

**Atividade anti-micotoxina *in vitro* de probiótico (*Bacillus spp*) e microalgas (*Chaetoceros gracilis*) para aflatoxina B1 e ocratoxina A usados na alimentação do *Litopenaeus vannamei***

***In Vitro* anti-mycotoxin activity of probiotic (*Bacillus spp*) and microalgae (*Chaetoceros gracilis*) for aflatoxin B1 and ochratoxin A used to feed *Litopenaeus vannamei***

**Actividad anti-micotoxina *in vitro* de probióticos (*Bacillus spp*) y microalgas (*Chaetoceros gracilis*) para aflatoxina B1 y ocratoxina A utilizadas para alimentar a *Litopenaeus vannamei***

Recebido: 06/11/2020 | Revisado: 15/11/2020 | Aceito: 19/11/2020 | Publicado: 26/11/2020

**Rodrigo Maciel Calvet**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-4758>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Brasil

E-mail: [rodrigocalvet@hotmail.com](mailto:rodrigocalvet@hotmail.com)

**Maria Marlúcia Gomes Pereira Nóbrega**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6600-9214>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [marlucia-gomes@hotmail.com](mailto:marlucia-gomes@hotmail.com)

**Amilton Paulo Raposo Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1966-913X>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [amilfox@uol.com.br](mailto:amilfox@uol.com.br)

**Carina Maricel Pereyra**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9350-6726>

Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

E-mail: [carinpereyra06@gmail.com](mailto:carinpereyra06@gmail.com)

**Aline Marques Monte**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7246-6211>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [montealine@yahoo.com.br](mailto:montealine@yahoo.com.br)

**Maria Christina Sanches Muratori**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4569-0995>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

## Resumo

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade anti-micotoxina de dois probióticos comerciais constituído de esporos de *Bacillus* spp – A1 e A2 e da microalga *Chaetoceros gracilis* – A3 utilizados na alimentação de *Litopenaeus vannamei* para aflatoxina B1 (AFB1) e ocratoxina A (OTA). A quantidade de probiótico foi calculada para 10 L de água. A quantidade da microalga *Chaetoceros gracilis* foi calculada de acordo com a quantidade utilizada nas fazendas ( $12 \times 10^4$  células/mL). Foi preparado um grupo com cinco microtubos de cada probiótico com pH 2,0 e um outro grupo com pH 6,0 utilizando solução tampão fostato salino (PBS) em duplicata para simular o pH estomacal e intestinal dos camarões, respectivamente. As concentrações de probióticos utilizadas foram 0,0%; 25%; 50%; 75% e 100% (0,0025 g; 0,005 g; 0,0075 g; 0,010 g) em cada tubo. As concentrações da microalga foram as mesmas do probiótico. A concentração das micotoxinas foi 1.000 ng/mL. A atividade anti-micotoxina do A1, A2 e A3 para OTA e AFB1 foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência. Houve diferença na capacidade anti-micotoxina entre os probióticos testados para OTA e AFB1 com maior eficiência do A2. O A3 não apresentou atividade anti-micotoxina. Em A1 e A2 a adsorção de OTA e AFB1 iniciou a partir da concentração 25%. Metade da OTA (513 ng/mL) foi adsorvida utilizando o A2 (concentrações  $\geq 50\%$ ) em pH 2,0 e no A1 (concentrações  $\geq 75\%$ ) no mesmo pH (400 ng/mL). Para AFB1 a maior adsorção ocorreu no A2 (concentrações  $\geq 75\%$ ) em pH 2,0 (643 ng/mL) e pH 6,0 (672 ng/mL). O maior efeito anti-micotoxina do A1 só ocorreu (concentrações  $\geq 50\%$ ) em pH 2,0 (481 ng/mL) e 25% em pH 6,0 (592 ng/mL). Os probióticos constituídos por esporos de *Bacillus* spp possuem capacidade anti-micotoxina *in vitro* para AFB1 e OTA e a microalga *Chaetoceros gracilis* não apresentou esta capacidade.

**Palavras-chave:** Adsorção; Degradação; Micotoxinas; Biotransformação; Carcinicultura.

## Abstract

Objectives: The objective of this work was to evaluate the *in vitro* anti-mycotoxin capacity of two commercial probiotics consisting of spores of *Bacillus* spp - A1 and A2 and of the microalgae *Chaetoceros gracilis* - A3 used to feed *Litopenaeus vannamei* for aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA). The amount of probiotic was calculated for 10 L of water. The amount of *Chaetoceros gracilis* microalgae was calculated according to the amount used in the farms ( $12 \times 10^4$  cells / mL). A group with five microtubes of each probiotic with pH 2.0

and another group with pH 6.0 was prepared using phosphate buffered saline (PBS) in duplicate to simulate the stomach and intestinal pH of the shrimp, respectively. The concentrations of probiotics used were 0.0%; 25%; 50%; 75% and 100% (0.0025 g; 0.005 g; 0.0075 g; 0.010 g) in each tube. The same concentration of microalgae was used. The concentration of mycotoxins was 1.000 ng / mL. The anti-mycotoxin activity of A1, A2 and A3 for OTA and AFB1 were performed by high performance liquid chromatography. There was a difference in the anti-mycotoxin capacity between the probiotics tested for OTA and AFB1 with greater efficiency of A2. A3 did not show anti-mycotoxin activity. In A1 and A2 the adsorption of OTA and AFB1 started from the 25% concentration. Half of the OTA (513 ng / mL) was adsorbed using A2 (concentrations  $\geq 50\%$ ) at pH 2.0 and A1 (concentrations  $\geq 75\%$ ) at the same pH (400 ng / mL). For AFB1 the greatest adsorption occurred in A2 (concentrations  $\geq 75\%$ ) at pH 2.0 (643 ng / mL) and pH 6.0 (672 ng / mL). The greatest anti-mycotoxin effect of A1 only occurred (concentrations  $\geq 50\%$ ) at pH 2.0 (481 ng / mL) and 25% at pH 6.0 (592 ng / mL). Probiotics made up of spores of *Bacillus* spp have anti-mycotoxin capacity *in vitro* for AFB1 and OTA and the microalgae *Chaetoceros gracilis* did not show this capacity.

**Keywords:** Adsorption; Degradation; Mycotoxins; Biotransformation; Shrimp farming.

### Resumen

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la capacidad anti-micotoxina de dos probióticos comerciales constituidos por esporas de *Bacillus* spp - A1 y A2 y de la microalga *Chaetoceros gracilis* - A3 utilizadas en la alimentación de *Litopenaeus vannamei* para aflatoxina B1 (AFB1) y ocratoxina A (OTA). La cantidad de probiótico se calculó para 10 L de agua. La cantidad de microalgas *Chaetoceros gracilis* se calculó según la cantidad utilizada en las granjas ( $12 \times 10^4$  células / mL). Se preparó un grupo con cinco microtubos de cada probiótico con pH 2.0 y otro grupo con pH 6.0 usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) por duplicado para simular el pH del estómago y intestino de los camarones, respectivamente. Las concentraciones de probióticos utilizados fueron 0.0%; 25%; 50%; 75,% y 100% (0,0025 g; 0,005 g; 0,0075 g; 0,010 g) en cada tubo. Se utilizó la misma concentración de microalgas. La concentración de micotoxinas fue de 1.000 ng / mL. La actividad anti-micotoxina de A1, A2 y A3 para OTA y AFB1 se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución. Hubo una diferencia en la capacidad anti-micotoxina entre los probióticos probados para OTA y AFB1 con mayor eficiencia de A2. A3 no mostró actividad anti-micotoxina. En A1 y A2, la adsorción de OTA y AFB1 comenzó a partir de la

concentración del 25%. La mitad de la OTA (513 ng / mL) se adsorbió usando A2 (concentraciones  $\geq 50\%$ ) a pH 2.0 y A1 (concentraciones  $\geq 75\%$ ) al mismo pH (400 ng / mL). Para AFB1, la mayor adsorción ocurrió en A2 (concentraciones  $\geq 75\%$ ) a pH 2.0 (643 ng / mL) y pH 6.0 (672 ng / mL). El mayor efecto anti-micotoxinas de A1 solo ocurrió (concentraciones  $\geq 50\%$ ) a pH 2.0 (481 ng / mL) y al 25% a pH 6.0 (592 ng / mL). Los probióticos compuestos por esporas de *Bacillus* spp tienen capacidad anti-micotoxina *in vitro* para AFB1 y OTA y la microalga *Chaetoceros gracilis* no mostró esta capacidad.

**Palabras clave:** Adsorción; Degradación; Micotoxinas; Biotransformación; Cultivo de camarón.

## 1. Introdução

As aflatoxinas são produzidas essencialmente por fungos da espécie *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Creppy, 2002; Klich, 2007; Pitt & Hocking, 2009) e encontram-se como contaminantes naturais dos cereais, tortas de oleaginosas, mandioca e toda uma série de alimentos para o homem (Taveira & Mídio, 1999; Mídio & Martins, 2000; Samsom et al, 2001; Cardoso Filho et al., 2011).

Seus efeitos na carcinicultura são variados, influenciando diretamente no desempenho produtivo e sanidade dos camarões, podendo causar prejuízos econômicos para os produtores (Calvet et al., 2015). Dentre os efeitos observados e descritos na literatura são: lesões no hepatopâncreas, órgão mandibular, órgão hematopoiético, diminuição na conversão alimentar, crescimento e sobrevivência (Wiseman et al., 1982; Lightner et al., 1982; Bautista et al., 1994; Ostrowski-Meissner, et al., 1995; Divakaran & Tacon, 2000; Boonyaratpalin, et al., 2001; Bintvihok et al., 2003; Burgos-Hernández et al., 2005; Gopinath & Raj, 2009)

As ocratoxinas são o segundo maior grupo de micotoxinas produzidos principalmente por *Aspergillus ochraceus* e outras espécies de *Aspergillus*, bem como *Penicillium verrucosum* e outras espécies de *Penicillium* (CAST, 2003). A ocratoxina A é conhecida como uma das micotoxinas de maior significado na saúde-pública e agro-economia (Duarte et al., 2011), e potencialmente tão importante quanto às aflatoxinas (MacDonald et al., 2004; El-Sayed, et al., 2009). Efeitos tóxicos têm sido atribuídos após a exposição como nefrotoxicidade, bem como impactos negativos no desempenho dos animais, resultando em importantes implicações econômicas.

Os probióticos são produtos biológicos feitos de cepas selecionadas de bactérias, microalgas, fungos e/ou leveduras, que convertem rapidamente os sedimentos sólidos em

substâncias mais simples e utilizáveis, além de diminuir as concentrações de substâncias tóxicas em ambientes de cultivo (Tabbu, 1997). Os mais estudados para uso em carcinicultura são: as microalgas (*Tetraselmis suecica*) (Maeda, 1999), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Berger, 2000), bactérias Gram-positivas (*Bacillus S11*, *Bacillus sp*, *Lactobacillus lactis* AR21) (Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006), bactérias Gram negativas (*Photorhodobacterium sp.*, *Vibrio alginolyticus*) (Rengpipat et al., 1998, 2000; Irianto & Austin, 2002). Dentre estes tipos de agentes, as bactérias do gênero *Bacillus sp.* representam organismos de grande importância e amplamente utilizados como probióticos para diferentes fases de cultivo de peneídeos (Moriarty, 1998; 1999; Decamp & Moriarty, 2006a 2006b).

Probióticos a base de esporos de *Bacillus spp* são muito utilizados na carcinicultura como um complemento para manter o ambiente de cultivo saudável livre de patógenos melhorando assim o desempenho das larvas e pós-larvas e fortalecendo o seu sistema imunológico (Silva et al., 2011). Estudos do uso de probiótico como agentes anti micotoxinas são escassos. Hai (2006) ao testar cepas de *Bacillus subtilis* no controle da produção de aflatoxinas concluiu que duas variantes desta cepa inibiram a produção da toxina.

*Lactobacillus* e *Streptococcus* são bactérias utilizadas principalmente como sequestradoras de micotoxinas mediante pontes hidrofóbicas que as liga à superfície bacteriana (Tapia-Salazar et al., 2010). Algumas bactérias, fungos, leveduras e suas enzimas atuam como agentes biotransformadores de micotoxinas e os agentes antimicotoxinas mais comumente utilizados em carcinicultura são a vermiculita e aluminossilicato.

A oferta de produtos adsorventes no mercado nacional é muito variável, porém nem todos apresentam resultados que comprovem sua eficiência protetora, portanto ao optar por um produto deve se fundamentar em resultados de avaliações do sequestrante por testes in vitro e in vivo. Deste modo, é necessário selecionar corretamente os produtos adsorventes e para isso são recomendados critérios como resultados de no mínimo 90% de capacidade de adsorção (suco gástrico e intestinal) na avaliação in vitro e nas avaliações in vivo o grupo de animais intoxicados com a presença de adsorvente na ração deve apresentar um ganho de peso superior estatisticamente ao grupo intoxicado sem adsorvente (Mallmann et al., 2006)

Devido os dados expostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade anti-micotoxina in vitro para aflatoxina B1 e ocratoxina A de dois probióticos constituído de esporos de *Bacillus spp* e da microalga *Chaetoceros gracilis* utilizados na alimentação de *Litopenaeus vannamei*.

## 2. Metodologia

Os estudos *in vitro* da adsorção de aflatoxina B1 (AFB1) e ocratoxina A (OTA) foram realizados no Laboratório de Controle Microbiológico dos Alimentos, do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos, da Universidade Federal do Piauí.

### 2.1 Material testado

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando dois probióticos comerciais: “A1” (constituído de esporos de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* na concentração de  $5,0 \times 10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup>), “A2” (constituído de esporos de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* na concentração de  $5,0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>). A quantidade de probiótico utilizada no teste *in vitro* obedeceu as recomendações do fabricante de 0,5 ppm ( $2,5 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) para nauplius 4 e nauplius 5 (N4 e N5) e zoé 2 (Z2), e 1,0 ppm ( $5,0 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) de Z3 para pós-larva 10 (PL10), equivalente a, 0,5 g e 1,0 g para 1000 L de água, respectivamente. A quantidade de probiótico utilizada no ensaio *in vitro*, foi calculada para 10 L de água.

Também foi testada a capacidade anti-micotoxina *in vitro* da microalga *Chaetoceros gracilis* (“A3”) que era cultivada na fazenda carcinicultora piauiense para suplementação alimentar das larvas, onde eram acrescentadas  $12 \times 10^4$  células/mL na água de cultivo.

### 2.2 Protocolo de avaliação *in vitro* dos efeitos anti- micotoxinas dos probióticos e algas utilizados

A capacidade anti-micotoxina *in vitro* foi realizada de acordo com as recomendações da Portaria nº 130, de 24 de maio de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2006). Para cada adsorvente, foi preparado um grupo com cinco microtubos com capacidade para 1,5 mL, para ser trabalhado com pH 2,0 simulando o conteúdo estomacal dos camarões e um outro grupo de cinco microtubos com pH 6,0, semelhante ao conteúdo intestinal dos camarões nas concentrações de 0,0%; 25,0%; 50,0%; 75,0% e 100,00% de adsorvente. Os efeitos anti-micotoxinas dos probióticos foram realizados em duplicatas utilizando as doses recomendadas pelo fabricante adaptadas para 10 L de água. A quantidade em gramas destes probióticos correspondeu a 0,0025 g; 0,005 g; 0,0075 g; 0,010 g respectivamente. A quantidade de microalga utilizada para verificar seus efeitos anti-micotoxinas foi calculada de acordo com a quantidade utilizada na fazenda para alimentar as

larvas de camarões.

Para o teste *in vitro* a quantidade dos adsorventes foi pesada em dobro para serem diluídos posteriormente. Em seguida foram transferidos para microtubos e acrescidos de 1.000 µL de solução tampão fostato salino com pH 2,0 e pH 6,0. Uma alíquota de 500 µL de cada concentração do adsorvente foi transferida para microtubos contendo 500 µL de uma concentração de 1.000 ng/mL de toxina. Os padrões de toxinas testados foram: aflatoxina B1 e ocratoxina A (Sigma Aldrich® Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%). Cada microtubo foi levado ao banho-maria a 37° C e agitação mecânica por uma hora. Após agitação os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi retirado para ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo SHIMADZU®, modelo PROMINENCE com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER.

Para AFB1 seguiu-se a metodologia recomendada por Trucksees et al., (1994) conforme segue: Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante (probiótico+toxina) foi derivatizada com 700 ul de ácido trifluoroacético: ácido acético: água (20:10:70, v/v/v). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6mm id., 5,0 µm de tamanho de partículas, VARIAN, Inc. Palo Alto, EUA). A fase móvel utilizada foi acetonitrila, metanol e água (17:17:66 v/v/v) a uma vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. A fluorescência de derivados de aflatoxina foi gravada em comprimentos de onda de excitação e emissão de λ 360 nm e 460 nm λ, respectivamente. A curva padrão foi construída em diferentes níveis de AFB1. Esta toxina foi quantificada pela correlação das alturas dos picos do extrato da amostra com o da curva padrão. O limite de detecção do método analítico foi de 0,4 ng/g.

Para OTA seguiu-se a metodologia de Scudamore e McDonald (1998) como segue: as separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa (150 x 4,6 mm, 5 mm de tamanho de partícula; Phenomenex, Luna), conectada a uma pré-coluna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 mm de tamanho de partícula, Supelco). A fase móvel utilizada foi uma solução de acetonitrila: água: ácido acético (57:41:2 v/v/v). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min. A longitude de onda de excitação e emissão usada foi de 330 e 460 nm, respectivamente. A quantificação da OTA foi realizada por medição das áreas e suas extrapolações a uma curva de calibração obtida mediante o uso de soluções padrões de OTA. O limite de detecção para OTA foi de 0,01 ng/g

No total foram realizados três ensaios *in vitro* para testar o efeito adsorvente dos probióticos e microalga *Chaetoceros gracilis* classificados como A1; A2 e A3,

respectivamente.

### 2.3 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes de degradação *in vitro* e os efeitos dos adsorventes foram submetidos a análise de variância e teste de SNK para comparação das médias, com significância ( $P < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaStat para Windows versão 2.03 (SPSS Inc.).

### 3. Resultados e Discussão

Houve diferença significativa na eficiência da capacidade anti-micotoxina entre os dois probióticos testados para ocratoxina A (OTA), e o que teve maior eficiência foi A2. O A3 não apresentou atividade anti micotoxina (Tabela 1). Em A1 e A2 pode-se verificar que a adsorção iniciou a partir da concentração 25% do probiótico. No A2 a metade da toxina foi adsorvida quando foram utilizadas concentrações maiores ou iguais a 50% em pH 2,0 e em A1 só ocorreu em concentrações maiores ou iguais a 75% no mesmo pH, este efeito deve ter ocorrido pela provável ativação de enzimas bacterianas do probiótico em baixas concentrações de pH. A limitação da atividade anti-micotoxina dos probióticos pode estar relacionada a saturação das pontes hidrofóbicas entre a superfície bacteriana e dos sítios de ligações entre a toxina e o micro-organismos ou suas enzimas conforme afirmam Tapia-Salazar et al., (2010). Era de se esperar que o A1 tivesse maior atividade anti-micotoxina, por ter em sua composição três espécies de *Bacillus*, enquanto o A2 possuía apenas duas destas mesmas espécies, porém estas interações microbianas com micotoxinas devem ser melhor estudadas para avaliar seus efeitos adsorventes.

**Tabela 1.** Médias da quantidade adsorvida de ocratoxina A *in vitro* usando dois probióticos em diferentes concentrações.

Dose do Probiótico g (%)	Quantidade Adsorvida de Micotoxina (ng/mL)					
	A1 <sup>B</sup>		A2 <sup>A</sup>		A3 <sup>n.a.</sup>	
	pH 2,0	pH 6,0	pH 2,0	pH 6,0	pH 2,0	pH 6,0
0,0 (0%)	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0	0
0,0025 (25%)	188 <sup>bA</sup>	87 <sup>bA</sup>	399 <sup>bA</sup>	175 <sup>bB</sup>	0	0
0,005 (50%)	254 <sup>b<sup>c</sup>A</sup>	90 <sup>b<sup>B</sup></sup>	513 <sup>cA</sup>	410 <sup>cB</sup>	0	0
0,0075 (75%)	379 <sup>dA</sup>	200 <sup>cB</sup>	585 <sup>cA</sup>	513 <sup>dA</sup>	0	0
0,010 (100%)	400 <sup>dA</sup>	204 <sup>cB</sup>	589 <sup>cA</sup>	534 <sup>dA</sup>	0	0

AB= letras diferentes representam resultados diferentes na mesma linha ( $p < 0,05$ ); abcd= letras diferentes representam resultados diferentes na mesma coluna ( $p < 0,05$ ); n.a.= não adsorveu OTA; g= Grama. Fonte: Autores.

Houve diferença significativa na eficiência da capacidade anti-micotoxina entre os probióticos testados para aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), e o que teve maior eficiência foi A2. O A3 não apresentou esta atividade (Tabela 2). Em A2 e A1 pode-se verificar que a adsorção iniciou a partir da concentração 25% de probiótico. No A2 a maior parte da toxina foi adsorvida quando foram utilizadas concentrações maiores ou iguais a 75% em pH 2,0 e pH 6,0. Quanto ao A1 só ocorreu em concentrações maiores ou iguais a 50% em pH 2,0 e 25% em pH 6,0. O melhor efeito antimicotóxico para a AFB<sub>1</sub> em A1 ocorreu com o pH 6,0, em A2 este efeito foi semelhante em ambas concentrações de pH. Este efeito deve ter ocorrido pela provável ativação de enzimas bacterianas do probiótico em concentrações próximas a neutralidade (Tabela 2).

O nível de redução da AFB<sub>1</sub> por *Bacillus* spp presentes nos dois probióticos testados pode ter ocorrido pela destruição direta da toxina pelos metabólitos da bactéria conforme afirma Hai (2006) e que *B. subtilis* foram eficazes como inibidores na produção e adsorção de AFB<sub>1</sub> conforme os resultados deste estudo.

**Tabela 2.** Médias da quantidade adsorvida de aflatoxina B<sub>1</sub> *in vitro* usando dois probióticos em diferentes concentrações.

Quantidade Adsorvida de Micotoxina (ng/mL)						
Dose do Probiótico g (%)	A1 <sup>B</sup>		A2 <sup>A</sup>		A3 <sup>n.s.</sup>	
	pH 2,0	pH 6,0	pH 2,0	pH 6,0	pH 2,0	pH 6,0
0,0 (0%)	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0	0
0,0025 (25%)	309 <sup>bB</sup>	592 <sup>bA</sup>	398 <sup>bA</sup>	180 <sup>bB</sup>	0	0
0,005 (50%)	481 <sup>cB</sup>	659 <sup>bA</sup>	549 <sup>cA</sup>	421 <sup>cB</sup>	0	0
0,0075 (75%)	518 <sup>cB</sup>	680 <sup>bA</sup>	643 <sup>cdA</sup>	672 <sup>dA</sup>	0	0
0,010 (100%)	546 <sup>cB</sup>	730 <sup>bA</sup>	739 <sup>dA</sup>	650 <sup>dA</sup>	0	0

AB= letras diferentes representam resultados diferentes na mesma linha (p<0,05); abcd= letras diferentes representam resultados diferentes na mesma coluna (p<0,05); n.s.= não adsorveu AFB<sub>1</sub>; g=Grama. Fonte: Autores.

Probióticos a base de *Bacillus* spp são utilizados rotineiramente em carcinicultura (Moriarty, 1998; 1999; Decamp e Moriarty, 2006a 2006b), para promover um ambiente saudável, com redução de patógenos, melhorar o ganho de peso, os parâmetros de crescimento e fortalecimento do sistema imunológico dos camarões (Silva et al., 2011).

Pinheiro et.al., (2015; 2017) ao avaliarem os efeitos adsorventes *in vitro* de probióticos utilizados na aquicultura frente a aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A, respectivamente, constataram que produtos comerciais à base de leveduras secas de cervejaria e de probióticos formados por bactérias ácido lácticas juntamente com *Bacillus* possuem capacidade de adsorção *in vitro* de OTA e AFB<sub>1</sub> em condições simuladas de pH gastrointestinal de tilápias. Resultados estes semelhantes ao observados neste estudo.

Pode-se estabelecer que estes probióticos também podem ser utilizados como adsorventes e sequestrantes de OTA e AFB<sub>1</sub> que por ventura estejam presentes nas rações. Os probióticos A1 e A2 testados poderiam conferir segurança para utilização em rações que tivessem contaminação de AFB<sub>1</sub> e OTA até níveis de 500 µg/Kg, comprovados em testes *in vitro*. Deste modo, recomenda-se que sejam realizados testes *in vivo* utilizando estes probióticos em rações contaminadas experimentalmente com estas toxinas.

#### 4. Considerações Finais

Probióticos constituídos por esporos de *Bacillus* spp possuem capacidade anti-micotoxina *in vitro* para aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A

A microalga *Chaetoceros gracilis* utilizadas na alimentação de *Litopenaeus vannamei* não apresentou capacidade anti-micotoxina *in vitro* para aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A.

#### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e ao Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamentos de Alimentos (NUEPPA).

#### Referências

- Bautista, M. N., Lavilla-Pitogo, C. R., Subosa, P. F., Begino, E. T., (1994). Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon*. *Journal of Science Food Agriculture*, 65 (01), 5–11.
- Berger, C., (2000). Aportes de la biotecnología a la alimentación y a la imunoestimulación de camarones Penaeidos. In: Cruz-Suárez, L. E. et al. (Ed.). *Avances en Nutrición Acuícola. Yucatán: Memores del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 1, 19-22.
- Bintvihok, A., Ponpornpisit A., Tangtrongpiros, J., Panichkriangkrai, W., Rattanapanee, R., Doi K. and Kumagai, S., (2003). Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. *Journal of Food Protection*, 66(5), 882-5.
- Boonyaratpalin, M., Supamattaya K., Verakunpiriya, V. and Suprasert, D., (2001). Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research*, 32 (Suppl. 1), 388-398.

Brasil Portaria n 13, de 24 de maio de 2006, Institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. *Diário Oficial da União*. Brasília-DF. Seção 2, p 6, 25 jan 2006.

Burgos-Hernández, A., Farias, S.I., Torres-Arreola, W. and Ezquerra-Brauer, J.M., (2005). In vitro studies of the effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 250 399– 410.

Calvet, R. M., Pereira, M. M. G., Torres, A. M., Costa, A. P. R., Muratori, M. C. S. Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. *Ciência Rural*, Santa Maria, 45(6), 1021-1026.

Cardoso Filho, F. C., Calvet, R. M., Pereyra, C. M., Pereira, M. M. G., Rosa, C. A. R., Torres, A. M., Muratori, M. C. S., (2011). Ocorrência de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e aflatoxinas em amostras de farinha de milho utilizadas no consumo humano, Piauí, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78 (03), 443-447.

CAST, (2003). Mycotoxins – Risks in Plant, Animal and Human Systems, Task Force Report n°. 139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 1–191.

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

Decamp, O., & Moriarty, D. J. W. (2006). Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(04), p. 60-62a.

Decamp, O., & Moriarty, D.J.W., 2006. *Safety of Aquaculture Probiotics*. *Global Aquaculture Advocate*, 4/5, 86-87b.

Divakaran, S., & Tacon, A. G. J. (2000). Studies on the toxicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) fed diets Dosed with aflatoxin B<sub>1</sub> to humans. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(03), 115-120.

Duarte, S. C., Lino, C. M., & Pena, A. (2011). Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Veterinary Microbiology*, 154(2), 1–13.

El-Sayed, Y. S., Khalil, R. H., & Saad, T. T., (2009). Acute toxicity of ochratoxin-A in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Chemosphere* 75, 878–882.

Gopinath, R., & Raj, R. P. (2009) Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxina B<sub>1</sub> incorporated diets. *Aquaculture Research*, 40, 1235-1242.

Hai, N. N., (2006). *Bacillus subtilis* possibly used for aflatoxin control. Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. October 20-21.

Irianto, A., & Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Disease*, 25, 633–642.

Klich, M. A., (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*. 48, 71–80

Lightner, D. V., Redman, R. M., Price, R. L. & Wiseman, M. O., (1982). Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 40(02), 279-291.

MacDonald, S., Prickett, T. J., Wildey, K. B., & Chan, D. (2004). Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK. *Food Additives Contaminants*. 2, 172–181.

Maeda, M. *Microbial processes in Aquaculture*. (1999). Biocreate Press, Tsukuba, Japan and Derby, UK. 5.

Mallmann, C. A., Dilkin, P., Giacomini, L. Z., & Rauber, R.H., (2006). Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. *Anais. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*, 213-224.

Moriarty, D. J. W., (1998). Control of luminous *Vibrio* species in *Penaeid* aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.

Moriarty, D. J. W., (1999). *Diseases Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria*. Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the eighth International Symposium on Microbial Ecology. In: Bell, C. R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Ed.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Ochoa-Solano, J. L., & Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Aquaculture*, 23, 519-525.

Ostrowski-Meissner, H. T., Leamaster, B. R., Duerr, E. O., Wlash, W. A. (1995). Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B1. *Aquaculture* 131, 155 – 164. p. 12-16, 1985.

Pinheiro, R. E. E., Pereyra, C. M., Neves, J. A., Calvet, R. M., Santos, J. T. O., Lima, C. E., Alves, V. C., Muratori, M. C. S. Adsorção “in vitro” de ochratoxina a por probióticos utilizados na aquicultura. *Acta Veterinaria Brasilica*, 9(1), 59-64, 2015.

Pinheiro, R. E. E., Pereyra, C. M., Neves, J. A., Calvet, R. M., Santos, J. T. O., Lima, C. E., Alves, V. C., Pereira, M. M. G., Muratori, M. C. S. Avaliação *in vitro* da adsorção de aflatoxina B1 por produtos comerciais utilizados na alimentação animal. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.84, 1-6, e0072015, 2017

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. (2009). (3a ed.) Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 524p.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. (1998) Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301–313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P., (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191, 271-288.

Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., & Filtenborg O., (2001). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 389.

Scudamore, K., & Macdonald, S. (1998). A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives Contaminants* 15, 401-410.

Silva, E. F., Soares, M. A., Calazans, N. F., Vogeley, J. L., Valle, B. C., Soares, R. & Peixoto, S., (2011). Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 1–9.

Tabbu, M. Y., (1997). Los efectos benéficos de un producto sobre químicos seleccionados y parâmetros de crecimiento en aguas de estanques de *Penaeus monodon*. In: World Aquaculture, 1997. Washington. *Anais. Washington: World Aquaculture*, 19-23.

Tapia-Salazar, M., García-Pérez, O. D., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., Villarreal-Cavazos, D., et al., (2010). *Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura*. Avances en Nutrición Acuícola X - *Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, Novo León, México*. pp. 514-546.

Trucksess, M. W., Stack, M. E., Nesheim, S., Albert, R. H., & Romer, T. R., (1994). Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachionuts: collaborative study. *JAOAC. Int* 6, 1512-1521.

Taveira, J. A., & Mídio, A. F., (1999). Aflatoxina M1 – A micotoxina do leite. *B Soc Bra C Tec Alim*, 33 (01), 115-126.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Rodrigo Maciel Calvet – 20%

Maria Marlúcia Gomes Pereira Nóbrega – 15%

Amilton Paulo Raposo Costa– 15%

Carina Maricel Pereyra– 15%

Aline Marques Monte– 15%

Maria Christina Sanches Muratori– 15%