

Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas

Aflatoxin Decontamination in Foodstuffs by Lactic Acid Bacteria

Fernanda Bovo^a; Carlos Humberto Corassin^b; Carlos Augusto Fernandes de Oliveira^{c*}

Resumo

As aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas e amplamente distribuídas na natureza, que possuem propriedades tóxicas acentuadas e atingem predominantemente culturas como o milho e amendoim. A exposição crônica de seres humanos às aflatoxinas representa sério risco à saúde, o que levou muitos países a criar programas de monitoramento dessa toxina em diversas matérias-primas, bem como a realização de ações para regulamentação e a determinação de limites de tolerância. Desta forma, tornam-se necessárias a criação de estratégias para prevenir a formação de aflatoxinas em alimentos, assim como, eliminar, inativar ou reduzir sua biodisponibilidade em produtos contaminados. Neste contexto, os métodos de descontaminação que envolvem processos biológicos tem sido amplamente estudados, já que a biodegradação de aflatoxinas utilizando microorganismos oferece alternativa interessante para o controle ou eliminação dessas toxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança. De todos os tipos de microorganismos existentes, as bactérias ácido-láticas são as mais estudadas e que apresentam resultados mais promissores na remoção de aflatoxinas do meio contaminado, seja através da inibição da biossíntese da micotoxina ou da sua adsorção, minimizando, então, sua ação. Portanto, o objetivo dessa revisão foi avaliar os progressos científicos sobre a capacidade de bactérias ácido-láticas em degradar as aflatoxinas, bem como identificar seus mecanismos de ação e os principais fatores envolvidos no processo de descontaminação.

Palavras chaves: Aflatoxina B₁. Bactérias ácido-láticas. Descontaminação.

Abstract

Aflatoxins are the best known mycotoxins and more widely distributed in nature, which present markedly toxic properties and that predominantly affect crops like corn and peanuts. The human chronic exposure to aflatoxins is considered a serious health risk problem, hence many countries have set up monitoring programs of this mycotoxin in several commodities, as well as regulatory actions and determination of tolerance limits. There is a need for developing strategies to prevent the formation of aflatoxins in foods, as well as eliminate, inactivate or reduce its bioavailability in contaminated products. In this context, the methods for decontamination involving biological processes have been widely studied, since the biodegradation of aflatoxins using microorganisms offers an interesting alternative for the control or elimination of these toxins in foods and feeds, protecting its quality and safety. Among all types of microorganisms, the lactic acid bacteria are the most studied and have become more promising for the removal of aflatoxins from the contaminated environment, minimizing its action either by inhibiting biosynthesis or adsorption of the mycotoxin. Therefore, the purpose of this review was to evaluate the scientific progress on the ability of lactic acid bacteria to degrade aflatoxins, as well as try to identify its mechanism of action and the main factors involved in the decontamination process.

Keywords: Aflatoxin B₁. Lactic acid bacteria. Decontamination.

^a Mestranda em Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo (USP). E-mail: fernanda.bovo@usp.br.

^b Doutor em Ciência Animal e Pastagens - Universidade de São Paulo (USP). Docente do Centro Universitário Monte Serrat (UNIMONTE) e Fundação de Ensino Superior de Bragança Paulista (FESB). E-mail: carloscorassin@usp.br.

^c Doutor em Saúde Pública - Universidade de São Paulo (USP). Docente da Universidade de São Paulo (USP). E-mail: carlosaf@usp.br.

* Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia de Alimentos, USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13.635-900, Pirassununga-SP.

1 Introdução

Atualmente, cerca de 100.000 fungos já foram identificados, dos quais mais de 400 podem ser considerados potencialmente toxigênicos e cerca de 5% são conhecidos por produzir compostos tóxicos ou classes de compostos que causam efeitos adversos em animais e humanos em diversas partes do mundo¹. Esses compostos, denominados micotoxinas, são metabólitos secundários de baixo peso

molecular produzidos pelos micélios ou esporos de fungos filamentosos². D'Mello e Macdonald (1997)³ sugerem que a produção das micotoxinas é geralmente limitada a um número relativamente pequeno de espécies de fungos, podendo ser toda a espécie produtora ou apenas uma cepa específica, e, ainda, que quanto mais complexo for o caminho da síntese de uma micotoxina, menor o número de espécies de fungos que a produzem.

De todas as micotoxinas isoladas, uma das mais conhecidas e amplamente distribuídas em alimentos, e que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas são as aflatoxinas⁴. Estas são predominantemente produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, mas também podem ser produzidas por outras cepas como *A. nomius*, *A. tamaritii* e *A. pseudotamaritii*⁵. A contaminação por fungos aflatoxigênicos pode ocorrer em qualquer momento durante a produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento⁶, sendo atingidos os mais diversos tipos de

alimentos, como: milho, amendoim, sementes de algodão, arroz, pistache, amêndoas, nozes, castanha do Brasil e sementes de abóbora, bem como outras oleaginosas como girassol e coco⁷.

As aflatoxinas apresentam ocorrência no mundo inteiro, sendo que as espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer em ampla variedade de substratos e sob diversas condições ambientais. A formação da toxina nos produtos agrícolas ocorre em condições de tempo quente e úmido, e em instalações de armazenagem deficiente ou inadequada, sendo que os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a produção de aflatoxinas são: a umidade relativa, que na maioria dos casos a faixa requerida é de 88 a 95%⁶, e a temperatura, sendo ótima para o crescimento do fungo de 36 a 38°C e para a produção máxima de toxina de 25 a 27°C⁸. Outros fatores que podem ainda influenciar a produção de aflatoxinas são: composição do substrato, pH, atmosfera (teor de oxigênio e de dióxido de carbono), competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta^{2,9}.

A preocupação relacionada aos impactos negativos das aflatoxinas sobre a saúde levou à investigação de estratégias para prevenir sua formação em alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade destas toxinas em produtos contaminados¹⁰. Para prevenir a contaminação utilizam-se métodos de melhoria das práticas agrícolas, agentes antifúngicos, engenharia genética e controle das condições de armazenamento². Para reduzir a biodisponibilidade, utiliza-se a enteroadsorção, que é feita por meio da adição na dieta de compostos adsorventes nutricionalmente inertes, os quais são agentes sequestrantes de micotoxinas, pois evitam sua absorção no trato gastrointestinal dos animais, impossibilitando a distribuição para o órgão-alvo^{11,12}, sendo que esse método tem aplicação prática limitada devido à questão de segurança dos adsorventes usados e a dificuldade da sua aplicação em alimentos para humanos¹³. E, por último, para eliminar ou inativar, isto é, para realizar a descontaminação utilizam-se métodos físicos, químicos e biológicos, os quais devem ter como características a completa inativação, destruição ou remoção da toxina; não produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos, preservando seu valor nutritivo e palatabilidade; destruir os esporos e as micelas de fungos para prevenir a produção ou o reaparecimento da toxina; não modificar as propriedades físicas do alimento significativamente, possuir custo acessível e ser de fácil utilização^{1,9}.

Os métodos físicos de descontaminação de micotoxinas envolvem procedimentos como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes, e os métodos químicos utilizam agentes que degradam estruturalmente as micotoxinas, como o uso de cloração (hipoclorito de sódio e cloro gasoso), agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio), ou agentes hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia). Entretanto, ambos os métodos possuem

desvantagens, seja por não removerem eficientemente, ou então, por apresentarem altos custos ou proporcionarem perdas nutricionais aos produtos^{14,15}. Os métodos biológicos decorrem da atuação de microorganismos, como por exemplo, leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas, entre outros, sobre as micotoxinas através de mecanismos como competição por nutrientes e espaço, interações e antibiose¹⁶.

Assim, o objetivo do presente trabalho é fazer uma revisão de literatura nas bases de dados *on line Science Direct, PubMed, Ingenta Connect* e *Scielo* sobre os métodos microbiológicos de descontaminação de aflatoxinas, mais especificamente sobre a capacidade de bactérias ácido-láticas em degradar essa micotoxina.

2 Propriedades Toxicológicas das Aflatoxinas

São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados, com base na sua fluorescência sob a luz ultravioleta (B = *Blue* e G = *Green*), como aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂), sendo que destes compostos a AFB₁ é a mais prevalente e tóxica¹⁷. Quando a AFB₁ é ingerida por animais domésticos, entre eles o gado leiteiro, através do consumo de rações ou alimentos contaminados, ela sofre biotransformação hepática e converte-se em aflatoxina M₁ (AFM₁), tornando-se uma forma hidroxilada da AFB₁ excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais¹⁸⁻²⁰. Creppy²¹ relata que da totalidade de AFB₁ ingerida através da ração, aproximadamente 0,3% a 6,2% é transformada em AFM₁ no leite, e Bakirci²² afirma que existe ainda uma relação linear entre a quantidade de AFM₁ no leite e a ração contaminada por AFB₁ consumida pelos animais.

A exposição crônica a baixos níveis de aflatoxinas representa sério risco à economia e principalmente à saúde⁵. Para a economia, os danos causados estão relacionados a menor eficiência na produção agropecuária e industrial, como a perda na qualidade, bem como menor rendimento e defeitos nos produtos^{1,23}. Alberts *et al*²⁴ relata que, em alguns estados dos Estados Unidos da América, as perdas econômicas na agropecuária chegam a 100 milhões de dólares. Já para a saúde humana e animal, os efeitos biológicos das aflatoxinas podem ser carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e imunossupressivos^{10,25}, sendo estes influenciados pela variação da espécie, sexo, idade, estado nutricional e os efeitos de outros produtos químicos, além da dose e o período de exposição do organismo à toxina²⁶. De acordo com a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*²⁷, a AFB₁ é classificada como pertencente ao grupo 1, carcinogênica para humanos, e a AFM₁ como pertencente ao grupo 2B, possivelmente carcinogênica para humanos, sendo que a AFM₁ é aproximadamente 10 vezes menos carcinogênica que AFB₁.

A AFB₁ é metabolizada pelo fígado através do sistema enzimático citocromo P450 formando o seu metabólito mais

carcinogênico, o AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), ou, ainda, outras formas menos mutagênicas como AFM₁, Q₁ ou P₁. Existem vários caminhos que a AFBO pode seguir depois de metabolizada, sendo que um deles pode resultar em um câncer, outro em toxicidade, e o outro na sua excreção. A exoforma da AFBO se liga facilmente às macromoléculas celulares, incluindo o material genético, como, por exemplo, as proteínas e DNA, formando adutos. É a formação desses adutos de DNA que leva ao aparecimento de mutações genéticas e câncer, sendo que a sua excreção na urina de pessoas infectadas, não só serve como prova de que os seres humanos têm os caminhos bioquímicos necessários para a carcinogênese, mas também oferece um biomarcador confiável para a exposição à AFB₁²⁰.

O potencial risco que as aflatoxinas causam para a saúde humana tem levado à criação de programas de monitoramento da toxina em diversas matérias-primas, bem como a ações de regulamentação por quase todos os países ao redor do mundo⁷. Uma pesquisa realizada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) no ano de 2002 apontou que aproximadamente 100 países possuíam legislação específica para a presença de aflatoxinas em alimentos, produtos lácteos e/ou rações, sendo que a população total desses países representava aproximadamente 90% da população mundial. A mesma pesquisa ainda mostrou que as legislações para aflatoxina estão ficando cada vez mais diversas e detalhadas, incluindo métodos de amostragem e metodologia analítica²⁸. Nos países que possuem legislação para aflatoxinas, os níveis de tolerância para aflatoxina total (soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) variam entre 1 e 35 µg/kg para alimentos, sendo o valor médio de 10 µg/kg, e variam entre zero e 50 µg/kg para rações, com valor médio de 20 µg/kg. Para AFM₁ em leite, os níveis de tolerância estão entre 0,05 e 0,5 µg/kg, sendo que a maioria dos países adota o limite de 0,05 µg/kg⁸. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. A Portaria N°183, de 21 de março de 1996, do Ministério da Agricultura internalizou as normas do MERCOSUL GMC/RES. N°56/94, adotando limites máximos admissíveis de aflatoxinas no leite, amendoim e milho²⁹. Além disto, o Ministério da Saúde, através da Resolução 274, de 15 de outubro de 2002, estabeleceu limites máximos de AFM₁ admissíveis no leite fluido (0,5 µg/L) e em pó (5,0 µg/kg), assim como os limites máximos para aflatoxina total em amendoim e milho (20,0 µg/kg)³⁰.

3 Descontaminação de Aflatoxinas por Bactérias Ácido-Láticas

A biodegradação de aflatoxinas utilizando microorganismos oferece alternativa atrativa para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos e rações, resguardando sua qualidade e segurança²⁴, além de poder ser utilizada com um apelo mais “natural”, já que a resistência do consumidor a tratamentos químicos continua a crescer¹. Os métodos de descontaminação biológicos estão sendo

amplamente estudados e podem ser uma escolha muito promissora, desde que apresentem eficiência, especificidade, e que sejam ambientalmente corretos³¹. De todos os tipos de microrganismos existentes e que podem ser utilizados para a remoção de aflatoxinas do meio contaminado, as bactérias ácido-láticas são umas das mais estudadas e que apresentam resultados mais promissores.

As bactérias ácido-láticas (BAL) são um grande grupo de bactérias geneticamente diversas, que além de produzirem o ácido lático como principal produto do seu metabolismo, possuem características comuns como serem gram-positivas, não-esporogênicas, não se locomoverem espontaneamente, e serem catalase e oxidase negativas. Portanto, elas crescem anaerobicamente, mas são aero-tolerantes. Além disso, elas obrigatoriamente fermentam açúcares e tendem a ser nutricionalmente exigentes, frequentemente requerendo aminoácidos específicos e vitaminas do complexo B como fatores de crescimento³². Vários gêneros de BAL, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactococcus*, são conhecidos por sua capacidade de atuar como agentes conservadores em produtos alimentícios fermentados, como vegetais, cereais, produtos lácteos e carnes, através da inibição ativa da deterioração e de bactérias patogênicas, além de melhorar a vida de prateleira e as propriedades sensoriais¹⁹. Esta inibição é, em parte, devido aos produtos finais da fermentação, como ácido lático, diacetil, acetaldeído e ácido acético, que podem acumular para níveis inibitórios em certos alimentos e bebidas. Em outros casos, a inibição pode, ainda, ser causada por subprodutos secundários da atividade metabólica, tais como peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas³³.

Portanto, dois aspectos podem ser considerados quando se utilizam as BAL: a fermentação e a antibiose. No primeiro caso, a cultura iniciadora adicionada age sobre o substrato, resultando em benefícios ao alimento, e no segundo caso, a cultura iniciadora deve inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que causam danos ao produto ou à saúde humana. Fuchs *et al*³⁴ comenta que um dos efeitos identificados das BAL é a proteção contra toxinas contidas nos alimentos, como aminas heterocíclicas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, espécies reativas de oxigênio e micotoxinas. Neste último caso, estudos têm demonstrado que as BAL possuem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, ou ainda, possuem a habilidade de remover a micotoxina do meio minimizando a ação desta. Ressalta-se que com o aumento de interesse na produção de alimentos probióticos em todo o mundo, a seleção de culturas de BAL com características probióticas e com alta capacidade de remoção das micotoxinas poderá ajudar a reduzir os riscos de exposição a essas toxinas através dos alimentos, caracterizando-se como uma linha de pesquisa bastante promissora na área de micotoxicologia. Shetty e Jespersen³⁵ afirmam que cepas de leveduras e BAL possuem alta capacidade de remoção de micotoxinas e podem ser usadas como parte de

culturas *starter* na fermentação de alimentos e bebidas, tendo, portanto, capacidade fermentativa e descontaminante, e que componentes purificados dessas mesmas cepas podem ser usados em pequenas quantidades como aditivos alimentícios sem comprometerem as características do produto final.

Um dos primeiros estudos nessa área foi o realizado na década de 1960 por Ciegler et al³⁶, quando os autores avaliaram a habilidade de cerca de 1.000 tipos de microrganismos em degradar a aflatoxina, entre eles leveduras, fungos filamentosos, bactérias, actinomicetos, algas e esporos de fungos, sendo que destes apenas a bactéria *Flavobacterium aurantiacum* B-184 (conhecida atualmente como *Nocardia corynebacterioides*) foi capaz de remover irreversivelmente as aflatoxinas da solução. Depois desse estudo, muitos outros foram realizados, entretanto, os mais significativos na área começaram a aparecer após a década de 1990. El-Nezami et al¹⁵ avaliaram a ação de 7 diferentes tipos de bactérias sobre a AFB₁ e encontraram que algumas cepas de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LC-705) conseguiram remover eficientemente boa parte da micotoxina do meio, alcançando até cerca de 80% de remoção. Haskard et al²³ analisaram 9 cepas de *Lactobacillus* e também chegaram ao resultado de que *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LC-705 foram mais eficientes na remoção da AFB₁, chegando a 78,9% e 76,5%, respectivamente. Peltonem et al¹⁹ estudaram 15 tipos de BAL, entre elas *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e 5 tipos de bifidobactérias, e obtiveram resultados de remoção com a AFB₁ variando de 5,6 a 59,7%, sendo que as cepas de *Lactobacillus amylovorus* (CSCC 5160 e CSCC 5197) e *L. rhamnosus* LC 1/3 foram as que apresentaram melhores resultados, 59,7%, 57,8% e 54,6% respectivamente. Oatley et al¹⁸ observaram que diferentes cepas de bifidobactérias removeram de 37 a 46% da AFB₁, e que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* removeram 46 e 37%, respectivamente.

A maioria dos ensaios de remoção de aflatoxinas dos trabalhos citados anteriormente foi realizada em soluções tampão. Shahin³⁷ além de testar a habilidade de 27 cepas de *Lactococcus* ssp. e 15 cepas de *Streptococcus* ssp., isoladas de iogurte, leite cru e queijo *Karish*, em remover AFB₁ em solução tampão, observando que *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* apresentaram os maiores níveis de remoção de toxina (54,85% e 81,0%, respectivamente), também testou a habilidade de remoção de AFB₁ das células viáveis e não-viáveis em diferentes óleos vegetais, e observou que as células viáveis de *L. lactis* removeram de 71 a 86,7% da AFB₁, enquanto que as células não-viáveis removeram 100% da toxina em todos os óleos. Ainda, as células viáveis de *S. thermophilus* removeram de 66,5 a 91,5% da toxina, e as não-viáveis de 81,7 a 96,8% da AFB₁. Rasic et al³⁸ adicionaram AFB₁ ao iogurte e leite acidificado, em concentrações de 1.000 e 1.400 µg/Kg, obtendo a redução da AFB₁ no iogurte (pH 4,0) de 97,8 e 90%, respectivamente, sendo que a diminuição máxima da AFB₁ ocorreu durante a fermentação do leite. Para o leite acidificado com os ácidos cítrico, láctico e acético (pH

4,0), a redução da AFB₁ (concentração de 1.000 µg/Kg) foi de 90, 84 e 73%, respectivamente. Pierides et al²⁵, investigando a habilidade de *L. rhamnosus* GG em remover AFM₁ de preparados de leite em pó desnatado e integral, obtiveram remoção de 18,8% e 26,0%, respectivamente. Os autores concluíram que essa menor efetividade de remoção pode ser explicada pelo fato de a AFM₁ possivelmente não estar acessível no leite, isto é, estar associada à caseína, sendo que a interferência das proteínas no processo de remoção pode ser responsável pela diferença entre os leites desnatado e integral (aproximadamente 10% menor), já que o leite desnatado em pó utilizado no estudo continha 37g proteína/100g, enquanto que o conteúdo protéico do leite integral em pó era de 25g/100g. No mesmo estudo, comparou-se, ainda, a atividade de remoção de AFM₁ em solução tampão (50,7%) com a remoção de AFB₁ na mesma solução (75,3%) pela mesma cepa bacteriana, concluindo-se que a remoção da primeira micotoxina foi menos efetiva possivelmente devido à presença de um grupo -OH adicional na molécula de AFM₁ resultando em aumento de polaridade, o que a torna mais hidrofílica e amplia sua tendência em ficar retida em soluções aquosas. Alguns tratamentos físicos, químicos e enzimáticos podem aumentar a habilidade das BAL em unir-se à aflatoxina do meio. Haskard et al³⁹ 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%). A aplicação de vários tratamentos físicos e químicos (ácido clorídrico e tratamento térmico em autoclave ou fervura a 100°C) sobre *L. rhamnosus* GG e LC-705 causou aumento significativo na remoção com a AFB₁, verificando-se que a degradação metabólica por parte das células viáveis das bactérias pode ser descartada como possível mecanismo de atuação^{13,15}. Comparando-se a habilidade de células viáveis e tratadas termicamente de bifidobactérias, chegou-se ao resultado de que as células viáveis removeram de 4 a 56% da AFB₁ do meio, enquanto as células não-viáveis de 12 a 82%¹⁹. Na remoção de AFM₁ utilizando 8 cepas de BAL, encontrou-se que as células tratadas termicamente uniram-se mais eficientemente (25,5 a 61,5%) do que as células bacterianas viáveis (18,1 a 53,8%)²⁵. Em tratamentos utilizando pronase E, lipase e periodato, o tratamento com periodato produziu significativas reduções nessa capacidade tanto para as células viáveis quanto para as não-viáveis, já que causa a oxidação dos grupos -OH *cis* em grupos aldeídos e ácido-carboxílicos, sugerindo que a união ocorre predominantemente com os polissacarídeos da bactéria. O tratamento com pronase E causou a mesma redução significativa na remoção da AFB₁, evidenciando que proteínas podem estar também envolvidas no processo. Assim, o fato da pronase E e periodato terem ambos efeito significativo sobre a remoção de AFB₁, indica que os sítios de ligação são de natureza protéica. Já o tratamento com lipase não causou nenhuma diminuição significativa na

remoção da AFB₁, mostrando que a participação de lipídios, como o ácido lipoteicoico, é pouco provável. Embora os tratamentos utilizados diminuíssem a remoção de AFB₁, em todos os casos esta ainda continuou ocorrendo em quantidades substanciais, mostrando possivelmente envolvimento de múltiplos componentes na ligação com a micotoxina²³.

Pode-se perceber pelos exemplos citados que ambas as células, viáveis e não-viáveis, conseguem remover a aflatoxina em soluções aquosas. Pelo fato das células não-viáveis conseguirem também realizar essa remoção da toxina, supõe-se que ocorra uma união de natureza física com a mesma, ou seja, uma adesão aos componentes da parede celular bacteriana, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, ao invés de ocorrer através de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo da bactéria^{1,35,40}. Tanto os polissacarídeos quanto os peptidoglicanos da parede celular bacteriana devem ser muito afetados pelos tratamentos térmicos e ácido, já que o calor pode causar a desnaturação de proteínas ou a formação de produtos da reação de Maillard. Além disso, o ácido pode romper as ligações glicosídicas em polissacarídeos, liberando monômeros que podem ser ainda mais fragmentados em aldeídos, degradando também as proteínas até componentes menores como peptídeos e aminoácidos. Assim, o tratamento ácido pode quebrar a estrutura do peptidoglicano, comprometendo sua integridade estrutural, isto é, diminuindo a espessura dessa camada, reduzindo as ligações cruzadas e aumentando o tamanho dos poros. Essas perturbações causadas pelos tratamentos citados permitem que a AFB₁ se vincule à parede celular bacteriana e aos componentes da membrana plasmática, os quais não estavam disponíveis quando a célula bacteriana estava intacta²³.

Entretanto, não apenas o tipo de cepa bacteriana e o tratamento de inativação aplicado podem influenciar sobre a formação e a estabilidade do complexo BAL/aflatoxina, mas também muitos outros fatores como a concentração bacteriana, a especificidade da bactéria, o pH, a temperatura de incubação, a adição de nutrientes, os solventes utilizados e outros^{10,19,23,39}.

Analisando-se o efeito de lavagens sobre a estabilidade do complexo BAL/AFB₁, observou-se que parte da aflatoxina se libertou do complexo após as lavagens e retornou gradualmente para a solução aquosa. Deste modo, quanto maior foi o número de lavagens, mais aflatoxina foi liberada para a solução, mostrando que a ligação que as unia não era forte e sugerindo que essa ligação era não-covalente fraca, ocorrendo associação a sítios hidrofóbicos na superfície bacteriana^{19,39}. Contrariamente a esta hipótese, D'Souza e Brackett⁴¹, realizando as mesmas lavagens sobre o complexo formado entre *Flavobacterium aurantiacum* e AFB₁, observaram que não houve liberação da aflatoxina na solução aquosa. Outro estudo sobre a estabilidade do complexo formado entre AFB₁ e 8 cepas de *Lactobacillus casei* após as lavagens demonstrou que as quantidades de aflatoxina que foram liberadas variaram entre praticamente zero e 9,2%.

Possíveis explicações para essa variação na liberação de AFB₁ existente entre as cepas incluem diferenças nos sítios de ligação presentes nas diferentes cepas, ou, então, mais provavelmente, que esses sítios de ligação são similares, mas que apresentam diferenças mínimas dependendo de cada cepa¹⁰.

Avaliando a interferência da concentração bacteriana no meio, observou-se que uma concentração mínima de 5×10^9 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium longum* é necessária para remover apenas 13% da AFB₁ em cerca de uma hora⁴². Para os microrganismos *Lactobacillus* e *Propionibacterium*, foi preciso uma concentração mínima de 2×10^9 UFC/mL para remover 50% da AFB₁, sendo que remoção maior aconteceu quando a concentração de BAL foi elevada para 10^{10} UFC/mL¹⁵. Nesse mesmo estudo, os autores ainda observaram a dependência em relação à temperatura, já que a eficiência de remoção de aflatoxina foi maior a 37°C ao invés de 4°C e 25°C. Complementarmente, observou-se que bactérias gram-positivas são melhores sequestradoras de aflatoxina do meio que bactérias gram-negativas, com taxas de remoção de 80 e 20%, respectivamente, sugerindo que a habilidade de remoção da toxina é dependente da estrutura da parede celular. Haskard *et al*²³ também realizaram ensaios em diferentes temperaturas de incubação de AFB₁ com *L. rhamnosus* GG e LC-705, mas não observaram mudanças significativas na estabilidade do complexo BAL/AFB₁ formado na faixa de temperatura de 4°C a 37°C. Quando o pH do meio foi variado de 2 até 10, faixa na qual está incluído o pH do trato gastrointestinal, apenas 10% da AFB₁ removida foi liberada para a solução, ao contrário dos solventes orgânicos que liberaram quase toda a AFB₁ removida pelas cepas bacterianas, proporcionando mais uma evidência de que a ligação é não-covalente. Neste estudo, a ordem de efetividade de extração foi: metanol < acetona < benzeno < clorofórmio, não coincidindo com a ordem de decréscimo da polaridade. Isso pode ser explicado pela hidrofobicidade da molécula de AFB₁ ser mais semelhante à molécula de clorofórmio. Estes resultados mostram mais uma vez que as interações hidrofóbicas desempenham papel importante no mecanismo de união entre a BAL e a toxina.

Examinando-se outros fatores que pudessem influenciar na atividade de *L. rhamnosus* GG sobre a AFB₁, observou-se que ao adicionar uréia ao meio, a remoção da toxina diminuiu significativamente para as células não-viáveis de 85 a 91% para 50 a 60%. Como a uréia é um agente anti-hidrofóbico, o seu efeito de diminuição na taxa de remoção da toxina implica que interações hidrofóbicas possuem papel relevante na mesma, pelo menos para as células não-viáveis. A adição de diferentes concentrações de NaCl e CaCl₂ (de 0,01 a 1M) e uma 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 não são importantes³⁹. A estabilidade do complexo BAL/AFB₁ em uma ampla faixa de pH é fator importante para o uso de probióticos com esse fim em alimentos fermentados, já que a liberação da toxina durante a passagem gástrica teria

implicações negativas para a saúde, de modo que o complexo formado deve resistir aos principais estresses ambientais durante a passagem pelo trato gastrointestinal, como o baixo pH e a presença de bile. Com relação à influência da presença de bile sobre o complexo BAL/ AFB₁ formado, observou-se que as cepas de *L. casei* removeram mais AFB₁ quando expostas à bile e que as diferenças de remoção existentes entre essas cepas diminuíram, sugerindo que a exposição à bile causa modificações na estrutura e na composição da parede celular do *L. casei*, induzindo provavelmente à formação de novos sítios de ligação para a aflatoxina, ou, então, aumentando o tamanho dos sítios já existentes¹⁰. El-Nezami *et al*¹³ investigaram a habilidade de *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS em remover a AFB₁ de um meio líquido intestinal extraído do duodeno de frangos, e observaram que a concentração de AFB₁ reduziu 54% em apenas 1 minuto na presença de *L. rhamnosus* GG, enquanto que apenas 44% na presença de *L. rhamnosus* LC705 e 36% na presença de *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. Os autores observaram que o acúmulo de AFB₁ no tecido intestinal apresentou redução de 74%, 63% e 37%, respectivamente para *L. rhamnosus* (cepas GG e LC705) e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, mostrando que essas bactérias podem afetar a biodisponibilidade da aflatoxina e serem utilizadas para redução da sua toxicidade em humanos e animais.

4 Considerações Finais

Considerando os dados de diversos experimentos realizados até o presente momento, pode-se perceber que os microorganismos, entre eles as bactérias ácido-láticas, possuem grande potencial de aplicação para a degradação de aflatoxinas em alimentos. Entretanto, são necessárias novas pesquisas para identificação de espécies bacterianas com maior potencial de ligação com aflatoxinas, já que existem diferenças de sensibilidade e seletividade, verificando-se também a influência de fatores intrínsecos e extrínsecos às células bacterianas no processo de descontaminação. Uma vez cumpridas essas etapas para escolha das espécies com maior eficiência, poderão ser desenvolvidas tecnologias de produção que sejam viáveis economicamente, com vistas à sua aplicação em alimentos para seres humanos e animais.

Referências

- Bata A, Lasztity R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. Trends Food Sci Technol. 1999;10:223-28.
- Gonzalez E, Pinto MM, Felicio JD. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico*. 2001;63(1/2):15-9.
- D'Mello JPF, MacDonald AMC. Mycotoxins. Anim Feed Sci Technol. 1997;69:155-66.
- An Z. Handbook of Industrial Mycology. New York: Marcel Dekker, 2005.
- 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.
- Park DL, Liang B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. Trends Food Sci Technol. 1993;41:334-42.
- Chu FS. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. Mutation Res. 1991;259:291-306.
- Abbas HK. Aflatoxin and food safety. Boca Raton: CRC Press; 2005.
- Magan N, Olsen M. Mycotoxins in food: Detection and Control. Boca Raton: CRC Press; 2006.
- Hernandez-Mendoza A, Garcia HS, Steele JL. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. Food Chem Toxicol. 2009;47:1064-68.
- Gratz S, Mykkänen H, El-Nezami H. Aflatoxin B1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. J Food Prot. 2005;68(11):2470-4.
- Sekiyama BL, Ferrari G, Machinski Junior M. Processos de descontaminação de rações contendo micotoxinas. Rev Analytica. 2007;26:64-67.
- 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. J Food Prot. 1998;61(4):466-8.
- Line JE, Brackett RE. Factors affecting aflatoxin B1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. J Food Prot. 1995;58(1):91-4.
- El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food Chem Toxicol. 1998;36:321-6.
- Fazeli MR, Hajimohammadali M, Moshkani A, Samadi N, Jamalifar H, Khoshayand MR, et al. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. J Food Prot. 2009;72(1):189-92.
- 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):417-24.
- Oatley JT, Rarick MD, Ji GE, Linz JE. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. J Food Prot. 2000;63(8):1133-6.
- 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.
- 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 Lett. 2002;127:19-28.
- Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control 2001;12:47-51.
- Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpaa PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 2001;67(7):3086-91.

24. 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.
25. Pierides M, El-Nezami H, Peltonem 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.
26. Mishra HN, Das C. A Review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(3):245-64.
27. IARC International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1993;56:19-23.
28. Van Egmond HP, Jonker MA. Worldwide regulations on aflatoxins – The situation in 2002. *Toxin Rev.* 2004;23:273-93.
29. Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº183 de 21/03/1996. Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho. Brasília: Ministério da Agricultura; 1996.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº274 de 15/10/2002. Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim e no Milho. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
31. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabol Rev.* 2009;41(1):1-7.
32. Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. *Dairy Science and Technology.* Boca Raton: CRC Press; 2006.
33. Onilude AA, Fagade OE, Bello MM, Fadahunsi IF. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *Afr J Biotechnol.* 2005;4(12):1404-8.
34. Fuchs S, Sontag G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1398-1407.
35. Shetty PH, Jespersen L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17:48-55.
36. Ciegler A, Lillehoj EB, Peterson RE, Hall HH. Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl Environ Microbiol.* 1966;14(6):934-9.
37. Shahin AAM. Removal of aflatoxin B1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *Int J Agric Biol.* 2007;9(1):71-5.
38. Rasic JL, Skrinjar M, Markov S. Decrease of aflatoxins B1 in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia* 1991;113:117-9.
39. Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact.* 2000;128:39–49.
40. 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.
41. D'Souza DH, Brackett RE. Aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *J Food Prot.* 2001;64(2):268-71.
42. Bolognani F, Rummey CJ, Rowland IR. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem Toxicol.* 1997;35:535-45.
43. El-Nezami H, Mykkänen H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *J Food Prot.* 2000;63(4):549-52.

