfico 3 vezes maior que o desvio padrão da linha de base dos cromatogramas.

A quantificação da porcentagem de AFM₁ adsorvida pela bactéria foi feita através da Equação 1, onde A representa a porcentagem de AFM₁ adsorvida pela bactéria, B a área do pico cromatográfico do controle positivo, C a área do pico cromatográfico do controle neutro, D a área do pico cromatográfico da amostra e E a área do pico cromatográfico do controle negativo.

$$A = \left\{ \frac{[(B - C) - (D - E)]}{B - C} \right\} * 100$$

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS²⁶, para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as cepas bacterianas e as condições de experimento. Para comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste de Tukey, adotando-se nível de rejeição de 5%²⁷.

3 Resultados e Discussão

As curvas de concentração bacteriana foram construídas através da correlação entre as medidas de absorbância obtidas e do plaqueamento em profundidade de cada bactéria. A partir dos dados obtidos, geraram-se equações potenciais, que foram utilizadas para o cálculo da concentração bacteriana no meio e, conseqüentemente, para o cálculo do volume de meio com o cultivo de bactérias utilizado para alcançar uma concentração de células de aproximadamente 5 x 10⁹ UFC. As equações adequaram-se perfeitamente aos dados, já que o valor dos coeficientes de determinação (R²) de cada uma delas variou entre 0,997 e 0,999.

As porcentagens de remoção de AFM₁ pelas BAL foram obtidas comparando-se os cromatogramas gerados pelo sistema CLAE, tanto para as células bacterianas viáveis quanto para as inviáveis a 37 °C nos tempos de contato de 15 minutos e 24 horas. O tempo de retenção da AFM₁ nas condições de análise especificadas foi de 6,1 minutos. Os resultados encontrados para os ensaios de remoção de AFM₁ em PBS estão descritos na tabela 1.

Comparando-se os resultados encontrados para os diferentes tratamentos aplicados, observa-se que, de maneira geral, as células inviáveis apresentaram as maiores porcentagens de remoção da AFM₁, tanto no tempo de 15 minutos quanto no tempo de 24 horas, exceto para *Lb.*

Paracasei, que não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (p>0,05). Quando analisadas as diferenças de remoção de AFM₁ entre as bactérias estudadas, observou-se que, para as células viáveis no tempo de 15 minutos não houve diferenças significativas entre as bactérias (p>0,05). Entretanto, para as células inviáveis no mesmo tempo de remoção (15 minutos), *Lb. plantarum* apresentou a maior taxa de remoção, embora não tenha diferido significativamente de *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus*. Já no tempo de contato de 24 horas, as células viáveis de *P. pentosaceus* mostraram-se as mais eficazes em remover a AFM₁ do meio, enquanto células inviáveis de *E. avium* apresentaram o maior valor de remoção da toxina, embora este não foi significativamente diferente dos valores de *Lc. cremoris*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. plantarum*.

Tabela 1: Porcentagem de remoção¹ de AFM₁ em solução tampão fosfato

Bactérias	% de Remoção de AFM ₁			
	Viável 15min	Inviável 15min	Viável 24h	Inviável 24h
<i>Lc. cremoris</i>	8,31 ±	11,47 ±	8,57 ±	15,52 ±
	0,68 ^{ab}	2,15 ^{bcB}	1,05 ^{bb}	1,49 ^{abA}
<i>E. avium</i>	9,88 ±	10,51 ±	10,33 ±	17,42 ±
	1,09 ^{ab}	2,99 ^{bcB}	0,39 ^{bb}	1,98 ^{aA}
<i>Lb. paracasei</i>	11,58 ±	12,96 ±	10,53 ±	11,17 ±
	0,79 ^{aA}	1,22 ^{abA}	1,65 ^{bA}	1,60 ^{bA}
<i>Lb. rhamnosus</i>	8,26 ±	15,04 ±	8,14 ±	13,25 ±
	1,37 ^{ab}	2,21 ^{abA}	0,63 ^{bb}	2,22 ^{abA}
<i>Lb. plantarum</i>	11,99 ±	16,92 ±	10,51 ±	15,48 ±
	2,29 ^{abC}	0,68 ^{aA}	0,83 ^{bc}	1,19 ^{abAB}
<i>P. pentosaceus</i>	8,61 ±	9,23 ±	13,13 ±	13,06 ±
	1,95 ^{ab}	1,65 ^{cb}	0,47 ^{aA}	0,37 ^{bA}

¹ Percentual de toxina removida de uma solução contendo 0,15 µg AFM₁/mL. Valores expressos como média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

^{a-c} Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

^{A-C} Em uma mesma linha, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Elgerbi *et al.*²⁸ analisaram a capacidade de remoção de AFM₁ por células viáveis de 12 cepas de BAL em PBS a 37 °C com as contagens bacterianas variando entre 1,3 x 10⁸ e 5,0 x 10⁹ UFC/mL. Após 24 horas de contato, os resultados variaram entre 0% e 14,6%, sendo *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (NCFB 1986) responsável pelo maior resultado, enquanto que *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) e *Lactobacillus plantarum* (DSM 12028) removeram 0,6% e 0,0%, respectivamente. Quando esses valores foram comparados com os observados na tabela 1 para as mesmas espécies, embora para cepas diferentes, percebeu-se que *Lc. cremoris* teve resultado inferior, enquanto que as outras duas bactérias tiveram resultados mais elevados (8,57%, 8,14% e 10,51%, respectivamente). Assim, observa-se que dentro de um dado gênero e até mesmo de determinada espécie, nem

todas as cepas são equivalentes em termos de remoção da toxina, ao contrário, a capacidade de remoção de aflatoxina é característica apenas de linhagens específicas, com sua eficácia variando acentuadamente²⁹.

Pierides *et al.*²¹ analisaram a habilidade de células viáveis e tratadas termicamente de 8 cepas de BAL em remover a AFM₁ em tampão fosfato a 37 °C após 16 horas de contato e obtiveram resultados variando de 18,1 a 53,8% para as células viáveis e de 25,5 a 61,5% para as inviáveis. Os pesquisadores observaram que *Lactobacillus rhamnosus* (cepas GG e LC705) foram as bactérias que apresentaram as melhores taxas de remoção, tanto para as células viáveis (50,7% e 46,3%, respectivamente) quanto para as células inviáveis (57,8% e 51,6%, respectivamente). El-Nezami *et al.*²⁰, trabalhando com as mesmas bactérias, obtiveram resultados de remoção de AFB₁ de 77,0% e 65,0%, respectivamente. Segundo Pierides *et al.*²¹, a remoção da AFM₁ foi menos efetiva possivelmente devido à presença de um grupo –OH adicional na molécula, o que resulta em aumento da polaridade da mesma, tornando-a mais hidrofílica e aumentando sua tendência em ficar retida em soluções aquosas.

Kabak e Var²³ examinaram a capacidade de 4 cepas de *Lactobacillus* e 2 cepas de *Bifidobacterium* em remover a AFM₁ em solução tampão e observaram que as células viáveis (10⁸ UFC/mL) foram capazes de remover de 10,22% a 26,65% da AFM₁ presente na solução, dependendo do nível de contaminação e do período de incubação, enquanto que as células inviáveis removeram de 14,04% a 28,97% da toxina. Os pesquisadores concluíram que o processo de remoção foi rápido, não havendo diferenças significativas entre os tempos de contato de 0, 4 e 24 horas. Já Elgerbi *et al.*²⁸ observaram que cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bifidobacterium* apresentaram porcentagens de remoção variando entre 0% e 14,6% no tempo de 24 horas, e entre 4,5% a 73,1% no tempo de 96 horas.

Observou-se que a viabilidade bacteriana não foi pré-requisito para a remoção de AFM₁ pelas BAL e que alguns tratamentos de inativação, sejam eles físicos, químicos ou enzimáticos, são capazes de aumentar a habilidade das BAL em unir-se à aflatoxina do meio. Haskard *et al.*³⁰ estudaram a capacidade de *L. rhamnosus* GG em unir-se à AFB₁, observando pouca diferença entre a remoção de aflatoxina pelas células tratadas termicamente e com ácido (85% e 91%, respectivamente), em relação às células viáveis da bactéria (86%). Os autores também observaram que a adição de uréia ao meio, um agente antihidrofóbico, diminuiu significativamente a remoção da toxina pelas células inviáveis, de 85 a 91% para 50 a 60%, mostrando que interações hidrofóbicas possuem papel relevante. Além disso, a adição de diferentes concentrações de NaCl e CaCl₂ (de 0,01 a 1M) e variação de pH de 2,5 a 8,5 praticamente não apresentaram efeitos sobre a remoção da AFB₁ pela bactéria, sugerindo que ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas não são importantes.

Azab *et al.*³¹, avaliando a influência de tratamentos de inativação sobre a capacidade de 4 tipos de *Lactobacillus* em remover a AFB₁, observaram que os tratamentos ácido (58,6% a 87,0%) e térmico (33,5% a 71,9%) aumentaram a capacidade de remoção quando comparados à solução tampão (16,3% a 56,6%). Já os tratamentos, alcalino (8,3% a 27,4%) e com etanol (15,9% a 46,5%) diminuíram a quantidade de aflatoxina removida.

Apesar do mecanismo de ação das bactérias sobre as aflatoxinas não ser completamente esclarecido, supõe-se que ocorra ligação de natureza física aos componentes da parede celular bacteriana, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, já que tanto células viáveis quanto inviáveis foram capazes de unir-se à micotoxina, descartando-se a união através de ligações covalentes ou degradação pelo metabolismo da bactéria³².

Os tratamentos de inviabilização causam perturbações à parede celular bacteriana, permitindo que a aflatoxina se vincule aos componentes da membrana celular plasmática que estavam indisponíveis quando esta estava intacta. O tratamento com ácidos rompe ligações glicosídicas em polissacarídeos e proteínas, transformando-os em componentes menores e quebrando a estrutura do peptidoglicano, reduzindo ligações cruzadas e aumentando o tamanho dos poros. No entanto, o tratamento térmico causa a desnaturação de proteínas, aumentando a natureza hidrofóbica de sua superfície e formando produtos da reação de Maillard²². Hernandez-Mendoza *et al.*³³ explicam que a integridade da parede celular bacteriana é importante no processo de remoção de aflatoxina por células viáveis e inviáveis. Em seu estudo com AFB₁, os autores puderam verificar que tanto a parede celular bacteriana quanto seus fragmentos purificados foram capazes de remover a aflatoxina do meio, entretanto, quando ocorreu a perda ou destruição da parede celular (total ou parcial) em resposta a tratamentos enzimáticos, uma diminuição significativa da capacidade de remoção foi observada.

Observa-se na tabela 2 que as quantidades de AFM₁ liberadas de volta para a solução tampão após lavagem da bactéria variaram de 29,01% a 81,61%. As células viáveis de *Lc. cremoris* com tempo de contato de 15 minutos foram as que mais liberaram AFM₁ de volta para o meio, embora não tenham diferido significativamente de *P. pentosaceus* e do resultado apresentando por suas células inviáveis no mesmo tempo de contato. A bactéria que menos liberou a AFM₁ para a solução foi *E. avium*, no tratamento com células viáveis e tempo de 15 minutos. Entretanto, esse valor não apresentou diferenças significativas em relação às suas células viáveis no tempo de 24 horas e ao valor encontrado para as células viáveis de *Lb. paracasei* no tempo de 15 minutos.

Elgerbi *et al.*²⁸ também observaram grande liberação da AFM₁ após a primeira lavagem dos *pellets* bacterianos com PBS (72,7% a 98,7%), sendo que após a terceira lavagem, praticamente toda a AFM₁ adsorvida havia sido liberada de

volta para o meio pelas bactérias analisadas (92% a 100%). Contrariamente, Kabak e Var²³ observaram que apenas pequenas quantidades de AFM₁ voltaram para a solução tampão (5,62% a 8,54%) após uma lavagem.

Tabela 2: Porcentagem¹ de AFM₁ liberada pelas cepas bacterianas após lavagem com PBS

Bactérias	% de AFM ₁ liberada pela bactéria			
	Viável 15min	Inviável 15min	Viável 24h	Inviável 24h
<i>Lc. cremoris</i>	81,61 ± 3,40 ^{aA}	70,11 ± 1,67 ^{aA}	49,63 ± 3,44 ^{aB}	45,05 ± 9,47 ^{eB}
<i>E. avium</i>	29,01 ± 8,27 ^{cC}	69,68 ± 1,95 ^{aA}	34,17 ± 3,28 ^{aBC}	42,01 ± 2,50 ^{eB}
<i>Lb. paracasei</i>	33,74 ± 3,77 ^{eB}	67,29 ± 5,79 ^{aA}	51,89 ± 11,02 ^{aAB}	65,95 ± 6,66 ^{abA}
<i>Lb. rhamnosus</i>	54,13 ± 6,30 ^{bB}	59,61 ± 2,25 ^{abAB}	49,99 ± 8,53 ^{aB}	75,67 ± 7,44 ^{aA}
<i>Lb. plantarum</i>	61,03 ± 6,40 ^{bA}	50,59 ± 2,94 ^{baB}	41,28 ± 6,11 ^{aB}	51,20 ± 5,76 ^{bcAB}
<i>P. pentosaceus</i>	66,88 ± 4,83 ^{abA}	71,19 ± 7,52 ^{aA}	36,64 ± 7,41 ^{aB}	44,00 ± 7,55 ^{eB}

¹ Percentual de toxina liberada pela bactéria após lavagem com solução tampão fosfato.

Valores expressos como média ± desvio padrão de amostras analisadas em triplicata.

^{a-c} Em uma mesma coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

^{A-C} Em uma mesma linha, médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Observa-se grande variação em estudos realizados para avaliar o efeito da lavagem de *pellets* bacterianos sobre a liberação de AFB₁. Enquanto Haskard *et al.*²² observaram que *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705 e *Lactobacillus casei* Shirota liberaram 3,7%, 3,0% e 2,4%, respectivamente, da AFB₁ de volta para a solução; Peltonen *et al.*³⁴ encontraram valores de liberação da AFB₁ na primeira lavagem de 48,6%, 30,7% e 26,5% para *Lactobacillus amylovorus* (cepas CSCC 5160 e CSCC 5197) e *L. rhamnosus* Lc 1/3, respectivamente, e após 5 lavagens, 94,4%, 82,6% e 67,8%, respectivamente.

Portanto, a capacidade de retenção de aflatoxina por BAL é instável e quanto maior o número de lavagens, maior a quantidade de toxina liberada para a solução, mostrando que a ligação é não-covalente fraca e que ocorre uma associação aos sítios hidrofóbicos na superfície bacteriana³⁰. Embora a estrutura da parede celular dos diferentes tipos de BAL seja parecida, existem pequenas diferenças nos sítios de ligação presentes em cada cepa que faz com que exista essa variação na adsorção e na liberação da aflatoxina. Hernandez-Mendoza *et al.*³³ explicam que a menor liberação da toxina para o meio após as lavagens pode ser atribuída às interações entre as moléculas de aflatoxina retidas na parede celular de uma bactéria com as moléculas retidas na parede celular da bactéria adjacente, formando uma espécie de matriz reticulada que impede a liberação da aflatoxina.

4 Conclusão

Os resultados encontrados demonstram que as cepas de bactérias ácido-láticas estudadas não apresentaram elevada eficiência de remoção da AFM₁ em solução PBS. Contudo, pode-se concluir que a viabilidade bacteriana não é um requisito para que ocorra a remoção da toxina e que o processo de adsorção ocorre rapidamente, já que as células inviáveis foram mais eficazes e não se observou diferença entre os tempos analisados. Sendo assim, faz-se necessária a pesquisa de novas cepas bacterianas, e de um maior entendimento dos mecanismos de ação destas sobre as aflatoxinas para que se possam identificar aquelas que são eficazes na remoção das micotoxinas e, assim, ajudem a reduzir a exposição humana e animal a esses contaminantes.

Referências

- Gonçalez E, Pinto MM, Felicio JD. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico* 2001;63(1/2):15-9.
- Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, van Zyl WH. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int J Food Microbiol* 2006;109:121-6.
- Hernandez-Mendoza A, Garcia HS, Steele JL. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1064-8.
- Mishra HN, Das C. A Review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43(3):245-64.
- Park DL, Liang B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends Food Sci Technol* 1993;41:334-342.
- Bhat R, Rai RV, Karim AA. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comp Rev Food Sci Food Saf* 2010;9:57-81.
- Oliveira CAF, Germano PML. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Rev Saúde Pública* 1997;31(4):417-4.
- Oatley JT, Rarick MD, Ji GE, Linz JE. Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria in vitro. *J Food Protection* 2000;63(8):1133-36.
- Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. Food mycotoxins: an update. *J Food Sci* 2006;71(5):51-65.
- Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Letters* 2002;127:19-28.
- Fink-Gremmels J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Addit Contam* 2008;25(2):172-80.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 2009;47:984-91.
- World Health Organization. Evaluation of certain mycotoxins. Geneva: WHO; 2001.
- Oliveira CAF, Germano PM, Bird C, Pinto CA. Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 1997;14:7-10.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n°7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União* 22 fev 2011.
- Gonçalez E, Felicio JD, Pinto MM, Rossi MH, Nogueira

- JHC, Manginelli S. Ocorrência de Aflatoxina M₁ em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. *Arq Inst Biol* 2005;72:435-8.
17. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab Rev* 2009;41(1):1-7.
 18. Alberts JF, Gelderblomb WCA, Botha A, van Zyl WH. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. *Int J Food Microbiol* 2009;135:47-52.
 19. Bovo F, Corassin CH, Oliveira CAF. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 2010;12(2):15-21.
 20. El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 1998;36:321-326.
 21. Pierides M, El-Nezami H, Peltonen K, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J Food Prot* 2000;63(5):645-50.
 22. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(7):3086-91.
 23. Kabak B, Var I. Factors affecting the removal of aflatoxin M₁ from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *J Environ Sci Health Part B*. 2008;43:617-24.
 24. American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products. Washington: APHA; 2004.
 25. Scott PM. Natural poisons. In: Helrich, K. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington: AOAC; 1990.
 26. SAS Institute. SAS User's Guide: statistics. Cary, NC: SAS; 1992.
 27. Gacula JR, Singh J. Statistical methods in food and consumer research. Orlando: Academic; 1984.
 28. Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AAG, Williams AG. Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin M₁ in milk and phosphate buffer. *Milchwissenschaft* 2006;61(2):197-9.
 29. El-Nezami H, Mykkänen H, Haskard C, Salminen S, Salminen E. Lactic acid bacteria as a tool for enhancing food safety by removal of dietary toxins. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Nova Iorque: Marcel Dekker; 2004.
 30. Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Int* 2000;128:39-49.
 31. Azab RM, Tawakkol WM, Hamad ARM, Abou-Elmagd MK, El-Agrab HM, Refai MK. Detection and estimation of aflatoxin B₁ in feeds and its biodegradation by bacteria and fungi. *Egypt J Natl Toxins* 2005;2:39-56.
 32. Lahtinen SJ, Haskard CA, Ouwehand AC, Salminen SJ, Ahokas JT. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam* 2004;21(2):158-64.
 33. Hernandez-Mendoza A, Guzman-de-Peña D, Garcia HS. Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *J Appl Microbiol* 2009;107:395-403.
 34. Peltonen K, El-Nezami, H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Dairy Sci* 2001;84:2152-6.