

ADSORÇÃO “*IN VITRO*” DE OCHRATOXINA A POR PROBIÓTICOS UTILIZADOS NA AQUICULTURA

[*In vitro* adsorption of ochratoxin A by probiotics used in aquaculture]

Raizza Eveline Escórcio Pinheiro^{1*}, Carina Maricel Pereyra², Josyanne Araújo Neves³, Rodrigo Maciel Calvet³, Juliet Teixeira de Oliveira Santos⁴, Cristiane Evangelista Lima⁴, Verbena Carvalho Alves⁵, Maria Christina Sanches Muratori⁶

¹ Médica Veterinária, Docente do Curso de Medicina Veterinária, Campus Bom Jesus – Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil;

² Departamento de Microbiología y Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto- Argentina, Córdoba, Argentina;

³ Docente Instituto Federal do Maranhão – IFMA;

⁴ Pós-graduação em Ciência Animal – CCA/ UFPI;

⁵ Fiscal de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR;

⁶ Docente Departamento de Morfofisiologia Veterinária – CCA/ UFPI;

RESUMO – Devido as constantes contaminações de rações comerciais pelas micotoxinas, o presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* a capacidade de dois produtos comerciais utilizados na aquicultura em adsorverem Ochratoxina A (OTA). Dois tipos de probióticos comerciais, compostos por *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* (Probiótico A) e, *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de cervejaria (Probiótico B) foram utilizados no ensaio. Soluções em tampão fosfato salino (PBS), com pH de 1,5 e 7,5, foram elaborados para simular o pH do estômago e intestino de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). As soluções de PBS foram testadas nas duas faixas de pH (1,5 e 7,5), com as concentrações dos produtos comerciais de 0%; 25%; 50%; 75% e 100%, para uma concentração de 1.000 ng.mL⁻¹ de OTA. As concentrações de OTA foram adicionadas em microtubos para que fosse determinado a capacidade de adsorção dos probióticos utilizados neste estudo. Na detecção e quantificação de OTA, utilizou-se a metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados finais mostraram que os probióticos A e B nas suas concentrações máximas foram capazes de adsorver OTA nas quantidades de 13,78 a 76,81 e 301,48 a 317,54 (ng.mL⁻¹), respectivamente. Os dados mostraram que os dois tipos de probióticos são promissores para adsorverem OTA nas condições simuladas de pH gastrointestinal de tilápias do Nilo, sendo a maior eficiência verificada para o probiótico B.

Palavras-Chave: Bactérias; Leveduras; Micotoxinas; *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT – Given the constant contamination of animals by feed mycotoxins, this study aimed to evaluate *in vitro* the ability of commercial products used in aquaculture as adsorbents of ochratoxin A (OTA). Two commercial probiotics, composed of *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* (Probiotic A) and one made of dry yeast of *Saccharomyces cerevisiae* from a brewery (Probiotic B) were used in the assay. Phosphate buffered saline solutions (PBS) at pH 1.5 and 7.5 were formulated to simulate the pH of the stomach and intestine of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The PBS solutions were tested at the two pH (1,5 and 7,5) with the probiotics concentrations of 0%; 25%; 50%; 75% and 100% for a OTA concentration of 1.000 ng.mL⁻¹. The OTA concentrations were added in microtubes for evaluation of adsorption capacity of the probiotics. The OTA detection and quantification were performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The final results showed that the probiotics A and B in their maximum concentration were capable of adsorbing OTA in amounts from 13.78 to 76.81 and from 301.48 to 317.54 (ng.mL⁻¹), respectively. The data showed that this two probiotics were very promising at adsorbing OTA under simulated gastrointestinal conditions of pH of tilapias, being more efficient the probiotic B.

Keywords: Bacteria; Yeast; Mycotoxin; *Oreochromis niloticus*.

* Autor para correspondência. E-mail: raizza_eveline@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por alguns fungos filamentosos, que são capazes de gerar efeitos deletérios em homens e animais (Pitt & Hocking, 2009). A ochratoxina A é uma micotoxina produzida por dois gêneros fúngicos: *Aspergillus* e *Penicillium*, durante o armazenamento de rações comerciais (Pitt, 1997; Rupollo, et al., 2006). Atualmente, existem sete tipos de ochratoxinas, sendo a mais tóxica a ochratoxina A (OTA) (Abrunhosa et al., 2010; Gimeno & Martins, 2011). Além de ser conhecida pela variedade de produtos que podem ser contaminados, a OTA está associada a nefropatias, possuindo ainda propriedades mutagênicas, teratogênicas, neurotóxicas, hepatotóxicas e carcinogênicas (Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007; Duarte et al., 2011).

Em geral, as micotoxinas são compostos termorresistentes que não se degradam completamente sob temperaturas elevadas (Murphy et al., 2006). Sendo assim, podem contaminar diversos alimentos derivados de cereais e intoxicar os consumidores (Oerke et al., 2010). A ochratoxina A é um contaminante natural de rações para animais em todo o mundo, o que representa uma ameaça em potencial para animais de produção (Duarte et al., 2011). Os efeitos gerados por esta micotoxina em diferentes espécies de peixes promovem as mais variadas anormalidades, dentre elas: deformidades da cabeça, cauda e olhos (Debeaupuis et al., 1984), degeneração grave, necrose do rim e fígado, redução no ganho de peso e pobre conversão alimentar (Doster et al., 1972) e diminuição no crescimento (Srouf, 2004).

A descontaminação de OTA pode ocorrer por agentes físicos, químicos e biológicos (Huwig et al., 2001; Shetty & Jespersen, 2006; Denli et al., 2008). Estratégias foram desenvolvidas, com a finalidade de reduzir a absorção de micotoxinas no trato digestivo, mediante o uso de agentes adsorventes ou detoxificantes (Kabak et al., 2006). Nesta categoria estão incluídos os aditivos antimicotoxinas (AAM), formados por produtos que, quando adicionados em alimentos para animais, são capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas (Brasil, 2006). Um agente sequestrante eficiente é aquele que: previne ou limita a absorção de micotoxina do trato gastrointestinal do animal; deve encontrar-se livre de impurezas; odores e possuir eficácia comprovada em testes *in vitro* e *in vivo*. No entanto, é extremamente importante que os resultados *in vitro* tenham o suporte de experimentos *in vivo* relativamente adequados à espécie animal para a qual está sendo administrado (Mallman et al., 2006).

Limitações, tais como a perda de qualidade nutricional e sensorial, bem como o preço elevado de equipamentos necessários para a aplicação prática desses métodos têm incentivado a recente ênfase nos métodos biológicos, (Teniola et al., 2005; Pizzolitto et al., 2011) que utilizam micro-organismos para decompor, transformar ou adsorver OTA, através de alguns mecanismos, tais como diminuição do pH, inibição do crescimento do micro-organismos deteriorantes e patogênicos e, produção de componentes inibitórios (Salminen et al., 2004). Estudos *in vitro* com leveduras, bactérias e fungos filamentosos mostraram a capacidade de biodegradar OTA (Caridi et al., 2006; Nunez et al., 2008; Abrunhosa et al., 2010) e, uma gama destes micro-organismos vem sendo utilizados mostrando bons resultados (El-Nezami et al., 1998), como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias ácido lácticas (BAL).

Diante disso, objetivou-se avaliar a capacidade de adsorção “*in vitro*” de OTA por dois produtos comerciais (Probiótico A e B) utilizados em aquicultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina-PI, Brasil. A avaliação “*in vitro*” foi realizada utilizando dois produtos comerciais com formulação diferenciada: o Probiótico A; composto por *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* (concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC.g⁻¹) e o Probiótico B; composto integralmente por leveduras secas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de cervejaria. A quantidade recomendada por cada fabricante para adição do probiótico A na ração de animais adultos foi de 10 kg.t⁻¹ e para o probiótico B de 3,0 kg.t⁻¹.

O ensaio de adsorção de OTA foi realizado de acordo com as recomendações para registro de AAM do Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas, de acordo com a Portaria nº 130, de 24 de maio de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2006). Para adequar a fisiologia do estômago e intestino das tilápias do Nilo foram realizadas modificações na metodologia proposta pelo MAPA, com adaptações de pH para 1,5 e 7,5, respectivamente.

Para simular o pH do estômago e intestino de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), foram elaboradas soluções em tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, PBS: NaCl 80g, KCl 2g, Na₂HPO₄ 14,4g, KH₂PO₄ 2,4g, Água destilada

q.s.p. 1000mL), e posteriormente ajustadas com adição de ácido clorídrico (HCl 0,1 N) para pH 1,5 e com hidróxido de sódio (NaOH 0,1 N) para pH 7,5. O pH foi ajustado utilizando um pHmetro digital Labmeter (Modelo pHS-3B). Utilizou-se OTA (Sigma Aldrich®) para a elaboração da solução padrão na concentração final de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (1000 ng.mL^{-1}) para os ensaios de adsorção. Para a preparação da solução de trabalho (1000 ng.mL^{-1}) de OTA diluiu-se o padrão em metanol e em seguida, após a evaporação, adicionou-se as soluções com o PBS para cada pH (1,5 e 7,5).

Foram utilizadas diferentes concentrações de probióticos A e B: 0%; 25%; 50%; 75% e 100% da dose máxima recomendada pelo fabricante, sendo cada ensaio realizado em triplicata. Neste estudo foram preparadas amostras de controle positivo (OTA em PBS) e controle negativo (somente PBS) para realização dos cálculos de adsorção.

As alíquotas de 500 μL de OTA foram agregadas separadamente a cada microtubo contendo 500 μL de PBS com as diferentes concentrações dos probióticos A e B, obtendo ao final um volume de 1000 μL ($1 \mu\text{g/mL}$). Os microtubos foram homogeneizados em agitador tipo *Vortex* e submetidos a movimentos para simular baixas revoluções, em temperatura ambiente ($\pm 30^\circ\text{C}$) por 40 minutos para haver o contato entre a toxina e o produto comercial utilizado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 14.000 rotações por minuto, para ocorrer a separação da toxina livre da toxina unida aos produtos. Logo após essa etapa, recuperou-se a toxina livre presente no sobrenadante e realizou-se a detecção e quantificação por meio de uma Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para determinação e quantificação de OTA foi utilizado um cromatógrafo SHIMADZU®, modelo Prominence com detector de fluorescência (excitação: 330 nm e emissão: 440 nm) modelo RF-10AXL SUPER, loop de 20 μL , conforme metodologia proposta por Scudamore e McDonald (1998). As separações cromatográficas foram realizadas por uma coluna C18 Luna (150 x 4,6 mm, 5 μm de tamanho de partícula, VARIAN®, Inc. Palo Alto, EUA) conectada a uma precoluna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 μm de tamanho de partícula, Supelco). Os extratos secos foram ressuspensos em metanol. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: água: ácido acético (99:99:2 v/v) a uma vazão de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. A curva de quantificação da toxina foi realizada por medição das áreas e sua interpolação a uma curva de calibração obtida mediante o uso de soluções padrão de OTA. O limite de detecção do método foi de $0,02 \text{ ng.g}^{-1}$.

Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$, sendo dois valores de pH (1,5 e 7,5), dois produtos comerciais (probiótico A e B) em cinco concentrações (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), com três repetições por tratamento, obtendo-se um total de 60 amostras. As análises dos dados foram realizadas utilizando software SAS 9.0, submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo SNK, baseado no *Lsmeans* com probabilidade de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para o ensaio de adsorção de 1000 ng.mL^{-1} de OTA foram variáveis de acordo com os valores de pH e as concentração dos produtos comerciais utilizados (Tabela 1).

Tabela 1. Valores e percentuais de adsorção de 1000 ng.mL^{-1} de ochratoxina A em diferentes concentrações de produtos comerciais utilizados em aquicultura

| Concentração (%) | Quantidade adsorvida de OTA (ng.mL^{-1}) | | | |
|------------------|---|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Probiótico A | | Probiótico B | |
| | pH | | pH | |
| | 1,5 N (%) | 7,5 N (%) | 1,5 N (%) | 7,5 N (%) |
| 0 | 0,0(0,0) ^{cA} | 0,0(0,0) ^{eA} | 0,0(0,0) ^{eA} | 0,0(0,0) ^{cA} |
| 25 | 11,51(1,2) ^{bB} | 36,95(3,7) ^{dA} | 247,66(24,8) ^{dB} | 309,08(30,9) ^{bA} |
| 50 | 11,64(1,2) ^{bB} | 50,77(5,1) ^{cA} | 275,18(27,5) ^{cB} | 308,27(30,8) ^{bA} |
| 75 | 12,25(1,2) ^{bB} | 55,86(5,6) ^{bA} | 287,78(28,8) ^{bB} | 309,25(30,9) ^{bA} |
| 100 | 13,78(1,4) ^{aB} | 76,81(7,7) ^{aA} | 301,48(30,1) ^{aB} | 317,54(31,8) ^{aA} |

CV = 0,50

^{a, b, c, d, e} = Médias na mesma coluna, para o mesmo produto e mesmo pH, seguida da mesma letra minúscula diferem significativamente entre si pelo teste SNK ($p < 0,05$).

^{A, B} = Médias na mesma linha, para o mesmo produto e mesma concentração, seguidas da mesma letra maiúscula diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Os produtos comerciais formados por bactérias (probiótico A) e por leveduras secas de *Saccharomyces cerevisiae* (probiótico B) quando testados sob estas condições apresentaram capacidade antimicotóxica para OTA, com percentuais de adsorção variando de 1,2% a 31,8% (Tabela 1). Os valores máximos de adsorção para o probiótico A em pH de 1,5 e 7,5 foram de (1,4% a 7,7%), respectivamente. Já com relação ao probiótico B os percentuais em pH de 1,5 e 7,5 foram de 30,1% a 31,8%, respectivamente, mostrando assim uma diferença significativa entre os dois produtos testados.

Os valores de adsorção foram menores quando comparados aos resultados de Piotrowska & Zakowska (2005) que utilizaram cepas de *Lactobacillus* na concentração de 1mg.L^{-1} e obtiveram percentuais de redução de OTA entre 70% e 87% após cinco dias a 37°C , demonstrando assim, que o período de contato entre o produto biológico e a toxina são importantes para aumentar o percentual de remoção. Segundo Turbic et al. (2002) estirpes de bactérias que receberam este tratamento foram capazes de remover 36% a 76% de OTA em solução tampão (pH 7,4), após duas horas a 37°C . A adsorção de OTA foi demonstrada por Bejaoui et al. (2004) e verificou-se que as células viáveis de *Saccharomyces* removeram de 35% a 45% de OTA, enquanto as cepas que receberam tratamento (adição de ácido e calor) tiveram um percentual de adsorção de 75%, pois acredita-se que ocorra um aumento da estabilidade do complexo formado, indicando a natureza física da ligação. De acordo com estes autores, tratamentos efetuados (adição de ácido, calor) com cepas de bactérias e leveduras facilitam a remoção de OTA de solução tampão, em comparação com a utilização de células viáveis (Turbic et al., 2002; Bejaoui et al., 2004; Piotrowska & Zakowska, 2005). Por outro lado, alguns estudos onde houve apenas uma redução moderada de OTA, os autores afirmaram que as cepas utilizadas não eram específicas, sugerindo assim que a adsorção de OTA era dependente da espécie (Abrunhosa et al., 2010).

As melhores respostas de adsorção ocorreram quando os produtos foram utilizados na concentração 100% (Tabela 1). No probiótico A, em pH 1,5 não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores de adsorção, quando em concentrações de 25%, 50% e 75%. O mesmo ocorreu para o probiótico B que, em pH 7,5 também não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre as concentrações 25%, 50% e 75%. De acordo com Abrunhosa et al. (2010) a utilização de microorganismos, tais como *S. cerevisiae* e BAL apresentam grandes vantagens, uma vez que têm um histórico de uso extensivo na indústria

alimentar, além de possuírem propriedades probióticas.

O pH 7,5 favoreceu a adsorção para os dois probióticos testados em todas as concentrações (Tabela 1). Este resultado caracteriza uma maior adsorção em pH básico, sugerindo que o pH do intestino de tilápia, seja mais propício a este processo. De acordo com Mallman et al. (2006) para um composto ser considerado bom adsorvente é ideal que mantenha sua eficácia em uma ampla faixa de pH, para que a micotoxina permaneça ligada ao adsorvente em todo o trato intestinal e seja posteriormente excretada. Melhores percentuais de adsorção também foram encontrados por Turbic et al. (2002) e Fuchs et al. (2008) em seus trabalhos ao utilizarem pH próximo aos do presente estudo (pH 7,5). Fuchs et al. (2008) mostrou que uma estirpe de *L. acidophilus* foi capaz de diminuir $\geq 95\%$ de OTA em soluções tampão (pH 5,0) contendo 0,5 e 1mg.L^{-1} de OTA, quando incubada a 37°C .

Por outro lado, em estudo mais recente, Armando et al. (2012) ao avaliarem a capacidade de estirpes de *S. cerevisiae* para remover OTA em condições *in vitro* observaram que percentuais variaram entre diferentes cepas de leveduras e e diferentes concentrações de OTA, obtendo variação de 16% até valores máximos de 74,2%. Duas das cepas utilizadas no estudo em pH 7,0 obtiveram diferença ao serem submetidas a pH 2,0, tendo melhores valores em pH ácido. Constataram que o maior teor de parede celular das estirpes de *S. cerevisiae* está relacionado a maior capacidade de remover OTA e que estes valores podem ser afetados por fatores ambientais, condições de pH, presença de bile e temperatura. Estes resultados demonstram que a eficiência de remoção de OTA não está relacionada a fatores isolados e que são necessários estudos mais específicos para testar diferentes cepas probióticas e sua capacidade de se ligar às micotoxinas durante sua passagem pelo trato gastrointestinal.

O produto comercial composto por leveduras secas de *S. cerevisiae* (24,8 a 31,8%) foi mais eficiente do que os compostos por bactérias ácido lácticas associadas a *Bacillus* sp. (1,2 a 7,7%). Resultados semelhantes foram encontrados por Böhm et al. (2000), ao utilizarem cepas de *S. cerevisiae* obtiveram percentuais de adsorção de até 38% de $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de OTA sem descrever quaisquer metabólitos de degradação resultantes. Em estudos realizados por Caridi et al. (2006) as diferenças na atividade de ligação de leveduras para OTA podem ser explicadas pela variabilidade estrutural dos componentes de cada levedura.

Os componentes da parede celular de leveduras (betaglicanos, glucomanos e mananogossacarídeos) atuam como substratos para fixação das micotoxinas, dificultando a absorção, atravessam o trato gastrointestinal, mantendo-as aderidas, sendo posteriormente eliminadas, além de melhorar o sistema imunológico dos animais na resistência contra os patógenos (Ringot et al., 2007). A adsorção de OTA por células e parede celular de leveduras também foram relatadas por Huwig et al. (2001) e Nunez et al. (2008). Em conjunto, estes resultados sugerem que os produtos compostos por leveduras secas de *S. cerevisiae* ao serem incluídos na dieta de *Oreochromis* sp., além de possuírem propriedades benéficas, podem reduzir a biodisponibilidade de OTA.

Avaliações *in vitro* são consideradas úteis para triagem de produtos, sejam eles de natureza física, química ou biológica, proporcionando uma idéia de afinidade e capacidade de ligação com a toxina. Pesquisas *in vitro* ainda, auxiliam na seleção de produtos para futuros testes *in vivo*, que na maioria das vezes são caros, complicados e de longa duração, mas não devem ser utilizados separadamente na tomada de decisões práticas (Bailey et al., 1998; Garcia et al., 2003; Diaz et al., 2004), pois muitos fatores e condições podem afetar os resultados, conforme apresentados em nosso estudo.

CONCLUSÕES

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 em condições simuladas de pH gastrointestinal de tilápias. Porém, produtos à base de leveduras secas de cervejaria são mais eficientes do que os compostos por bactérias.

REFERÊNCIAS

- Abrunhosa, L.; Paterson, R.R.M.; Venâncio, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, v.2, n.5, p.1078-1099, 2010.
- Armando, M.R.; Pizzolitto, R.P.; Dogi, C.A.; Cristofolini, A.; Merkis, C.; Poloni, V.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*, v.113, n.2, p.256-264, 2012.
- Bailey, R.H.; Kubena, L.F.; Harvey, R.B.; Buckley, S.A.; Rottinghous, G.E. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science*. v.77, p.1623-1630, 1998.
- Bejaoui H.; Mathieu F.; Lebrihi A.; Taillandier P. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*. v.97, p.1038-1044, 2004.
- Böhm J.; Grajewski J.; Asperger H.; Rabus B.; Razzazi E. Study on biodegradation of some trichothecenes (NIV DON, DAS, T-2) and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Research*. v.16, p.70-74, 2000.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Estabelece protocolos para reavaliação do uso de adsorventes de micotoxinas como aditivo autorizado na alimentação animal. Portaria nº 130, de 24 de maio de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2006.
- Caridi A.; Galvano F.; Tafuri A.; Ritieni A. Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.122-126, 2006.
- Debeaupuis, J.P.; Marche, C.; Lafont, P. Embryotoxicity and teratogenicity of ochratoxin A in the zebra-fish (*Brachydanio rerio*). *Microbiologie, aliments, nutrition*. v.2, p.257-269, 1984.
- Diaz, D.E.; Hagler Jr, W.M.; Blackwelder, J.T.; Eve, J.A.; Hopkins, B.A.; Anderson, K.L.; Jones, F.T.; Whitlow, L.W. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*. v.157, p.233-241, 2004.
- Denli, M.; Blandon, J.C.; Guynot, M.E.; Salado, S.; Perez, J.F. Efficacy of a new ochratoxin-binding agent (OchraTox) to counteract the deleterious effects of Ochratoxin A in laying hens. *Poultry Science*, v.87, p.2266-2272, 2008.
- Doster, R.C.; Sinnhuber, R.O.; Wales, J.H. Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxins A and B in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food and Cosmetics Toxicology*, v.10, p.85-92, 1972.
- Duarte, S.C.; Lino, C.M.; Pena, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Veterinary Microbiology*. v.154, p.1-13, 2011.
- El-Nezami, H.S.; Ahokas, J. Lactic acid bacteria: approach to detoxify aflatoxins. In: Salminen, S.; Von, W.A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, p.359-367, 1998.
- Fuchs, S.; Sontag, G.; Stidl, R.; Ehrlich, V.; Kundi, M.; Knasmüller, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.1398-1407, 2008.
- Garcia, A.R.; Avila, E.; Rosiles, R.; Petrone, V.M. Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Avian Diseases*, v.47, p.691-699, 2003.
- Gimeno, A.; Martins, M.L. *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. 3. ed. Mexico: Inc. USA. 127 p. 2011.
- Huwig, A.; Freimund, S.; Kappeli, O.; Dutler, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, v.122, p.179-188, 2001.
- Kabak, B.; Dobson, A.D.W.; Var, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.46, p.593-619, 2006.
- Mallmann, C.A. Dilkin, P.; Giacomini, L.Z.; Rauber, R.H. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006, Santos. *Anais...* Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. p.213-224, 2006.

- Murphy, P.A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C.M. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, v.71, n.5, p.51-65, 2006.
- Nunez Y.P.; Pueyo E.; Carrascosa A.V.; Martínez Rodríguez A.J. Effects aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of Ochratoxin A in a wine model system. *Journal of Food Protection*, v.71, p.1496-1499, 2008.
- Oerke, E. C.; Meier, A.; Dehne, H. W.; Sulyok, M.; Krska, R.; Steiner, U. Spatial variability of *Fusarium* head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. *Plant Pathology*, v.59, n.4, p.671-682, 2010.
- Pfohl-Leszkowicz, A.; Manderville, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.61-99, 2007.
- Piotrowska M.; Zakowska Z. The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*. v.54, p.279-286. 2005.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and food spoilage*. 3 ed. New York: Springer, 2009. 519 p.
- Pizzolitto, R.P.; Bueno, D.J.; Armando, M.R.; Cavaglieri, L.; Dalcero, A.M.; Salvano, M.A. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. In: Guevara-Gonzalez, R. G. *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. InTech, p.323 - 346, 2011.
- Ringot D.; Lerzy B.; Chaplain K.; Bonhoure J.; Auclair E.; Larondelle Y. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, v.98, p.1812-1821, 2007.
- Rupollo, G.; Gutkosky, L.C.; Martins, I.R.; Elias, M.C. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. *Ciência e Agrotecnologia*. v.30, p.118-125, 2006.
- Salminen, S.; Ouwehand, A.C.; Von Wright, A.; Daly, C. Future aspects of research and product development of lactic acid bacteria. In: Salminen, S.; Von Wright, A.; Ouwehand, A.C. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., Cap.22, 2004.
- Scudamore, K. A.; Mcdonald, S. J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunOTAffinity column clean-up. *Food Additives & Contaminants*. v.15, n.4, p.401-410, 1998.
- Shetty, P. H.; Jespersen, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends in Food Science and Technology, v.17, n.2, p.48-55, 2006.
- Srouf, T.M. Effect of ochratoxin-A with or without Biogen on growth performance, feed utilization and carcass composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Journal of Agricultural Sciences*. v.29, p.51-61, 2004.
- Statistical Analysis System. SAS. System for linear models. Cary: SAS Institute, 2009.
- Teniola, O.D.; Addo, P.A.; Brost, I.M.; Färber, P.; Jany, K.-D.; Alberts, J.F.; Van Zyl, W.H.; Steyn, P.S.; Holzapfel, W.H. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthivivans* sp. nov. DSM44556T. *International Journal of Food Microbiology*, v.105, p.111-117. 2005.
- Turbic, A.; Ahokas, J.T.; Haskard, C.A. Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Additives Contaminants*, v.19, n.2, p. 144-152. 2002.