

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MARIA CLARA CÂNDIDO MOREIRA

**EFEITO DOS PROBIÓTICOS *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus rhamnosus* E
PREBIÓTICOS INULINA E OLIGOFRUTOSE NA REDUÇÃO E
BIOACESSIBILIDADE DE AFB₁ EM LEITE FLUÍDO**

MEDIANEIRA

2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MARIA CLARA CÂNDIDO MOREIRA

**EFEITO DOS PROBIÓTICOS *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus rhamnosus* E
PREBIÓTICOS INULINA E OLIGOFRUTOSE NA REDUÇÃO E
BIOACESSIBILIDADE DE AFB₁ EM LEITE FLUÍDO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel.

Orientador (a): Deisy A. Drunkler

Co-orientador(a): Daniélly Nascimento Morais

MEDIANEIRA
2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Coordenação Engenharia de Alimentos

Maria Clara Cândido Moreira

**EFEITO DOS PROBIÓTICOS *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus rhamnosus* E
PREBIÓTICOS INULINA E OLIGOFRUTOSE NA REDUÇÃO E
BIOACESSIBILIDADE DE AFB₁ EM LEITE FLUÍDO**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado às 19:00 horas do dia 17 de Junho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira de Alimentos, do Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

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

Co-orientadora: Daniélly Nascimento Morais

Membro da Banca: Eliane Colla

Membro da Banca: Tânia Becker-Algéri

Aluno

Medianeira, 17 de junho de 2019

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso.

RESUMO

MOREIRA, MARIA CLARA CÂNDIDO. **Efeito dos probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* e prebióticos inulina e oligofrutose na redução e bioacessibilidade de AFB₁. EM LEITE FLUÍDO.** 54 PÁGINAS Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira, 2019.

O leite é uma importante fonte de nutrientes, sendo consumido pela maioria da população mundial. Porém, pode sofrer contaminações, sendo estas químicas, físicas e biológicas. Um dos mais preocupantes contaminantes químicos são as micotoxinas, com destaque a aflatoxina B₁ (AFB₁) devido a sua toxicidade. Visando a preocupação com a saúde, são vários os estudos que foram realizados para promover a descontaminação parcial ou total do leite. Dentre eles, estão os métodos envolvendo o emprego de probióticos. O emprego de prebióticos para descontaminação ou redução da bioacessibilidade ainda é recente. Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação dos probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* e dos prebióticos inulina e oligofrutose na redução e na bioacessibilidade de AFB₁ em leite UAT artificialmente contaminado. Houve redução de AFB₁ em todos os tratamentos, sendo o melhor tratamento àquele adicionado dos dois probióticos, com uma redução de 88,47%. Entre os prebióticos, a inulina, quando adicionada sozinha, foi a que apresentou melhor resultado de redução da contaminação (84,69%). Em relação a bioacessibilidade, a utilização do probiótico *L. casei* resultou em uma bioacessibilidade de 11,53%, ao passo que a adição de oligofrutose teve uma bioacessibilidade de 34,43%. Com isso, pode-se perceber que a aplicação destes microrganismos aliados a prebióticos é eficaz na redução de AFB₁ em leite, podendo ser aplicada na indústria láctea.

Palavras-chave: micotoxinas, descontaminação, leite.

ABSTRACT

MOREIRA, MARIA CLARA CÂNDIDO. **Efeito dos probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* e prebióticos inulina e oligofrutose na redução e bioacessibilidade de AFB₁. EM LEITE FLUÍDO.** 54 PAGES. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira, 2019.

Milk is an important source of nutrients, being consumed by the majority of the world population. However, it can suffer with contaminations, being these chemical, physical and biological. One of the most worrying chemical contaminants is mycotoxins, with emphasis on aflatoxin B₁ due to its toxicity. Aiming at health concerns, several studies have been carried out to promote partial or total decontamination of milk. Among them are methods involving the use of probiotics. The use of prebiotics for decontamination or reduction of bioaccessibility is still recent. The objective of this work was to evaluate the action of probiotics *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* and the prebiotics inulin and oligofructose in the reduction and bioaccessibility of AFB₁ in artificially contaminated milk. When analyzing the results, it was observed that there was a reduction of AFB₁ in all the treatments, being the best treatment to that added of the two probiotics, with a reduction of 88.47%. Among prebiotics, inulin, when added alone, was the one that presented the best result (84.69%). Regarding bioaccessibility, the use of the probiotic *L. casei* resulted in a bioaccessibility of 11.53%, while the addition of oligofructose 34.43%. With this, it can be noticed that the application of these microorganisms allied to prebiotics is effective in the reduction of AFB₁ in milk, and can be applied in industries.

Keywords: mycotoxins, decontamination, milk.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.1 Objetivos Específicos	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Leite.....	11
3.2 Micotoxina.....	13
3.3 Probióticos.....	16
3.4 Prebióticos.....	17
3.5 Estudos que envolvem a remoção de micotoxinas em leite e derivados empregando probióticos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Padrões e reagentes químicos.....	20
4.2 Preparo da solução padrão de aflatoxina B ₁ e quantificação.....	20
4.3 Condição de cultura e estimativa da concentração bacteriana.....	21
4.4 Validação do método de QUECHERS para determinação da aflatoxina AFB ₁	23

4.5 Capacidade de remoção das aflatoxinas pelo probiótico e prebiótico.....	23
4.6 Análise de digestibilidade in vitro.....	26
4.7 Extração e concentração das aflatoxinas.....	26
4.8 Quantificação e identificação por cromatografia a líquido de ultra alta eficiência – UHPLC.....	28
4.9 Ações do micro-organismo probiótico e dos prebióticos na descontaminação das aflatoxinas.....	29
4.10 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Curva de concentração bacteriana.....	31
5.2 Validação do Método de Quechers.....	32
5.3 Avaliação do percentual de redução de AFB ₁ em leite por <i>L. casei</i> e <i>L. rhamnosus</i> e prebióticos.....	35
5.4 Avaliação da bioacessibilidade de AFB ₁ em leite pela ação de <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. casei</i> e prebióticos.....	39
6 CONCLUSÃO.....	43
7 REFERÊNCIAS... ..	44
APÊNDICE A.....	54
APÊNDICE B.....	55

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma importante fonte de nutrientes; no entanto, pode ser contaminado por uma série de compostos físicos, químicos ou biológicos, dentre eles as micotoxinas.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma grande variedade de fungos filamentosos, especialmente por espécies dos gêneros *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Claviceps sp.*, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.* (ERKMEN; BOZOGLU, 2016). Dentre as micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas.

As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B₁, B₂, G₁ e G₂ (OLIVEIRA, 2010) e produzidas, principalmente, por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é uma das micotoxinas de maior toxicidade e abundância, sendo classificada no “Grupo I” pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como composto altamente carcinogênico para os seres humanos (IARC, 2012), pois possuem propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressores, que podem causar efeitos adversos na saúde humana e animal, os quais são influenciados pela variação da espécie, sexo, idade, estado nutricional, além da dose e do período de exposição do organismo à toxina (BOVO et al., 2013; ELSANHOTY et al., 2014).

A AFB₁ contamina o leite através da ingestão de silagem e ração contaminada. No organismo animal, acreditava-se que toda a AFB₁ era convertida em AFM₁ e esta, somente, encontrava-se no leite no entanto, tem sido demonstrado que a AFB₁ também pode estar presente no leite (CARVAJAL et al., 2003; ZAIN, 2011; SCAGLIONI et al., 2014), o que faz com que mecanismos para redução do percentual e da bioacessibilidade desta aflatoxina sejam estudados.

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos nas doses apropriadas e com alguma frequência, podem ser acrescentados aos alimentos com o propósito de regular a microflora intestinal do hospedeiro resultando em efeitos benéficos (FAO/WHO, 2006).

O uso de microrganismos probióticos como descontaminantes de aflatoxinas tem sido estudado por inúmeros autores, tais como Bovo (2011); Corassin (2013); Oliveira (2010); El-Khoury; Atoul; Yaghi (2011); Serrano-Nino et al. (2013), Becker-Algeri (2016), Vasconcelos (2016) e Wochner (2017), que comprovam que cepas probióticas removem e/ou inativam as aflatoxinas (M_1 e B_1) impedindo a sua adsorção pelas células intestinais do consumidor.

Assim, além dos efeitos benéficos relacionados na literatura pelo consumo destes micro-organismos (NOGUEIRA, 2011, SAAD, 2006, TUOHY, 2003), o efeito na concentração e bioacessibilidade de micotoxinas amplia a importância da adição destes em alimentos.

O emprego conjunto de probióticos e prebióticos tem resultado na elaboração de produtos denominados de simbióticos. Entende-se por prebiótico “todo ingrediente alimentar não digerível que afeta de maneira benéfica o organismo por estimular seletivamente o crescimento e ou atividade de um número limitado de bactérias do cólon” (BRASIL, 2011). Entre os prebióticos já consolidados e utilizados comercialmente estão a inulina e a oligofrutose (KONAR et al., 2016).

A incorporação em alimentos de ingredientes que confirmam a propriedade simbiótica resultando na elaboração de um produto funcional tem despertado interesse na realização de estudos sobre sua capacidade em retardar ou reduzir a absorção de micotoxinas. Como a procura por alimentos funcionais tem crescido nos últimos anos e estudos tem demonstrado que o uso de um ou de outro é efetivo na redução do percentual ou da bioacessibilidade, a avaliação de diferentes cepas de microrganismos probióticos e de prebióticos torna-se interessante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos microrganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* e a contribuição de prebióticos inulina e oligofrutose na redução e bioacessibilidade de AFB₁ em leite integral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ação dos microrganismos probióticos, isolados e/ou combinados, na redução e bioacessibilidade da AFB₁ em leite integral artificialmente contaminado.

Avaliar a ação dos prebióticos, isolados e/ou combinados, na redução e bioacessibilidade da AFB₁ em leite integral artificialmente contaminado.

Avaliar a ação conjunta dos microrganismos probióticos e dos prebióticos na redução e bioacessibilidade da AFB₁ em leite integral artificialmente contaminado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2017).

Segundo o Relatório da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) de 2016, aproximadamente 150 milhões de lares em todo o mundo estão envolvidos na produção leiteira, sendo característica da maioria dos países em desenvolvimento a produção a partir de pequenos agricultores (ZOCCAL, 2016).

O leite é considerado um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, sendo essencial no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (CARVALHO et al., 2017)

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), o Brasil se mantém entre os quatro maiores produtores de leite no *ranking* mundial no ano de 2017. Entretanto, ao se falar de produção regional, em 2018 o Paraná se manteve em terceiro lugar em relação à produção de leite do país, ficando atrás apenas de Minas Gerais e Rio Grande do Sul.

Além do valor nutritivo que consiste em proteínas, lipídios e carboidratos, o leite contém numerosas substâncias biologicamente ativas, tais como imunoglobulinas, enzimas, peptídeos, antimicrobianos, oligossacarídeos, hormônios, citosinas e fatores de crescimento (EBRINGER, 2008).

Quimicamente, o leite é uma dispersão mista, opaca, de cor branca, levemente adocicado, de caráter neutro, constituído de gorduras em emulsão, proteínas em

estado coloidal (caseína), hidratos de carbono (lactose), sais (citratos e fosfatos) e vitaminas (A e D) em solução num meio dispersante (água) (OLIVEIRA, 2010).

Em relação à qualidade do leite, esta pode ser avaliada através de determinações físicas, químicas, microbiológicas, sensoriais e provas de higiene. A composição química deve ser sempre analisada nos laticínios e nas indústrias em razão dos padrões mínimos exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (VENTUROSOSO, 2007).

O leite Ultra Alta Temperatura (UAT), também denominado de UHT (da sigla, em inglês *Ultra High Temperature*), é assim denominado devido ao tratamento térmico aplicado, que consiste na utilização de Ultra-alta temperatura (UAT), sendo de 130° a 150°C, durante um curto período de tempo, de 2 à 4 segundos e posteriormente resfriada em temperaturas abaixo de 32°C (DALPIAZ & PINTO, 2016; BRASIL, 1997). Possui vida útil relativamente longa, pois são associados ao seu processamento as tecnologias de ultra pasteurização e o envase asséptico em embalagens longa vida com a retirada do ar durante o fechamento da embalagem, garantindo ao leite UAT a preservação de suas propriedades organolépticas e nutritivas, sem a necessidade da utilização de conservantes e de refrigeração, facilitando o processo de transporte e armazenamento. Estas vantagens existentes na utilização deste processo provocaram nos últimos anos uma redução significativa no consumo de leite pasteurizado em virtude do aumento do consumo do leite UAT (SILVA, 2019).

Apesar de passar por tratamento térmico, alguns contaminantes do leite podem se manter presentes, em especial, as micotoxinas (DOS SANTOS et al., 2014), por serem termoestáveis e por não serem destruídas por métodos de processamento usados na produção do leite UAT (TAHEUR, 2017). Por este motivo, as micotoxinas se tornaram foco deste trabalho.

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma grande variedade de fungos filamentosos, especialmente por espécies dos gêneros *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Claviceps sp.*, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.* (ERKMEN; BOZOGLU, 2016).

Existem mais de 400 tipos de micotoxinas, mas somente 20 são frequentemente quantificadas em alimentos, sendo que as principais são: ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e aflatoxinas (CARDOSO FILHO, 2015).

Dentre as micotoxinas, a aflatoxina, produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, tem recebido grande atenção em comparação com as demais micotoxinas, devido aos efeitos carcinogênicos que podem provocar em animais e o efeito tóxico em seres humanos (PEREIRA et al., 2002).

A presença de micotoxinas nos alimentos depende de fatores biológicos, ambientais, das condições de colheita e de armazenamento. Dentro estes fatores, consideram-se a suscetibilidade do cultivo de oleaginosas; a presença de fungos toxigênicos durante o cultivo; a presença de danos mecânicos e causados por insetos; o estado de maturação do cultivo; a umidade relativa; a atividade de água e a temperatura de armazenamento (SERNA, 2018). Para MAZIERO E BERSOT (2010), o pH, a composição química do alimento e o potencial redox também favorecem a produção de micotoxinas.

As principais aflatoxinas conhecidas foram denominadas de B₁, B₂, G₁ e G₂. Esta classificação foi feita com relação à fluorescência sob luz ultravioleta (B= *Blue*, G= *Green*) e à mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada (FREIRE et al., 2007). São solúveis em solventes polares como clorofórmio,

metanol e acetonitrila, característica que fez o uso destes solventes serem amplamente utilizados em metodologias de análise (OLIVEIRA, 2010).

A Aflatoxina B1 (AFB₁) é uma das micotoxinas de maior toxicidade e abundância, sendo classificada no “Grupo I” pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como composto altamente carcinogênico para os seres humanos (IARC, 2012). Este pode causar também hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão e carcinoma hepático (MURPHY et al., 2006).

Em leite e derivados, a principal aflatoxina presente é a aflatoxina M₁ (MAZIERO, 2010). 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 AFM₁, que é excretada no leite, tecidos e fluidos biológicos desses animais (OATLEY, 2000; MURPHY, 2006).

Segundo Fink-Gremmels (2005), parte da AFB₁ é degradada no rúmen, resultando na formação de aflatoxicol. A fração restante é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva, sendo hidroxilada no fígado em AFM₁. Por sua vez, AFM₁ é conjugada com ácido glicurônico e excretada via bile ou transferida para o sistema circulatório. A excreção de AFM₁ inicia após 12-24 h da ingestão de alimentos contaminados com AFB₁, atingindo níveis elevados em poucos dias e desaparecendo cerca de 24 h depois de ter sido eliminados da dieta (NACHTMANN et al., 2007). A ocorrência de AFM₁ no leite atinge níveis máximos após 2 dias da ingestão de ração contaminada (DRAGASSI, 1995).

No entanto, estudos têm demonstrado que nem toda a AFB₁ é convertida em AFM₁ e, por conseguinte, permanecem resíduos deste componente no leite (CARVAJAL et al., 2003; ZAIN, 2011; SCAGLIONI et al., 2014).

Existe uma relação proporcional entre a dose e o nível de contaminação, sendo que a biodisponibilidade é tomada como pressuposto básico. O termo biodisponibilidade foi definido como a fração de um composto bioativo presente em uma matriz ingerida pelo humano que não se modifica estruturalmente por meio das

reações ocorridas no trato digestivo e, assim, torna-se disponível para absorção intestinal (FERNANDEZ-GARCÍA et al., 2009; MALLEBRERA et al., 2013).

Em vários países, existem legislações que estabelecem limites máximos para a presença de aflatoxinas em alimentos *in natura*, processados e em rações, visando proteger os consumidores contra os efeitos nocivos dessas micotoxinas. (FREIRE et al, 2007). Em relação à segurança do leite, a Resolução RDC N° 07 da ANVISA, de 18 de fevereiro de 2011, estabelece o limite máximo de AFM₁ de 0,5 µg/L para leite fluido e 5,0 µg/L para leite em pó (BRASIL, 2011). Porém, não faz alusão ao limite máximo de AFB₁.

As aflatoxinas são resistentes a altas temperaturas, de 237 a 320°C, se decompondo de acordo com o tempo de aquecimento, umidade e pH do alimento. Sendo assim, as aflatoxinas não são destruídas por processos de Ultra Alta Temperatura (UAT) (SERNA, 2018). Por essa razão, o risco permanece não somente no leite disponível comercialmente, mas também nos seus produtos derivados (SANTOS, 2014).

Com isso, é grande a demanda por estratégias que previnam tanto a formação de aflatoxinas nos alimentos e rações, na tentativa de redução do impacto da contaminação existente, quanto a sua remoção em produtos já contaminados (SANTOS, 2014).

De todos os tipos de microrganismos existentes e que podem ser utilizados para a remoção de aflatoxinas do meio contaminado, as bactérias ácido-láticas, em especial os probióticos, são as mais estudadas e que apresentam resultados mais promissores (BOVO, 2010).

3.3 PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos nas doses apropriadas e com alguma frequência, podem ser acrescentados aos alimentos com o propósito de regular a microbiota intestinal do hospedeiro resultando em efeitos benéficos (FAO/WHO, 2006). A avaliação realizada pelos órgãos deve contemplar três fatores principais: comprovação da identidade da linhagem do microrganismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (ANVISA, 2017). Além de manter um nível apropriado de células viáveis durante o armazenamento do produto, sem interferir no sabor e textura (GALLINA et al., 2012). A Federação Internacional de Laticínios (IDF) recomenda uma quantidade mínima de 10^7 UFC por g de produto consumido (GALLINA, 2019).

A maioria dos microrganismos probióticos são Bactérias Ácido Láticas (BAL), Gram-positivo, geralmente catalase-negativo, não esporulantes, anaeróbios estrictos, facultativos ou que crescem em microaerofilia. Assim sendo, os probióticos incluem espécies de BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* e outros (ALVIN, 2015).

O gênero *Lactobacillus* conta hoje com 56 espécies reconhecidas. Dezoito delas, presentes na microbiota intestinal de humanos, são consideradas de interesse como probióticos, tais como *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - *subsp. paracasei* e *subsp. tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (BADARÓ, 2008).

Os seus mecanismos de ação incluem a remodelação de comunidades microbianas e a supressão de agentes patogênicos, supressão de agentes pró-inflamatórios, efeitos na diferenciação de células epiteliais e proliferação e promoção da barreira intestinal (ALMEIDA, 2018).

Assim, ressalta-se que com o aumento de interesse na produção de alimentos probióticos em todo o mundo, a seleção de culturas 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.

3.4 PREBIÓTICOS

De acordo com a legislação brasileira, prebióticos podem ser definidos como “todo ingrediente alimentar não digerível que afeta de maneira benéfica o organismo por estimular seletivamente o crescimento e ou atividade de um número limitado de bactérias do cólon” (BRASIL, 2011). É uma substância que modifica a composição da microbiota intestinal de tal forma que as bactérias com potencial de promoção de saúde tornam-se a maioria predominante

Em 2017, um grupo de especialistas revisaram e atualizaram o conceito de prebiótico para “substratos seletivamente utilizados pelos microrganismos conferindo benefícios à saúde do hospedeiro” (GIBSON, et al., 2017).

Para que um ingrediente (ou grupo de substâncias) possa ser definido como tal, deve cumprir os seguintes requisitos: não ser digerida por enzimas digestivas, nem absorvido na porção superior do trato digestório; ser seletivamente fermentado por uma colônia de bactérias potencialmente benéficas ao cólon, alterando para uma composição da microbiota mais saudável e ser osmoticamente ativa (RAIZEL, 2011).

Todavia, a partir de novas descobertas científicas, notou-se que outras substâncias fazem parte do grupo de prebióticos, como os fenólicos de vegetais, que não são digeridos e chegam intactos ao colón, onde podem servir de substrato para a microbiota presente no colón, e o xilooligossacarídeo (muito utilizado em gomas de

mascar), que abrange a nova descoberta em que os prebióticos não atuam somente no intestino, podendo ter ação em outros locais do corpo (PERES, 2018).

A fermentação prebiótica aumenta a diversidade e a atividade da microbiota intestinal através de mecanismos de “cross-feeding”, promovendo o crescimento de microrganismos probióticos (Valcheva e Dieleman, 2016).

A inulina e a oligofrutose pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos e estão entre os prebióticos mais estudados (KONAR et al., 2016). As fontes mais comuns incluem: banana, alho, cebola, trigo, tomate, alho porró, mel, alface, beterraba, maçã, açúcar mascavo, centeio, cevada, cerveja, aspargos, alcachofra, chicória, bardana, triticale, yacon, aveia e leite humano (FONTES, 2009).

A inulina e oligofrutose são carboidratos complexos e possuem algumas propriedades funcionais e tecnológicas importante. São fibras solúveis fermentáveis, não digeríveis pela alfa amilase nem pelas enzimas hidrolíticas (maltase, sacarase), contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal. Portanto, o aumento de inulina e oligofrutose em alimentos não aumenta seu índice glicêmico, o que os tornam ingredientes potenciais para uso em alimentos para diabéticos. (FIGUEIREDO, 2018).

3.5 ESTUDOS QUE ENVOLVEM A REMOÇÃO DE MICOTOXINAS EM LEITE E DERIVADOS EMPREGANDO PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS

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

O mecanismo real de remoção de aflatoxinas por probióticos ainda não é completamente conhecido; porém, a literatura indica que as aflatoxinas se ligam à

parede celular bacteriana e não são metabolicamente degradados (CORASSIN et al., 2013; PELTONEN ET AL., 2001).

Por ser um método prático, econômico e seguro para descontaminação, tem incentivado a realização de vários estudos visando a redução da contaminação por aflatoxinas (HASKARD et al., 2001; CORASSIN et al., 2013; BOVO, 2011; OATLEY, et al., 2000; EI-KHOURY, ATOUI; YAGHI, 2011, VASCONCELOS, 2016, BECKER-ALGÉRI, 2016; WOCHNER, 2017; SALADINO, 2017; CHLEBICZ, 2019; PANWAR, 2019); porém, a maioria destes em sistemas modelo e não em alimentos propriamente ditos.

Em relação à ação dos prebióticos, estudos têm sido realizados visando avaliar a bioacessibilidade de micotoxinas (MALLEBRERA et al. 2013; MECA et al., 2012, VASCONCELOS, 2016) e, mesmo assim, são muito escassos.

Quando se trata de estudos envolvendo a ação conjunta de prebiótico e probiótico, existem poucos trabalhos que demonstram resultados na redução e bioacessibilidade de aflatoxinas B₁ (VASCONCELOS, 2016, WOCHNER, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PADRÕES E REAGENTES QUÍMICOS

O padrão da micotoxina AFB₁ e as enzimas para a determinação da digestibilidade *in vitro* foram adquiridas da *Sigma Chemical Company*® (St. Louis, MO, Estados Unidos). Os micro-organismos probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* foram adquiridos na empresa Sacco Lyofast (Cadorago, Itália). Todos os solventes utilizados na cromatografia líquida possuíram pureza analítica grau HPLC e a água utilizada foi ultrapurificada em sistema purificador de água por osmose reversa (Osmose 10 LX, Gehaka, 2010) acoplada a um sistema ultrapurificador de água (Master System P&D TOC, MS 2000, Gehaka). Os solventes cromatográficos e água foram filtrados em sistema de filtração a vácuo e desgaseificados por 20 minutos usando banho ultrassom (Elma, Elmasonic, Alemanha). O leite ultra alta temperatura (UAT) integral foi adquirido no comércio local e os prebióticos oligofrutose (Raftilose P95, Orafti®) e inulina (Raftiline GR, Orafti®) foram gentilmente cedidos por empresa especializada.

4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE AFB₁ E QUANTIFICAÇÃO

O preparo da solução padrão da micotoxina AFB₁ bem como a determinação da concentração seguiu o proposto por Scaglioni et al. (2014). Para o preparo da solução de AFB₁, 1 mg foi diluído em 100 mL de solução benzeno:acetonitrila (98:2 v.v⁻¹), dividido em 10 frascos âmbar e evaporados em corrente de N₂ a 45°C. Os frascos

secos foram devidamente vedados e armazenados sob temperatura de congelamento (-20 °C). Para verificar a real concentração da aflatoxina, um frasco do padrão foi diluído com metanol P. A., e quantificado em espectrofotômetro de UV-VIS (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido), no comprimento de onda de 360 nm (SCAGLIONI et al., 2014). A concentração final da solução padrão foi calculada pela Equação 01.

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

Onde: A = absorvância MW = peso molecular do composto, AFB₁=312 ε= absortividade molar, AFB₁=21800

Para obter a solução de trabalho empregada na contaminação das amostras de leite integral, o padrão de AFB₁ seco foi ressuspendido em solução de benzeno:acetonitrila (98:2 v.v⁻¹) (SCAGLIONI et al., 2014) até a concentração de interesse para as análises e, a seguir, colocado em banho de ultrassom (ElmasonicP, Elma, Singen, Alemanha) por 10 minutos a temperatura ambiente (25° ± 2 °C), para garantir a homogeneização da aflatoxina.

4.3. Condições de cultura e estimativa da concentração bacteriana

A cultura de *Lactobacillus casei* foi pré-ativada na proporção de 1%(mv⁻¹) em frasco contendo 10 mL de caldo de Man Rogosa-Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Germany) com 0,05% de L-cisteína e incubado a 37 ± 1°C por 36 horas. Após, foi acrescentado 90 mL de caldo MRS e incubado novamente em estufa bacteriológica (Fanem, Orion® 502, São Paulo, Brasil) até atingir o máximo de concentração

bacteriana, estimado através de curva de calibração de densidade ótica versus contagem microbiana (EL KHOURI; ATOUI; YAGUI, 2011; KABAK; OZBEY, 2012a).

A cultura de *Lactobacillus rhamnosus* foi pré-ativada em 5mL de caldo MRS e incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas, e após acrescentado 95 mL de caldo MRS e incubado novamente em estufa bacteriológica (Fanem, Orion® 502, São Paulo, Brasil) até atingir o máximo de concentração bacteriana, estimado através de curva de calibração de densidade ótica versus contagem microbiana (EL KHOURI; ATOUI; YAGUI, 2011; KABAK; OZBEY, 2012).

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

Para estimar a concentração bacteriana do *L. casei* e *L. rhamnosus* no caldo MRS (1% m.v⁻¹) foi utilizada a técnica de leitura da densidade ótica. Após o crescimento da cultura bacteriana em caldo MRS por 36 e 6 horas, respectivamente, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ foi criada uma curva de calibração correlacionando-se a medida da absorbância a 600 nm do caldo diluído em água peptonada (espectrofotômetro UV-Vis duplo feixe com varredura, Lambda XLS, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), com o logaritmo da concentração bacteriana obtida através da contagem de colônias por plaqueamento em profundidade (BOVO et al., 2013). A partir desses dados, foi gerada a equação para calcular a concentração bacteriana no meio e o volume de caldo de cultura necessário para obter a concentração desejada no leite. Para avaliar a capacidade do *L. casei* e *L. rhamnosus* em remover a micotoxina estudada, cada inóculo foi ajustado e mantido na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹, que

se refere a concentração em que os probióticos devem estar presentes, por porção de alimento, conforme indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999).

4.4 Validação do método QuEChERS para determinação da aflatoxina AFB₁

Para avaliar a porcentagem de recuperação (%R) do método, alíquotas de 15 mL de amostra foram fortificadas (em triplicata) com 3 diferentes níveis, para AFB₁ (10, 5 e 1 µg.L⁻¹). Após fortificação, as amostras foram ultrassonificadas por 15 min a 37 °C e foram submetidas à extração pelo método de QuEChERS e posterior injeção em UHPLC para identificação e quantificação. O método foi validado para extração de AFB₁ em leite UAT homogeneizado através da estimativa do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, linearidade e recuperação (%R), conforme proposto pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

A porcentagem de recuperação foi calculada através da Equação 4.

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

Em que: %R = porcentagem de recuperação C1= concentração determinada na amostra fortificada; C2= concentração determinada na amostra não fortificada; C3= concentração do padrão utilizado para a fortificação. (BRASIL, 2003).

4.5 Ações do microrganismo probiótico e dos prebióticos na descontaminação das aflatoxinas

Para avaliar o efeito dos probióticos e dos diferentes prebióticos na descontaminação e bioacessibilidade de AFB₁ em leite integral foi empregado o delineamento proposto na Tabela 1.

Para a realização do ensaios, o padrão de AFB₁ seco foi ressuspensionado em metanol, até obter a concentração desejada para fortificação do leite (6,5 µg.L⁻¹) para as contaminações, colocados em banho de ultrassom (ElmasonicP, Elma, Singen-Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente (25° ± 2°C) para homogeneização e transferidos para erlenmeyer de 250 mL.

Tabela 1: Delineamento experimental para avaliação do efeito do *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus*, inulina e oligofrutose na redução (%) e bioacessibilidade (%) de AFB₁ em leite integral artificialmente contaminado

Tratamentos	Variáveis
1	Controle negativo
2	Controle positivo
3	<i>L. casei</i> + AFB ₁
4	<i>L. rhamnosus</i> + AFB ₁
5	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + AFB ₁
6	Inulina + AFB ₁
7	Oligofrutose + AFB ₁
8	<i>L. casei</i> + Inulina + AFB ₁
9	<i>L. casei</i> + oligofrutose + AFB ₁
10	<i>L. casei</i> + Inulina + Oligofrutose + AFB ₁
11	<i>L. rhamnosus</i> + Inulina + AFB ₁
12	<i>L. rhamnosus</i> + Oligofrutose + AFB ₁
13	<i>L. rhamnosus</i> + Inulina + Oligofrutose + AFB ₁
14	Inulina + Oligofrutose + AFB ₁

15	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + Inulina + AFB ₁
16	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + Oligofrutose + AFB ₁
17	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + Inulina + Oligofrutose + AFB ₁

Nota: Concentração de AFB₁: 6,5 µg.L⁻¹; concentração dos probióticos: 10⁸ UFC.mL⁻¹; concentração dos prebióticos: 0,75% m.v⁻¹

Fonte: Autoria própria, 2019

O erlenmeyer com AFB₁ foi então seco em estufa (50° ± 1°C) para evaporar todo o metanol. A seguir, foi adicionado 100 mL de leite integral e levado os frascos para banho ultrassom por 5 minutos a temperatura ambiente (25° ± 2°C), com o objetivo de obter uma solução homogênea.

Finalizada a etapa de fortificação, foi feita a adição dos prebióticos no nível superior (0,75% m.v⁻¹) que está baseada na Lista de Alegações de Propriedades Funcionais e de Saúde da ANVISA para que estes compostos exerçam ação benéfica ao organismo humano (BRASIL, 1999) e da biomassa de *L. casei* e *L. rhamnosus*, na concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹, seguindo o proposto na Tabela 01. Para tal, os probióticos foram previamente incubados em caldo MRS (1% m.v⁻¹) com 0,05% (m.v⁻¹) de L-cisteína por 24 e 3 h, respectivamente, a 37 ± 1 °C e quantificado através de leitura de absorbância (em triplicata) em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Waltham, São Paulo). Para a estimativa da concentração bacteriana utilizou-se a curva de crescimento do micro-organismo, determinando desta forma o volume de caldo MRS a ser coletado, que foi submetido à centrifugação (CT-5000R, Cientec, Piracicaba, SP, Brasil) a 3000 rpm por 5 minutos a 25 °C de acordo com Pispan, Hewitt e Stapley (2013), a fim de obter a concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹.

4.6 Capacidade de remoção das aflatoxinas pelo probiótico e prebióticos

Para avaliar a capacidade de remoção de micotoxinas foi utilizada metodologia adaptada de El Khouri, Atoui e Yaghi (2011). Para tal, 15 mL de cada tratamento foram coletados e submetidos ao processo de extração e quantificação da aflatoxina. O percentual de remoção das aflatoxinas foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{Redução} = \frac{\text{Concentração esperada} - \text{Concentração obtida}}{\text{Concentração esperada}} \times 100 \quad (2)$$

4.7 Teste de digestibilidade *in vitro*

Os tratamentos foram submetidos à digestibilidade *in vitro*, segundo procedimento adaptado proposto por Kabak e Ozbey (2012) e Versantvoort et al (2005). A digestão *in vitro* consiste em simular as condições de digestão no ser humano, sendo utilizada para determinar a bioacessibilidade das aflatoxinas das amostras de leite previamente contaminadas e a eficácia do *L. casei* e *L. rhamnosus* e dos prebióticos em reduzir a quantidade disponível da AFB₁ para absorção intestinal. No modelo de digestão utilizado para este estudo, 4,5 mL de leite de cada tratamento foi coletado para análise. O esquema da composição dos sucos digestivos é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Constituintes dos sucos gástricos do modelo de digestibilidade *in vitro*.

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

Fonte: Adaptado de VERSANTVOORT et al., (2005). As soluções orgânica e inorgânica foram aumentadas para 500 mL com água destilada. Após misturar e homogeneizar as soluções

orgânica e inorgânica, foram adicionados e dissolvidos mais alguns constituintes. Quando necessário fez-se o ajuste do pH.

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

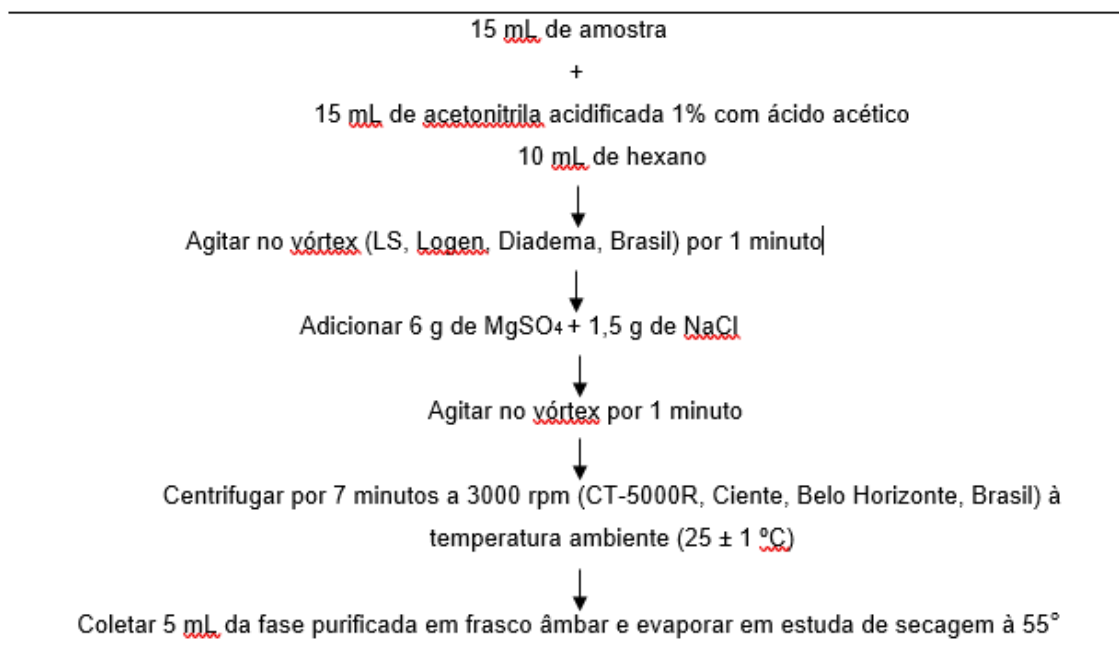
A bioacessibilidade dos compostos foi calculada a partir da Equação 03:

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \frac{\text{composto obtido do quimo}(\mu\text{g. L}^{-1})}{\text{composto obtido da amostra antes da digestão}(\mu\text{g. L}^{-1})} \times 100 \quad (3)$$

4.8 Extração e concentração das aflatoxinas

A AFB₁ foi extraída e purificada conforme método de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) descrito por Sartori et al. (2015) e com algumas modificações descritas na Figura 1.

Figura 1: Método de QuEChERS para extração e purificação de AFB₁



Fonte: adaptado de Sartori et al., (2015).

Para a quantificação da AFB₁, a amostra seca foi ressuspensa em 500 µL de solução de metanol, agitada em vórtex por 30 segundos e submetida a determinação cromatográfica.

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

Para a separação e quantificação da AFB₁ foi utilizado cromatógrafo à líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) acoplado de detector de fluorescência (UHPLCFL) (Dionex Corporation, Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) e os dados foram processados no software Chromeleon 7.2. A corrida cromatográfica

foi realizada em coluna de fase reversa C18 Acclaim PA 2, 5 μm Analítica (4,6 x 250 mm), com vazão de fase móvel de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura da coluna de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A fase móvel foi composta por acetonitrila:metanol:água acidificada a 1,5% com ácido acético (35:10:55), filtrada e degaseificada antes da sua inclusão no aparelho. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 360 nm e 450 nm, respectivamente, e o volume de injeção da amostra foi de $20 \mu\text{L}$. O tempo das corridas cromatográficas foi de 10 minutos.

4.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e quando detectada diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de probabilidade ao Teste de *Tukey studentized*, utilizando o programa computacional Software STATISTICA 10.

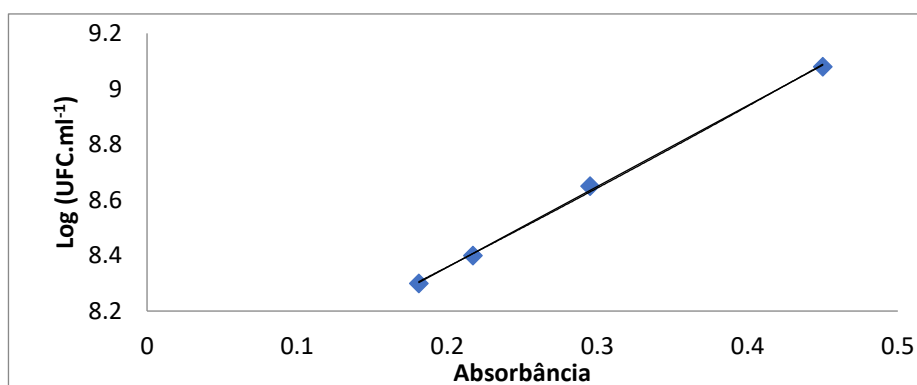
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA

As curvas de concentração bacteriana (Figura 3 e 4) foram construídas através da correlação entre as medidas de absorbância obtidas e do plaqueamento em profundidade do *L. rhamnosus* e *L. casei*. A partir dos dados obtidos, gerou-se as equações: $y = 2,9109x + 7,7757$ e $y = 1,0074x + 8,9758$, respectivamente, que foram utilizadas para o cálculo da concentração bacteriana no meio e, posteriormente, o cálculo do volume de meio para alcançar uma concentração de células de, aproximadamente, 10^8 UFC.mL⁻¹. Os dados se ajustaram de forma adequada as equações geradas, uma vez que os valores dos coeficientes de determinação (R^2) foram de 0,9991 e 0,9980.

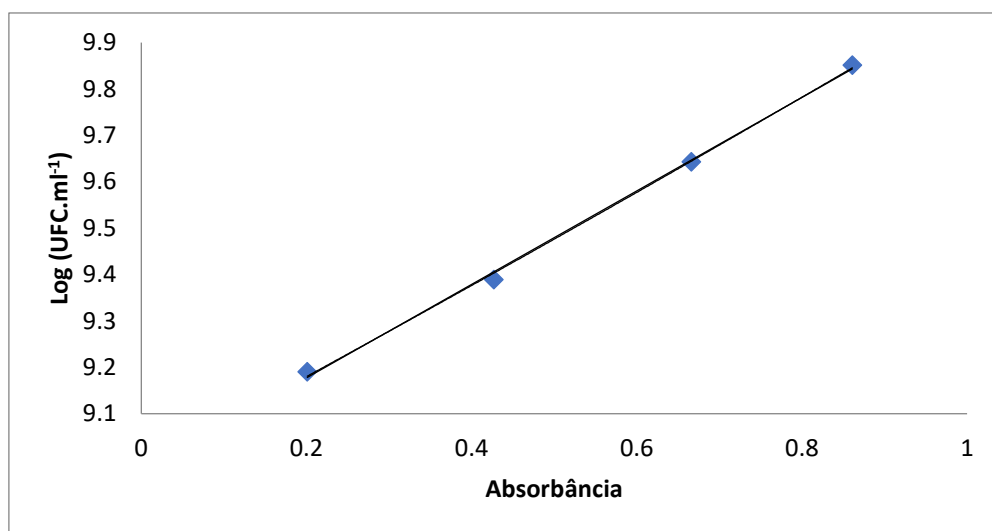
Nas figuras abaixo, se encontra a curva de cada microrganismo e suas equações.

Figura 3: Curva de concentração bacteriana para a cepa probiótica *L. rhamnosus*.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 4: Curva de concentração bacteriana para a cepa probiótica *L. casei*.



Fonte: Autoria própria, 2019.

5.2 Validação do Método de Quechers

Cada amostra foi fortificada com concentrações conhecidas de AFB₁ e comparada com a amostra padrão (amostra sem contaminação), determinando-se assim a sua seletividade. Não foram observados sinais interferentes no tempo de retenção registrado da AFB₁ (~7,5 min). A linearidade da curva de calibração foi verificada nos intervalos de concentração estudados com coeficientes de determinação satisfatórios ($R^2 = 0,9993$), evidenciando dessa forma o ajuste ideal dos dados à linha de regressão. A curva de regressão linear para AFB₁ foi $y = 394079x - 106,6$. O intervalo de concentração para a curva de trabalho da AFB₁ foi de 0,5 – 4,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir dos limites de detecção (LODi) e quantificação (LOQi) previamente determinados para o instrumento para a AFB1 (0,3 e 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente) (BRASIL, 2003). A repetibilidade do método foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo percentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação (%R) do método sintetizados na Tabela 3. Os valores de recuperação (%R) variaram de 84,0% a 113,33% e a precisão foi comprovada a partir dos valores de RSD(%) que não ultrapassaram os 28,67%, adequando-se aos padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

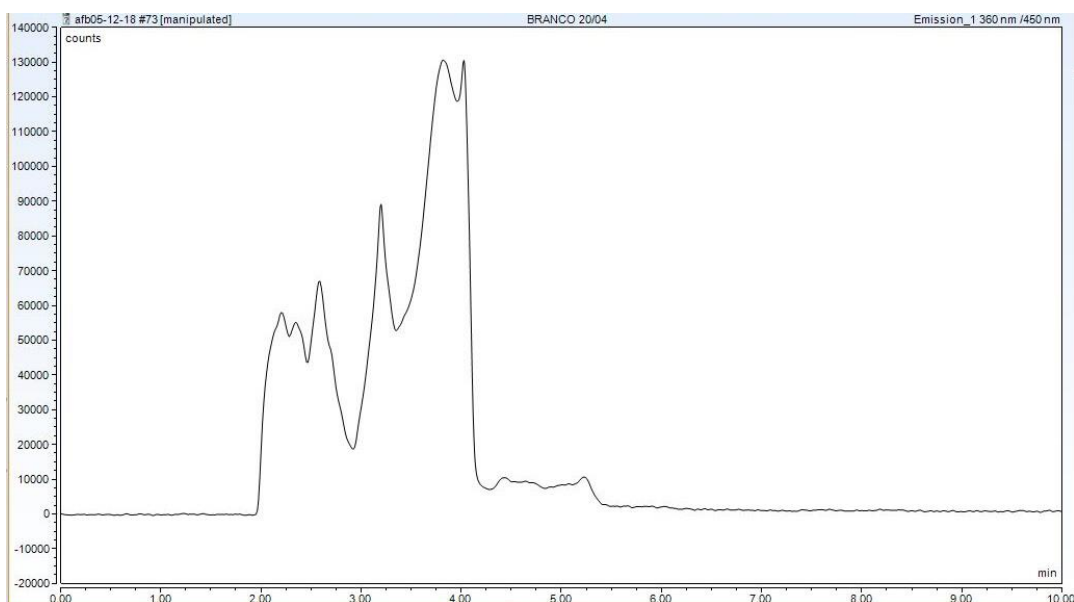
Os ensaios foram submetidos a extração das aflatoxinas e quantificação por cromatografia de alta eficiência com obtenção de cromatogramas (Figuras 5, 6, 7,). Os compostos foram identificados baseados no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão e para confirmação foi realizada co-cromatografia adicionando soluções padrão que promoviam o aumento de sinal do composto.

Tabela 3: Valores de precisão, LOD e LOQ para a determinação de AFB1 em leite

Fortificação	Recuperação (%)	CV (%)	LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
1,0	90	28,67	0,14	0,5
5,0	84	10,19		
10,0	113	19,63		

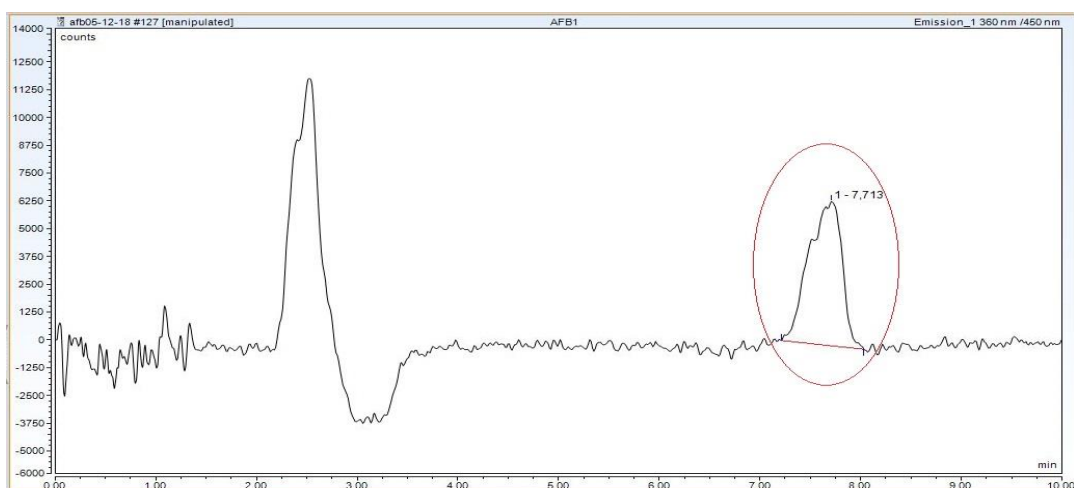
Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 5: Cromatografia da amostra de leite sem contaminação de AFB₁



Fonte: Autoria própria, 2019

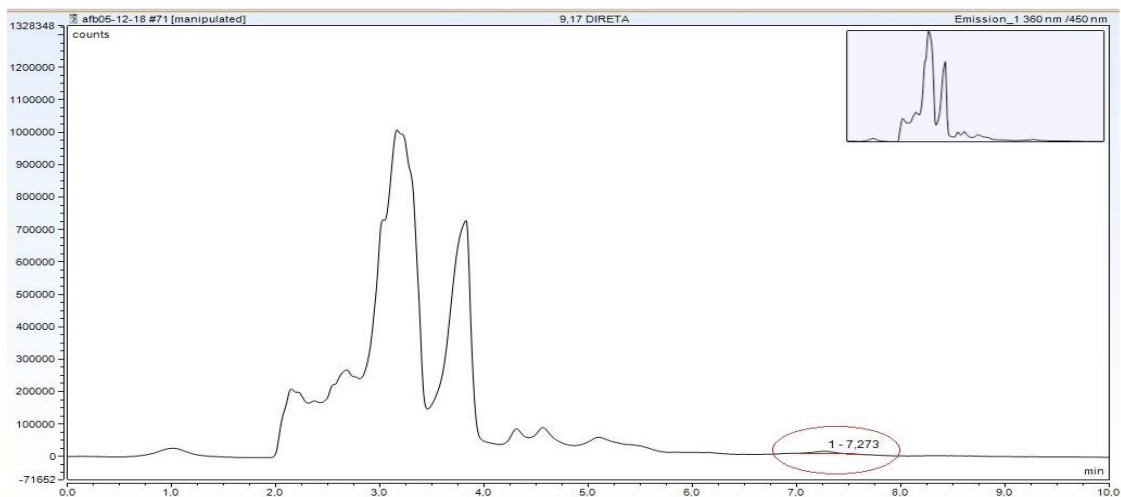
Figura 6: Cromatografia do pico padrão de AFB₁



Nota: Concentração de AFB₁: 6,5 µg.L⁻¹ Tempo de retenção: 7,7 minutos

Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 7: Cromatografia do pico de leite contaminado com AFB₁



Fonte: Autoria própria, 2019

5.3 Avaliação do percentual de redução de AFB₁ em leite por *L. casei* e *L. rhamnosus* e prebióticos

Devido à capacidade de certas estirpes bacterianas de se ligarem às micotoxinas, as BAL são sugeridas como um potencial método biológico para reduzir a toxicidade das aflatoxinas ou impedir a sua absorção pelo organismo humano (AHLBERG et al.,2015).

A porcentagem de redução das aflatoxinas após adicionar os microrganismos probióticos e prebióticos está descrita na tabela 4. Pode-se perceber que todos os tratamentos ocasionaram redução dos níveis de AFB₁; porém, com diferença significativa nos valores (Apêndice A).

Tabela 4: Porcentagem de redução e bioacessibilidade da AFB₁ após extração de AFB₁ em leite

Tratamento	Variáveis	%Redução	%Bioacessibilidade
1	Controle negativo	ND	ND
2	Controle positivo	13,57 ^a	49,56 ^a
3	<i>L. casei</i> + AFB ₁	76,99 ^b	11,53 ^b
4	<i>L. rhamnosus</i> + AFB ₁	46,08 ^{cf}	33,51 ^{ab}
5	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + AFB ₁	88,47 ^b	87,5 ^c
6	Inulina + AFB ₁	84,69 ^b	83,03 ^{cd}
7	Oligofrutose + AFB ₁	12,20 ^a	34,43 ^{ab}
8	<i>L. casei</i> + Inulina + AFB ₁	30,64 ^{de}	97,08 ^c
9	<i>L. casei</i> + oligofrutose + AFB ₁	28,88 ^{de}	46,49 ^a
10	<i>L. casei</i> + Inulina + Oligofrutose + AFB ₁	57,48 ^{cf}	69,99 ^{ac}
11	<i>L. rhamnosus</i> + Inulina + AFB ₁	40,71 ^{cdeg}	73,03 ^{cefg}
12	<i>L. rhamnosus</i> + Oligofrutose + AFB ₁	30,33 ^{de}	96,31 ^c
13	<i>L. rhamnosus</i> + Inulina + Oligofrutose + AFB ₁	52,22 ^{cfg}	54,71 ^{ae}
14	Inulina + Oligofrutose + AFB ₁	25,64 ^{ade}	45,85 ^a
15	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + Inulina + AFB ₁	43,63 ^{cdef}	93,07 ^c
16	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + Oligofrutose + AFB ₁	44,25 ^{cdf}	60,06 ^{adf}
17	<i>L. casei</i> + <i>L. rhamnosus</i> + Inulina + Oligofrutose + AFB ₁	2,39 ^a	53,13 ^{ag}

Fonte: Autoria própria, 2019.

NOTA: Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Ao analisar separadamente cada ensaio, pode-se perceber que os tratamentos, 5 (*L. casei* e *L. rhamnosus*) e 6, (inulina), foram os que se mostraram melhores na redução da AFB₁ no leite, com 88,47% e 84,69% respectivamente, não apresentando diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Esse valor foi superior ao determinado por Peltonen (2001), que obteve redução de 54,6% de AFB₁ utilizando, apenas, *L. rhamnosus* solução tampão fosfato. Comparando o tratamento 5, que possui ambos os probióticos, ao tratamento 4 que possuía

apenas *L. rhamnosus*, pode-se perceber que a adição do *L. casei* ocasionou uma melhor redução, sendo que o tratamento apenas com *L. rhamnosus* obteve 46,08%. Por sua vez, BOVO (2011), ao utilizar *L. rhamnosus* visando a redução de AFM₁ com concentração de 0,15 µg.ml⁻¹ obteve valores de 17,13% em 15 minutos e 27,79% em 24 horas de contato em solução tampão fosfato. Ao analisar a redução de AFM₁ em leite desnatado em temperaturas de 4° e 37°C a autora obteve reduções de 19,70% e 24,46%. No presente estudo, os resultados obtidos foram superiores ao relatado pela autora. Kabak e Var (2008) obtiveram 3,44%, 2,90% e 3,17% de redução de AFM₁ ao utilizar o *L. rhamnosus* no tempo 0, 4 e 24 horas, respectivamente, quando utilizado uma concentração de 5 µg.L⁻¹, em solução tampão fosfato. Com isso foi possível perceber que um maior tempo de contato não foi significativo. Por sua vez, ao utilizar como matriz leite reconstituído obtiveram, em 4 horas, uma redução de 21,74%. Autores sugerem que o fato das aflatoxinas estarem associadas à matriz alimentícia, em especial a caseína do leite, provavelmente seja o principal motivo para os diferentes percentuais de redução encontrados em leite e soluções modelo (BOVO et al., 2013; CAVALLARIN et al., 2014).

Haskard (2001), obteve para *L. rhamnosus* GG, valores de 49,5% a 71,3% e para *L. rhamnosus* LC-705 valores de 37,9% a 71,1% de redução de AFB₁ em solução tampão fosfato após diferentes tratamentos físicos de temperatura e adição de ácido. Enquanto para El-Nezami, Kankaanpaa, Anhokas (1998), utilizando estas mesmas cepas de *L. rhamnosus*, obteve uma redução de aproximadamente 80%, enquanto para a cepa de *L. casei* Shirota, a redução foi de aproximadamente 33%. Wochner (2017) usando *L. acidophilus* isolado obteve uma redução de AFB₁ de 34,96%.

Sarlak (2017), ao analisar a redução de AFM₁ em leite fermentado utilizando cepas probióticas, notou que para as cepas de *L. rhamnosus* e *L. casei* os valores foram próximos a 15% em tempos de incubação de 1, 14 e 28 dias. Dentre esses

resultados, o *L. casei*, após 28 dias foi o que obteve uma menor redução, sendo de apenas 10,6%, e *L. rhamnosus* foi o que possuiu maior redução sendo de 16,8% também em 28 dias, mostrando assim, que dependendo do probiótico utilizado e da micotoxina presente, um tempo de contato maior deve ser utilizado para uma melhor redução na contaminação.

Utilizando solução tampão fosfato, Chlebicz (2019), visualizou a redução AFB₁ após a utilização de diferentes probióticos, em tempo de incubação de 6, 12 e 24 horas. Para as diferentes cepas de *L. rhamnosus* foram obtidos valores que variaram entre 20 e 50%, enquanto para *L. casei* os valores ficaram entre 33 a 55%. Ao comparar com este trabalho, o valor obtido para *L. casei* foi maior no tempo de 0 horas.

Em relação aos prebióticos, há poucos trabalhos que mostram a influência do mesmo na redução de AFB₁. Os tratamentos com inulina possuíram um índice de redução entre 26 e 85%, sendo que o tratamento que possuía apenas esse prebiótico, teve uma redução de 84,69%. Em comparação com o tratamento que possuía apenas oligofrutose, que teve uma redução de 12,2%, pode-se perceber que a inulina seria a melhor escolha. Vasconcelos (2016), ao adicionar inulina obteve uma porcentagem de redução de AFB₁ em leite de apenas 7,57%, enquanto para o tratamento de oligofrutose, obteve um resultado de 22,98%, sendo este último maior que o obtido neste trabalho. Wochner (2017) obteve uma redução de AFB₁ em leite 24,55% usando inulina e 13,53% usando apenas oligofrutose, sendo que a oligofrutose teve um valor bem próximo ao encontrado neste trabalho.

Zoghi (2016), usando os prebióticos inulina e oligofrutose, combinados com a *L. plantarum* conseguiram uma redução de patulina em suco de maçã de 42,34% à 62,86%, e usando *L. acidophilus* com estes mesmo prebióticos, a redução foi de 40,59% à 58,06%, quando analisados no primeiro dia de contato e durante 6 semanas.

Os tratamentos que combinaram os prebióticos com os microrganismos obtiveram resultados que não ultrapassaram os 60%, porém, ao combinar todos os compostos estudados, a redução não se mostrou tão eficiente, sendo de apenas 2,39% e com isso acredita-se que a ação dos prebióticos possam ter inibido a ação dos microrganismos.

Embora o mecanismo de ação das bactérias ácido-láticas sobre a aflatoxina ainda não seja esclarecido, tem sido sugerido que ocorre pela adesão física aos componentes da parede celular bacteriana (polissacarídeos e peptidoglicanos), ao invés de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo de bactérias (Salark, et al, 2017)

5.4 Avaliação da bioacessibilidade de AFB₁ em leite pela ação de *L. rhamnosus* e *L. casei* e prebióticos

A inibição da micotoxina no trato digestório por adsorção de agentes tais como microrganismos pode ser uma estratégia promissora para proteger contra o efeito tóxico destes contaminantes alimentares (FIRMIN et al.,2010).

A interação *in vivo* será favorecida quando houver uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico, anterior ao consumo que, em alguns casos, resulta numa vantagem claramente competitiva para a BAL se esta for consumida juntamente com o prebiótico (SAAD, 2006).

Para alcançar qualquer efeito em um tecido específico ou órgão, as micotoxinas devem estar bioacessíveis, termo que se refere à tendência do composto de ser extraído a partir da matriz alimentar, e então se tornar disponível para absorção pelas células intestinais (FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2009).

Com isso, todos os ensaios foram submetidos a um modelo de digestão *in vitro* estático para estimar a quantidade de AFB₁ que fica disponível para absorção.

Para a amostra 2, que possuía apenas leite e AFB₁, a bioacessibilidade foi de 49,56%, ou seja, esse valor é o liberado para o fluido biológico após a digestibilidade quando consideradas amostras sem adição de prebióticos e probióticos. Após a digestibilidade dos tratamentos, os valores variaram de 11,5% à 98,0%, sendo os melhores resultados obtidos os tratamentos 3 (*L. casei*), 4 (*L. rhamnosus*) e 7 (oligofrutose), com valores entre 11,53 e 34,43%.

No que diz respeito a estudos avaliativos da bioacessibilidade de AFB₁ em amostras de leite empregando modelos *in vitro* poucos trabalhos foram publicados.

Vasconcelos (2016), obteve uma bioacessibilidade de 27,12% em seu estudo, quando adicionado apenas o *L. plantarum*. Enquanto, Becker-Algeri (2016) em leite pasteurizado, contaminado artificialmente por AFB₁, alcançou o seu melhor resultado, sendo de 28,0% utilizando *L. acidophilus* isoladamente, e obteve para AFM₁ um valor de 58,8%. Estes resultados ficaram próximos do obtido neste trabalho para o *L. rhamnosus*, que resultou em 33,51%, e foram mais alto do que o tratamento usando *L. casei*, onde se obteve 11,53%. No estudo de Serrano-Niño et al. (2013) tiveram reduções na bioacessibilidade da AFM₁ em leites fermentados de 22,7 a 45,2% com destaque para *B. bifidum* NRRL. Para Wochner (2017), a bioacessibilidade de AFB₁ quando adicionado de *L. acidophilus* foi de 22,37%, enquanto para AFM₁ ficou abaixo do limite de quantificação.

Em relação aos prebióticos, quando combinados, a bioacessibilidade chegou a 45,85%, sendo que quando adicionado apenas a oligofrutose, o valor foi menor, chegando a 34,43% e adicionando apenas inulina, o valor foi de 83,03%. Pode-se perceber que no caso da inulina, a adição de outros componentes fez com que a bioacessibilidade diminuísse. No trabalho de Vasconcelos (2016), inulina em 0 horas e oligofrutose em 6 h, tiveram percentuais de aproximadamente 15%, valores menores do obtido neste trabalho. Enquanto para Wochner (2017), utilizando os mesmos probióticos, alcançou uma acessibilidade de 34,58% e

26,08%, valores similares ao deste trabalho, quando adicionado apenas a oligofrutose.

Kabak e Ozbey (2012), adicionaram bactérias probióticas (*B.longum*, *L.rhamnosus*, *B.species 420*, *L.acidophilus*, *L.acidophilus* NCFM150B, *L.casei* Shirota) em matriz alimentar seca e alcançaram uma bioacessibilidade de 13,5 a 31,9%. Quando feito tratamentos em leite, obtiveram uma bioacessibilidade para *L. rhamnosus* e *L. casei* entre 60 e 70%. Por sua vez, Kabak et al. (2009) a partir fórmulas infantis artificialmente contaminadas, relataram uma bioacessibilidade entre 21% e 37% de AFB₁ com a adição de *L. acidophilus* NCC 12. Para matrizes secas, Kabak et al (2009) obteve valores de bioacessibilidade entre 14 e 30% utilizando os mesmos probióticos deste trabalho. A diferença de bioacessibilidade encontrada para as micotoxinas depende de vários fatores, tais como o tipo de matriz alimentar, nível de contaminação e tipo de contaminação (fortificação ou contaminação natural) (KABAK et al., 2009).

Panwar (2019), após contaminar leite desnatado com AFM₁, obteve uma redução na bioacessibilidade de 44,09% usando *L. rhamnosus*.

Em um estudo realizado para bioacessibilidade da micotoxina beauvericina (BEA), o emprego de inulina promoveu considerável redução da bioacessibilidade (MECA et al., 2012). Mallebrera (2013) observou a bioacessibilidade desta mesma micotoxina em vários estágios da digestibilidade, e conseguiu resultados de 20 a 50% usando *L. rhamnosus* e 30 a 60% usando *L. casei*.

Para Luz (2018), após a digestibilidade para amostra de pão contaminada com ocratoxina, a bioacessibilidade ficou entre 13,8 a 21% quando usado cepas diferentes de *L. rhamnosus* e obteve também valores de 24,4 e 31,7% quando usado duas cepas diferentes de *L. casei*. Saladino (2018) submeteu pão de forma contaminado com AFB₁ ao processo de digestibilidade após adição de diversas cepas probióticas, e analisou a bioacessibilidade na etapa após adição de suco gástrico e de suco duodenal. O probiótico *L. bulgaricus* foi o que obteve uma

melhor redução na bioacessibilidade, com valor de 15,41%. Enquanto para os mesmos probióticos utilizados para este trabalho, o resultado foi de 68,50% para *L. casei* e 63,89% para *L. rhamnosus*.

Além de diferentes sítios de ligação, o complexo aflatoxina-LAB parece ser extremamente específico para cada cepa. BAL têm propriedades diferentes com diferentes composições de parede celular, mesmo dentro da mesma espécie o que justifica as diferentes percentagens de redução encontradas pelos mesmos gêneros ou mesmo espécies (AHLBERT et al.,2015).

6. CONCLUSÃO

O uso dos probióticos *L. rhamnosus* e *L. casei* em conjunto com os prebióticos inulina e oligofrutose se mostraram eficientes na redução de AFB₁ no leite, cujo os níveis variaram entre 2,39% à 88,47%. O tratamento 5 que continha apenas *L. casei* e *L. rhamnosus* foi o mais eficaz na redução do percentual de AFB₁. O efeito da adição da inulina (tratamento 6) foi similar ao do tratamento com ambos os probióticos (tratamento 5); no entanto, os prebióticos quando adicionados aos tratamentos que continham probióticos promoveram uma redução menor do percentual de AFB₁.

O uso dos probióticos e prebióticos também promoveu a redução do percentual de bioacessibilidade. Os valores variaram entre 11,53% à 97,08%, sendo que entre os tratamentos, o que obteve melhor resultado foi o que continha apenas *L. casei*, enquanto, os tratamentos que envolviam probióticos e prebióticos em conjunto obtiveram valores de bioacessibilidade altos.

A adição de probióticos e prebióticos aliado a questão de prevenção da contaminação, desde do início da produção, pode ser um dos caminhos para reduzir o percentual e bioacessibilidade de contaminação de AFB₁ em leites e derivados, aliado ao fato de que estes compostos possuem propriedades funcionais.

7 REFERÊNCIAS

_____. Minuta de Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos. Brasília, DF, 2017. Acesso em: 20 maio 2019.

AHLBERG, S.H.; JOUTSJOKI, V.; KORHONEN, H.J. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. **International Journal Food Microbiology**, v.207, p.87-102, 2015.

ALMEIDA, C. R. F. **A influência do microbioma humano nas doenças cardiovasculares**. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, 2018.

ARENA, M.P.; RUSSO, P.; CAPOZZI, V.; RASCÓN, A.; FELIS, G.E.; SPANO, G.; FIOCCO, D. Combinations of cereal β -glucans and probiotics can enhance the antiinflammatory activity on host cells by a synergistic effect. **Journal of Functional Foods**, v.23, p.12-23, 2016.

BADARÓ, A. C. L., et al. Probiotics foods: application as the promoters of the human health – Part 1. **NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição** v. 2– n. 3, 2008.

BECKER-ALGERI, Tania Aparecida. **Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite**. 208f. Doutorado em engenharia e ciência de alimentos na Universidade Federal do Rio Grande Escola de Química e Alimentos. Rio Grande Sul, 2016.

BOVO, F., et al. Efficiency of Lactic Acid Bacteria for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Solution. **Cient Ciênc Biol Saúde** ;13(3) p. 151-6, 2011.

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

BRASIL, ANVISA. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de Propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministério. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado, Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.**

BRASIL, ANVISA Resolução RDC nº 07 de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil.**

CARDOSO FILHO, F. C., et al. **Fungi and aflatoxins in cereal: A review.** Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ., v. 2, n.2, p.122-130, 2015.

CARVAJAL M., et al. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 11, p.1077-86, 2003.

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

CHLEBICZ, A.; SLIZEWSKA, K. In Vitro Detoxification of Aflatoxin B₁, deoxynivalenol, Fumonisin, T-2 Toxin and Zearalenone by Probiotic Bacteria from Genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 2019

CORASSIN, C. H., et al. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. **Food Control** v. 31, p. 80 – 83, 2013.

DRAGACCI, S., et al. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 1, p. 59-65, 1995.

EBRINGER, M. et al. Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products – Review. **Folia Microbiol.** v. 53 (5), p. 378–394, 2008.

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

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

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

ERKMEN, O.; BOZOGLU, T. F. **Food Microbiology: Principles into practice**. 1ª ed., Hoboken, p.193, 2016

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Probióticos en los alimentos**. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, p.45, 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>.

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

FIGUEIREDO, J. A. et al. Estudo da estabilidade higroscópica de micropartículas de oleoresina de pimento rosa obtidas por spray dryer. **Congresso Mineiro de Engenharia de Alimentos**, 2018.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in forages. **The Mycotoxin Blue Book**. p. 249-268, 2005.

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

FORTES, R. C., et al. Effects of dietary supplement with fructooligosaccharides and inulin on human organism: evidence based study. **Com. Ciências Saúde**. v. 20, n. 3, p. 241-252, 2009.

FREIRE, F. C. O., et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2007.

GALINNA, D. A.; ORMENESE, R. C; GARCIA, A. O. Probiotic yogurt with red fruit pulp: physical chemical and microbiological characterization, sensory acceptability and probiotics viability. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, p. 196-208, 2019.

GIBSON, G. R. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews**, V. 14, 2017.

HASKARD, C. et al. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p.3086-3091, 2001.

International Agency of Research on Cancer- IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, WHO, Lyon, 2012 v. 82.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_4tri.pdf>.

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

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

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

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

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

LUZ, C. et al. Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 60-66, 2018.

MALLEBRERA, B. et al. Influence of pro- and prebiotics on gastric, duodenal and colonic bioaccessibility of the mycotoxin beauvericina. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 32 p.141–149, 2013.

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

MECA, G. et al. Influence of different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor Fusarium mycotoxin beauvericina. **Food and Chemical Toxicology** v.50 p. 1362–1368, 2012.

MURPHY, P. A., et al. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, vol. 71, n. 5, 2006.

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

NOGUEIRA, J. C. R., et al. Probiotics - Literature Review. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15 n. 4 p. 487-492, 2011.

OATLEY J. T., et al. Binding of Aflatoxin B₁ to Bifidobacteria In Vitro. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p. 1133–1136, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F., et al. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, p. 221-225, 2010.

PANWAR, R. et al. Aflatoxin M₁ Detoxification Ability of Probiotic Lactobacilli of Indian Origin in In vitro Digestion Model. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.11 p.460-469, 2019.

PELTONEN, K. Aflatoxin B₁ Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science** v. 84, n. 10, 2001.

PEREIRA, M. M. G. CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *Aspergillus flavus* E *Aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 141 – 156, 2002.

PERES, J. F. **Sensory profile, influence of information in the acceptance analysis and preference directors in light synbiotic chocolate ice cream with different high-intensity sweeteners.** Doutorado em Alimentos e Nutrição. Universidade Estadual de Campinas. 144f, 2018.

RAIZEL, R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 42, n. 1, 2006.

SANTOS, J. S., et al. Aflatoxin M₁ in Dairy Products and Acid Lactic Bacteria as Biocontrol Agent in Milk. **UNICIÊNCIAS**, v. 18, n. 1, p. 51-56, 2014.

SARLAK, Z. et al. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M₁ in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). **Food Control**, v 71, p. 152-159, 2017.

SARTORI, A. V., et al. Determination of aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Vigil. sanit. Debate**, v.3, n.3, p.115 – 121, 2015.

SCAGLIONI, P., et al. Aflatoxin B₁ and M₁ in milk. **Analytica Chimica Acta.**, v.829, p.68-74, 2014.

SERNA, C. M. B. **Efeito de aflatoxinas na ração sobre matrinxã (Brycon cephalus): acúmulo em tecidos e desempenho produtivo**. Doutorado em Ciências, 101f, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2018.

SERRANO-NINO, J.C.; CAVAZOS-GUARDUNO, A.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; APPLGATE, B.; FERRUZZI, M.G.; SAN MARTIN, G.M.F.; GARCIA, H.S. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, n.31, p. 202-207, 2013.

SILVA, V. M. A., et al. Avaliação dos Parâmetros de qualidade de leites UHT integral. **Caderno de Pesquisa, Ciência e Inovação**. v.2, 2019.

TAHEUR, F. B., et al. Adsorption of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**. 2017

TUOHY, K. M. **Using probiotics and prebiotics to improve gut health**. DDT v. 8, n. 15, 2003.

VALCHEVA R, DIELEMAN LA.. Prebiotics: definition and protective mechanisms. **Best Practice in Research and Clinical Gastroenterology**. v. 30p 27-37, 2016.

VASCONCELOS, R. A. M., **Efeito do probiótico *Lactobacillus plantarum* e prebióticos na redução e bioacessibilidade da aflatoxina B₁ no leite**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2017.

VENTUROSOSO, R. C., et al. Determination of the physical-chemical composition of dairy products: exploratory study to compare the results obtained by classic methodology and by ultra-sound. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 43, n. 4, 2007.

VERSANTVOORT, C.H.M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from Food. **Food and Chemical Toxicology**, p. 31-33, 2004.

WOCHNER, K. F. **Influência do probiótico *Lactobacillus acidophilus* e prebióticos na redução e bioacessibilidade de aflatoxinas M1 e B1 em leite integral**. 84f. Mestrado em Tecnologia de alimentos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

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

ZOGUI, A. Effect of probiotics on patulina removal from symbiotic apple juice. **J SCI Food Agric**, v. 97, p.2601-2609, 2017

APÊNDICE A

Teste de *Tukey studentized*, ao nível de 5% de probabilidade para médias obtidas para redução de AFB₁.

Tukey HSD test; Variable: Redução (%) (Spreadsheet2)																
Marked differences are significant at $p < ,05000$																
Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
	M=13,570	M=76,990	M=46,085	M=88,470	M=84,695	M=12,200	M=30,645	M=28,885	M=57,485	M=40,710	M=30,335	M=52,225	M=25,640	M=43,630	M=44,250	M=2,3950
2 {1}		0,000179	0,000185	0,000179	0,000179	1,000000	0,019457	0,045652	0,000179	0,000301	0,022632	0,000179	0,198371	0,000204	0,000197	0,283632
3 {2}	0,000179		0,000194	0,251864	0,775493	0,000179	0,000179	0,000179	0,005950	0,000179	0,000179	0,000604	0,000179	0,000182	0,000184	0,000179
4 {3}	0,000185	0,000194		0,000179	0,000179	0,000181	0,043001	0,018305	0,259902	0,977833	0,037048	0,939949	0,003794	0,999996	1,000000	0,000179
5 {4}	0,000179	0,251864	0,000179		0,999241	0,000179	0,000179	0,000179	0,000194	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179
6 {5}	0,000179	0,775493	0,000179	0,999241		0,000179	0,000179	0,000179	0,000297	0,000179	0,000179	0,000179	0,000185	0,000179	0,000179	0,000179
7 {6}	1,000000	0,000179	0,000181	0,000179	0,000179		0,009957	0,023531	0,000179	0,000238	0,011590	0,000179	0,109436	0,000190	0,000187	0,458747
8 {7}	0,019457	0,000179	0,043001	0,000179	0,000179	0,009957		1,000000	0,000326	0,421815	1,000000	0,002238	0,987822	0,134035	0,101567	0,000247
9 {8}	0,045652	0,000179	0,018305	0,000179	0,000179	0,023531	1,000000		0,000235	0,219365	1,000000	0,001042	0,999863	0,059874	0,044574	0,000354
10 {9}	0,000179	0,005950	0,259902	0,000194	0,000297	0,000179	0,000326	0,000235		0,022522	0,000300	0,981435	0,000188	0,090620	0,119972	0,000179
11 {10}	0,000301	0,000179	0,977833	0,000179	0,000179	0,000238	0,421815	0,219365	0,022522		0,379688	0,248408	0,051311	0,999961	0,999627	0,000179
12 {11}	0,022632	0,000179	0,037048	0,000179	0,000179	0,011590	1,000000	1,000000	0,000300	0,379688		0,001946	0,993143	0,116798	0,088158	0,000259
13 {12}	0,000179	0,000604	0,939949	0,000179	0,000185	0,000179	0,002238	0,001042	0,981435	0,248408	0,001946		0,000346	0,643534	0,737184	0,000179
14 {13}	0,198371	0,000179	0,003794	0,000179	0,000179	0,109436	0,987822	0,999863	0,000188	0,051311	0,993143	0,000346		0,012439	0,009186	0,001083
15 {14}	0,000204	0,000182	0,999996	0,000179	0,000179	0,000190	0,134035	0,059874	0,090620	0,999961	0,116798	0,643534	0,012439		1,000000	0,000179
16 {15}	0,000197	0,000184	1,000000	0,000179	0,000179	0,000187	0,101567	0,044574	0,119972	0,999627	0,088158	0,737184	0,009186	1,000000		0,000179
17 {16}	0,283632	0,000179	0,000179	0,000179	0,000179	0,458747	0,000247	0,000354	0,000179	0,000179	0,000259	0,000179	0,001083	0,000179	0,000179	

APÊNDICE B

Teste de *Tukey studentized*, ao nível de 5% de probabilidade para médias obtidas para bioacessibilidade de AFB₁.

Tukey HSD test: Variable: Bioacessibilidade (Spreadsheet2)																
Marked differences are significant at $p < ,05000$																
Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
	M=49,560	M=11,535	M=33,515	M=87,500	M=83,035	M=34,435	M=97,080	M=46,495	M=69,990	M=73,030	M=96,310	M=54,710	M=45,850	M=93,075	M=60,060	M=53,130
2 {1}		0,000593	0,366937	0,000604	0,001981	0,449014	0,000193	1,000000	0,114711	0,045553	0,000198	0,999793	0,999996	0,000241	0,879121	0,999998
3 {2}	0,000593		0,072170	0,000179	0,000179	0,054385	0,000179	0,001293	0,000179	0,000179	0,000179	0,000249	0,001554	0,000179	0,000189	0,000300
4 {3}	0,366937	0,072170		0,000180	0,000186	1,000000	0,000179	0,662451	0,000859	0,000432	0,000179	0,091472	0,725997	0,000179	0,017203	0,145153
5 {4}	0,000604	0,000179	0,000180		0,999962	0,000180	0,932019	0,000332	0,256939	0,512112	0,962494	0,002426	0,000298	0,999492	0,012929	0,001530
6 {5}	0,001981	0,000179	0,000186	0,999962		0,000189	0,554747	0,000845	0,655917	0,909840	0,632688	0,009746	0,000720	0,907840	0,053136	0,005908
7 {6}	0,449014	0,054385	1,000000	0,000180	0,000189		0,000179	0,752048	0,001099	0,000519	0,000179	0,120021	0,809467	0,000179	0,023064	0,187696
8 {7}	0,000193	0,000179	0,000179	0,932019	0,554747	0,000179		0,000183	0,014455	0,037986	1,000000	0,000272	0,000182	0,999990	0,000750	0,000232
9 {8}	1,000000	0,001293	0,662451	0,000332	0,000845	0,752048	0,000183		0,045199	0,017258	0,000185	0,978257	1,000000	0,000200	0,603278	0,996833
10 {9}	0,114711	0,000179	0,000859	0,256939	0,655917	0,001099	0,014455	0,045199		1,000000	0,018486	0,434613	0,036926	0,051354	0,914036	0,302475
11 {10}	0,045553	0,000179	0,000432	0,512112	0,909840	0,000519	0,037986	0,017258	1,000000		0,048333	0,207759	0,014046	0,128303	0,663455	0,133781
12 {11}	0,000198	0,000179	0,000179	0,962494	0,632688	0,000179	1,000000	0,000185	0,018486	0,048333		0,000300	0,000184	0,999999	0,000910	0,000249
13 {12}	0,999793	0,000249	0,091472	0,002426	0,009746	0,120021	0,000272	0,978257	0,434613	0,207759	0,000300		0,960878	0,000545	0,999680	1,000000
14 {13}	0,999996	0,001554	0,725997	0,000298	0,000720	0,809467	0,000182	1,000000	0,036926	0,014046	0,000184	0,960878		0,000195	0,538221	0,992342
15 {14}	0,000241	0,000179	0,000179	0,999492	0,907840	0,000179	0,999990	0,000200	0,051354	0,128303	0,999999	0,000545	0,000195		0,002269	0,000395
16 {15}	0,879121	0,000189	0,017203	0,012929	0,053136	0,023064	0,000750	0,603278	0,914036	0,663455	0,000910	0,999680	0,538221	0,002269		0,995165
17 {16}	0,999998	0,000300	0,145153	0,001530	0,005908	0,187696	0,000232	0,996833	0,302475	0,133781	0,000249	1,000000	0,992342	0,000395	0,995165	