



BIOACESSIBILIDADE DAS AFLATOXINAS M₁ E B₁ EM LEITES FERMENTADOS COM *Streptococcus thermophilus* E *Lactobacillus bulgaricus*

T.A. Becker-Algeri¹, L. Canci², L.L. Antunes², D.A. Drunkler², E.B. Furlong¹

1- Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil - e-mail: (taniabecker86@yahoo.com.br)

2- Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA), – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 85884-000 – Medianeira – PR – Brasil, Telefone: 55 (45) 3240-8000 – e-mail: (luizacanci1@gmail.com, laura.luisi@msn.com, deisydrunkler@utfpr.edu.br).

RESUMO – Neste estudo foi avaliado a capacidade de duas bactérias ácido láticas (BAL), *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, em reduzir a concentração e bioacessibilidade das aflatoxinas M₁ (2 µg.L⁻¹) e B₁ (10 µg.L⁻¹) em amostras de leite contaminadas artificialmente submetidas ao processo de fermentação, isoladamente e em combinação. O processo fermentativo proporcionou a redução nos níveis das aflatoxinas, com destaque para aflatoxina B₁ (AFB₁) (12 a 35% de redução). Por sua vez, para aflatoxina M₁ (AFM₁) o emprego de *S. thermophilus* foi o que resultou maior redução. A bioacessibilidade das aflatoxinas reduziu em todos os ensaios, com destaque para o *L. bulgaricus* que reduziu a bioacessibilidade da AFM₁ em aproximadamente 70%. O emprego das BALs foi eficaz na redução da concentração e da bioacessibilidade das aflatoxinas estudadas.

ABSTRACT – In this study, the ability of two lactic acid bacteria (LAB), *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, to reduce the concentration and bioaccessibility of aflatoxins M₁ (2 µg.L⁻¹) and B₁ (10 µg.L⁻¹) in contaminated milk samples artificially submitted to the fermentation process, alone and in combination. The fermentative process provided a reduction in the levels of aflatoxins, with emphasis on aflatoxin B₁ (AFB₁) (12 to 35% reduction). In turn, for aflatoxin M₁ (AFM₁) the use of *S. thermophilus* was what resulted in the greatest reduction. The bioaccessibility of aflatoxins decreased in all tests, with emphasis on *L. bulgaricus*, which reduced AFM₁ bioaccessibility by approximately 70%. The use of LABs was effective in reducing the concentration and bioaccessibility of the studied aflatoxins.

PALAVRAS-CHAVE: iogurte, digestibilidade, micotoxinas.

KEYWORDS: yogurt, digestibility, mycotoxins.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido láticas (BALs) são um grupo de bactérias amplamente utilizadas na indústria alimentícia para produção de queijos, iogurtes e leites fermentados, com destaque para os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, pois seus benefícios vão além de aplicações tecnológicas (Gourama e Bullerman, 1995). Estudos tem demonstrado que estes microrganismos podem ser empregados no controle de contaminantes, com destaque para as aflatoxinas, que são os principais contaminantes do leite (Wochner et al., 2017).

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*), e que contaminam diversos tipos de alimentos e rações, em várias etapas da produção (Jiang et al., 2005). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é classificada como carcinogênica para humanos. A alimentação de animais com ração contaminada por esse composto põe em risco a qualidade do leite, pois a mesma

é metabolizada durante o processo digestivo do animal, resultando na aflatoxina M₁ (AFM₁), que também é carcinogênica para humanos (Creppy, 2002). Além da ocorrência comprovada da AFM₁ em amostras de leite, pesquisas vêm demonstrando que a AFB₁ também pode estar presente nesse alimento, e chama atenção para seus níveis, que em grande parte dos casos são altos (Becker-Algeri et al., 2016; Scaglioni et al., 2014).

Alinhar métodos de descontaminação que não afetem a qualidade e as características do leite, que é uma matéria prima extremamente sensível à processos tecnológicos, associado à redução da biodisponibilidade desses compostos para absorção no organismo humano é um grande desafio, e o estudo das bactérias ácido lácticas amplamente utilizadas na indústria de laticínios pode ser um aliado nessas questões. Em vista disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação das culturas iniciadoras do iogurte (*L. delbruecki* subs. *bulgaricus* e *S. salivarius* ssp. *thermophilus*) na contaminação por aflatoxinas M₁ e B₁ em amostras de leite, bem como quantificar a bioacessibilidade dessas micotoxinas após a fermentação das amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os leites fermentados (Quadro 1) foram elaborados a partir da inoculação das bactérias em 500 mL de leite homogeneizado pasteurizado fortificado com 2 µg.L⁻¹ de AFM₁ e 10 µg.L⁻¹ de AFB₁, com concentração bacteriana previamente estimada de 10¹⁰ UFC.mL⁻¹, seguido de incubação a temperatura de 42°C±1°C. Foi incubada ainda uma amostra fortificada com as duas micotoxinas (nas concentrações acima especificadas) e sem as BALs, denominada “Controle”. Foram realizadas três repetições, em triplicata. Foram coletadas 100 mL de amostra no tempo zero (0 hora de incubação), após 4 horas e ao atingir pH entre 4,5 a 4,9 (pH referente à produção de iogurte), para realização das determinações de pH e acidez total em ácido láctico (Brasil, 2006), bem como os teores de AFM₁ e AFB₁.

Quadro 1. Tratamentos elaborados para o estudo da redução da concentração e bioacessibilidade das AFM₁ e AFB₁.

TRATAMENTO	MICOTOXINAS	MICROORGANISMO ADICIONADO (10 ¹⁰ UFC.mL ⁻¹)
Controle	AFM ₁ * (2 µg.L ⁻¹) + AFB ₁ (10 µg.L ⁻¹)	Ausência de microrganismos
01	AFM ₁ (2 µg.L ⁻¹) + AFB ₁ (10 µg.L ⁻¹)	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i>
02	AFM ₁ (2 µg.L ⁻¹) + AFB ₁ (10 µg.L ⁻¹)	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>
03	AFM ₁ (2 µg.L ⁻¹) + AFB ₁ (10 µg.L ⁻¹)	<i>L. delbruecki</i> subs. <i>bulgaricus</i> + <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>

AFM₁ = aflatoxina M₁; AFB₁ = aflatoxina B₁

A extração das AFM₁ e AFB₁ foi realizada pelo método QuEChERS, conforme procedimento descrito por Sartori et al. (2015). A separação e quantificação foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado de detector de fluorescência (CLAE-FLD) (*Dionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos*) e processamento no *software Chromeleon 7.2*. Para a separação das micotoxinas AFM₁ e AFB₁ foi utilizada fase móvel composta por Acetonitrila:Metanol:Ácido Acético 1% (H₂O ultra pura), na proporção 35:10:55 (ACN:MetOH:H₂O_{Acid.}, v/v/v), em método isocrático de eluição. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 *Acclaim PA2, 5 µm Analítica (4,6 x 250 mm)*, com vazão de fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 35°C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360 e 450 nm, respectivamente e o volume de injeção da amostra de 20 µL. O tempo de eluição foi de 10 min.

Para avaliação da digestibilidade, as amostras foram coletadas no tempo 0 e após atingir o pH final (pH entre 4,4 e 4,9), e submetidas ao método de digestibilidade *in vitro* (Oomen et al., 2003; Kabak e Ozbey, 2012; Versantvoort et al., 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação do leite com as BALs proporcionou reduções nos níveis das micotoxinas (Tabela 1), em especial para a AFB₁, que teve redução de, aproximadamente, 35% desta micotoxina quando a amostra foi fermentada com *S. salivarius* ssp. *thermophilus*. Em relação ao controle positivo, os tratamentos mantiveram-se com as concentrações inicialmente adicionadas constantes durante o período de incubação.

Tabela 1: Efeito das bactérias ácido lácticas nas concentrações de AFB₁ e AFM₁ durante o processo fermentativo do leite.

	AFM ₁				AFB ₁			
	(µg.L ⁻¹) ± desvio padrão			Red. (%)	(µg.L ⁻¹) ± desvio padrão			Red. (%)
	Tempo Incubação				Tempo Incubação			
	0 h	4 h	pH final		0 h	4 h	pH final	
01	1,89±0,01	2,66±0,09	2,69±0,18	-42,3	4,77±0,46	4,32±0,25	3,72±0,06	21,9
02	2,25±0,05	2,06±0,04	1,97±0,03	12,5	4,01±0,14	3,47±0,19	2,62±0,04	34,7
03	2,27±0,07	2,45±0,11	2,21±0,15	2,7	3,68±0,27	4,36±0,20	3,81±0,1	12,5

01: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) e *L. delbruecki* subs. *bulgaricus*; 02: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) e *S. salivarius* ssp. *thermophilus*; 03: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) e *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus*

Apesar de ter sido adicionado 10 µg.L⁻¹ de AFB₁ ao leite, a adição das BALs promoveu uma redução imediata na concentração desta aflatoxina (Tabela 1), o que está de acordo com estudos que tem evidenciado que o poder de ligação e inibição dessas bactérias sobre a AFB₁ em meio tampão ocorre desde os primeiros minutos de contato (El Nezami et al.; 1998). Haskard et al. (2001), usando *S. salivarius* ssp. *thermophilus* em meio acidificado, observaram que a bactéria fazia uma interação estável com a AFB₁ e mesmo após lavagens sucessivas, 63,8% da micotoxina inicial ainda permanecia ligada à bactéria.

Para a AFM₁, os níveis de redução foram de 2,7 e 12,5%, e quando o leite foi inoculado com *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* não houve redução da contaminação (Ensaio 1). Estudos anteriores avaliaram o poder de ligação das BAL sobre os níveis de AFM₁ em soluções tampão e em leite, e observaram que a ligação com a BAL foi melhor quando a bactéria estava viável e em leite, do que em PBS. O efeito da matriz neste caso é desconhecido, mas pode estar relacionado com o conteúdo de caseína do leite, proteína em que a AFM₁ é ligada (Brackett e Marth, 1982) ou com a aplicação de bactérias viáveis (Orrhage et al., 1994), que é o caso deste trabalho.

As reduções da contaminação por AFM₁ e AFB₁ nas amostras incubadas com ambas as culturas iniciadoras de iogurte (Ensaio 3) foram de 2,7 e 12,5%, respectivamente, sendo semelhantes aos resultados observados na contaminação das amostras por AFB₁, e na contaminação do leite por AFM₁ avaliada por outros autores (El Khoury, et al. 2011; Sarimehmetoglu e Küplülü, 2004).

Decorrido o tempo de fermentação, as amostras foram submetidas ao processo de digestão *in vitro* e posteriormente o quimo foi submetido a extração das aflatoxinas a fim de avaliar a biodisponibilidade desses compostos para absorção no organismo (Tabela 2).

Tabela 2: Bioacessibilidade de AFB₁ e AFM₁ em leite fermentado com BAL.

Ensaio	Aflatoxina M ₁			Aflatoxina B ₁		
	Quimo (ng)	Leite (µg.L ⁻¹)	Bioacessibilidade (%)	Quimo (ng)	Leite (µg.L ⁻¹)	Bioacessibilidade (%)
CP	13,59	2,54	107,4±5,98	13,72	2,733	101±6,3
01	4,25	2,82	30,2±1,42	13,28	3,72	71,4±1,24
02	4,27	1,97	43,6±0,39	9,82	2,62	75,0±0,4
03	7,64	2,21	71,9±3,49	10,88	3,81	57,4±3,92

CP - Controle Positivo: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) sem BALs; 01: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) e *L. delbruecki* subs. *bulgaricus*; 02: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) e *S. salivarius* ssp. *thermophilus*; 03: AFM₁ (2 µg.L⁻¹) + AFB₁ (10 µg.L⁻¹) e *L. delbruecki* subs. *bulgaricus* + *S. salivarius* ssp. *thermophilus*



A bioacessibilidade das AFM₁ e AFB₁ nas amostras de leite que não foram fermentadas (CP) foram de 107,4% e 101%, respectivamente. A fermentação do leite por BAL promoveu redução da bioacessibilidade em todos os experimentos. Os maiores níveis de redução para AFM₁ disponível para absorção foram obtidos nos fermentados produzidos com bactérias de forma isolada (ensaios 01 e 02). Para a AFB₁ os níveis de redução, quando comparados ao controle, variaram de 57 a 75% e os maiores níveis foram observados nas amostras fermentadas com ambas BALs (Ensaio 3).

A habilidade das BAL em reduzir os níveis de bioacessibilidade de AFM₁ em leites contaminados já foi comprovada por outros autores. Kabak e Ozbey (2012) foram pioneiros nestes estudos e avaliaram a influência da fermentação de leites (naturalmente contaminados e fortificados com AFM₁) com bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, obtendo reduções da bioacessibilidade da micotoxina entre 15,5 a 31,6% em comparação com os controles.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível verificar a eficiência das BAL na redução da concentração das AFM₁ e AFB₁ em amostras de leite, com destaque para a AFB₁ que foi reduzida em todos os ensaios. A redução da porcentagem de micotoxina disponível para absorção após a fermentação, indiferente se as bactérias foram empregadas isoladas ou combinadas, ocorreu em todos os ensaios, evidenciando desta forma o poder de ligação das BAL com consequente diminuição do risco de absorção delas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., Bortoli, K., Souza, C., Drunkler, D. A., Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science*, [S. I.], 81 (3) 544 - 552.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (2006). *Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos*. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União de 14 de dezembro de 2006.

Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, [S. I.], 127, 19–28.

El Khoury, A., Atoui, A., Yaghi, J. (2011) Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*, [S.I.], 22, 1695-1699.

Gourama, H., Bullerman, L. B. (1995). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, [S. I.], 58, 1249–1256.

Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpaa, P. E., Salminen, S., Ahokas, J. T. (2001). Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, [S. I.], 67, 3086-3091.

Jiang, Y., Jolly, P. E., Ellis, W. O., Wang, J.-S., Phillips, T. D., Williams, J. H. (2005). Aflatoxin B₁ albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *International Immunology*, [S. I.] 17, 807-814.

Kabak, B., Ozbey, F. (2012). Aflatoxin M₁ in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccebility using an in vitro digestion model. *Food Control*, [S. I.], 28, 338-344.

Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an *In Vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, [S. I.], 44, 81-287.

Orrhage, K., Sillerstrom, E., Gustafsson, J. A., Nord, C. E., Rafter, J. (1994). Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation Research e Fundamental and Molecular Mechanism of*



Mutagenesis, [S. I.], 311, 239-248.

Sartori, A. V., Matos, J. S., Moraes, M. H. P., N´Obrega, A. W. (2015). Determination of aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, and G₂ and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography tandemMass spectrometry. *Food Analytical Methods*, [S. I.], 8, 2321–30.

Versantvoort, C. H., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C. J., & Sips, A. J. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31-40.

Wochner, K. F., Becker-Algeri, T., Colla, E., Badiale-Furlong, E., Drunkler, D. A. (2017). The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk. *Critical Reviews In Microbiology*, 24, 1-12.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br