AVALIAÇÃO DO USO DE *LACTOBACILLUS CASEI* NA REMOÇÃO DE AFM_1 EM LEITE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO

Jéssica Franco Custódia[1]; Gabriela Kern[1]; Suse Botelho da Silva[1]

[1]Escola de Saúde e Escola Politécnica - Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Avenida Unisinos nº 950, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. 93020190. E-mail: jeehfcustodia@gmail.com, susebs@unisinos.br

Resumo

As aflatoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus,* que quando presentes em alimentos representam um risco a saúde humana por apresentarem propriedades hepatotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. Essas micotoxinas podem contaminar grãos e outras matérias-primas normalmente utilizadas na produção de rações para alimentação animal. A Aflatoxina M_1 (AFM_1) é um metabólito tóxico resultante da biotransformação da Aflatoxina B_1, que é excretada pelos animais em fluidos como o leite. Os processos de pasteurização e esterilização não conseguem inativar completamente as aflatoxinas, por isso o método de descontaminação biológica tem se mostrado como uma alternativa para a remoção dessas micotoxinas em alimentos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a remoção de AFM_1 em leite artificialmente contaminado utilizando a linhagem *Lactobacillus casei* (ATCC55544) em tempos de contato de até uma hora. A metodologia empregada envolveu a adição de 2 μg/L de AFM_1 a leite desnatado com posterior avaliação da remoção da toxina pela bactéria nos tempos de contato de 5 a 60 minutos. A quantidade de AFM_1 foi estimada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a percentagem de remoção foi calculada. Os resultados mostraram que a linhagem de *L. casei* utilizada promoveu uma redução dos teores de AFM_1 já nos primeiros minutos de contato. Uma remoção acima de 80% foi obtida em 30 minutos, não diferindo estatisticamente da remoção obtida em 60 minutos. Assim, o uso da *Lactobacillus casei* (ATCC55544) se mostra como uma boa alternativa para redução da contaminação da aflatoxina M_1 em leite.

Palavras-chave: bactéria-ácido-lática*;* leite; aflatoxinas; descontaminação

Introdução

As aflatoxinas são compostos altamente tóxicos produzidos naturalmente por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus,* principalmente *A.flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Essas micotoxinas podem contaminar grãos como amendoim, trigo, milho, arroz, entre outros que, normalmente, são utilizados na produção de rações para alimentação animal. São identificadas quatro aflatoxinas como contaminantes naturais de produtos agrícolas, sendo elas: aflatoxina B_1 (AFB_1); B_2 (AFB_2); G_1 (AFG_1) e G_2 (AFG_2). (WEIGEL, 2007).

A AFB_1 é considerada a mais tóxica de todas as aflatoxinas, apresentando propriedades hepatotóxicas, teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas. (RAI; VARMA, 2010). Quando a AFB_1 é ingerida pelo gado, ao consumir a ração contaminada, parte é degradada por microrganismos do rúmen, formando o aflatoxicol. A parte restante é absorvida pelo trato digestivo por difusão passiva e sofre biotransformação hepática convertendo-se em aflatoxina M_1, sendo uma forma hidroxilada da AFB_1 que é excretada no leite e fluidos biológicos dos animais. (FINK-GREMMELS, 2008). Segundo Creppy (2002), da totalidade de AFB_1 ingerida através da ração, aproximadamente 0,3 % a 6,2 % é transformada em AFM_1 e é excretada no leite.

O potencial carcinogênico da AFM_1 é significativamente inferior ao da AFB_1, possuindo a AFB_1 e a AFM_1 um TD_{50} (teor de micotoxina passível de causar desenvolvimento de tumores malignos em 50% dos indivíduos) de 10,4 e 1,2 μg / kg p.c. (peso corporal) / dia, respectivamente. Sendo assim, a AFM_1 possui cerca de 10 % da atividade carcinogênica de aflatoxina B_1. (GIMENO; MARTINS, 2006). Porém, ambas estão classificadas no Grupo 1, carcinogênico para humanos, segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002).

O leite é um alimento consumido durante todas as fases da vida, sendo a principal fonte de nutrientes para as crianças. Por isso, é indispensável que o mesmo se apresente sem qualquer tipo de contaminação. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2011) estabelece na RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 que o limite máximo permitido de AFM_1 em leite fluido seja de 0,5 μg/L, com a finalidade de diminuir os riscos causados por essa toxina. Como os processos de pasteurização e esterilização não eliminam por completo essas toxinas, métodos de descontaminação biológicos vêm sendo amplamente estudados como uma alternativa para sua remoção (WU et al., 2009). As Bactérias Ácido-Láticas (BAL) estão entre os microrganismos utilizados industrialmente que apresentam os resultados mais promissores para a redução de aflatoxinas em meio contaminado. (BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010). Para Fuchs et al. (2008), isso pode ser explicado pelo fato das BAL possuírem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, ou ainda, possuírem a habilidade de se ligarem à micotoxina no meio contaminado.

Algumas espécies de BAL como *Lactobacillus acidophillus*, *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* são relatadas em outros estudos como eficazes na remoção de AFM_1 de leite artificialmente contaminado em tempos de contato entre 4 a 24 horas. (BECKER-ALGERI, 2016; EL KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; ELSANHOTY et al., 2014). Tempos de contato inferiores a uma hora são pouco estudados, podendo-se citar o exemplo de Bovo et al. (2013) que estudaram a remoção de AFM_1 em leite por *Lactobacillus rhamnosus, L. delbruecki subs. bulgaricus* e *Bifidobacterium lactis* em um período de 15 minutos. No entanto, esses autores não testaram nenhuma linhagem de *Lactobacillus casei*. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar a capacidade da linhagem *Lactobacillus casei* (ATCC55544) em remover a AFM_1 em leite artificialmente contaminado, utilizando tempos de contato entre a toxina e a bactéria de no máximo uma hora.

Material e Métodos

A bactéria *Lactobacillus casei* – ATCC 55544 *(*L.casei 431®, Chr. Hansen, Denmark) foi reativada em caldo MRS (Acumedia® - Lansing, MI, USA) a 37 ºC por 48 horas em shaker a 150 rpm (Nova Técnica, Brazil). A cultura foi repicada 3 vezes em caldo MRS para que atingisse uma alta concentração de células. A determinação da contagem de células viáveis (UFC/ml) foi realizada por plaqueamento em profundidade em ágar MRS (Acumedia® - Lansing, MI, USA) a 37 ºC por 48 horas. Concomitante ao plaqueamento, foi realizada a estimativa da concentração bacteriana nos cultivos, por meio de medida da densidade óptica em espectrofotômetro (PerkinElmer, Lambda Bio+, Reino Unido) a 600 nm. Uma curva de calibração (UFC x absorbância) utilizando uma cultura de 15 horas de *L. casei* também foi construída para ser utilizada como uma estimativa da concentração das células nos ensaios de remoção posteriores.

Para os ensaios de remoção da AFM_1, seguiu-se a metodologia proposta por Bovo et al. (2013), exceto pela concentração da toxina no leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil), que no presente trabalho foi artificialmente contaminado com foi 2 μg/L (Sigma, St Louis, MO, USA). Seguindo essa metodologia, cultivos *de L. casei* em caldo MRS foram conduzidos em shaker (37 ºC, 150 rpm). Após 15 horas de cultivo, foi feita a imersão do tubo de cultura em banho de gelo por 3 minutos. A concentração de células viáveis foi estimada a partir da leitura da absorbância a 600 nm, mediante curva de calibração. Um volume do caldo de cultivo correspondente a 1 x 10^8 células foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Eppendorf 5430R, Alemanha). O centrifugado foi lavado com solução salina 0,85% estéril e novamente centrifugado. O pellet foi ressuspenso em 10 mL da solução de leite fortificado com 2 μg/L de AFM_1. Esta solução de leite/bactéria permaneceu sob agitação suave em agitador de movimento lateral (FinePCR, Compact Rocker CR95, Korea) a 20 ºC, pelos tempos de contato de 5, 15, 30 e 60 minutos. Os ensaios foram conduzidos em triplicata para cada tempo de contato.

Após o término do tempo de contato, as células foram centrifugadas (4.000 rpm, 15 min) e o sobrenadante passou pelo processo de extração do tipo QuEChERS, seguido por etapa de *clean up* com $MgSO_4$ e PSA (amina primária secundária), conforme descrito por Prestes et al. (2009). Um controle com leite fortificado com 2 μg/L de AFM_1 sem a a bactéria também foi submetido às etapas de QuEChERS e *clean up*. Para a análise da AFM_1 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo (HPLC/MS Modelo 1260, Agilent, EUA), acoplado ao detector de massas (MS) com fonte de ionização ESI (*eletrospray*) e analisador de massas single

quadrupolo (Agilent, EUA), munido de bomba de impulsionamento quaternária e auto-mostrador com coluna C18-XDB em fase reversa e processamento no software *OpenLab Chemistation* (Agilent, EUA). A metodologia baseou-se no procedimento descrito por Hengst e Mastovska (2013), que validaram o método para a determinação de AFM_1 em fórmulas lácteas infantis após extração QuEChERS (recuperação 99,4% e RSD 5,7%). A fase móvel foi composta por Formiato de amônio 5 mM e Ácido fórmico 0,1% em água (Fase A) e Metanol (Fase B). O volume de injeção de amostra foi de 20 µL, sendo realizadas duas injeções para cada triplicata dos tempos de contato.

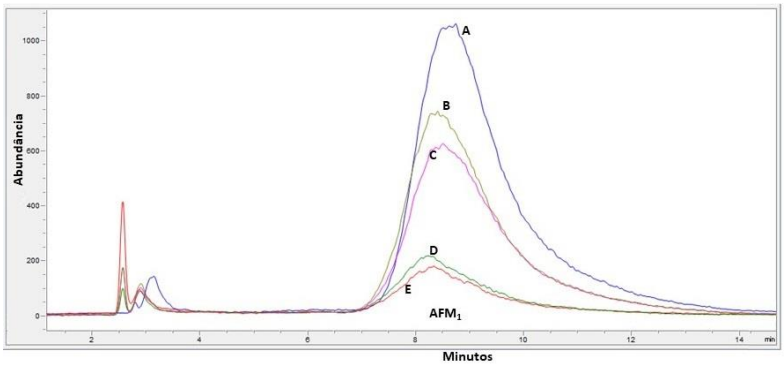
A porcentagem de remoção de AFM_1 foi estimada através da comparação entre as áreas dos picos cromatográficos de AFM_1 (BOVO et al. 2013) da amostra de leite artificialmente contaminado (2 µg/L) no tempo zero e das amostras obtidas após o tratamento com a bactéria em diferentes tempos de contato. Na Equação 1, **A** representa a porcentagem de AFM_1 removida pela bactéria, **B** a área do pico cromatográfico no tempo zero (2 µg/L de AFM_1) e **C** a área do pico cromatográfico da amostra em cada tempo de contato. Não foram utilizados controles específicos para cada tempo. A análise estatística dos resultados foi realizada mediante ANOVA e o teste de *Tukey* foi utilizado para comparação das médias ao nível de confiança de 95%.

$$A = \frac{B-C}{B} * 100 \qquad \text{(Equação 1)}$$

Resultados e Discussão

A partir dos ensaios experimentais foram obtidas as porcentagens de remoção de AFM_1 pela linhagem *Lactobacillus casei* ATCC 55544, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos gerados pelo sistema CLAE, nos tempos de contato de 5, 15, 30 e 60 minutos, com o controle positivo de 2 µg/L no tempo zero. A Figura 1 apresenta um cromatograma de sobreposição com curvas típicas obtidas para cada tempo de contato, no tempo de retenção da AFM_1 (8,4 minutos). Os resultados encontrados nos ensaios de descontaminação da AFM_1 em leite, expressos em termos da percentagem de remoção da aflatoxina, são apresentados na Tabela 1. Cada valor apresentado na tabela refere-se à média de 3 ensaios para cada tempo de contato. Os desvios-padrão também são apresentados na tabela.

Figura 1: Sobreposição de cromatogramas referentes a diferentes tempos de contato nos ensaios de descontaminação da AFM1 em leite



Tempos de contato: A- 0 minutos; B- 5 minutos; C- 15 minutos; D- 30 minutos; E- 60 minutos

Tabela 1: Porcentagem de remoção de AFM_1 em leite artificialmente contaminado submetido a diferentes tempos de contato com *Lactbacillus casei* (ATCC 55544)

Tempo de contato	5 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos
% Remoção[1] de AFM_1 em leite[2]	7,13 ± 1,07[c]	45,5 ± 19,8[b]	80,8 ± 3,5[a]	87,4 ± 2,3[a]

[1] Percentual de AFM_1 removida de leite artificialmente contaminado com 2 µg/L.

[2] Valores expressos como média ± desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

[a-c] Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Comparando-se os resultados encontrados para os diferentes tempos de contato, observa-se que em todos os períodos houve redução nos níveis da toxina no leite. A redução ocorreu de forma gradual, no tempo zero a concentração era de 2μg/L, sendo que nos primeiros 5 minutos já se pôde detectar uma pequena remoção e após 15 minutos a remoção foi de quase 50 %. A grande redução observada já com poucos minutos dá indícios de que o processo de remoção tem pouca relação com o metabolismo microbiano. Ao contrário, parece que a redução na contaminação do leite decorre de algum fenômeno adsortivo ou de interação com a parede celular microbiana. Segundo Bovo, Corassin e Oliveira (2010) isso pode ser explicado pela adesão da micotoxina aos componentes da parede celular da bactéria, principalmente aos polissacarídeos e aos peptidoglicanos, ao invés de ocorrer através de ligação covalente ou degradação pelo metabolismo da bactéria.

A remoção de AFM_1 utilizando-se BAL, especialmente o gênero *Lactobacillus*, foi observada também em outros estudos que avaliaram o poder remoção da micotoxina em tempos de contato que variaram de 4 a 24 horas. Elsanhoty et al. (2014) avaliaram a eficiência de diferentes BAL na diminuição dos teores de AFM_1 em tampão fosfato (pH = 7,3) fortificado com 50 μg/L da toxina, utilizando tempos de contato de 4, 8, 16 e 24 horas. As maiores reduções já ocorreram nas primeiras 4 horas de contato. Isso corrobora os resultados encontrados no presente trabalho, indicando que não são necessários tempos prolongados para que a bactéria consiga adsorver a micotoxina. No entanto, esses autores não testaram tempos de contato inferiores a 4 horas.

Semelhante ao presente estudo, Bovo et al. (2013) também utilizaram um tempo de contato de 15 minutos entre a toxina e a bactéria, em temperaturas de 4 e 37 ºC. Aquele estudo avaliou a redução de AFM_1 em leite artificialmente contaminado com 0,15 μg/mL utilizando as cepas *Lactobacillus rhamnosus, L. delbruecki subs. bulgaricus e Bifidobacterium lactis*. A *L. bulgaricus* foi a única que apresentou diferença significativa entre as temperaturas aplicadas, com remoção de 33,54% a 37 ºC. Diferente do *L. casei* (ATCC55544) que, em nosso estudo, reduziu 45,5% neste mesmo tempo. Assim, observa-se que dentro de um mesmo gênero, nem todas as espécies são equivalentes em termos de remoção da toxina do meio contaminado.

Em nosso estudo, os tempos de 30 e 60 minutos apresentaram as maiores porcentagens de remoção, com valores superiores a 80%, não apresentando diferença significativa entre os mesmos ($p > 0,05$). A percentagem de redução da AFM_1 em leite em 30 minutos de contato foi ainda um pouco superior ao encontrado por de Becker-Algeri (2016). Esse autor quantificou e avaliou a redução nos níveis da AFM_1 em leite fortificado com 2 μg/L, utilizado na produção de leite fermentado (4 horas de contato, 42 ºC). Naquele trabalho, foram utilizados *L. acidophillus*, *L. delbruecki subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, sendo que o *L. acidophillus* foi o que apresentou uma redução de 73,7 % da toxina.

Considerando o limite máximo tolerado da AFM_1 em leite (0,5 μg/L), de acordo com a RDC nº 7/2001 (BRASIL, 2011), o tempo de contato de 30 minutos se mostrou eficaz, pois reduziria os níveis da toxina de 2 μg/L para valores inferiores 0,4 μg/L. Isso demonstra o potencial do *L. casei* ATCC 55544 para reduzir a concentração de AFM_1 até níveis exigidos pela legislação. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para melhor entender os mecanismos envolvidos na remoção de AFM_1 pelas bactérias ácido-láticas em leite e também para melhor avaliar os impactos de outros fatores interferentes nesta remoção.

Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a linhagem *Lactobacillus casei* ATCC 55544 é capaz de reduzir os teores de AFM_1 em leite artificialmente contaminado em menos de uma hora de contato. Em 30 minutos, os níveis de remoção da AFM_1 foram superiores a 80 %, demonstrando potencial para reduzir a concentração da toxina até níveis exigidos pela legislação.

Referências

BECKER-ALGERI, T. A. **Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite**. 2016. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia

e Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2016.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **Revista UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.l.], v.12, n.2, p.15-21, 2010.

BOVO, F. et al. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M_1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. **Food and Bioprocess Technology**, [S.l.], v. 6, n. 8, p. 2230-2234, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 mar. 2011.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, [S.l.], v. 127, n. 1-3, p.19-28, 2002.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M_1 in milk and yogurt and AFM_1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, [S.I.], v. 22, n. 10, p. 1695-1699, 2011.

ELSANHOTY, R. M. et al. Detoxification of aflatoxin M_1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, [S.I.], v. 43, p. 129-134, 2014.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants,** [S.l.], v.25, n. 2, p.172–180, 2008.

FUCHS, S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 46, n. 4, p.1398-1407, 2008.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. **Mycotoxins and mycotoxicosis in animals and humans**. Estados Unidos: Special Nutrients, Inc., 2006. p. 67-75.

HENGST, D.; MASTOVSKA, K. Analysis of regulated mycotoxins in infant formula using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. In: ANNUAL NORTH AMERICAN CHEMICAL RESIDUE WORKSHOP, 50, 2013, St. Pete Beach. Anais... Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/HengstNACRW13-pg1.pdf>. Acesso em: 9 abr.2018.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, 2002. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 82).

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RAI, M.; VARMA, A**. Mycotoxins in food, feed and bioweapons**. Germany: Springer, 2010. 405 p.

WEIGEL, M. **Avaliação da contaminação por Aflatoxina M_1 em leite cru e leite UHT.** 2007. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, [S.l.], v. 41, n. 1, p.1-7, 2009.