



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

SISTEMA MODELO PARA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ZEARALENONA POR AÇÃO
ENZIMÁTICA

SABRINA DE OLIVEIRA GARCIA

Prof.^a Dr.^a Jaqueline Garda Buffon
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

SISTEMA MODELO PARA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ZEARALENONA POR AÇÃO
ENZIMÁTICA

SABRINA DE OLIVEIRA GARCIA

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos da
Universidade Federal do Rio Grande, como
requisito para obtenção do título de mestre.

Prof.^a Dr.^a Jaqueline Garda Buffon
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

Ficha catalográfica

G216s Garcia, Sabrina de Oliveira.
Sistema modelo para redução dos níveis de zearalenona por ação
enzimática / Sabrina de Oliveira Garcia. – 2016.
91 f.

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

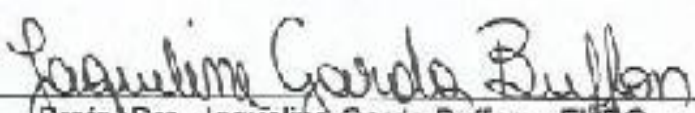
Orientadora: Dr^a. Jaqueline Garda Buffon.

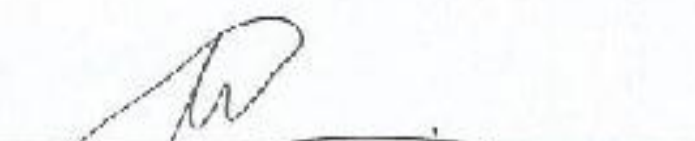
1. Micotoxina 2. Peroxidase 3. Farelo de arroz 4. Farelo de soja
5. Cinética enzimática I. Garcia, Sabrina de Oliveira II. Título.

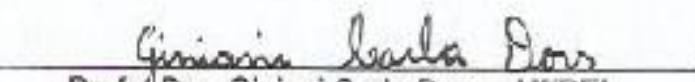
CDU 664

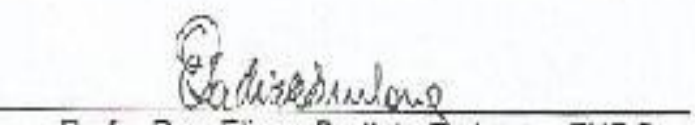
APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Sabrina de Oliveira Garcia e aprovada em 29 de março de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dra. Jacqueline Garza Buffon – FURG


Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann – UFSM


Prof. Dra. Giniani Carla Durs – UFPEL


Prof. Dra. Eliana Badiale Burlong – FURG

Dedico:

Aos meus pais, Maria Sedeni e José
Alberto (*in memorian*), ao meu irmão
Aresdeni e ao meu namorado/melhor
amigo Bruno, por sempre me
apoiarem e motivarem.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela minha saúde e por todas as coisas boas que vivi durante toda minha vida, e em especial neste dois últimos anos. Sou muito agradecida, por todas suas benções meu criador. Ao meu amado pai **José Alberto**, que se faz presente em meu coração e que me acompanha sempre. Me conduzindo por caminhos fascinantes. Pai, faço de tudo para ser seu orgulho e tenho certeza que o senhor está feliz por saber que estou realizando mais um dos meus sonhos. O amor que nos une é além da vida e é inexplicável à razão humana.

À minha mãe **Maria Sedeni**, por ter me criado e educado com muito sacrifício, sem nunca me deixar faltar nada. Sempre abdicando de sua vida e coisas para o meu conforto. Obrigada por todo o amor, atenção, apoio e ensinamentos a mim dedicado.

Ao meu irmão **Aresdeni** (Ari), mano tu és o meu exemplo. Um homem trabalhador, honesto, persistente e generoso. Tenho orgulho de ser sua irmã e todo dia me espelho na sua força de vontade para crescer e vencer na vida.

Ao meu namorado **Bruno**, agradeço pelo amor, carinho, atenção, respeito e lealdade. Obrigada, pela paciência das inúmeras horas que ficou ao telefone ouvindo minhas alegrias e frustrações. Por todo suporte técnico em informática, pois sei o quanto é especial ter um profissional em tecnologia da informação como namorado. ISSO É INCRÍVEL! Te agradeço, por me mostrar que o amor e a saudade são os sentimentos principais para se contar as semanas, os dias e horas para o nosso reencontro, e que cada segundo quando se está junto é valioso. E quem se arrisca dizer que um namoro a distância não pode dar certo?

Bruno, EU AMO VOCÊ!

À minha **orientadora Profª Jaqueline**, por me receber de braços abertos. Te agradeço pelo apoio, pela amizade, pela confiança, por sempre me motivar e principalmente por ter paciência e compreender minhas dúvidas e questionamentos. Obrigada pelas explicações, conselhos e dicas que foram primordiais durante o desenvolvimento desta dissertação. Jaque, agradeço por respeitar meus limites, mas acima de tudo por me mostrar que superá-los era menos difícil do que eu imaginava.

À **Profª Eliana**, obrigada pela paciência de responder todas as minhas incontáveis perguntas e estar sempre disposta a ajudar. Profª a senhora nasceu com o dom raro de transmitir ensinamentos, experiências e teorias. E devido a isto, a senhora foi a professora que mais contribuiu para meu crescimento intelectual e pessoal não somente durante o mestrado, e sim durante toda minha vida acadêmica. Enfim, obrigada por ser esse exemplo de profissional.

À **Ana** (Ana Banana ou Les, para os íntimos) te agradeço pela paciência e ensinamentos desde o primeiro dia dentro do laboratório. Sempre respondendo as milhares de perguntas intermináveis fosse no laboratório, em casa ou até mesmo quando estava descansando no Formigueiro (pelo bate-papo). Ana tu te tornou para mim uma amiga/irmã e amigos de verdade te mostram o caminho, te motivam, fazem críticas construtivas e acreditam no seu potencial. Obrigada, pelo carinho e abraços apertados, pela ajuda nos experimentos e discussão dos resultados. Ana, obrigada por tudo, quero que você saiba que significa muito para mim. À **Larine** (Lalá) te agradeço por existir. Te agradeço pelo bom humor e carinho que fez dos dias cinzas e deprimentes de inverno mais ensolarados. Lalá, boa parte deste trabalho foi realizada porque tu me ensinou a pensar, cada passo dado me sentia segura em saber que você estava lá para me ajudar, fosse no laboratório, por bate-papo ou por áudio no WhatsApp. E fica claro para todos que você ama muito o que faz e isso incentiva as pessoas que te rodeiam. **Les** e **Lalá**, vocês sabem que essa dissertação não é somente minha, mas sim

NOSSA!

Ao **Lucas**, meu incansável Ic, te agradeço pela disposição, dedicação e comprometimento no cumprimento de suas atividades. Lucas, obrigada por ser esforçado, pois sua ajuda foi extremamente necessária e indiscutível para execução deste trabalho.

À **Priscila** (Pri) e à **Taiana** (Tai), agradeço a vocês pela didática e paciência em me ensinar a fazer cálculos, pela ajuda para resolver problemas do nosso cotidiano no laboratório e no cromatógrafo, por sempre demonstrarem o afeto e a empatia que possuem por mim.

À **Kelly** (Kelly Slater ou minha amiga Kelly), por ser tão carinhosa e atenciosa comigo.

Obrigada pelo apoio em todas as horas que precisei, como por exemplo, em nossa emocionante viagem a Buenos Aires. Obrigada por todos os conselhos e também os puxões de orelha. À **Bibiana** (Bibi, Biba ou Bivis) eu agradeço por fazer dos meus dias no laboratório mais leves, uma parceira, seja para trabalhar pesado nos finais de semana, administrar a caixinha do laboratório, estudar, rir, chorar e falar sobre coisas fúteis. Heim, Kelly e Bibi, por mais que o Paraná e o Mato Grosso sejam longe jamais quero perder vocês de vista, é só convidar que eu vou visitar.

À querida **Profª Leonor** (Nonô) e sua equipe de moças amáveis (**Anelise, Adriana, Lidiane, Carolina Graça, Carolina Collazzo**), à maravilhosa, carinhosa e organizada laboratorista **Maristela** (Maris), às mestrandas mais dedicadas, sensíveis e carinhosas (**Milena e Naralice**), às doutorandas mais sorridentes e simpáticas do EQA (**Elisa, Carmen e Karen**), ao trio do TCC 2015 (**Maria Augusta, Carolina Boeira e Rafael**) e Ics do laboratório (**Chiara, Rosana, Raquel, Armando, Larissa Chivanski, Larissa Quadros, Carolina Padilha,**

Paulo, Andressa, Maicon, Cíntia, Priscila Colosso), ao agregado (**Manuel**) e aos ex-integrantes do LAMCA (**Natháli, Annie e Antônio**) agradeço por todo carinho, atenção, afeto que sempre demonstram ter por mim e pela ajuda que me foi dada quando precisei.

Aos **ingressantes do mestrado no ano de 2014**, agradeço pela união nos momentos de diversão e também nos momentos de estudos, vocês são inesquecíveis. Aos **meus amigos, familiares e professores do IFF- Campus Alegrete**, por sempre entenderem minha ausência, me incentivarem, mas acima de tudo por se orgulharem de mim. Aos meus sogros, **Lúcia e Cleir**, por todo amor, carinho e atenção. Obrigada por sempre colocarem meu nome em suas rezas e por torcerem por mim.

À minha família de Pelotas (**Débora, Gilson, Pedro, João, Dadá, Nelsi e demais Embrapeanos**) agradeço a vocês por sempre me alegrarem e que mesmo estando longe de casa, quando estou com vocês me sinto mais segura e amada. Em especial quero agradecer à **Jussara (Ju) e a Milene (Mi)**, por serem pessoas magníficas, agradeço por me amarem, por me ajudarem em vários momentos em que mais precisei e por se preocuparem com meu bem estar.

À **Sergiane (LACOM)** e **Alisson (LOU)** pelo apoio em algumas análises. À **Islanda** pelas informações e ajuda referentes a documentações e etc.

Aos professores, **membros da banca**, por aceitarem o convite e tenho a certeza que todas as avaliações e parecer serão importante para elaboração da versão final da dissertação e do artigo. Muito obrigada pela disponibilidade!

À **FURG** e aos **professores do PPGECA**, pelos ensinamentos e pela oportunidade de cursar e concluir o mestrado.

À **CAPES, CNPq e FAPERGS**, pelo apoio financeiro.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.” Antoine de Saint-Exupéry

A gente precisa continuar acreditando: que vale a pena ser honesto. Que vale a pena estudar. Que vale a pena trabalhar. Que é preciso construir: a vida, o futuro, o caráter, a família, as amizades e os amores.

Lya Luft

RESUMO

Estudos têm enfatizado que a ação de enzimas apresenta resultados satisfatórios quanto a redução dos efeitos tóxicos das micotoxinas e sua aplicação apresenta como vantagem promover alterações mínimas nas propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos quando comparado aos métodos químicos. A Zearalenona (ZON) é uma micotoxina produzida principalmente por fungos da espécie *Fusarium graminearum*, quando em condições de estresse, apresentando como características ação estrogênica. Contamina diversas matérias-primas destinadas à alimentação humana e animal, representando riscos à saúde. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da enzima peroxidase (PO) comercial e obtida de farelo de arroz (FA) e de farelo de soja (FS) na redução dos níveis de ZON. A PO foi extraída com tampão fosfato 10 mM pH 5,0 e 4,7 para FS e FA, respectivamente, sob agitação orbital de 100 rpm durante 60 min. Como estratégia de purificação enzimática foi utilizada a técnica de partição trifásica. ZON e β -Zearalenol (β -ZOL, metabólito de degradação da ZON) foram extraídos do meio reacional enzimático por partição líquido-líquido e quantificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência (CLAE-FL). Para otimização do meio reacional para a avaliar a cinética de redução foram realizados testes em diferentes meios (tamponante, aquoso e etanólico) visando a obtenção da melhor atividade enzimática em conjunto com a maior recuperação de ZON. A estabilidade da micotoxina foi avaliada durante 7 dias de incubação no meio reacional ótimo. A afinidade entre as enzimas e a ZON foi verificada segundo os parâmetros de K_M e $V_{m\acute{a}x}$. A cinética de redução da concentração de ZON ($1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) foi realizada utilizando as enzimas PO comercial ($0,6\ \text{U mL}^{-1}$) e PO obtida de FA e FS ($0,6$ e $6\ \text{U mL}^{-1}$) durante 24 h. A confirmação da ação da PO na redução dos níveis de ZON foi avaliada através da caracterização da estrutura química da micotoxina em espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e a identificação do íon molecular da ZON e β -ZOL em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tandem espectrometria de massas (LC-MS/MS). A aplicação da enzima PO comercial, visando a redução da concentração de ZON, foi realizada em amostras de cerveja tipo Pilsen. A recuperação e o fator de purificação para a PO obtida de FA e de FS foram de 41 e 94% e 0,7 e 4,4, respectivamente. Um método sensível, exato e preciso foi validado para CLAE-FL. O meio reacional aquoso e tamponante foram definidos para ação da PO obtida FA e de FS, respectivamente, sendo que a ZON permanece estável em tais meios por 24 h. Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para a PO comercial e PO obtida de FA foram de $39,61\ \mu\text{M}$ e $0,170\ \mu\text{M min}^{-1}$ e $8,90\ \mu\text{M}$ e $0,011\ \mu\text{M min}^{-1}$, respectivamente. A PO comercial reduziu a concentração de ZON em 69,9% em 24 h, enquanto que a PO obtida de FA e de FS apresentaram uma redução de ZON de 47,4 e 30,6%, respectivamente. As análises de FTIR e LC-ESI-MS/MS confirmaram a ação oxidorredutiva da PO comercial. A atuação da PO comercial em amostras de cerveja reduziu a concentração de ZON em 5,8%. Desta forma a redução dos níveis de ZON poderá possibilitar a aplicação da PO em processos industriais, visando à utilização de grãos e cereais contaminados na produção de alimentos.

Palavras-chave: Micotoxina. Peroxidase. Farelo de arroz. Farelo de soja. Cinética enzimática.

ABSTRACT

Studies have emphasized that the enzymatic action shows satisfactory results with respect to the reduction of the toxic effects of mycotoxins, and his application has the advantage of promoting minimum changes in the functional and nutritional properties in food, when compared to chemical methods. Zearalenone (ZON) is a mycotoxin produced mainly by the specie *Fusarium graminearum*, when in stress conditions, with features such as estrogenic action. Contaminates various raw materials for the food and feed, representing health risks. The aim of this study was to evaluate the reduction of ZON levels by the action of commercial peroxidase (PO) and obtained from rice bran (RB) and soybean meal (SM). The PO was extracted with phosphate buffer 10mM pH 5.0 and 4.7 for RB and SM, respectively, under orbital agitation of 100 rpm for 60 min. The technique of three-phase partition was used as enzymatic purification strategy. ZON and β -zearalenol (β -ZOL, ZON degradation metabolite) were extracted from the enzymatic reaction medium by liquid-liquid partition and quantified in high-performance liquid chromatograph with fluorescence detector (HPLC-FL). To optimization of the reaction medium to evaluate the reduction kinetics tests were performed on various mediums (buffering aqueous and ethanolic) in order to obtain the best enzyme activity in conjunction with the greatest recovery of ZON. The stability of the mycotoxin was evaluated for 7 days of incubation in medium optimal reaction. The affinity between enzymes and ZON was verified according to the parameters K_m and V_{max} . The reduction kinetics of the ZON concentration ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) was performed using commercial enzymes PO (0.6 U mL^{-1}) and PO obtained of FA and FS (0.6 and 6 U mL^{-1}) for 24 h. The confirmation of PO action in reducing ZON levels was assessed using the characterization of the chemical structure of mycotoxin in spectrometry of the infrared Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and confirmation of ZON and β -ZOL molecular ion's by liquid chromatography coupled to a source of electrospray ionization coupled to tandem mass spectrometry mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The application of commercial PO enzyme, in order to concentration reduce of ZON was held in Pilsen beer samples. The recovery and purification factor for PO obtained for RB and SM were 41 and 94% and 0.7 and 4.4, respectively. A sensitive, accurate and precise method has been validated for HPLC-FL. The reaction medium aqueous and buffering were defined for PO action obtained RB and SM, respectively, whereby ZON remains stable in such media for 24 h. The K_M and $V_{m\acute{a}x}$ values for commercial PO and PO obtained from RB were $39.61\text{ }\mu\text{M}$ and $0.170\text{ }\mu\text{M min}^{-1}$ and $8.90\text{ }\mu\text{M}$ and $0.011\text{ }\mu\text{M min}^{-1}$, respectively. The commercial PO reduced ZON concentration at 69.9% in 24 h, while the PO obtained from RB and SM showed a reduction of ZON of 47.4 e 30.6%, respectively. The FTIR and LC-ESI-MS/MS analysis confirmed the oxidoreduction action of commercial PO. The performance of commercial PO in beer samples reduces the concentration of ZON at 5.8%. In this way, the reduction levels of ZON enables the application of PO in industrial processes to the use of contaminated grains and cereals in food production.

Keywords: Mycotoxin. Peroxidase. Rice bran. Soybean meal. Kinetics enzymatic.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Limites máximos tolerados (LMT) de ZON a partir de 2017 para alimentos segundo a legislação brasileira.....	25
Tabela 2- Meios reacionais para avaliação da recuperação de ZON ($0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e atividade enzimática da PO obtida de FA e FS	41
Tabela 3- Condições da fase móvel no modo gradiente em LC-ESI-MS/MS.....	44
Tabela 4- Condições de fragmentação de ZON e β -ZOL em LC-ESI-MS/MS	45
Tabela 5- Composição química de FA e FS	47
Tabela 6- Otimização da proporção dos solventes da fase móvel para detecção de ZON	50
Tabela 7- Recuperação de ZON e atividade enzimática da PO obtida de FA e FS em diferentes meios reacionais	54
Tabela 8- Parâmetros de validação do método analítico avaliados em CLAE-FL para ZON e β -ZOL	58
Tabela 9- Recuperações de ZON e β -ZOL dos meios reacionais enzimáticos	60
Tabela 10- Parâmetros KM e $V_{\text{máx}}$ para PO comercial e PO obtida de FA.....	61
Tabela 11- Cinética de redução de ZON em meio reacional mediante ação da PO comercial e PO obtida de FA e FS	66
Tabela 12- Redução da concentração de ZON pela ação da enzima PO desnaturada.....	67
Tabela 13- Grupamentos funcionais e número de ondas de absorção descritos na literatura e presentes no espectro infravermelho (FTIR) para ZON	68
Tabela 14- Recuperação de ZON de amostras de cerveja tipo Pilsen	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da Zearalenona (a) e de seus metabólitos (b) α -Zearalenol (R1=OH e R2=H) e β -Zearalenol (R1=H e R2=OH)	23
Figura 2- Cromatograma de eluição de ZON em CLAE-FL utilizando condições de detecção em 350 nm (excitação) e 450 nm (emissão) e vazão da fase móvel de 0,5 mL min ⁻¹	48
Figura 3- Cromatograma de eluição de ZON em CLAE-FL utilizando condições de detecção em 270 nm (excitação) e 455 nm (emissão) e vazão da fase móvel de 1,0 mL min ⁻¹	48
Figura 4- Cromatograma de eluição de ZON em CLAE-FL utilizando fase móvel composta acetonitrila:água adicificada com ácido acético 1%. Sendo a= teste 1; b= teste 2; c= teste 3; d= teste 4; e= teste 5 e f= teste 6.....	50
Figura 5- Cromatograma de eluição de ZON e β -ZOL em CLAE-FL.....	53
Figura 6- Estabilidade de ZON em meio reacional de cada enzima durante incubação (1º; 2º e 7º dia). Sendo a= Meio reacional PO comercial ; b= Meio reacional PO obtida de FA e c= Meio reacional PO obtida de FS	56
Figura 7- Gráfico de velocidade de redução versus concentração ZON (Figura a) e gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figura b) para a PO comercial	63
Figura 8- Gráfico de velocidade de redução versus concentração ZON (Figura a) e gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a PO obtida de FA (Figura b).....	64
Figura 9- Cinética de redução da concentração de ZON mediante atuação da PO comercial (0,6 U mL ⁻¹)	65
Figura 10- Espectro infravermelho (FTIR) do padrão ZON (a), espectro de massas de ZON em LC-ESI-MS/MS com íon molecular detectado em 317,3 no modo ESI- (b) e espectro de massas de β -ZOL em LC-ESI-MS/MS com íon molecular detectado em 319,3 no modo ESI- (c).....	70
Figura 11- Espectro infravermelho (FTIR) da ação da PO comercial na ZON (a) e espectro de massas em LC-ESI-MS/MS da ação da PO comercial na ZON no modo ESI- (b).....	72
Figura 12- Espectro infravermelho (FTIR) da ação da PO obtida FA (a) e de FS (b) na ZON e espectro de massas em LC-ESI-MS/MS ação da PO obtida de FA (c) e de FS (d)	73

LISTA DE ABREVIATURAS

abs- Absorvância

A_eEB- Atividade enzimática específica (U_t) do extrato bruto

A_eEP- Atividade enzimática específica (U_t) do extrato purificado

AFLA- Aflatoxina

ANOVA- Análise de variância

Anvisa- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC- Associação Oficial de Químicos Analíticos, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

A_tEB- Atividade enzimática total (U_t) do extrato bruto

A_tEP- Atividade enzimática total (U_t) do extrato purificado

BSA- Albumina de soro bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*

CCF- Cromatografia em camada fina

CG- Cromatografia gasosa

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE- FL- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência

CLAE- MS/MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série

CLAE-MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento

CV- Coeficiente de variação

DON- Deoxinivalenol

FA- Farelo de arroz

FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

FB- Fumonisina

FC- Fator de correção do instrumento

FP- Fator de purificação enzimática

FS- Farelo de soja

FTIR- Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

HRP- Padrão enzimático de peroxidase tipo VI obtida de raiz-forte

IARC- Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC- União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k - Fator de retenção

K_M - Constante de Michaelis-Menten

LC- ESI- MS/MS- cromatografia líquida acoplada a fonte de ionização por electrospray acoplada a espectrometria e massas tandem espectrometria de massas

LD_i - Limite de detecção do instrumento

LD_m - Limite de detecção do método

LLE- Extração por partição líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extration*

LQ_i - Limite de quantificação do instrumento

LQ_m - Limite de quantificação do método

MM- Massa molecular

OMS- Organização Mundial da Saúde

OTA- Ocratoxina

PAT- Patulina

PO- Enzima peroxidase

PSA- Amina primária e secundária

R - Coeficiente de correlação

Rec- Recuperação enzimática

R_s - Resolução

s - Estimativa do desvio padrão absoluto

t_M - Tempo de retenção de um analito não retido

TPP- Purificação por partição trifásica

t_R - Tempo de retenção de cada analito

T_{r1} e T_{r2} - Tempo de retenção de dois picos adjacentes

$V_{amostra}$ - Volume de extrato enzimático utilizado

$V_{máx}$ - Velocidade máxima

$V_{reação}$ - Volume total do tubo de reação

W_{b1} e W_{b2} - Largura dos picos na base, em unidades de tempo

$\bar{x}$ - Média dos resultados

ZHD 101- Zearalenona lactonahidrolase 101

ZON- Zearalenona

α - Fator de separação

α - ZOL- α -Zearalenol

β -ZOL- β -Zearalenol

ϵ - Absortividade molar

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 MICOTOXINAS	21
3.1.1 Zearalenona	22
3.2 DESCONTAMINAÇÃO DE ZON	25
3.2.1 Métodos químicos	26
3.2.2 Métodos físicos.....	26
3.2.3 Métodos biológicos	27
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ZON	28
3.4 ENZIMA PEROXIDASE.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAL	32
4.1.1 Co-produtos agroindustriais e cerveja	32
4.1.2 Padrões de micotoxinas e enzima peroxidase.....	32
4.1.3 Reagentes e solventes	32
4.1.4 Instrumentação.....	32

4. 2 MÉTODOS	33
4.2.1 Preparo das soluções de micotoxinas.....	33
4.2.2 Preparo de amostra.....	34
4.2.3 Caracterização química dos farelos.....	34
4.2.4 Obtenção da enzima PO de FA e FS	34
4.2.5 Determinação da atividade enzimática da PO.....	35
4.2.6 Purificação do extrato enzimático da PO	36
4.2.7 Aplicação da enzima PO na redução dos níveis de ZON	37
4.2.7.1 Condições cromatográficas para separação e quantificação de ZON e β -ZOL	37
4.2.7.2 Extração da micotoxina do meio reacional	39
4.2.7.3 Validação do método analítico.....	39
4.2.7.4 Estudo do meio reacional enzimático para ação da PO	40
4.2.7.5 Estudo da estabilidade da ZON em meio reacional	41
4.2.7.6 Determinação dos parâmetros KM e V _{máx} e cinética de redução dos níveis de ZON.....	41
4.2.7.7 Estudo da ação da enzima PO desnaturada na redução da concentração de ZON.....	43
4.2.7.8 Confirmação da redução da concentração de ZON	43
4.2.7.9 Aplicação da PO para redução da concentração de ZON em amostras de cerveja.....	45
4.2.8. Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidrarias	46
4.2.9. Recuperação de solvente orgânico	46
4.2.10. Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FARELOS	47
5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ZON E β -ZOL.....	47
5.3 ESTUDO DO MEIO REACIONAL ENZIMÁTICO PARA AÇÃO DA PO	53
5.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA ZON EM MEIO REACIONAL	56
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	58
5.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS KM E V _{máx} E CINÉTICA DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ZON MEDIANTE AÇÃO ENZIMÁTICA	60
5.7 ESTUDO DA AÇÃO DA ENZIMA PO DESNATURADA NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ZON	67
5.8 ANÁLISE DE REDUÇÃO DE ZON POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO E DE CROMATOGRAFIA LC-ESI-MS/MS	67
5.9 ESTUDO DA REDUÇÃO DE ZON EM AMOSTRAS DE CERVEJA.....	74
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixa massa molecular, produzidos por fungos toxigênicos, apresentando efeitos nocivos para o homem e outros vertebrados, além de alguns invertebrados, como plantas e micro-organismos (BENNETT; KLICH, 2003). Os gêneros fúngicos com destaque na produção de micotoxinas são os *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium* (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008), sendo que os metabólitos secundários são formados, principalmente, durante o final da fase exponencial de crescimento do fungo, atuando principalmente como forma de defesa contra estresse celular (JAY, 2005). Estudos revelaram a existência de, pelo menos, cerca de 400 diferentes micotoxinas produzidas por vias secundárias (BETINA, 1984).

Em decorrência da frequente ocorrência de micotoxinas em matérias-primas e alimentos e dos efeitos causados por micotoxicoses, estes compostos são motivo de preocupação de diversos órgãos de controle sanitário. Em adição, o controle de micotoxinas produzidas por *Fusarium* é muito difícil, uma vez que sua presença é resultado da proliferação do fungo, podendo ocorrer na pré-colheita, tanto nas sementes como no solo, ou mesmo pelo ar. Estima-se que anualmente mais de 1 bilhão de toneladas de cereais estão sob o risco de contaminação por micotoxinas (FORSYTHE, 2013).

Dentre as micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero *Fusarium*, encontra-se a Zearalenona (ZON), micotoxina não esteroide com características estrogênicas, tanto em machos como fêmeas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). A ZON e seus derivados contaminam comumente grãos como milho, cevada, aveia, trigo e sorgo, utilizados como matéria-prima na formulação de alimentos (PLACINTA; D' MELLO; MACDONALD, 1999). Estudos realizados com ZON utilizando animais de experimentação (peixes, camundongos e porcos) demonstraram que a micotoxina induz o efeito estrogênico e provoca alterações no sistema genital dos animais, promovendo deficiência reprodutiva (BAKOS et al., 2013; FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007; SCHOEVERS et al., 2012) e também problemas pertinentes a hepatotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, imutotoxicidade e hematotoxicidade (MARIN et al., 2013; ZINEDINE et al., 2007). Pesquisa realizada por Hassen et al. (2007), empregando cultura celular hepática Hep G2 demonstrou que ZON ocasiona perda da viabilidade celular e indução de lesões oxidativas no DNA.

As perdas econômicas geradas pela presença da toxina ZON nos alimentos e seu impacto na saúde humana e animal, incentiva o estudo de estratégias para desintoxicar alimentos contaminados, possibilitando o emprego de métodos químicos, físicos e biológicos.

Destes, o controle biológico de ZON é uma alternativa atraente para a eliminação da micotoxina de forma economicamente viável, ambientalmente sustentável e também pelo fato de apresentar condições brandas de reação, vantagem importante quando voltado à aplicabilidade em alimentos. Estudos realizados utilizando micro-organismos como *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011), *R. stolonifer*, *R. oryzae* e *R. microsporusi* (VARGA et al., 2005), *Aspergillus niger* (SUN et al., 2014), *Planococcus* sp. cepa S118 (LU; LIANG; CHEN, 2011) e levedura *Trichosporon mycotoxinivorans* (MOLNAR et al., 2004) demonstraram resultados significativos na redução da concentração de diversas micotoxinas. Enzimas também têm sido estudados como agentes de degradação de ZON, tendo como exemplo a enzima Zearalenona lactonahidrolase, isolada de *Clonostachys rosea* que converteu ZON em um composto com menor estrogenicidade (TAKAHASHI-ANDO et al.; 2005).

Neste contexto, a enzima peroxidase (PO) vem recebendo atenção devido ao seu mecanismo de atuação que consiste em oxidar grupamentos doadores de elétrons, na presença de peróxidos, podendo atuar na descontaminação de micotoxinas. Estudos relatam o emprego da PO na redução da concentração de micotoxinas como o Deoxinivalenol (BUFFON, 2008; FELTRIN, 2013), Ocratoxina A (NORA, 2015) e Aflatoxina B₁ (DAS; MISHRA, 2000).

A PO é uma enzima da classe das oxidoredutases produzidas por micro-organismos, animais e plantas (HAMID; REHMAN, 2009) e entre suas principais fontes vegetais vem se destacando o farelo de arroz e o farelo de soja, sendo estes co-produtos resultantes do beneficiamento dos grãos (FELTRIN, 2013; SINGH; PRAKASH; SHAH, 2012). No Brasil, o Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz e terceiro maior produtor de soja do país com safra 2015/2016 estimada em 7,87 e 15,2 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2016). A descontaminação de ZON pela aplicação da PO comercial e/ou obtida de FA e de FS poderá possibilitar a utilização de uma alternativa eficiente e economicamente viável para as indústrias, para que as mesmas se adequem aos limites máximos tolerados para ZON, descritos na RDC Nº 59 de dezembro de 2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Desta forma, a avaliação da redução dos níveis micotoxicológicos através da ação enzimática se faz necessária para garantir a qualidade dos alimentos destinados ao consumo humano e animal através da redução da concentração deste contaminante.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ação da PO na redução dos níveis de ZON em sistema modelo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar condições cromatográficas para detecção, separação e quantificação de ZON e β -Zearalenol (β -ZOL).
- Definir as condições reacionais para ação PO obtida de FA e FS para a redução de ZON.
- Avaliar a cinética de redução dos níveis de ZON mediante ação enzimática e produção de seu metabólito β -ZOL.
- Caracterizar o mecanismo de ação enzimática da PO.
- Aplicar a PO comercial na redução da concentração de ZON em amostras de cerveja tipo Pilsen.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

O termo micotoxina é originário do grego “mikes” (fungo) e do latim “toxicum” (toxina), formando a expressão grego-latina “mikes toxicum” que significa toxina fúngica (LAZZARI, 1997). A presença das micotoxinas vem sendo associada a saúde humana há muitos anos. Nos séculos XIX e XX, ocorreu no Japão uma epidemia chamada doença do arroz amarelo que causou grande número de mortes devido o consumo de arroz mofado. A doença foi atribuída à citreoviridina, toxina cardiotoxica (beribéri cardíaco) produzida por fungos do gênero *Penicillium* (FAO, 1991). A presença das micotoxinas foi confirmada no mundo ocidental como um composto químico após o acidente econômico ocorrido na Inglaterra entre maio e agosto de 1960, quando morreram 100.000 perus de granjas. As aves afetadas morreram no intervalo de uma semana, durante o qual perderam o apetite, tornaram-se apáticas e perderam a força das asas após a ingestão de torta de amendoim proveniente do Brasil e da África (STEVENS et al., 1960). Confirmado de que um metabólito produzido por *Aspergillus flavus* era o responsável pelas mortes das aves, houve o incentivo para o estudo dessas toxinas que se seguem até hoje (FREIRE et al., 2007). Na evolução histórica da micotoxicologia, chama atenção o episódio chamado de Fogo de Santo Antônio, ocorrido na Idade Média, no qual cereais contaminados com o fungo *Claviceps purpurea* promovia a doença que tinha como características propriedades vasoconstritoras da ergotamina que dificultava a circulação periférica levando os afetados a apresentarem tumor ou coceira continua (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os fungos crescem e se proliferam em diversos cereais e grãos, principalmente no amendoim, milho, trigo, cevada, sorgo e arroz onde geralmente encontram substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento (KIRINČIČ et al. 2015; MALLMANN; DILKIN, 2007). A produção de micotoxinas ocorre quando os fungos são submetidos a condições de estresse. Nos grãos armazenados a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos. Nas condições de campo o estresse pode ocorrer por condições climáticas, intempéries, pragas, entre outros, que também resultam em perda de vigor da planta, predispondo-a a colonização de fungos toxigênicos (SANTI et al., 2005). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estima que por ano, 25% da produção mundial de grãos é contaminada por micotoxinas (MOREAU; SIQUEIRA, 2010).

As micotoxinas são produzidas como metabólitos secundários. Em geral, esses metabólitos parecem ser formados quando grande quantidade de precursores de metabólitos primários, como acetato, aminoácidos, piruvatos são acumulados e atuam como forma de defesa contra o estresse celular (JAY, 2005). Os principais gêneros fúngicos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium*. Esses crescem preferencialmente durante o armazenamento dos grãos, e normalmente não causam problemas no campo. Os do gênero *Fusarium*, infectam os grãos na lavoura, são fitopatógenos que necessitam de alta umidade, em torno de 20% e temperatura amena. Apesar da menor frequência, é possível o aparecimento de micotoxinas produzidas por *Fusarium* na fase pós-colheita (HOLLINGER; EKPERIGIN, 1999; SANTIN et al., 2005).

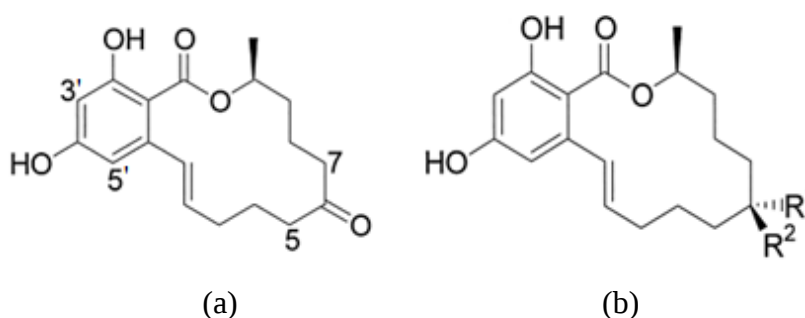
As micotoxinas são estudadas principalmente devido aos riscos que oferecem a saúde de humanos e animais, sendo que as Aflatoxinas (AFLA) ocasionam principalmente problemas no fígado e carcinomas (GNONLONFIN et al., 2013); a Ocratoxina (OTA) ocasiona problemas renais (RINGOT et al., 2006; SHEPHARD, 2008); ZON promove o hiperestrogenismo, problemas no sistema reprodutor e infertilidade (BAKOS et al., 2013, MINERVINI et al., 2005; PIZZO et al., 2016), o DON provoca distúrbio do trato gastrointestinal e depressão do sistema imunológico (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004), a Fumonisin (FB) está relacionada com edema pulmonar e encefalomalácia (WÁSKIEWICZ et al., 2015) a Patulina (PAT) causa aberrações cromossômicas em células de animais e vegetais (BINDER et al., 2007; FORSYTHE, 2013).

3.1.1 Zearalenona

A ZON, anteriormente conhecida como toxina F2, é uma micotoxina estrogênica não esteroide biossintetizada na via de policétideo. A micotoxina ZON é produzida por fungos *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium equiseti* e *Fusarium semitectum* (BENNETT, KLICH, 2003; RICHARD, 2007). A ZON é uma lactona do ácido fenólico resorcílico, descrita quimicamente, como $C_{18}H_{22}O_5$, de massa molecular 318,4 g mol⁻¹ e nome pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) “(3S,11E)-14,16-dihydroxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1,7(8H)-dione” (IUPAC, 1986). Sua molécula é constituída de radical “-eno” decorrente da dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o “-ona” pela cetona no C6 (URRY et al., 1966), como mostra a Figura 1. Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico, atribuído à presença de um grupo metil

secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). A ZON possui características estrogênicas e semelhança química com a estrutura do hormônio estrogênico 17- β -estradiol (ZINEDINE et al., 2007). A metabolização desta micotoxina em mamíferos tem como característica a formação de dois metabólitos isômeros, o α -Zearalenol (α -ZOL) e β -Zearalenol (β -ZOL) (Figura 1) que também possuem ação estrogênica. Rotas bioquímicas que levam a redução da ZON em α -ZOL e β -ZOL são mais ativas no fígado e foram estudadas em espécies como nos ratos, suínos, bovinos, ovinos e galinhas (MALEKINEJAD et al., 2006). No entanto, os eritrócitos também possuem esta capacidade (CHANG; LIN, 1984), assim como a mucosa e a microbiota intestinal (OTHMEN et al., 2008). O metabólito α -ZOL possui maior potencial estrogênico que a ZON e o β -ZOL, devido este apresentar maior afinidade pela ligação com os receptores de estrogênio (CELIUS et al., 1999; MALEKINEJAD et al., 2006; MINERVINI et al., 2001).

Figura 1- Estrutura química da Zearalenona (a) e de seus metabólitos (b) α -Zearalenol ($R_1=OH$ e $R_2=H$) e β -Zearalenol ($R_1=H$ e $R_2=OH$)



Fonte: VAN EGMOND; PAULSCH, 1986.

O quadro clínico das intoxicações pela ZON varia muito de acordo com quantidade de toxina ingerida, tempo de ingestão, idade, sexo e espécie animal. A ZON, como outras micotoxinas, provoca alterações dos parâmetros hematológicos, além de efeitos hepatotóxicos, imunotóxicos e nefrotóxicos em animais e humanos (ABID-ESSEFI et al, 2004; HASSEN et al, 2007). Conforme Forsythe (2013) e Richard (2007), ZON e seus derivados causam hiperestrogenismo, graves problemas de reprodução, aborto, prolapso retal e do sistema reprodutor de fêmeas e machos, além de infertilidade em animais. A ação hematotóxica da ZON foi demonstrada com o aumento do número das hemácias, hemoglobina, hematócritos leucócitos totais e a redução do número de plaquetas e linfócitos, reforçando assim a sua atividade imunossupressora (ABBES et al., 2006; MARIN et al. 2013). O estudo realizado por Kuiper-Goodman; Scott; Watanabe (1987) sugere que o consumo máximo recomendado da

ZON para a segurança humana é estimada em $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corporal diário. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – IARC (1993), a ZON é classificada no Grupo 3 quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos, ou seja, não há evidências adequadas para afirmar o seu potencial carcinogênico.

A ZON contamina principalmente milho e, em menor proporção, a cevada, aveia, soja, trigo, sorgo, painço, arroz. Além disso, foi detectada em produtos industrializados oriundo de cereais contaminados, como farinha e produtos de panificação, malte e cerveja (BAUER et al., 2016; IQBAL et al., 2014^a, IQBAL et al., 2014^b; KUZDRALIŃSKI; SOLARSKA; MUSZYŃSKA, 2013; RIBEIRO et al., 2015; ZINEDINE et al., 2007). Registros de contaminação de grãos, cereais e alimentos por ZON datam desde 1962 até hoje, em uma faixa de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ até um maior nível detectado de $2.900 \mu\text{g g}^{-1}$ (EDWARDS et al., 1987; STOB et al., 1962; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Os grãos contaminados por *Fusarium* podem apresentar uma coloração roseada (RICHARD, 2007). A denominação ZON provém do fungo “*Gibberella zeae*” (forma sexuada do *Fusarium graminearum*) grande produtor desta micotoxina (STOB et al.; 1962; URRY et al., 1996).

No Brasil, os níveis de ZON em alimentos são regulamentados pela Anvisa, RDC Nº 59 de dezembro de 2013 e os limites máximos tolerados de ZON irão variar de 20 até $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ a partir de 2017, conforme apresentado na Tabela 1.

Os métodos analíticos empregados para detecção e quantificação de ZON devem ter como características fundamentais a sensibilidade, robustez e confiabilidade, devido a esta substância apresentar toxicidade mesmo quando presente em baixas concentrações (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). A ZON é um sólido cristalino branco, solúvel em álcali-aquoso, benzeno, clorofórmio, cloreto de metila, acetato de etila, acetonitrila e álcoois e fracamente solúvel em éter de petróleo. Uma característica importante, utilizada em alguns métodos analíticos, é a grande solubilidade em álcali-aquoso (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; SANTOS et al., 2014). Uma característica marcante da ZON é fluorescer azul esverdeada quando excitada com luz ultravioleta de ondas longas (360 nm) e uma fluorescência verde mais intensa quando é excitada com luz ultravioleta de ondas curtas (254 nm) (JAY, 2005; OMS, 1983).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é a técnica de detecção mais utilizada para determinar a contaminação de micotoxinas, incluindo ZON em amostras de cereais. A CLAE acoplada a detector por fluorescência, conforme características físicas e químicas do analito possibilita limites de detecção e quantificação exata, fato que define o maior emprego desta técnica (OK et al., 2014; SERRA, 2005), porém ZON e seus metabólitos também

podem ser quantificados por meio de cromatografia em camada fina (CCF) (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009), cromatografia gasosa (CG) (QIAN et al., 2015), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS) (PRELUSKY et al., 1989) ou então acoplada ao espectrômetro de massas em série (CLAE-MS/MS) (BELHASSEN et al., 2014; SONGSERMSAKUL, et al., 2006).

Tabela 1- Limites máximos tolerados (LMT) de ZON a partir de 2017 para alimentos segundo a legislação brasileira

Alimento	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	100
Arroz beneficiado e derivados	100
Arroz integral	400
Farelo de arroz	600
Milho em grão para posterior processamento	150
Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	150
Trigo para posterior processamento e trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

Fonte: ANVISA (2013).

3.2 DESCONTAMINAÇÃO DE ZON

Mesmo com o desenvolvimento contínuo de novos estudos e aprimoramento das técnicas de plantio, cultivo, colheita, transporte e armazenamento, não há como garantir que os fungos não se proliferem e, conseqüentemente, que não haja contaminação por micotoxinas. Por isso, há necessidade de encontrar métodos eficientes de descontaminação ou desintoxicação que sejam capazes de reduzir ou destruir a micotoxina e que ao final do processo não gerem resíduos tóxicos, preservando as características sensoriais e nutricionais do produto (SANTOS et al., 2014). Estratégias de desintoxicação para alimentos contaminados ou redução dos efeitos tóxicos de ZON são realizadas empregando métodos químicos, físicos e biológicos, necessários

para melhorar a qualidade alimentar, evitando perdas econômicas através da recuperação de produtos contaminados (ZINEDINE et al., 2007).

3.2.1 Métodos químicos

Dentre os métodos químicos avaliados, destaca-se a aplicação do gás ozônio em concentrações de 2; 10 e 20% expostos durante 5 min em $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ZON que foi totalmente degradada após 15 s na concentração de 10%, não sendo detectada a formação de subproduto (MCKENZIE et al., 1997). Lemke et al. (1999) avaliaram a água contendo 12 mg L^{-1} de ZON e submeteram à ozonização, seguida de extração, concentração e adição no óleo de milho que foi adicionado na dieta de ratos do sexo feminino resultando na ausência de efeitos estrogênicos no útero dos animais que consumiram a dieta com ZON tratada com o gás ozônio quando comparado ao grupo de animais que consumiram a dieta com ZON sem ter sido tratada.

Abd Alla (1997) elucidou que ZON é degradada quando exposta a peróxido de hidrogênio 10% durante 16 h e temperatura de 89°C .

3.2.2 Métodos físicos

Referente a métodos físicos, a extrusão tem demonstrado resultados satisfatórios, pois durante o processo os alimentos são submetidos ao calor, altas pressões e à tensão de corte reduzindo em torno de 90% os níveis de ZON (RYU; JACKSON; BULLERMAN, 2002). Segundo Jouany (2007), a remoção (descasque) da parte externa do grãos reduz a contaminação de ZON nas frações de farelo em 34%. Contudo, a eficiência do processo de remoção depende da penetração dos moldes no grão. Bata e Lásztity (1999) citam que a remoção parcial da micotoxina por ser obtido com a limpeza dos grãos secos e também no processo de moagem. Havendo no fracionamento o aumento da concentração de ZON no farelo e diminuição da concentração na farinha.

A utilização de adsorventes nutricionalmente inertes é uma das abordagens propostas para reduzir a toxicidade de ZON. A colestiramina e o carvão ativado são eficientes na adsorção de ZON, podendo ser utilizados como aditivos para alimentação animal, prevenindo o hiperestrogenismo em suínos (AVANTAGGIATO et al., 2003; AVANTAGGIATO et al., 2005). Ramos et al. (1996) avaliaram a adsorção intestinal de ZON *in vitro* através da atuação de cinco adsorventes. Os resultados de adsorção obtidos de acordo com as isotermas de Freundlich e Langmuir para ZON em pH 7,5 utilizando crospovidona,

montmorillonita, bentonita, sepiolite e trissilicato de magnésio foram de 313,7; 192,2; 112,4; 74,4; e 22,6 $\mu\text{g}_{\text{ZON}} \text{g}_{\text{adsorvente}}^{-1}$. A colestiramina foi considerado o melhor adsorvente, pois a uma concentração de 5% foi capaz de adsorver ZON a níveis abaixo da faixa de detecção do método analítico proposto no estudo.

Bueno et al. (2005) avaliou a capacidade de adsorção de ZON *in vitro* através da utilização de carvão ativado. O estudo demonstrou que o carvão ativado em níveis de 0,1; 0,25; 0,5 e 1% é um bom desintoxicante de ZON, pois adsorveu a micotoxina em até 100% em pH de 3 e 7,3. Shehata et al. (2000) avaliaram a adsorção de 30 mg kg^{-1} de ZON em tampão fosfato (pH 3,0 e 7,0) através de carvão ativado e outros adsorventes (produtos derivados da parede celular de leveduras modificadas, mistura de vitaminas, óleo refinado vegetal, bentonita, enzimas, vitamina E, selênio, ferro e manganês). ZON foi totalmente adsorvida quando utilizado 0,1% de carvão ativado, independentemente do pH do tampão. Thimm et al. (2001) observaram em seu estudo a adsorção de 100% de ZON na concentração de 1 g L^{-1} em tampão citrato (pH 3) e fosfato (6,5) utilizando a bentonita organofílica.

Sabater-Vilar et al. (2007) avaliaram *in vitro* (condições semelhantes ao sistema gastrointestinal de suínos) o emprego de argilas minerais (à base de esmectita, quartzo, dolomita, feldspato, traços de gesso, ilita, mica e caulinita), substâncias húmicas (leonardite, mistura de substâncias húmicas e lignosulfonato), quatro produtos derivados da parede celular de levedura, carvão ativado e seis adsorventes comerciais de micotoxinas. As adsorções de ZON observadas acima de 70% foram utilizando a argila mineral à base de esmectita, a mistura substâncias húmicas, produtos derivados da parede celular de levedura e o carvão ativado.

Zhao et al. (2015^b) sintetizaram três tipos de polímeros de quitosana, para adsorção de ZON, sendo que o método A foi constituído somente de quitosana, o método B construído de quitosa e tripolifosfato de sódio e o método C constituído de quitosa e glutaraldeído. Os resultados apresentados mostraram que o método C foi o que proporcionou adsorção de 94% de ZON.

3.2.3 Métodos biológicos

Há um interesse crescente pela possibilidade de aplicação de micro-organismos ou enzimas para degradar ou reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas. Varga et al. (2005) demonstraram que a ZON foi completamente degradada por isolados de *Rhizopus*, incluindo cepas de *R. stolonifer*, *R. oryzae* e *R. microsporus*. Em estudo realizado *in vitro* com o material da parede celular, manano-oligossacarídeos derivados de *Saccharomyces cerevisiae* 1026,

mostraram consideravelmente a ligação com ZON em cerca de 80% (DEVEGOWDA et al., 1996 apud ZINEDINE et al., 2007).

Sun et al. (2014) concluíram através de suas pesquisas que a utilização do micro-organismo *Aspergillus niger* FS10 isolado de soja fermentada é eficaz na redução de ZON. Em seu estudo, os autores utilizaram água de maceração de milho com a presença de ZON tratadas com o *Aspergillus niger* para alimentação de ratos, que apresentaram menor dano no fígado e rins quando comparado ao controle contendo ZON sem o tratamento. Recentemente, Harkai et al. (2016) degradaram 99% da ZON após incubação em meio líquido contendo ágar, inóculo de cepas *Streptomyces rimosus* K189 e K154 e a micotoxina, durante 5 dias a 28 °C e agitação de 170 rpm.

Tan et al. (2015) isolaram bactérias *Pseudomonas otitidis* TH-N1 do rúmen de vacas e incubaram em meio Murashige e Skoog (MS) durante 3 dias a 37 °C e agitação orbital a 180 rpm, onde 79% de ZON foi degradada devido a uma ou mais enzimas intracelular de *P. otitidis* TH-N1. Sendo que os autores, descrevem que mais estudos são necessários para revelar o mecanismo de degradação de ZON e avaliar a segurança da utilização de *P. otitidis* na alimentação humana e animal. Zhao et al. (2015^a) empregou 27 cepas de *Lactobacillus* para degradar ZON e observou que a *L. plantarum* degradou em 48% da micotoxina em 48 h utilizando meio ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS). Tinyiro et al. (2011) avaliaram a degradação de 70% de ZON e adsorções entre 60 e 90% utilizando duas culturas bacterianas (*B. subtilis* 168 e *B. natto* CICC 24640).

A aplicação da enzima Zearalenona lactonahidrolase (ZHD 101) foi descrita por Takahashi-Ando et al. (2005), resultando em um composto com menor toxicidade. Kosawang et al. (2014) também avaliou a ação da enzima ZHD 101, demonstrando que o fungo *Clonostachys rosea* é um potente agente de controle biológico contra diversos patógenos de plantas, inclusive de fungos *Fusarium graminearum* e consequentemente produção de ZON. He et al. (2016) extraiu de *Aspergillus niger* FS10 uma enzima para degradação de ZON, a enzima imobilizada degradou 75% e 90% da micotoxina *in vitro*, em suco gástrico artificial e suco intestinal artificial de suínos.

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ZON

Na literatura são encontrados diferentes técnicas para extração de ZON de diversas matrizes. Belhassen et al. (2014) extraiu ZON e seus cinco metabólitos (α -zearalenol, β -ZOL, α -ZOL, β -zearalanol e zearalanona) de amostras de urina humana, através da técnica de

extração por partição líquido-líquido com acetato de etila e ácido fórmico, na proporção 99:1 (v/v) e posteriormente uma etapa de limpeza com hexano. Os níveis de recuperação obtidos pelos autores variaram de 96 a 104%, com desvio padrão relativo inferiores a 8,5%. Sendo que as recuperações com seu respectivo desvio padrão relativo nos três níveis de fortificação (2,5; 5 e 10 ng mL⁻¹) citados pelos autores para ZON foram de 101 (4,8); 101 (4,0) e 100% (7,9). E, as recuperações para β -ZOL nos mesmos níveis foram de 101 (5,4); 101 (3,4) e 102% (4,4).

No trabalho realizado por Huang e colaboradores (2014), os autores empregaram acetonitrila para recuperar ZON e α -ZOL e purificação em cartuchos Oasis HLB em leite cru, leite industrializado e leite em pó. Os níveis de fortificação de ZON e seu metabólito foram de 0,025; 0,1 e 0,5 μ g kg⁻¹ e as recuperações de ZON e α -ZOL alcançados variaram entre 88,8 a 101,2% com coeficiente de variação abaixo de 9,4. Juan, Ritieni e Mañes (2012) empregaram uma mistura de acetonitrila e água (84:16, v/v) para extrair ZON e tricotecenos de amostras de trigo, aveia, cevada e espelta. Para a validação do método os autores utilizaram dois níveis de fortificação para cada tipo de amostra. Para o trigo e espelta os níveis de fortificação foram de 1,5 e 5 μ g kg⁻¹ e para aveia e cevada os níveis foram de 2,0 e 5 μ g kg⁻¹. As recuperações de ZON nos dois níveis para trigo, espelta, aveia e cevada foram de 89; 94; 86 e 95%, respectivamente. Sendo o desvio padrão relativo (%) de todos os testes igual ou menor que 3%. Wu et al. (2011) utilizaram o método QuEChERS para extração de ZON de cevada sendo a técnica realizada mediante a adição de cloreto de sódio (NaCl) e metanol nas amostras e posterior etapa de limpeza com NaCl, sulfato de magnésio (MgSO₄), negro de carbono (negro de fumo) e amina primária e secundária (PSA). As recuperações de ZON de cevada nos níveis de fortificação de 0,1; 1 e 10 mg g⁻¹ foram de 83,0; 87,4 e 91,5%, respectivamente, com desvio padrão relativo menor que 6%.

3.4 ENZIMA PEROXIDASE

A peroxidase é uma importante enzima das plantas (EC 1.11.1.7) pertencente à classe das oxidoreduases (BURNETTE, 1977), são heme proteínas glicosiladas, monoméricas, de 40-45 kDa, que incluem dois domínios similares, surgidos de duplicação de genes (DAMORADAN et al., 2010).

Esta enzima está envolvida em diversas reações entre elas: ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células (SPADIUT et al., 2012; VEITCH, 2004). As plantas contêm um número relativamente

elevado de isoenzimas de peroxidase, principalmente localizadas nas paredes celulares, as peroxidases aniônicas. A PO possui como principal característica participar do processo de lignificação e do mecanismo de defesa física contra tecidos danificados ou infectados (DUNFORD, 1999; NICELL; WRIGHT, 1997)

A PO gera um produto colorido mensurável via espectrometria de luz visível, com uma grande variedade de substratos na presença de peróxido de hidrogênio. Dentre eles, o substrato mais usado é o guaiacol, uma vez que o procedimento é bastante simples e os parâmetros de reação são bem conhecidos. O meio reacional é composto basicamente de guaiacol e peróxido de hidrogênio e a reação inicia-se pela adição da enzima (VIERLING; WILCOX, 1996). A formação de cor é acompanhada por absorvância a 470 nm, sendo proporcional à atividade da enzima em função do tempo (ROBINSON, ESKIN, 1995).

Segundo Koblitz (2010) a reação geral catalisada pela peroxidase pode ser descrita como: $\text{ROOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{ROH} + \text{A}^\bullet$, onde o composto ROOH é o substrato oxidante, tipicamente o peróxido de hidrogênio ($\text{R}=\text{H}$), podendo ser também um metil-ou-etil-peróxido. Durante a reação o peróxido reage com a enzima, formando o composto I oxidado que se reduz em duas etapas, passando pelo intermediário composto II, para regenerar a enzima. Há então a geração de radicais livres dos substratos redutores, doadores de e. As peroxidases catalisam a oxidação do substrato utilizando o poder oxidante do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou de peróxidos orgânicos (VIERLING; WILCOX, 1996; CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Segundo Voet, Voet e Pratt (2014), a $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima) de uma reação ocorre a elevadas concentrações de substrato nas quais a enzima está saturada, isto é, quando ela está inteiramente ligada na forma enzima:substrato (ES). O K_M é a concentração de substrato na qual a velocidade da reação corresponde à metade da $V_{\text{máx}}$. Kohaich e Baaziz (2015), extraíram PO de cladódio (cactus) *Opuntia ficus Indica L.* e estimaram os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ de 1,67 mM e 3, 1 mM min⁻¹, respectivamente, utilizando como substrato o guaiacol. Soysal e Söylemez (2005), extraíram PO de cenoura e relataram os valores de K_M de 1,4 mM e $V_{\text{máx}}$ de 0,06 mM min⁻¹, em guaiacol.

Existem dois tipos básicos de peroxidases: as que contêm ferro no sítio ativo (divididas em ferriprotoporfirina-peroxidases e verde-peroxidases) e aquelas que contêm FAD no sítio ativo (chamadas de flavoproteína-peroxidases). Dentre elas, as mais importantes são as que contêm como grupo prostético a ferriprotoporfirina II (ou proto-hemina) e que incluem a maior parte das peroxidases de vegetais superiores. São, em geral glicoproteínas encontradas sob várias isoformas em cada espécie, normalmente provenientes de genes codificadores distintos (SCOTT, 1975). A fonte de PO comercial mais utilizada é a raiz-forte (*Armoracia*

lapathifolia) (LIU; WANG; JI, 2006). Porém, estudos evidenciaram que o pêssego (*Prunus pérsica*), o inhame (*Alocasia macrorrhiza*), a mandioca (*Manihot utilíssima*), a alcachofra (*Cynara scolymus L.*), a batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*), o nabo (*Brassica campestris ssp rapira*), abobrinha (*Cucurbitapepo*) (ZERAÍK et al.; 2008), folhas de Copaíba (*Copaífera langsdorffii*) (MACIEL; GOUVEA; PASTORE, 2006), cascas de laranja (*Citrus sinenses*) (VETAL; RATHOD, 2015) por fungos do gênero *Pleurotus ostreatus*, espécie N° 494 e *P. pulmonariu* (STAJIĆ et al, 2006) e pela bactéria *Streptomyces* (REKIK et al, 2015) são considerados como fontes de PO. O FA e FS se caracterizam por serem fontes abundantes de peroxidase, após estudos realizados por Feltrin (2013), onde otimizou o procedimento de extração e purificação.

Um grande interesse por esta enzima surgiu devido às suas múltiplas aplicações em laboratórios de pesquisa, como por exemplo, na construção de biossensores, na indústria de papel e celulose, de alimentos, em análises bioquímicas, entre outras (LUPETTI, 2000). A PO vem sendo utilizada também no tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos, na síntese de produtos químicos aromáticos e na remoção de peróxido a partir de materiais, tais como produtos alimentares e de resíduos industriais (HAMID; REHMAN, 2009; HUBER et al., 2016; KULYS; GORANINA, 2009; LIU; WANG; JI, 2006; TANDJAOUÏ et al., 2016; XU et al., 2013).

A ação da PO relacionada à degradação ou descontaminação de micotoxinas foi demonstrada por Garda-Buffon; Kupski; Badiale-Furlong (2011) durante fermentação submersa empregando os fungos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* na qual foi avaliada a redução dos níveis da micotoxina DON. O tempo de fermentação em que foi observado a maior velocidade de degradação de DON correspondeu a maior atividade da enzima PO produzida pelos micro-organismos. No estudo efetuado por Flores (2013) utilizando o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo submerso na presença da micotoxina DON, também foi verificado a alteração do perfil de atividade da enzima PO, quando presente a micotoxina. Bretanha (2014) que também avaliou cultivo submerso utilizando *Saccharomyces cerevisiae* com duas cepas diferenciadas, uma de alta e outra de baixa fermentação, verificou um aumento da atividade da PO em 71% na presença de DON para a cepa de alta fermentação. Em estudo *in vitro*, Feltrin (2013) empregou a enzima PO comercial na avaliação da cinética de degradação de DON, obtendo uma redução da concentração da micotoxina 55%. Do mesmo modo, Nora (2015) utilizou as enzimas PO comercial e a obtida do FA para avaliar a redução dos níveis de OTA, resultando na redução de 59% e 41%, respectivamente. Resultados considerados promissores para o emprego da enzima como método biológico de descontaminação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Co-produtos agroindustriais e cerveja

As amostras de farelo de arroz (FA) e farelo de soja desengordurado (FS) resultantes do beneficiamento dos grãos, foram fornecidas pelas empresas situadas em Pelotas (RS) e Rio Grande (RS). A cerveja tipo Pilsen foi adquirida no comércio local da cidade de Rio Grande (RS). As amostras foram acondicionadas à temperatura de -18 °C até a sua utilização.

4.1.2 Padrões de micotoxinas e enzima peroxidase

Os padrões das micotoxinas Zearalenona (ZON) e β -Zearalenol (β -ZOL) foram adquiridos da *Sigma Chemical Company* (E.U.A., 2016). A PO padrão foi adquirida da *Sigma Chemical Company* (E.U.A.) (2016), como padrão enzimático de PO tipo VI obtida de raiz-forte (HRP) liofilizada com concentração de 250 a 330 U mg⁻¹.

4.1.3 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes empregados nos experimentos foram albumina de soro bovino (Inlab, Brasil), ácido acético P.A. (Merck, Alemanha), acetona (Neon Comercial Ltda), acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, E.U.A.), água destilada, água ultra purificada (Milli-Q) em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 M Ω cm), benzeno P.A. (Vetec Química, Brasil), carbonato de sódio (Synth, Brasil), clorofórmio P.A. (Alphatec, Brasil), Folin Ciocalteu 2N (Próton Química, Brasil), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Vetec Química, Brasil), etanol P.A. (Neon Comercial Ltda), guaiacol P.A. (Vetec Química, Brasil), membranas Millipore de Nylon 0,45 μ m de diâmetro (Millipore, Brasil), peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil), sulfato de amônio (Synth, Brasil), sulfato de cobre (Vetec Química, Brasil), tartarato de sódio e potássio (Isofar, Brasil).

4.1.4 Instrumentação

Os principais equipamentos utilizados foram espectrofotômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80; balança analítica de precisão FA2104N; banho termostático com agitação – Quimis; banho ultrassônico Unique Ultrasonic Cleaner de 25 e 40 kHz; centrífuga refrigera

Cientec CT- 5000R; microcentrífuga Eppendorf Mini Spin AG 22331; agitador tipo vórtex Biomixer Vtx-2500; mesa agitadora Tecnal; espectrômetro com região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) IR Prestige-21 Shimadzu modelo A21004 (Quioto, Japão); cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Quioto, Japão) constituído por um sistema de bombas 26 (modelo LC- 20AT), desgaseificador da fase móvel (modelo DGU- 20A₅), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL) conectado em *software LC solution data acquisition* com coluna anática Phenomenex® - Gemini C18 5 µm (250 x 4,6 mm diâmetro interno) e cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 x 3 mm diâmetro interno).

4. 2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das soluções de micotoxinas

Para o preparo das soluções estoque das micotoxinas, as mesmas foram solubilizadas em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) a uma concentração de 500 µg mL⁻¹ e armazenadas sob congelamento. As soluções trabalho foram obtidas das diluições das soluções estoque resultando em uma concentração de 50 µg mL⁻¹ em benzeno:acetonitrila (98:2).

A estimativa da concentração da solução trabalho (Equação 1) foi realizada empregado um espectrofotômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80. O comprimento de onda de máxima absorção foi de 317 nm e 239 nm e a absorvidade molar de 6060 e 24963 mol L⁻¹, em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) para ZON e metanol para β-ZOL, respectivamente (AOAC, 1995).

$$\text{micotoxina } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{abs} \times \text{MM} \times 1000 \times \text{FC} \times \varepsilon^{-1} \times b^{-1} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

micotoxina (µg mL⁻¹): concentração da micotoxina presente em 1 mL

abs: valor da absorvância da solução padrão;

MM: massa molecular da micotoxina em estudo (g mol⁻¹);

FC: fator de correção do instrumento;

ϵ : absorvividade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina (mol L^{-1});

b: largura da cubeta (cm).

4.2.2 Preparo de amostra

Com a finalidade de padronizar as amostras de farelos (FA e FS) para caracterização química e extração da enzima PO, os mesmos foram homogeneizados, triturados em moinho de facas e peneirados em 42 e 35 mesh para o FA e FS, respectivamente, de acordo com Feltrin (2013). A amostra comercial de cerveja foi desgaseificada sob agitação magnética e posteriormente verificado o pH.

4.2.3 Caracterização química dos farelos

O teor de umidade foi determinado empregando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105 °C de acordo com o método nº 935.29; os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo de acordo com o método nº 920.85; a determinação de cinzas por método gravimétrico através de incineração das amostras em mufla a 550°C método nº 923.03; o teor proteico determinado pelo método de micro-Kjeldahl nº 920.87 e o teor de fibra bruta segundo o método nº 991.43, todos descritos na Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 2000). O percentual de carboidratos foi estimado por diferença, considerando o somatório dos teores de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e fibra alimentar total.

4.2.4 Obtenção da enzima PO de FA e FS

A enzima PO foi extraída a partir de FA e FS, em 5 g do FA foram adicionados 50 mL de tampão fosfato 10 mM pH 5 e em 5 g do FS foram adicionados 50 mL de tampão fosfato 10 mM pH 4,7. As misturas foram submetidas a agitação orbital a 100 rpm durante 60 min e 25 °C, após centrifugadas a 3220 x g por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado e avolumado a 50 mL com o respectivo tampão de extração, segundo o método de extração otimizado por Feltrin (2013).

4.2.5 Determinação da atividade enzimática da PO

A determinação da atividade enzimática da PO comercial foi realizada conforme especificações do fabricante *Sigma Chemical Company* (2016), onde o meio reacional foi constituído de 2 mL de água destilada; 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM pH 6,0; 0,5 mL de guaiacol 1%, 1 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,08% e 1 mL de extrato enzimático comercial. Para a PO obtida de FA e FS, o método utilizado para determinação da atividade enzimática foi de acordo Devaiah e Shetty (2009) modificado por Feltrin (2013), onde o meio reacional para a PO de FA foi composto de 2 mL de água destilada; 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 5,5; 0,5 mL de guaiacol 1%; 1 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,08% e 1 mL de extrato enzimático; e para a PO de FS o meio reacional foi formado pelas mesmas soluções, porém em tampão fosfato 5 mM pH 5,0. Os tempos e temperaturas de incubação em banho-termostático da PO comercial foram de 15 min a 30 °C, para PO obtida de FA de 20 min a 25 °C e para PO obtida de FS de 10 min a 35 °C.

A oxidação dos compostos foi verificada em espectrofotômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80 a 470 nm e a atividade enzimática da PO foi estimada por meio da Equação 2, descrita por Schüttmann et al. (2014) e Zeraik et al. (2008) através da reação de oxidação do substrato a tetraguaiacol caracterizado pela formação da coloração laranja. Sendo que, uma unidade da atividade da peroxidase representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de guaiacol em 1 min.

$$\frac{U}{mL} = \frac{abs \times V_{reac\tilde{a}\tilde{o}} \times FD \times 10^6}{\epsilon \times d \times t \times V_{amostra} \times 1000} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

U mL⁻¹: unidade de atividade da PO por mL de extrato;

abs: absorvância da reação;

V_{reacção}: volume total do tubo de reação (mL);

V_{amostra}: volume de extrato enzimático utilizado (mL);

FD: fator de diluição (diluição do extrato bruto enzimático);

10⁶: conversão de mol para µmol;

ε: absortividade molar do tetraguaiacol (26600 mol L⁻¹ cm⁻¹);

d: tamanho horizontal da cubeta (cm);

t: tempo de reação (min).

A quantificação de proteína (mg mL^{-1}) nos extratos enzimáticos foi realizada pelo método de Lowry (1951) e a leitura foi em espectrofotômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80 a 660 nm, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

4.2.6 Purificação do extrato enzimático da PO

Os extratos enzimático brutos obtidos de FA e FS foram submetidos a purificação empregando a técnica de partição trifásica (TPP). Em um tubo de centrifuga de 15 mL contendo 2 mL de extrato bruto enzimático e sulfato de amônio até a obtenção de 30% de saturação do extrato bruto de FA e FS, respectivamente, seguida de homogeneização em vórtex. Após, foi acrescentado acetona em uma proporção extrato bruto:acetona de 1:2 e 1:1,5 para o extrato obtido de FA e FS, respectivamente. O sistema foi homogeneizado em vórtex durante 1 min e mantido em repouso por 60 min, seguido de centrifugação a $3220 \times g$, 4°C durante 10 min para separação das fases, conforme o método descrito por Özer et al. (2010) e modificado por Feltrin (2013).

A fase de topo (acetona) e de fundo (sal) foram separadas da interface formada durante a centrifugação, sendo retiradas com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*. A fração precipitada foi submetida a uma concentração *overnight* a 0°C com acetona na proporção extrato purificado:acetona de 1:3. Na fração precipitada contendo a PO foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 5 para o precipitado obtido de FA e pH 6 para FS. Em todas as fases e nos extratos enzimáticos purificados foi determinada a atividade enzimática da PO (U mL^{-1}) e a concentração de proteína (mg mL^{-1}).

Os parâmetros recuperação e fator de purificação enzimática foram determinados de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{REC (\%)} = \frac{A_{tEP}}{A_{tEB}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

REC: recuperação enzimática

A_{tEB} : atividade enzimática total (U_t) do extrato bruto

A_{tEP} : atividade enzimática total (U_t) do extrato purificado

$$\text{FP} = \frac{A_{eEP}}{A_{eEB}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

FP: fator de purificação enzimática

A_eEB: atividade enzimática específica (U_i) do extrato bruto

A_eEP: atividade enzimática específica (U_i) do extrato purificado

4.2.7 Aplicação da enzima PO na redução dos níveis de ZON

Para aplicação da PO nos testes de redução dos níveis de ZON, primeiramente foi realizada a validação do método cromatográfico para detecção e quantificação de ZON e β -ZOL. Posteriormente, o meio reacional foi avaliado para a obtenção da maior recuperação e maior atividade da enzima PO. Testes foram realizados objetivando avaliar a estabilidade da micotoxina frente ao meio reacional, durante 7 dias e os parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para as enzimas PO comercial e PO de FA foram determinados, definindo a concentração ideal de ZON para avaliação cinética de redução nas condições ótimas de cada enzima.

Com o propósito de confirmar o potencial de redução dos níveis de ZON foi avaliado o mecanismo da ação da enzima, onde foi realizado a caracterização da estrutura química da ZON em meio reacional através de FTIR e confirmação do íon molecular de ZON e seu metabólito (β -ZOL) por cromatografia líquida acoplada a fonte de ionização por electrospray acoplada a espectrometria e massas tandem espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS). Ao final, a enzima que apresentou maior potencial redutivo em meio reacional enzimático sobre ZON foi aplicada na cerveja tipo Pilsen.

4.2.7.1 Condições cromatográficas para separação e quantificação de ZON e β -ZOL

Para separação e quantificação das micotoxinas ZON e β -ZOL foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com injeção de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada micotoxina, utilizando detector de fluorescência (CLAE-FL). As condições cromatográficas descritas por Heidtmann-Bemvenuti (2014) e Pagnussatt et al. (2014) foram utilizadas como base para otimização do método empregado. A coluna cromatográfica utilizada foi *Phenomenex*® - Gemini C18 com tamanho de partícula de $5 \mu\text{m}$ e $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ de diâmetro interno. As condições de detecção foram em comprimento de onda de 350 e 270 nm para excitação e 450 e 455 nm para emissão. Utilizou-se modo de eluição isocrático avaliando a fase móvel nas seguintes razões entre os solventes: acetonitrila:água ou acetonitrila:água acidificada com ácido acético a 1% em 70:30; 80:20; 85:15; 90:10 e 100:0 (v/v) e vazões de 0,5; 0,8; 1 mL min^{-1} . Todos os solventes

utilizados na análise cromatográfica foram filtrados em bomba de vácuo com a utilização de membranas Millipore de nylon 0,45 µm de diâmetro e desgaseificados em banho ultrassônico de 40 kHz em temperatura ambiente durante 30 min.

A avaliação da separação de ZON e β-ZOL foi realizada empregando soluções padrão conforme preparo descrito no item 4.2.1 através do tempo de retenção (t_R) de cada analito, fator de retenção (k), fator de separação (α) e resolução (R_s) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), de acordo com as Equações 5, 6 e 7, respectivamente.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

k : fator de retenção;

t_R : tempo de retenção de um analito, tempo transcorrido desde a injeção até o ponto de máximo do pico;

t_M : tempo de retenção de um analito não retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

α : fator de separação;

k_2 : fator de retenção do segundo composto a eluir na análise cromatográfica;

k_1 : fator de retenção do primeiro composto a eluir na análise cromatográfica.

$$R_s = 2 \times \left(\frac{T_{r2} - T_{r1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) \quad \text{Equação (7)}$$

Onde:

R_s : resolução;

T_{r1} e T_{r2} : tempo de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b1} e W_{b2} : largura dos picos na base, em unidades de tempo.

4.2.7.2 Extração da micotoxina do meio reacional

A extração da micotoxina foi realizada utilizando a técnica de partição líquido-líquido (LLE). Sendo efetuado com adaptações de Nora (2015). Onde foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio (CH_3Cl) em 1 mL da amostra, seguidos de 30s de agitação em vórtex durante e 3 min em banho ultrassônico de 25 kHz. A fase orgânica foi retirada e o procedimento foi repetido por 3 vezes. O volume final obtido foi seco sob atmosfera de nitrogênio.

4.2.7.3 Validação do método analítico

A validação do método analítico para determinação das micotoxinas (ZON e β -ZOL) foi realizada empregando as figuras de mérito descritas na Resolução nº 899 da Anvisa (2003) e no Regulamento nº 401 da Comissão Europeia (2006): linearidade, curva analítica, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade).

A linearidade do instrumento foi determinada pela curva analítica. As soluções foram diluídas a partir do padrão de ZON e β -ZOL, secos sob atmosfera de nitrogênio, ressuspenso em acetonitrila e injetados em triplicata. Para a curva analítica de ZON as concentrações utilizadas foram 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,17; 0,3; 0,5; 1,0; 1,2; 1,4; 1,7 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para β -ZOL foram 0,05; 0,07; 0,1; 0,2; 0,3; 0,7; 0,9 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da curva analítica, foram obtidos os coeficientes de correlação e determinação, e os limites LD e LQ (CE, 2006).

O LD e LQ foram verificados mediante injeção das concentrações de forma decrescente até a obtenção do pico do analito com a relação de 3:1 e 10:1 entre o sinal e o ruído, respectivamente. A precisão (repetibilidade) foi demonstrada através do coeficiente de variação (CV) dos testes de recuperação em triplicata (ANVISA, 2003; CE, 2006).

O percentual do CV foi obtido conforme a Equação 8.

$$\text{CV (\%)} = \left(\frac{s}{x} \right) \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Onde:

CV (%): coeficiente de variação;

s: estimativa do desvio padrão absoluto;

x: média dos resultados.

A exatidão (recuperação) da ZON e β -ZOL foi analisada nos meios reacionais descritos no item 4.2.7.4 para ação de cada enzima. As amostras foram fortificadas com solução padrão das micotoxinas em 3 níveis de concentração (0,1; 0,3 e 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após, o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados os constituintes do meio reacional, homogeneizados em durante 30s em vórtex e 3 min em banho ultrassônico para solubilização da micotoxina, e posteriormente realizada extração, concentração e quantificação da ZON e β -ZOL em CLAE- FL. Os testes de recuperação foram realizados em triplicata juntamente com um controle (meio sem fortificação de ZON e β -ZOL) (ANVISA, 2003; CE, 2006). O percentual de recuperação foi calculado conforme a Equação 9.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação (9)}$$

Onde:

Recuperação (%): percentual de recuperação

C_1 : concentração determinada após a fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

C_2 : concentração determinada na amostra não fortificada (branco) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

C_3 : concentração de padrão adicionado na fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

4.2.7.4 Estudo do meio reacional enzimático para ação da PO

Com intuito de estudar o melhor meio reacional para extração de ZON concomitante com a maior atividade enzimática da PO, o efeito da presença de etanol e de sais na composição do meio reacional foi avaliado. Em recipientes de vidro de 10 mL foi adicionada a solução de ZON na concentração de 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foi acrescentado o meio tamponante (tampão de atividade de cada enzima conforme item 4.2.5), o meio aquoso e os meios etanólicos nas concentrações 5, 10 e 15%, conforme composição descrita na Tabela 2, seguido de homogeneização por 30 s em vórtex e 3 min em banho ultrassônico. Ao final do tempo de interação entre a micotoxina e o meio reacional, procedeu-se com a extração e quantificação, conforme itens 4.2.7.2 e 4.2.7.1, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata e comparados com o controle (branco) sem a micotoxina.

A avaliação da atividade enzimática nestes mesmos meios reacionais foi verificada com acréscimo de 0,5 mL de guaiacol 1% (substrato para PO), 1,0 mL de extrato enzimático da PO e ausência da micotoxina, conforme 4.2.5.

Tabela 2- Meios reacionais para avaliação da recuperação de ZON ($0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e atividade enzimática da PO obtida de FA e FS

Meio reacional	Solventes adicionados (mL)						Volume total *(mL)
	Água	Tampão	Etanol 5%	Etanol 10%	Etanol 15%	H ₂ O ₂	
Tamponante	3,5	1,5	-	-	-	1	6
Aquoso	5	-	-	-	-	1	6
Etanólico 5%	3,5	-	1,5	-	-	1	6
Etanólico 10%	3,5	-	-	1,5	-	1	6
Etanólico 15%	3,5	-	-	-	1,5	1	6

* Nos teste para atividade foi reduzido 1,5 mL de água de todos os meios reacionais e acrescentado 0,5 mL de guaiacol 1% e 1,0 mL de extrato enzimático.

4.2.7.5 Estudo da estabilidade da ZON em meio reacional

A estabilidade da concentração da micotoxina frente ao meio reacional foi avaliado durante 7 dias a temperatura ambiente. Os testes foram realizados com a adição da solução de ZON correspondendo a concentração final de 0,1; 0,3 e $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o solvente evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Após, foi adicionado o meio reacional, homogeneizado durante 30 s em vórtex e 3 min em banho ultrassônico e incubados a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente). Os testes foram realizados em triplicata e comparados com o controle (branco), ausência da micotoxina. Posteriormente, a micotoxina foi extraída e quantificada, conforme itens 4.2.7.2 e 4.2.7.1, respectivamente.

4.2.7.6 Determinação dos parâmetros K_M e $V_{\text{máx}}$ e cinética de redução dos níveis de ZON

Os parâmetros K_M e $V_{\text{máx}}$ foram determinados para as enzima PO comercial e PO obtida de FA. Sendo que, estes parâmetros não foram determinados para a PO obtida de FS devido a enzima apresentar baixa atividade enzimática obtida após purificação. Os parâmetros foram determinados utilizando a concentração de enzima de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$, de acordo com estudo realizado por Nora (2015), em relação a diferentes concentrações da micotoxina 0,16; 0,19; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,5; 3; 5 e $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os testes que utilizaram a PO comercial e

0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5, 5 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando PO obtida de FA. O tempo de ação da enzima foi de 90 min, de acordo com estudo realizado por Garcia et al. (2015). Os testes foram realizados em triplicata e comparados com o controle (branco) na presença da micotoxina e na ausência da PO.

O efeito da concentração de ZON sobre a ação enzimática foi descrito pela constante de Michaelis-Menten (K_M), determinado a partir do gráfico da velocidade *versus* a concentração de substrato. Os parâmetros foram obtidos por meio da linearização da equação de Michaelis-Menten, o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, onde os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ foram calculados a partir dos coeficientes angular e linear da Equação 10, respectivamente.

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad \text{Equação (10)}$$

A velocidade de redução dos níveis de ZON foi determinada a partir da diferença entre a massa inicial e a massa residual da micotoxina em relação ao tempo de reação e atividade enzimática da PO, de acordo com a Equação 11.

$$v = \frac{\text{ZON inicial} - \text{ZON final}}{U \times t} \quad \text{Equação (11)}$$

A cinética da redução dos níveis de ZON foi realizada em reator tipo Erlenmeyer, com volume útil de 125 mL onde a micotoxina na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi adicionada ao reator e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, foi acrescentado ao reator os solventes do meio reacional para a ação ótima da enzima PO comercial, estabelecidos pelo fabricante, e das enzimas obtidas de FA e FS, conforme estudo descrito no 4.2.7.4. A massa de micotoxina juntamente com o meio reacional foram submetidos a agitação de 30 s em vórtex e 3 min em banho ultrassônico, para solubilização da ZON. A adição da enzima foi realizada após a agitação. A atividade enzimática da PO comercial correspondeu a 0,6 U mL^{-1} e as obtidas de FA e FS foram de 0,6 e 6 U mL^{-1} . O reator foi incubado durante 24 h sob agitação orbital a 100 rpm a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Nos intervalos de tempo de 0; 15; 30; 60; 120; 240; 480 e 1440 min foram retiradas amostras para posterior extração e quantificação da micotoxina, de acordo com os conforme itens 4.2.7.2 e 4.2.7.1, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata e comparados com o controle (branco) na presença da micotoxina e na ausência da PO.

O percentual de redução foi determinado utilizando a Equação 12 através da razão entre a variação da massa final da micotoxina e a massa inicial da mesma.

$$\text{Redução da concentração de ZON (\%)}: \frac{\text{MM de ZON}_{\text{final}}}{\text{MM de ZON}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação (12)}$$

Onde:

MM de ZON_{inicial}: massa inicial da micotoxina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

MM de ZON_{final}: massa final da micotoxina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

4.2.7.7 Estudo da ação da enzima PO desnaturada na redução da concentração de ZON

O mecanismo de redução da concentração de ZON foi verificado através da avaliação da ação da enzima PO desnaturada. Para tanto, as enzimas comercial e extraída de FA e FS, foram desnaturadas de acordo com condições descritas por Feltrin (2013) com adaptações. Para a desnaturação térmica, as enzimas purificadas de FA e FS e a enzima comercial foram incubadas a 100 °C durante 1 e 3 h, respectivamente. Ao final do tempo proposto, foi determinada a atividade enzimática (item 4.2.5) para confirmar a desnaturação e aplicar a enzima desnaturada nos testes de redução.

Os testes de redução com a PO desnaturada foram conduzidos em recipiente de vidro de 10 mL. Foi adicionada ZON na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o solvente evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Após os solventes do meio reacional enzimático foram adicionados e homogeneizados durante 30 s em vórtex e 3 min em banho ultrassônico, seguida da adição da enzima desnaturada. Os testes foram incubados durante 24 h sob agitação orbital a 100 rpm a 25±1 °C. Posteriormente, a ZON foi extraída e quantificada, conforme os itens 4.2.7.2 e 4.2.7.1, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata e comparados com o controle (branco) na presença da micotoxina e ausência da ação da enzima desnaturada.

4.2.7.8 Confirmação da redução da concentração de ZON

Para a identificação da frequência de absorção das vibrações dos grupamentos funcionais presentes na molécula de ZON (amostras controle sem atuação da PO) e das amostras com redução da concentração da micotoxina foi utilizado a técnica espectroscopia FTIR, aplicando a refletância total atenuada horizontal (HATR) em espectrômetro

IR Prestige- 21Shimadzu, modelo A210045 – Japão. A análise foi realizada a temperatura de 20 °C e os espectros foram obtidos na faixa de 4000 cm^{-1} a 700 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} com 45 scans.

A confirmação da presença do íon molecular de ZON e β -ZOL das amostras resultantes dos testes de redução da concentração das micotoxinas pela ação das enzimas PO comercial e PO obtida de FA e FS foi realizada por LC-ESI-MS/MS no modo *scan*, conforme Dors et al. (2013) com adaptações. As micotoxinas foram injetadas na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (controle) e das amostras resultantes dos testes de redução pela ação das enzimas. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila 0,1% CH_3COOH e H_2O ultrapura 0,5% de CH_3COOH e 5 mM acetato de amônio, com eluição no modo gradiente e uma vazão de 0,4 mL min^{-1} . Para realização das análises, foram realizadas infusões diretas no espectrômetro de massas na vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, com voltagem do cone de 40 V no modo negativo, utilizando a fonte de ionização na temperatura de 120 °C, a temperatura do gás de dessolvatação (N_2) de 400 °C, a vazão do gás de dessolvatação de 500 L h^{-1} e a vazão do gás do cone de 50 L h^{-1} . As condições do gradiente e de fragmentação estão descritas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3- Condições da fase móvel no modo gradiente em LC-ESI-MS/MS

Tempo (min)	Acetonitrila	H_2O 0,5% CH_3COOH
	0,1% CH_3COOH (%)	5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (%)
0	18	82
3,0	45	55
3,8	100	0
4,3	18	82
10,0	18	82

Tabela 4- Condições de fragmentação de ZON e β -ZOL em LC-ESI-MS/MS

Micotoxina	ESI	Transição (m/z)	Voltagem do Cone (V)	Energia de colisão (eV)	Dwell Time (s)
		Íon precursor $\rightarrow$ Íon produto			
ZON	-	317>131*	40	30	0,3
		317>175	40	30	
β -ZOL	-	319.3>160.2*	45	33	0,3
		319.3>130.2	45	37	

*Transições utilizadas para confirmação.

4.2.7.9 Aplicação da PO para redução da concentração de ZON em amostras de cerveja

Com o intuito de verificar a aplicação da enzima PO, a mesma foi adicionada em amostras de cerveja comercial tipo Pilsen fortificadas com ZON. A troca do meio reacional tamponante exigiu a avaliação da exatidão do método analítico que foi verificado através da recuperação de ZON extraída de amostra comercial de cerveja. Para tanto, as amostras foram fortificadas com solução padrão da micotoxina em 3 níveis de concentrações, 0,1; 0,3 e 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As etapas de extração e quantificação da micotoxina foram realizadas conforme descrito por Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004) com modificações (de acordo com os itens 4.2.7.2 e 4.2.7.1, respectivamente). Os testes foram realizados em triplicata e comparados com as amostras controle, não fortificadas com a micotoxina. A recuperação foi calculada conforme a Equação 9.

Para os testes de redução de ZON foram utilizados reatores do tipo Erlenmeyer, com volume útil de 125 mL. A micotoxina foi adicionada e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, foi adicionado 20 mL de cerveja, 5 mL do cofator da atividade enzimática (H_2O_2) e 5 mL de extrato enzimático com atividade de 0,6 U mL^{-1} . O reator foi incubado sob agitação orbital a 100 rpm a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A amostragem ocorreu no tempo de maior redução da concentração de ZON em meio reacional, avaliado pela cinética de redução. O volume de 1 mL foi utilizado para extração e quantificação de ZON das amostras, conforme os itens 4.2.7.2 e 4.2.7.1, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata e comparados com as amostras controle na presença de ZON fortificada na cerveja e ausência da atuação da PO comercial.

4.2.8. Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidrarias

Para a limpeza das vidrarias e/ou utensílios foram utilizados soluções contendo a concentração de 3% de hipoclorito de sódio, através de imersão do material por 2 h. Este reagente garante a degradação da estrutura química e a ausência de recontaminação ambiental pelo descarte indevido do material.

4.2.9. Recuperação de solvente orgânico

A acetona que foi utilizada na purificação da enzima foi armazenada em vidros âmbar e posteriormente submetida à recuperação em destilador de solventes, Tecnal – TE- 012.

4.2.10. Análise estatística

A análise estatística dos resultados dos testes em triplicata da atividade enzimática da PO, recuperação e estabilidade de ZON e cinética de redução da concentração de ZON em meio reacional foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a um nível significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico “Statistica” (versão 5.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FARELOS

O conhecimento da composição química dos farelos (FA e FS) foi necessário devido a sua utilização para a extração da enzima PO. Sendo assim, a caracterização com resultados expressos em base seca estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Composição química de FA e FS

Amostra	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Fibras (%)	Carboidratos* (%)
FA	10,4 (4,1)	11,3 (1,9)	12,4 (5,1)	20,0 (1,3)	7,0 (8,9)	38,9 (3,3)
FS	11,8 (1,7)	5,8 (1,4)	38,2 (1,3)	3,5 (3,6)	5,8 (1,6)	35,0 (1,3)

* Carboidratos estimados por diferença. Resultados expressos como Média (CV). CV-coeficiente de variação (n=3).

Os valores encontrados para os constituintes da composição química do FA e FS estão de acordo com o descrito na literatura (BAGCHI; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2016; FELTRIN, 2013; GUL et al., 2015; KIM; LEE; KIM, 2015; LACERDA et al., 2010; NORA, 2015; WATTANASIRITHAM et al., 2016). De maneira geral, algumas variações de resultados são aceitáveis, pois existem inúmeras variedades (mesma espécie) de um mesmo grão, e estas variantes genéticas diferem no potencial genético para o aumento da concentração de proteínas, gorduras, fibras, minerais e demais componentes da amostra (WRIGLEY, 2016).

Para Amissah et al. (2003) na composição do farelo de arroz podem ocorrer pequenas variações e estas são admissíveis em virtude de algumas variações como tipo de solo e clima, a qualidade da matéria-prima utilizada no processamento do beneficiamento do grão, bem como o tipo de polimento no qual este foi exposto. O único componente que divergiu dos valores descritos na literatura é o percentual de lipídeos do FS desengordurado, resultado que pode ser explicado por este ser proveniente do processo de extração do óleo de soja e que durante o beneficiamento podem ocorrer alterações que influenciam no aumento ou diminuição da concentração presente na composição deste co-produto (MANDARINO; ROESSING, 2001).

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ZON E β -ZOL

Nos testes para detecção de ZON foi observado que os comprimentos de onda de 350 e 450 nm, para excitação e emissão, respectivamente, e vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 2) resultavam em cromatogramas com picos cromatográficos com área 1,5 vezes menor que quando empregando os comprimentos de onda de 270 nm para excitação e 455 nm para emissão e vazão de 1 mL min^{-1} (Figura 3). Porém, neste foi verificado uma distorção (pico dividido). Segundo Neto (2009), os picos alargados implicam diretamente sobre a resolução cromatográfica, uma vez que a capacidade de separação dos mesmos fica comprometida. Além disso, picos distorcidos aumentam a imprecisão da integração e consequentemente podem impactar sobre a exatidão das determinações. Para Soares (2006) o pico cromatográfico ideal deve ter uma forma gaussiana.

Figura 2- Cromatograma de eluição de ZON em CLAE-FL utilizando condições de detecção em 350 nm (excitação) e 450 nm (emissão) e vazão da fase móvel de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$

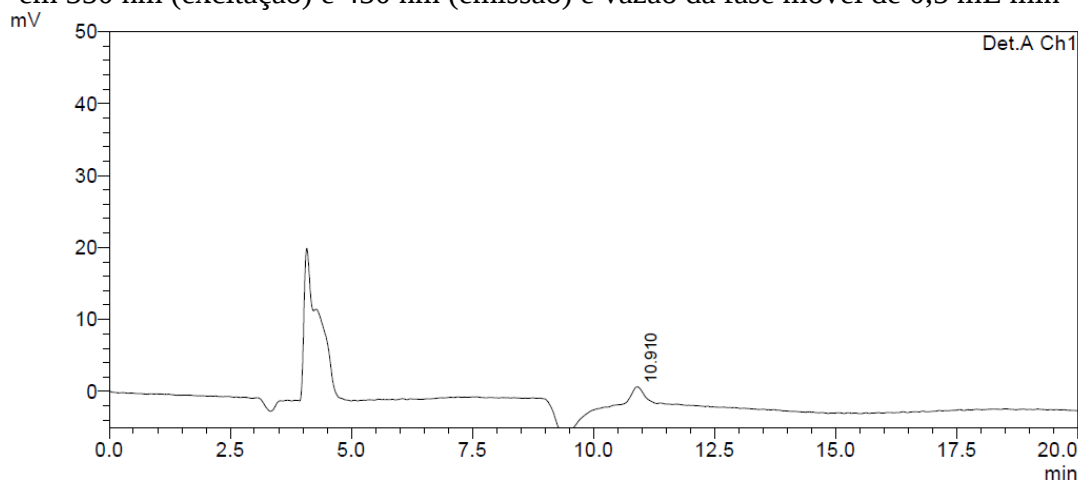
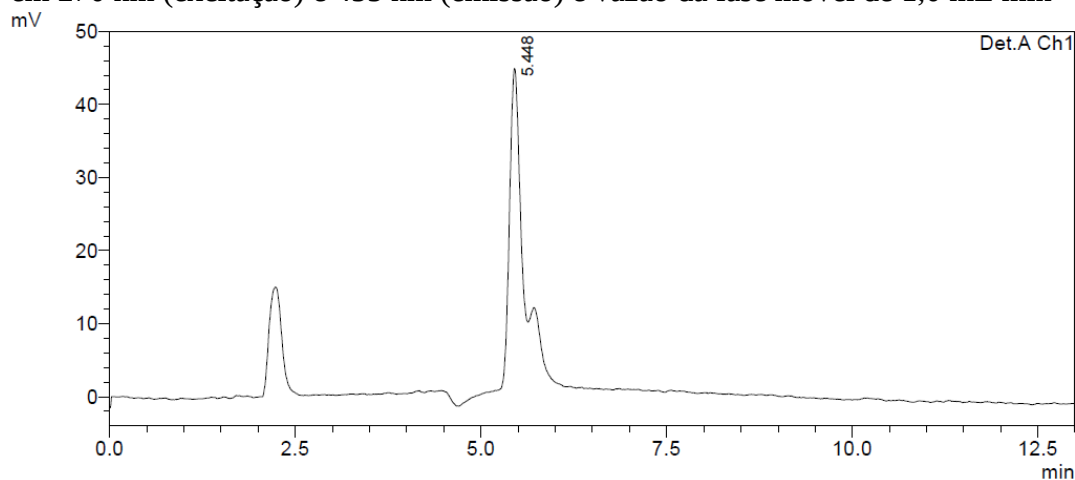


Figura 3- Cromatograma de eluição de ZON em CLAE-FL utilizando condições de detecção em 270 nm (excitação) e 455 nm (emissão) e vazão da fase móvel de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$



Desta maneira, mediante a fundamentação teórica e a análise dos resultados obtidos dos testes prévios (Figuras 2 e 3), a otimização das condições cromatográficas para detecção e

quantificação de ZON e β -ZOL foi estabelecida com a acidificação de água Milli- Q com ácido acético 1% (pH 2,8) comparada com água Milli- Q (pH 6,9). Para isto, foi admitido a padronização de injeção da concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os comprimentos de onda de detecção de 270 nm (excitação) e 455 nm (emissão) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O aumento da área de pico foi de 1,6 vezes quando utilizado a água Milli- Q acidificada. Na Tabela 6 estão demonstrados as proporções de acetonitrila e água Milli- Q acidificada com ácido acético 1%. Soares (2006) explica que o pH é responsável por manter sob forma ionizada todos os íons envolvidos na detecção e separação do analito. Desta forma, a água Milli-Q acidificada com ácido acético auxilia na estabilização da molécula da micotoxina na fase móvel quando submetida à eluição em CLAE-FL.

O fator de retenção (k) é descrito como a razão entre o tempo de retenção corrigido e o tempo morto e indica a relação entre o tempo que o composto esteve retido na fase estacionária e o tempo que esteve sendo carregado pela fase móvel. Fatores de retenção ideais estão entre 2 e 10, acima de 10 as separações seriam demoradas, o que resultaria em um número baixo de análises por unidade de tempo ocasionando alargamento dos picos que eluem por último no cromatograma (SOARES, 2006). Todavia, Harris (2003) afirma que o k para análise de compostos em concentrações traços podem variar entre 0,5 e 20. Desta maneira, somente os Teste 1, 2 e 3 estão de acordo com o descrito na literatura. Porém, no Teste 4 o valor de k foi igual a 0,4, próximo ao intervalo recomendado. No Teste 6 não foi possível estimar o k , tendo em vista que o solvente empregado para solubilização do extrato para injeção cromatográfica foi acetonitrila, mesmo solvente empregado como fase móvel (acetonitrila 100:0), resultando na presença de um pico cromatográfico, o da micotoxina, o que impossibilita o uso da equação matemática para obtenção do fator de retenção, conforme Figura 4f.

Outro aspecto importante a ser relatado é que a proporção dos solventes empregados nos Testes 1, 2 e 3 não foram eficientes para minimizar as distorções dos picos, proporcionando o efeito multicaminho. Consequentemente, todos os picos apresentaram forma inadequada, seja por divisão dos picos ou picos com ombro, resultado de caminhos diferenciados, e conseqüente diferentes números de pratos teóricos obtidos a partir da interação entre fase móvel e fase estacionária (Figuras 4a, 4b e 4c). Entretanto, nos Testes 4 e 5 foi verificado picos gaussianos, relatados como apropriados para análise cromatográfica (Figura 4d e 4e). O Teste 6, que utilizou somente acetonitrila (100:0 v/v) como fase móvel, o pico tem cauda, considerado inadequado (Figura 4f). Neto (2009) relatou que um pico intenso e com grande cauda pode encobrir por completo um pico mais retido e de menor intensidade, adjacente a ele. Lanças (2009) enfatizou que a redução da utilização de acetonitrila em análises cromatográficas é uma

tendência mundial devido à escassez da mesma no mercado internacional, o que ocasionou a elevação dos custos para sua aquisição, além do impacto que este solvente causa ao meio ambiente quando descartado inadequadamente.

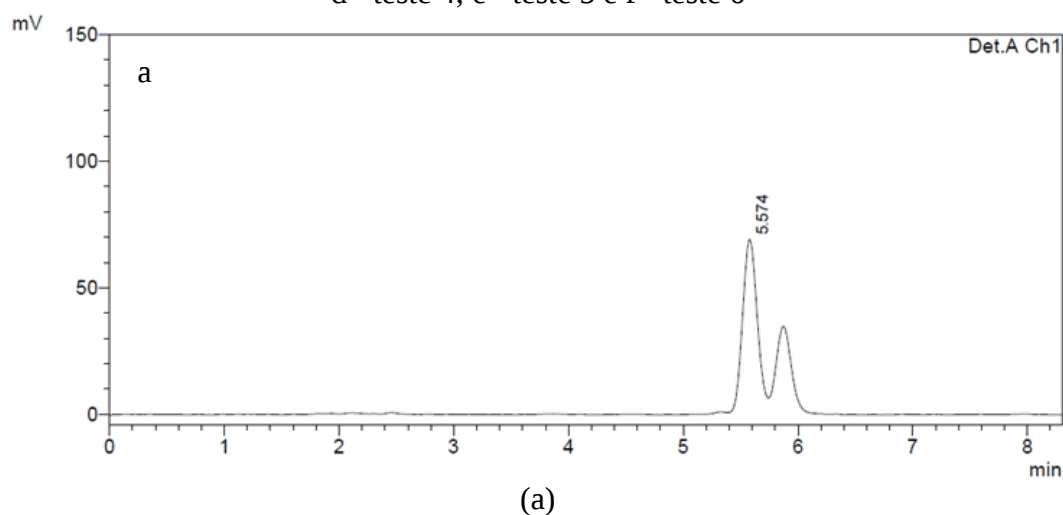
Tabela 6- Otimização da proporção dos solventes da fase móvel para detecção de ZON

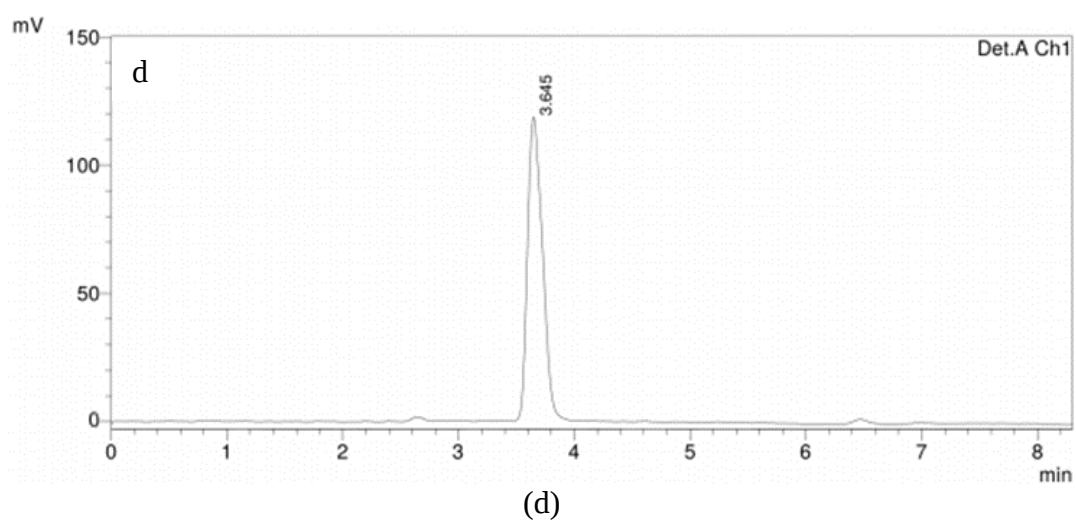
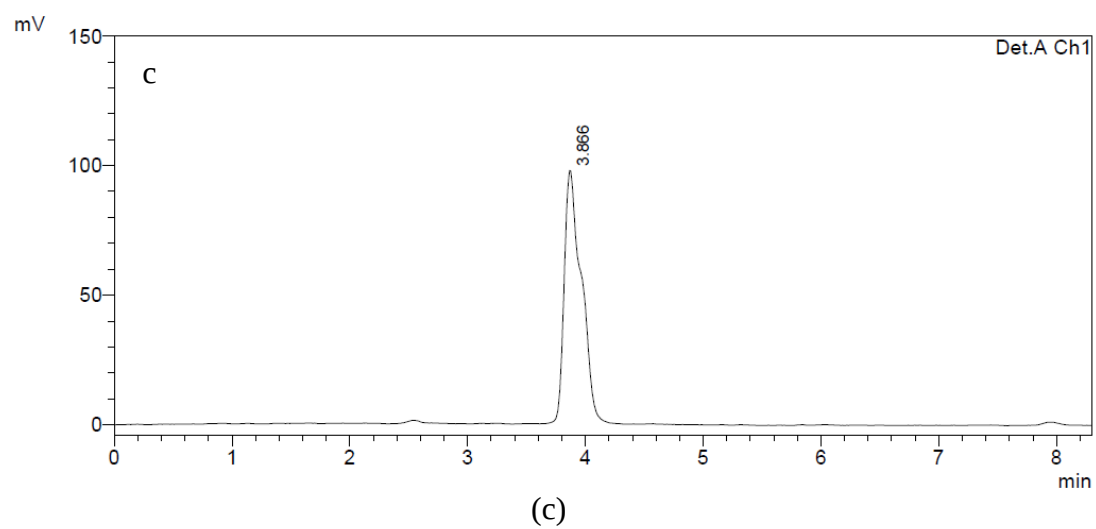
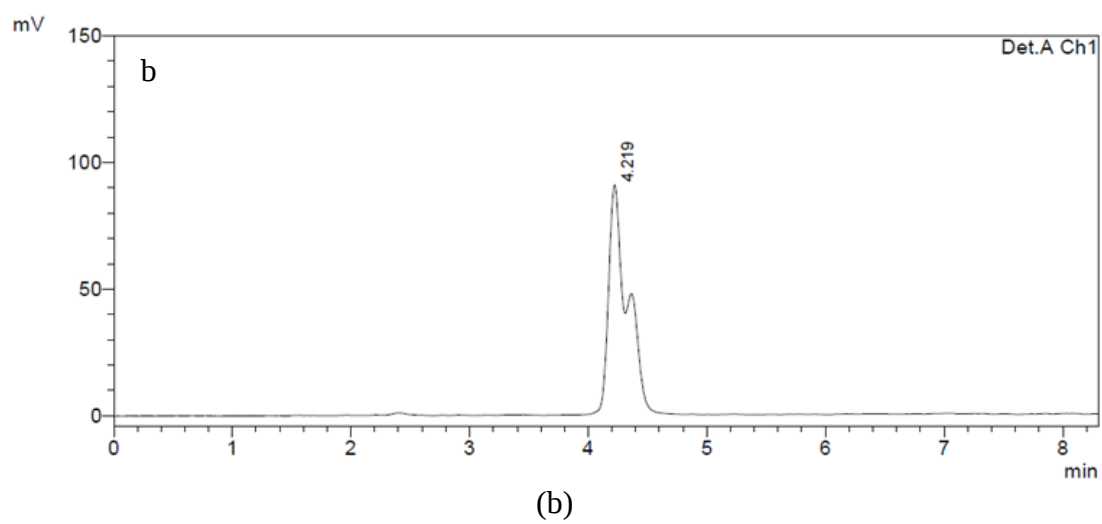
Teste	Fase móvel (v/v) *	t_R	k	Área relativa (%)
1	70:30	5,5	1,3	74,7
2	80:20	4,2	1,8	81,4
3	85:15	3,8	0,5	81,5
4	90:10	3,6	0,4	86,1
5	95:5	3,5	0,3	90,9
6	100:0	3,6	-	100

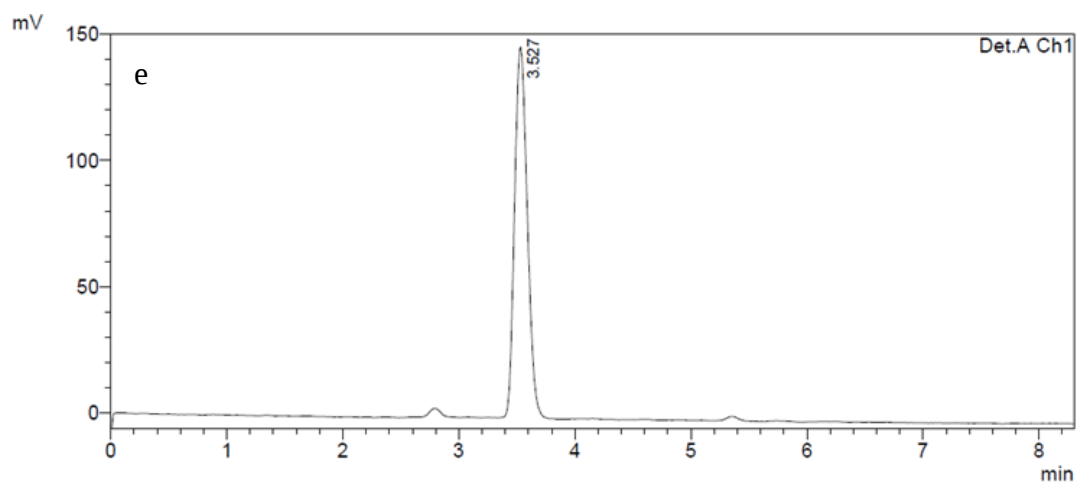
*Fase móvel- acetonitrila:água Milli- Q acidificada com ácido acético 1%; t_R - tempo de retenção (min); k - fator de retenção

A avaliação da área relativa dos picos correspondente aos Testes 1, 2, 3, 4, 5 e 6 possibilitam relacionar a maior sensibilidade do método para detecção e quantificação de ZON com o aumento da proporção de acetonitrila e consequentemente diminuição de água acidificada com ácido acético 1%. Desta maneira, somente os Testes 4 e 5 foram os que apresentaram as melhores condições para detecção de ZON, levando em consideração a proporção de solvente, o valor de k , a forma e a área do pico. Assim, acetonitrila:água acidificada, 90:10 foi a fase móvel escolhida.

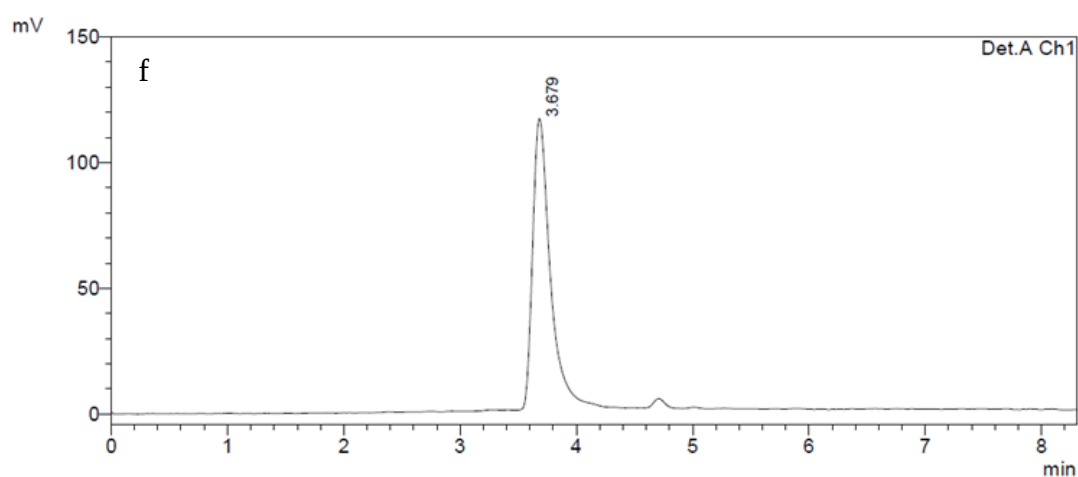
Figura 4- Cromatograma de eluição de ZON em CLAE-FL utilizando fase móvel composta acetonitrila:água adicificada com ácido acético 1%. Sendo a= teste 1; b= teste 2; c= teste 3; d= teste 4; e= teste 5 e f= teste 6







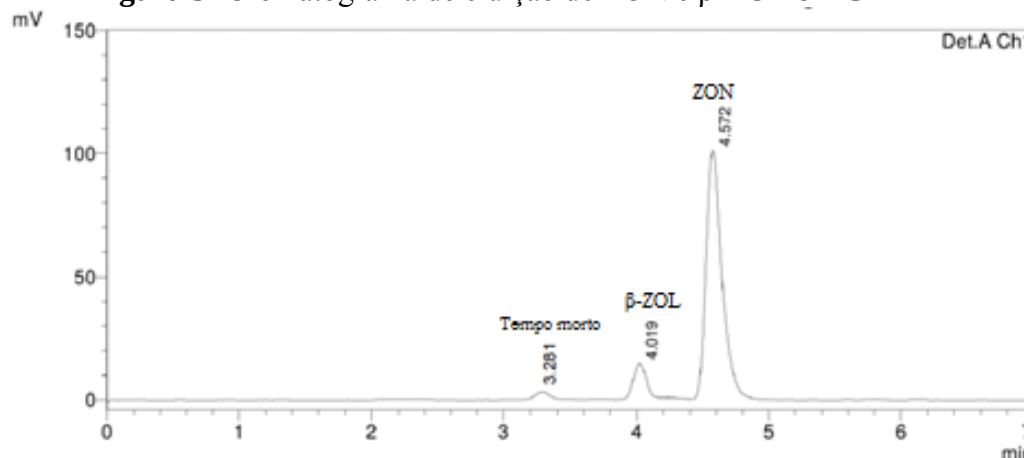
(e)



(f)

Os tempos de retenção para ZON variaram de 3,5 a 5,5 min utilizando vazão de 1 mL min^{-1} e fase móvel de acetonitrila:água acidificada 1% em diferentes proporções, conforme os Testes 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Na fase móvel do teste 4, acetonitrila:água acidificada 1% (90:10, v/v), os tempos de retenção foram de 4,5 e 3,6 min quando utilizado as vazões de 0,8 e 1 mL min^{-1} , respectivamente. Sendo assim, a vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ foi escolhida, evitando a proximidade de detecção do analito com o início da análise cromatográfica e do pico do solvente (tempo morto). Posteriormente, foi avaliado nas mesmas condições, separação de β -ZOL, conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5- Cromatograma de eluição de ZON e β -ZOL em CLAE-FL



Os t_R para β -ZOL e ZON foram de 4,0 e 4,5 min, respectivamente, possibilitando um tempo de análise cromatográfica de 7 min. Os k de 0,3 e 0,4 para β -ZOL e ZON, respectivamente, demonstram que mesmo não estando de acordo com os intervalos ideais indicados pela literatura (intervalo entre 0,5 a 20) os picos estão distantes do tempo morto. Collins et al. (2006), relatam que para uma boa separação de dois analitos através da técnica cromatográfica, o valor de α deve ser igual ou maior que 1. Neste caso, o parâmetro α verificado foi de 1,3 corroborando com uma boa seletividade do método para separação dos picos gaussianos de β -ZOL e ZON. O valor de R_s recomendado é superior a 1,5, pois é a resolução que relaciona a eficiência da coluna e da fase móvel e também do t_R suficiente para separação (COLLINS et al., 2006; HARRIS, 2003). A R_s obtida foi de 1,0 comprovando que a resolução foi afetada provavelmente devido aos picos do analito eluírem próximo ao tempo morto.

Por meio da otimização do método cromatográfico, conforme comprovado na Figura 5, foi possível detectar e separar a ZON e o β -ZOL de forma eficiente, possibilitando o emprego das condições na detecção e quantificação das micotoxinas em estudo.

5.3 ESTUDO DO MEIO REACIONAL ENZIMÁTICO PARA AÇÃO DA PO

A extração LLE envolve a exploração da solubilidade da micotoxina na fase aquosa e na fase orgânica não miscível. Para extrair em uma fase o composto de interesse e os demais compostos permanecem na outra fase. A LLE é eficiente para várias micotoxinas e apresenta bons resultados em testes de pequena escala (TURNER et al., 2015; TURNER, SUBRAHMANYAM e PILETSKY, 2009). Urry et al. (1966) descreveram que a ZON é solúvel

em solventes como benzeno, acetonitrila, álcoois, clorofórmio, acetato de etila e praticamente insolúvel em água.

A extração por LLE foi testada por Leite et al. (2012) que analisaram diferentes tipos de particionamento para validar um método de extração simultânea de AFLA B₁ e B₂, OTA, ZON e DON em águas da cadeia produtiva de arroz, sendo que o experimento que utilizava três extrações sucessivas com clorofórmio foi o que apresentou os melhores resultados, com recuperações acima de 70% e variabilidade inferior a 15%. Neste contexto, foi avaliado a recuperação de ZON em meio tamponante, meio aquoso e meio etanólico, conforme resultados demonstrados na Tabela 7. O objetivo da adição do etanol nas concentrações de 5, 10 e 15% no meio reacional, foi avaliar se a presença deste solvente colaboraria para uma melhor recuperação da micotoxina.

As recuperações de ZON em meio etanólico nas três concentrações não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), quando comparados com os demais meios (meio aquoso e tamponante). Todos os meios obtiveram recuperações acima de 70% (Tabela 7) demonstrando que a técnica por LLE foi eficaz na extração da micotoxina dos meios reacionais. Para a Comissão Europeia (2006) e ANVISA (2003), os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traços recomendados é entre 70% e 120% com precisão de até $\pm 20\%$.

Tabela 7- Recuperação de ZON e atividade enzimática da PO obtida de FA e FS em diferentes meios reacionais

Meio reacional	Recuperação de ZON* (%)	PO obtida de FA	PO obtida de FS
		Atividade enzimática* (U mL ⁻¹)	Atividade enzimática* (U mL ⁻¹)
Aquoso	94,4 (5,2) ^{ab}	0,276 (1,0) ^a	0,043 (8,0) ^b
Etanólico 5%	100,3 (14,0) ^{ab}	0,253 (4,1) ^b	0,044 (5,2) ^b
Etanólico 10%	95,5 (1,0) ^{ab}	0,232 (2,1) ^c	0,041 (7,9) ^b
Etanólico 15%	105,0 (1,5) ^a	0,226 (1,0) ^c	0,038 (7,6) ^b
Tamponante de FA**	79,3 (12,5) ^b	0,247 (0,7) ^b	n.a.
Tamponante de FS**	105,0 (9,7) ^a	n.a.	0,051 (1,5) ^a

*Resultados expressos com Média (CV). CV-coeficiente de variação (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatística (Tukey HSD, $p < 0,05$). ** Meio reacional tamponante de FA = tampão fosfato 5 mM pH 5,5 e de FS= tampão fosfato 5 mM pH5,0. n.a- Não avaliado.

Após a avaliação da recuperação da ZON dos diferentes meios reacionais foram realizados os testes para definir o meio de maior atividade enzimática da PO obtida de FA e de FS, tendo em vista sua aplicação nos testes de redução da concentração de ZON pelas mesmas.

A Tabela 7, expõe os resultados da atividade enzimática (U mL^{-1}) de ambas enzimas quando presente nos diferentes meios reacionais.

Os resultados demonstraram que a PO obtida de FA apresentou maior atividade enzimática ($0,276 \text{ U mL}^{-1}$) em meio aquoso ($p < 0,05$), sendo este constituído de água, H_2O_2 0,08% e guaiacol 1%. Enquanto, a PO obtida de FS exibiu maior atividade enzimática ($0,051 \text{ U mL}^{-1}$) quando presente em meio tamponante ($p < 0,05$), tendo como composição tampão fosfato 5 mM pH 5, água, H_2O_2 0,08% e guaiacol 1%. Pode-se observar que o acréscimo de etanol no meio reacional causou uma pequena diminuição da atividade enzimática quando comparada aos demais meios, sendo justificado pelo fato de que o solvente ocasiona alterações na estabilidade da enzima.

Damoradan et al. (2010) e Klibanov (1997) explicam que a água tem impacto sobre a velocidade de reação por servir como meio de difusão, controlar a diluição ou concentrar solutos, estabilizar e plastificar proteínas e servir de co-substrato para reações hidrolíticas. Bon, Ferrara e Corvo (2008) explicam que as moléculas de água do meio, têm papel importante na estabilidade proteica devido, principalmente, às interações intermoleculares das pontes de hidrogênio que estabilizam a conformação espacial intramolecular proteica na qual interações hidrofóbicas, forças de van de Waals e pontes salinas são formadas.

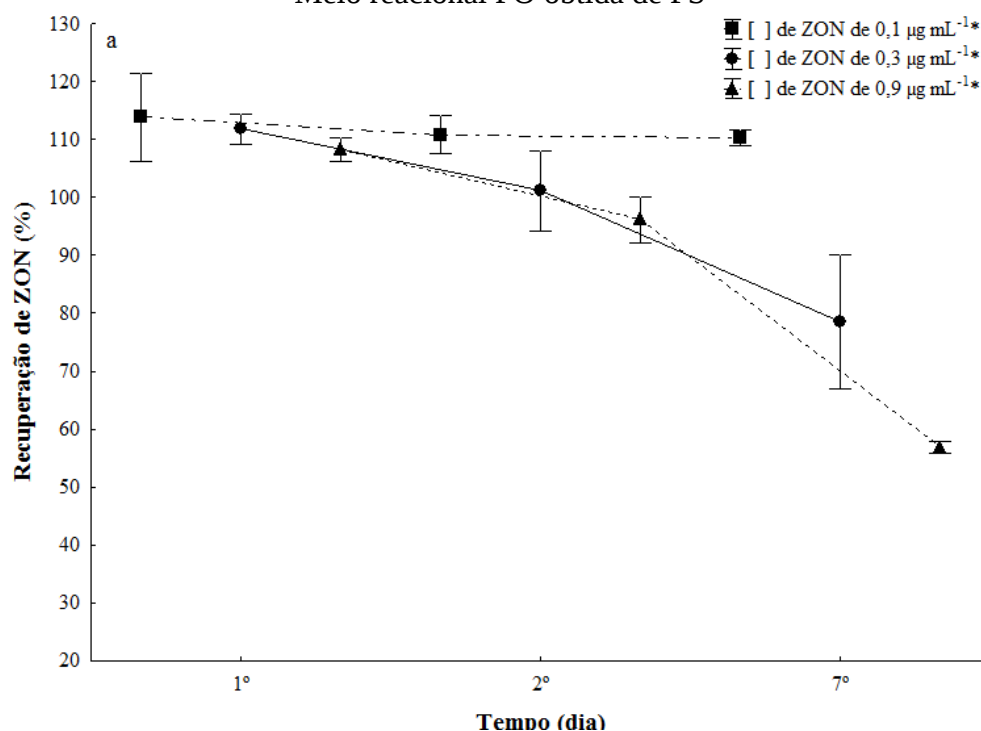
Segundo Doukyu e Ogino (2010) e Singh, Prakash e Shah (2012) as reações enzimáticas em meio orgânicos é restrita devido a maioria das enzimas serem menos ativas e estáveis, na presença de solventes orgânicos. Ryu e Dordick (1992) relatam que a exposição do centro ativo da peroxidase para volumes elevados ou reduzidos de solventes orgânicos miscíveis em água altera a polaridade local no centro ativo da enzima que afeta o estado de transição de reação enzimática e a eficiência catalítica. Bon, Ferrara e Corvo (2008) citam que solventes orgânicos causam alterações na conformação nativa da enzima, tanto na estrutura terciária como nas estruturas secundárias (α -hélice e a conformação β), e desta maneira, acarreta a sua desestabilização.

Tendo em vista as recuperações de ZON em meio aquoso e tamponante de FA que corresponderam a 94,4% e 79,3%, respectivamente, e em concordância com o meio reacional aquoso onde a PO extraída de FA apresentou maior atividade enzimática ($0,276 \text{ U mL}^{-1}$), quando comparado ao meio tamponante ($0,247 \text{ U mL}^{-1}$), o meio aquoso foi definido como apropriado para a realização dos testes de redução dos níveis de ZON mediante ação da enzima PO obtida de FA. No entanto, para ação da enzima PO obtida de FS foi definido o meio tamponante como ótimo, pois neste a recuperação da micotoxina atingiu 105% e obteve a maior atividade enzimática ($0,051 \text{ U mL}^{-1}$).

5.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA ZON EM MEIO REACIONAL

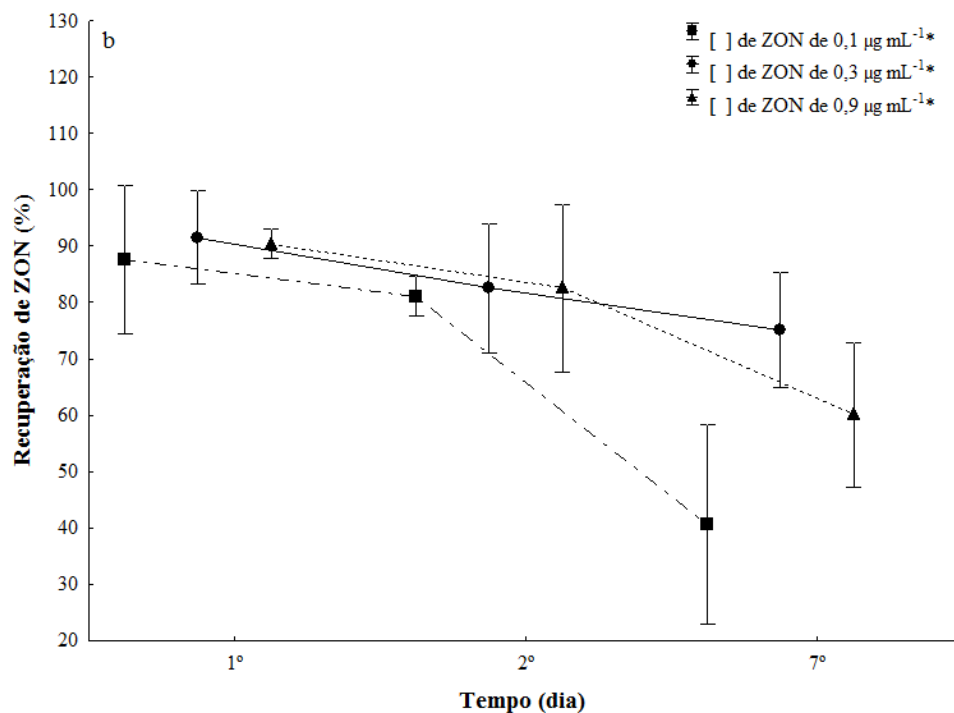
O estudo da estabilidade da ZON no meio reacional foi realizado em meio tamponante para a PO comercial (tampão fosfato 100 mM pH 6,0) e para a obtida de FS (tampão fosfato 5 mM pH 5,0), e em meio aquoso para a PO obtida de FA, conforme resultados do estudo do meio reacional descrito no item 5.3. Na Figura 6 estão apresentadas as recuperações de ZON de meio reacional cada enzima nas concentrações de 0,1; 0,3 e 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no 1º, 2º e 7º dia de incubação, de acordo com os gráficos a, b e c, respectivamente.

Figura 6- Estabilidade de ZON em meio reacional de cada enzima durante incubação (1º; 2º e 7º dia). Sendo a= Meio reacional PO comercial ; b= Meio reacional PO obtida de FA e c= Meio reacional PO obtida de FS



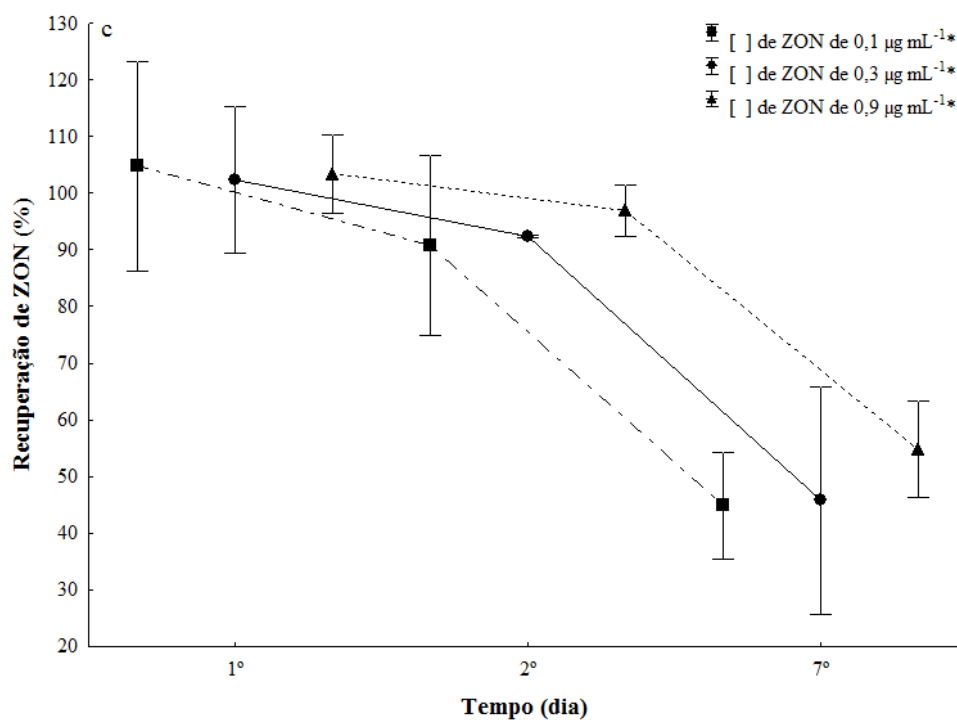
* Média $\pm$ 0,95 Intervalo de confiança; Sendo: ■ Concentração de ZON de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ● Concentração de ZON de 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ▲ Concentração de ZON de 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

(a)



* Média $\pm$ 0,95 Intervalo de confiança; Sendo: ■ Concentração de ZON de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ● Concentração de ZON de 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ▲ Concentração de ZON de 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

(b)



* Média $\pm$ 0,95 Intervalo de confiança; Sendo: ■ Concentração de ZON de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ● Concentração de ZON de 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ▲ Concentração de ZON de 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

(c)

Através dos resultados é possível verificar que a concentração de ZON permanece igual nos em dois primeiros dias em todos os meios reacionais, ou seja, até o 2º dia o meio reacional não ocasiona redução da concentração da micotoxina. Porém, a partir do 2º até o 7º

dia houve, de maneira geral, a redução de ZON em todas as concentrações, resultado da instabilidade da micotoxina em meio reacional durante este período de incubação. Mediante este estudo pode-se concluir que o meio reacional não causa influência na concentração da micotoxina durante 48 h de incubação, indicando que a avaliação da redução da concentração de ZON nos referidos meios devem considerar este período de tempo.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Desta maneira, as figuras de mérito utilizadas para validação do método cromatográfico para separação e quantificação de ZON e β -ZOL em CLAE-FL, estão expressas na Tabela 8.

Tabela 8- Parâmetros de validação do método analítico avaliados em CLAE-FL para ZON e β -ZOL

Parâmetros	Zearalenona (ZON)	β -Zearalenol (β -ZOL)
Equação da curva	$y = 1000000x + 7149,4$	$y = 106618x - 2685,2$
Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,01 a 2	0,05 a 1
Coeficiente de correlação	0,9994	0,9958
Coeficiente de determinação	0,9989	0,9917
LD_i ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,005	0,002
LQ_i ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,01	0,05
LD_m ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,005	0,002
LQ_m ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,01	0,05

LD_i - limite de detecção do instrumento; LQ_i - limite de quantificação do instrumento; LD_m - limite de detecção do método; LQ_m - limite de quantificação do método

De acordo com a Comissão Europeia (2006), para a construção de uma curva de calibração utilizada para quantificação devem ser utilizados, pelo menos, 5 níveis do analito. A Anvisa na Resolução nº 899 de 2003 descreve que a curva de calibração (linearidade) deve conter no mínimo 6 pontos. O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO (2007) descreve que linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração e a quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Desta maneira, a linearidade das curvas analíticas realizadas para as micotoxinas estão de acordo com o descrito na literatura, tendo em vista que a faixa de concentração compreendeu de 0,01 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (contendo 12

níveis de padrão) para ZON e de 0,05 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para β -ZOL (apresentando 8 níveis de padrão).

O coeficiente de correlação (R) é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode considerada como modelo matemático (INMETRO, 2007), sendo assim para esse órgão os valores considerados aceitáveis são valores de R acima de 0,90. Para a ANVISA (2003) o valor deve ser igual ou superior a 0,99. Soares (2006) afirma que para a prática analítica, valores de R acima de 0,99 indicam uma excelente correlação. Diante do exposto, os valores de R para ZON e β -ZOL (0,9994 e 0,9958, respectivamente) demonstram que o método analítico pode ser considerado confiável.

Rodríguez-Carrasco et al. (2015) validaram um método analítico através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) para análise de ZON e β -ZOL em amostras de cerveja, sendo que os parâmetros LD e LQ verificados pelos autores foram de 0,008 e 0,016 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para ZON e para β -ZOL os valores de LD e LQ foram de 0,004 e 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Rubert et al. (2013) validaram um método analítico para análise de ZON em cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas de triplo quadrupolo e os parâmetros LD e LQ determinados pelos mesmos foram de 0,007 e 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012) validaram ZON em CLAE- FL para arroz natural e parboilizado e sua frações, encontrando LD e LQ instrumental de 0,002 e 0,067 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, os valores de LD e LQ do instrumento e do método para ZON e β -ZOL deste trabalho demonstram e corroboram a boa sensibilidade.

As recuperações de ZON e β -ZOL nos 3 níveis (0,1; 0,3 e 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram realizadas nos meios reacionais enzimáticos ótimos para a ação de cada enzima. Para a enzima PO comercial o meio reacional tamponante (composto por tampão fosfato 100 mM pH 6,0; peróxido de hidrogênio 0,08% e água Milli-Q), para a PO obtida de FA o meio reacional aquoso (constituído de água Milli-Q e peróxido de hidrogênio 0,08%) e para a PO obtida de FS o meio reacional tamponante (formado por tampão fosfato 5 mM pH 5,0, peróxido de hidrogênio 0,08% e água Milli-Q), conforme Tabela 9.

Os intervalos aceitáveis para recuperação de ZON, segundo a Comissão Europeia (2006) e ANVISA (2003), são de 70 a 120 e precisão de $\pm 20\%$. As médias das recuperações de ZON e β -ZOL em todos os níveis de fortificação em meio reacional enzimático para PO comercial e PO obtida de FA e de FS foram de 111 e 107%; 90 e 102% e 103 e 95% com coeficientes de variação de 1,4 e 10,2%; 3,5 e 1,9% e 4,9 e 7,2%, respectivamente. Desta forma, as recuperações estão de acordo com os valores admissíveis para análise de componentes traços (ppm e ppb) presentes em amostras, podendo o método ser considerado exato e preciso.

Tabela 9- Recuperações de ZON e β -ZOL dos meios reacionais enzimáticos

Meio reacional	Recuperação* (%)					
	Níveis de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	0,1		0,3		0,9	
	ZON	β -ZOL	ZON	β -ZOL	ZON	β -ZOL
PO comercial	114 (2,7)	103 (14,9)	112 (0,9)	114 (13,4)	108 (0,7)	105 (2,5)
PO obtida de FA	88 (6,0)	107 (2,1)	92 (3,6)	91 (1,4)	90 (1,1)	107 (2,3)
PO obtida de FS	105 (7,1)	82 (5,5)	102 (5,1)	95 (11,5)	103 (2,7)	107 (4,6)

*Resultados expressos como Média (CV). CV-coeficiente de variação (n=3).

Feltrin (2013) utilizou o método de extração por partição líquido-líquido com clorofórmio e seus resultados para as recuperações de DON do meio reacional enzimático para PO comercial (composto por tampão fosfato 100 mM pH 6,0, peróxido de hidrogênio 0,08% e água Milli – Q) nos níveis de 1,49; 2 e 3,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram de 118, 90 e 85%, com coeficientes de variação de análise de 4,4; 3,5 e 2,6%, respectivamente. Da mesma forma, Nora (2015) extraiu OTA de meio reacional enzimático para PO obtida de FA (constituído por tampão fosfato 5 mM pH 5,5, peróxido de hidrogênio 0,08% e água Milli-Q) pelo método de extração por partição líquido-líquido com clorofórmio, nos níveis de 0,7; 3,7 e 22 ng mL^{-1} e recuperou 91; 90 e 101%, sendo os coeficientes de variação de 4, 11 e 5%, respectivamente. Ambos autores, utilizaram as mesmas condições deste estudo, referente a método de extração e meio reacional enzimático, e estes não prejudicaram as recuperações de DON ou OTA. Em concordância com as recuperações de ZON nos níveis de fortificação dos 3 meios reacionais deste trabalho são semelhantes aos descritos na literatura.

5.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS K_M E $V_{m\text{áx}}$ E CINÉTICA DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ZON MEDIANTE AÇÃO ENZIMÁTICA

A recuperação enzimática (RP) e o fator de purificação (FP) para a PO obtida de FA e do FS foram de 41 e 94% e 0,7 e 4,4; respectivamente. Nora (2015) purificou a PO obtida de FA e obteve 77,1% para a RP e 9,2 para FP. No entanto, a saturação pelo sulfato de amônio empregada pelo autor foi de 50% e neste trabalho a saturação utilizada foi de 30%. Feltrin

(2013) purificou a PO extraída de FA e FS na saturação de 30% de sulfato de amônio e verificou para a PO de FA e de FS a RP correspondente a 46 e 96% e FP de 1,79 e 23,62, respectivamente. Os valores de RP encontrados neste trabalho foram similares ao citados por Feltrin (2013). No entanto, o FP foi inferior, demonstrando a necessidade de otimização da etapa de purificação. A variação do FP de purificação verificada é justificada devido a origem dos farelos e a etapa de concentração da enzima para obtenção da atividade enzimática necessária para aplicação nos testes de redução da concentração de ZON.

Com a finalidade de determinar os parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram realizados os gráficos de velocidade inicial versus concentração de ZON e de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a PO comercial e PO obtida de FA, conforme as Figuras 7 e 8, respectivamente. A atividade enzimática estabelecida para os testes foi de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$ para ambas enzimas. Através, das equações apresentadas nos gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk de cada enzima, foi determinado os parâmetros de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ apresentados na Tabela 10. Como salientado anteriormente, não foram determinados tais parâmetros para a PO obtida de FS devido a sua baixa atividade enzimática.

Tabela 10- Parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para PO comercial e PO obtida de FA

Enzima PO	K_M		$V_{m\acute{a}x}$	
	μM	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{M min}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$
Comercial	39,61	12,61	0,170	0,05
FA	8,90	2,86	0,011	0,004

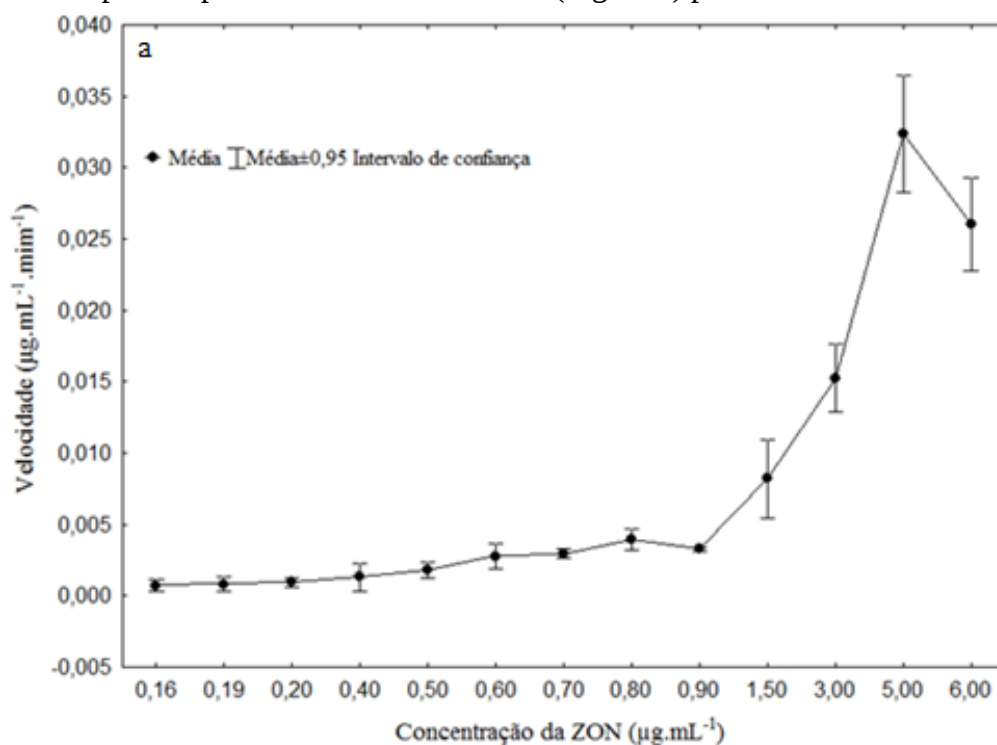
Singh, Prakash e Shah (2012) obtiveram PO de FA e avaliaram a cinética enzimática em comparação com a PO comercial utilizando como substrato o guaiacol, e obtiveram K_M de 5,58 e 3,66 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,00823 e 0,00421 mM min^{-1} , para PO de FA e PO comercial, respectivamente. Feltrin (2013) determinou estes parâmetros para a PO obtida de FA também purificada, utilizando o guaiacol como substrato e obteve de 0,06 mM e 666,66 U mg^{-1} para o K_M e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente. Nora (2015) determinou K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da PO comercial e PO obtida de FA, utilizando como substrato a micotoxina OTA, sendo que para o K_M o autor verificou a concentração de 0,00027 e 0,0065 mM e $V_{m\acute{a}x}$ em concentração de 0,000015 e 0,000031 mM min^{-1} , para PO comercial e obtida de FA, respectivamente. Desta forma, o substrato (OTA) utilizado por Nora apresenta 140 vezes mais afinidade pela PO comercial, quando comparado com os testes de K_M utilizando ZON como substrato e a mesma enzima. Entretanto, quando comparamos o K_M da PO obtida de FA para o substrato OTA ou ZON, as concentrações de micotoxinas são semelhantes. Ficando evidenciado através dos

valores de K_M demonstram que afinidade da PO obtida de FA com o substrato ZON é maior, quando comparada com a enzima comercial e que tanto a micotoxina ZON quanto a OTA podem ser utilizadas como substrato alternativo da PO.

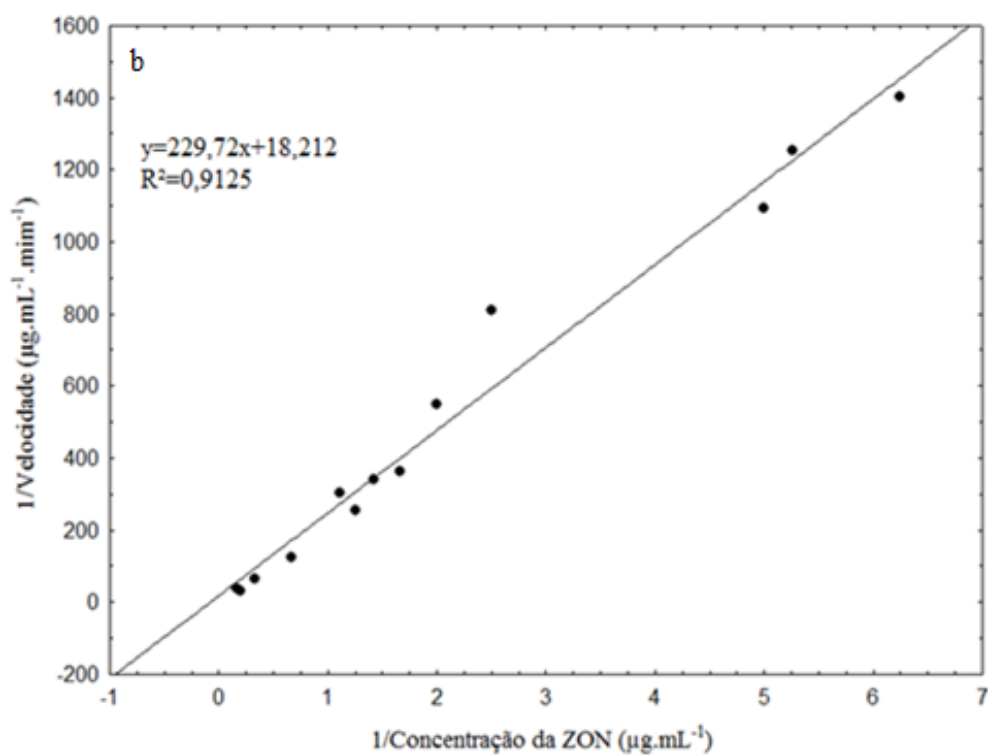
Posterior a determinação do K_M para a PO comercial ($0,03961 \text{ mM} - 12,61 \mu\text{g mL}^{-1}$) e PO extraída de FA ($0,0089 \text{ mM} - 2,86 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram realizados os testes para acompanhamento da cinética de redução da ZON. Porém, devido as altas concentrações de ZON admitidas pelo parâmetro K_M para ambas enzimas com atividade de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$ foi empregado a concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em todos os testes de redução, justificado pelo fato da micotoxina estar presente em diferentes matriz em concentração traço. Além disto, em se tratando de um contaminante e de um reator com volume total de 30 mL é importante levar em consideração os riscos da exposição do analista e também os elevados custos que envolvem a análise.

Posterior a determinação do K_M para a PO comercial ($0,03961 \text{ mM} - 12,61 \mu\text{g mL}^{-1}$) e PO extraída de FA ($0,0089 \text{ mM} - 2,86 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram realizados os testes para acompanhamento da cinética de redução da ZON. Porém, devido as altas concentrações de ZON admitidas pelo parâmetro K_M para ambas enzimas com atividade de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$ foi empregado a concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em todos os testes de redução, justificado pelo fato da micotoxina estar presente em diferentes matriz em concentração traço. Além disto, em se tratando de um contaminante e de um reator com volume total de 30 mL é importante levar em consideração os riscos da exposição do analista e também os elevados custos que envolvem a análise.

Figura 7- Gráfico de velocidade de redução versus concentração ZON (Figura a) e gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figura b) para a PO comercial

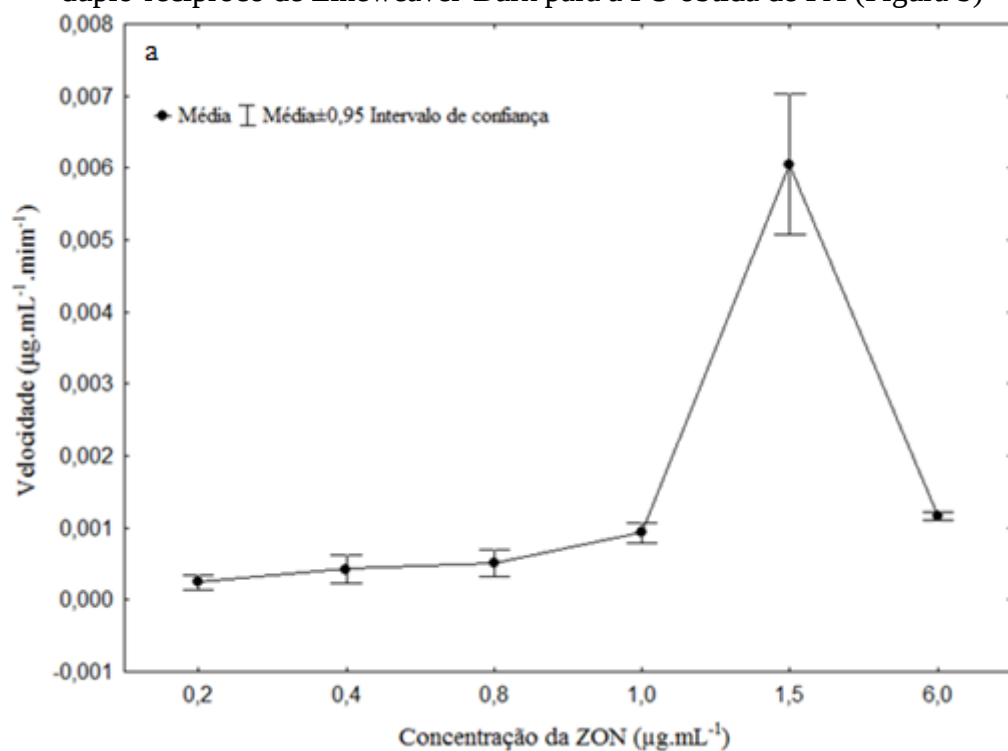


(a)

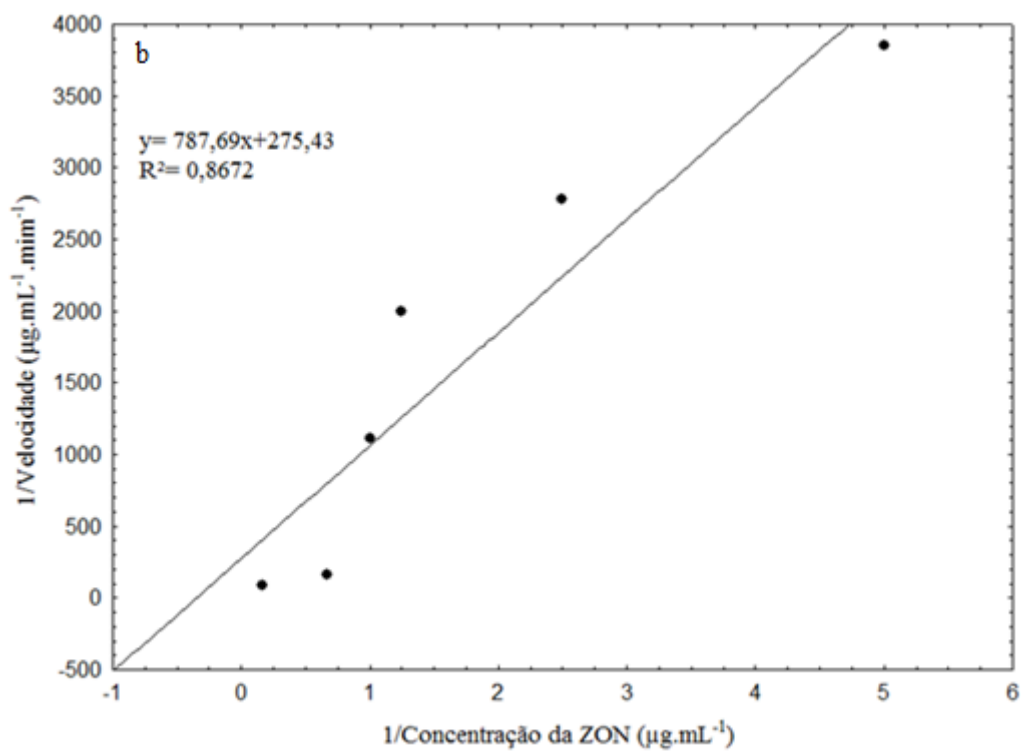


(b)

Figura 8- Gráfico de velocidade de redução versus concentração ZON (Figura a) e gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a PO obtida de FA (Figura b)



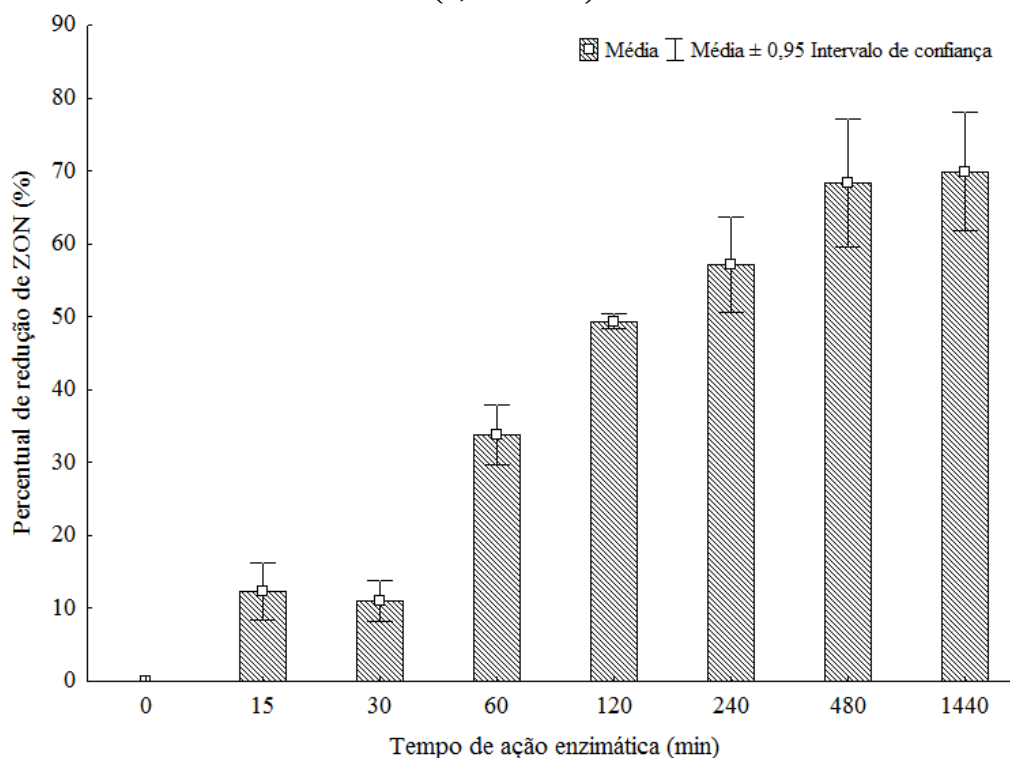
(a)



(b)

Os resultados obtidos da cinética de redução de ZON ao longo de 1440 min (24 h) mediante a PO comercial está demonstrado na Figura 9 e da PO obtida de FA e FS estão demonstrados na Tabela 11. Ao final do tempo de reação foi realizada a coleta de 1 mL de cada meio reacional para avaliar a atividade enzimática, conforme item 4.2.5, no qual foi demonstrado que a PO comercial e a PO obtida de FA e FS não apresentavam atividade residual.

Figura 9- Cinética de redução da concentração de ZON mediante atuação da PO comercial ($0,6 \text{ U mL}^{-1}$)



A redução da concentração de ZON foi gradativa quando submetida a ação da PO comercial, sendo que as maiores de reduções foram nos tempos de 480 e 1440 min, com 68,3 e 69,9%, respectivamente, sem diferença estatística entre si. Nos testes de redução de ZON através da atuação da PO obtida de FA com atividade enzimática de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$ não foi observado redução da concentração dos níveis de ZON da micotoxina. Este comportamento pode ser justificado pelo fato da enzima não apresentar alto grau de purificação quando comparada à enzima comercial, e que neste extrato enzimático purificado por pela técnica de TPP pode conter interferentes que atuam como inibidores enzimáticos. Diante dos resultados deste estudo, foi avaliado a cinética de redução de ZON da PO extraída de FA durante 1440 min com atividade enzimática de 6 U mL^{-1} , ou seja, atividade 10 vezes maior do que a utilizada nos testes anteriores.

Tabela 11- Cinética de redução de ZON em meio reacional mediante ação da PO comercial e PO obtida de FA e FS

Tempo (min)	Redução de ZON* (%)			
	PO comercial (0,6 U mL ⁻¹)	PO obtida de FA (0,6 U mL ⁻¹)	PO obtida de FA (6 U mL ⁻¹)	PO obtida de FS (6 U mL ⁻¹)
0	0 (0) ^f	0	12,9 (13,4) ^e	n.a
15	12,3 (13,0) ^e	0	34,9 (12,2) ^{cd}	n.a
30	11,0 (10,2) ^e	0	n.a	n.a
60	34,0 (4,9) ^d	0	46,1 (3,3) ^{ab}	n.a
120	49,3 (0,8) ^c	0	47,4 (13,9) ^a	n.a
240	57,1 (4,6) ^b	0	27,9 (12,9) ^d	n.a
480	68,3 (5,2) ^a	0	n.a	n.a
1440 (24h)	69,9 (4,7) ^a	0	37,5 (1,0) ^{bc}	30,6 (4,2)

*Resultados expressos com Média (CV). CV- CV-coeficiente de variação (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (Tukey HSD, p<0,05). n.a- Não avaliado

Os resultados da cinética de redução da concentração de ZON não diminuíram gradualmente pela ação da PO obtida de FA, houve variações ao longo da cinética, o que pode ser justificado pela possível falta de homogeneidade durante a retirada das amostras. Os maiores percentuais de redução da micotoxina verificados, sem diferença estatística, foram de 46,1 e 47,4 durante 60 e 120 min, respectivamente. A redução de ZON através da PO obtida de FS em 1440 min reduziu a concentração em 30,6% com coeficiente de variação de 4,2. A cinética de redução da PO extraída de FS ao longo de tempo de 1440 min não foi verificada, devido a baixa atividade enzimática obtida após purificação.

Nora (2015) empregou a PO comercial e a PO obtida de FA para redução de OTA em meio reacional, sendo que resultou na redução de 59% em 300 min e 41% durante 1440 min de ação enzimática, respectivamente. Neste estudo também foi observado a adsorção de 2,7% da OTA pela PO de FA. Feltrin empregou a PO comercial, a PO obtida de FA e a PO obtida de FS, e demonstrou que a PO comercial reduziu em 55% a concentração de DON após 60 min de reação, entretanto após 180 min a concentração inicial foi verificada novamente, evidenciando a possível adsorção da micotoxina ou formação de um composto de degradação com mesma massa molecular. Das e Mishra (2000) produziram AFLA B₁ por *Aspergillus flavus* ATCC 15517 e após aplicação de PO comercial houve a detoxificação de até 60% em testes *in vitro*.

Cabe ressaltar que o emprego da enzima PO na redução dos níveis de ZON ainda não foi relatado, assim esses resultados são promissores para utilização da enzima como um

agente de redução de ZON. Adicionalmente, a maior redução de ZON foi observada quando utilizado a enzima comercial que reduziu a concentração em 69,9% da em meio reacional enzimático.

5.7 ESTUDO DA AÇÃO DA ENZIMA PO DESNATURADA NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ZON

O efeito da redução da concentração da ZON pelas enzimas desnaturadas (PO comercial e da PO obtida de FA e de FS) estão apresentados na Tabela 12. Ao verificarmos os resultados observamos que as enzimas obtidas de FA e FS reduzem a micotoxina em 44,3 e 63,1%, respectivamente. Nos testes de redução da concentração de ZON com a enzima PO ativa obtida de FA e FS reduziram em 47,4 e 30,6%, que pode ser explicada pela possível ação de outras enzimas presentes no extrato enzimático e que não formaram desnaturadas termicamente. Adicionalmente, os testes confirmaram que a PO comercial desnaturada não reduziu a concentração da micotoxina, com variação da redução em 0,1% entre os testes, variação dentro dos desvios descritos no trabalho e aceitos por órgão regulamentadores.

Desta forma, pode-se dizer que é provável que o extrato enzimático obtido de FA e FS, é composto por um complexo enzimático capaz de reduzir a concentração de ZON, diferente da enzima PO comercial, altamente purificada, quando desnaturada.

Tabela 12- Redução da concentração de ZON pela ação da enzima PO desnaturada

Amostra	Redução* (%)
PO comercial desnaturada	0,1 (0,1) ^a
PO obtida de FA desnaturada	44,3 (1,8) ^b
PO obtida de FS desnaturada	63,1 (10,9) ^c

*Resultados expressos com Média (CV). CV- coeficiente de variação (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (Tukey HSD, p<0,05).

5.8 ANÁLISE DE REDUÇÃO DE ZON POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO E DE CROMATOGRAFIA LC-ESI-MS/MS

A técnica de FTIR foi realizada para identificar e caracterizar os grupamentos funcionais presentes na estrutura química de ZON e correlacionar com as amostras onde ZON foi submetida a redução dos níveis através da aplicação da enzima PO comercial e da PO extraída de FA e de FS, correspondente ao tempo de 24 h de ação enzimática. Posteriormente,

as amostras foram analisadas em LC-ESI-MS/MS no modo de varredura (*scan*) para confirmação do íon molecular de ZON e β -ZOL.

Na Tabela 13 estão demonstrados os grupamentos funcionais com os números de ondas (cm^{-1}) de absorção para cada pico descrito na literatura e verificados mediante o espectro de FTIR para a ZON (Figura 15). A conferência dos picos presentes no espectro foi possível através visualização da estrutura química da micotoxina ZON (Figura 1).

Tabela 13- Grupamentos funcionais e número de ondas de absorção descritos na literatura e presentes no espectro infravermelho (FTIR) para ZON

Grupamentos funcionais	Número de ondas (cm^{-1})*	Referência	Número de ondas de absorção (cm^{-1})**
OH livres	3600	Pavia et al. (2010) e Silverstein, Webster e Kiemle (2007)	3584 e 3697
C=O do éster	1735 a 1750	Pavia et al. (2010) e Silverstein, Webster e Kiemle (2007)	1750
C=O da lactona	1705 a 1720	Pavia et al. (2010) e Silverstein, Webster e Kiemle (2007)	1707
C-O do éster	1000 a 1300	Pavia et al. (2010)	1063; 1144; 1190
C=C em anéis aromáticos	1450 a 1600	Barbosa (2007) e Pavia et al. (2010)	1595
CH ₃	1375	Pavia et al. (2010) Silverstein, Webster e Kiemle (2007)	1419
CH ₂	3000	Pavia et al. (2010)	2883 e 2970
CH	650 a 900	Pavia et al. (2010)	picos de 695 a 937

*Dados descritos na literatura. **Dados experimentais.

De acordo com os fundamentos que a literatura descreve em conjunto com a estrutura química da ZON (Figura 1) e dos picos exposto no espectro FTIR (Figura 10a), pode-se analisar que os grupamentos OH presentes no anel aromático foram observados a 3584 e 3697 cm^{-1} , o primeiro pico (3697 cm^{-1}) com bandas de intensidade aguda. O grupamento carbonila presente no éster e no C6 foram verificadas no número de ondas de 1750 e 1707 cm^{-1} , respectivamente, sendo este pico muito intenso e largo, aspecto que ocasionou a saída dos dois picos em somente uma banda, ou seja, picos sobrepostos. A presença da ligação C-O do éster é possível ser comprovada através de vários picos de absorção em 1063; 1144 e 1190 cm^{-1} . As

frequências de absorção com intensidade aguda de 1485 e 1595 cm^{-1} , podem ser atribuídas as ligações C=C, encontradas no anel aromático e na lactona. Os demais grupamentos como CH, CH_2 e CH_3 são observados em picos de fraca intensidade de 695 a 937; 2883 a 2970 e 1419 cm^{-1} , respectivamente.

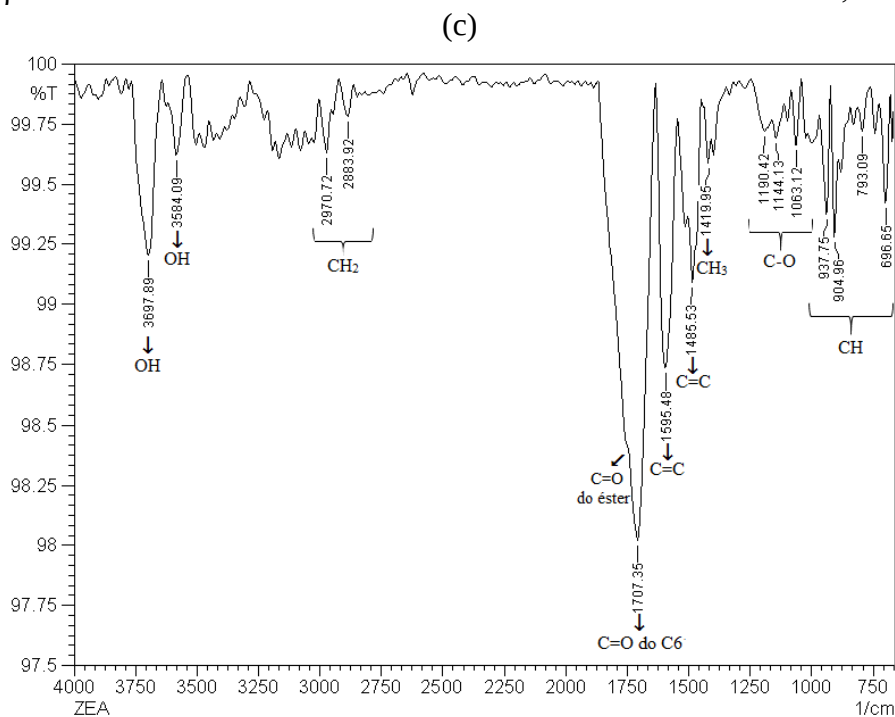
Após a confirmação dos grupamentos químicos presentes na estrutura da ZON, foram efetuadas as análises das amostras após atuação enzimática. Na Figura 11a, está apresentado o espectro FTIR da ZON quando exposta a ação da enzima PO comercial. A principal característica encontrada é a ausência das bandas de absorção das OH comparado ao FTIR do padrão de ZON (Figura 10a) em número de ondas de 3584 e 3697 cm^{-1} , este resultado pode ser justificado mediante ao conceito de ação de oxidorredução da PO. Segundo Clemente e Pastore (1998) e Damoradan et al. (2010), a PO pertence ao grupo das enzimas oxidoredutases, sendo capaz de catalisar um grande número de reações oxidativas usando peróxido como substrato, ou, em alguns casos, o oxigênio como um aceptor de hidrogênio. Com relação, aos grupamentos C=O, do éster e da cetona do C6, pode-se verificar a presença nas bandas de absorção correspondentes nos número de ondas de 1747 e 1700 cm^{-1} , respectivamente. As ligações C=C foram observadas em bandas de aproximadamente 1544 a 1656 cm^{-1} . Os picos equivalentes da presença de C-O; CH, CH_2 e CH_3 podem ser observados em 1060 e 1237; de 773 a 992; de 2921 e 2981 e 1355 cm^{-1} , respectivamente.

Na Figura 12a e 12b estão apresentados os espectros FTIR da ação da PO de FA e FS, respectivamente. Em ambos testes é possível observar as bandas de absorção correspondentes as ligações OH, com números de ondas de 3540 e 3640 cm^{-1} e 3541 e 3647 cm^{-1} , para os espectros FTIR da atuação da PO de FA e FS, respectivamente. A cetona do C6 da lactona é verificado com número de onda de 1721 cm^{-1} no espectro FTIR da PO de FS (Figura 12b), e no FTIR da PO de FA o pico não foi encontrado (Figura 12a). Nos dois espectros é possível verificar a ausência dos picos referentes a ligação C=O do éster e que essa absorção poderia ter sido afetada devido a presença de um pico de forte intensidade em aproximadamente 1630 cm^{-1} . Assim, um aspecto importante é que a absorção de tais grupamentos pode ter sido influenciada pela presença de interferentes nos extratos enzimáticos comprovado pelo baixo fator de purificação. A ligação C=C do anel aromático e da lactona são confirmadas através das bandas de absorção de 1461 e 1469 cm^{-1} , no FTIR da ação de PO de obtida de FA e de FS, respectivamente. As ligações C-O, CH, CH_2 e CH_3 do FTIR da PO obtida de FA (Figura 12a) foram verificadas em bandas de absorção de 1461; de 761 a 928; 978 e 1395 cm^{-1} , respectivamente. Os mesmos grupamentos (C-O, CH, CH_2 e CH_3) foram verificados no FTIR da PO obtida de FS (Figura 12b), sendo os picos apresentadas nos números de bandas

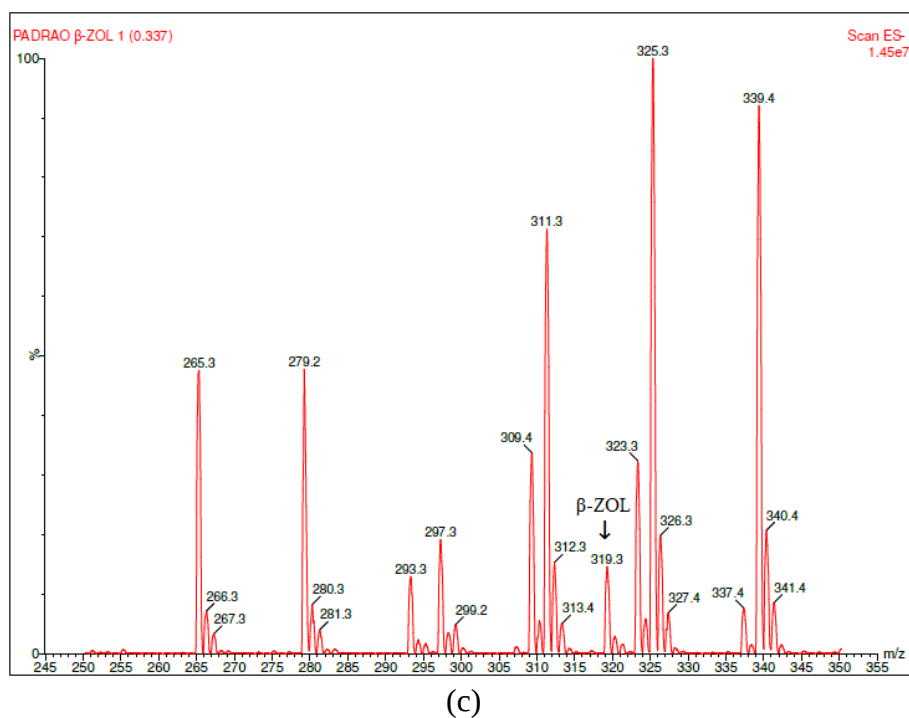
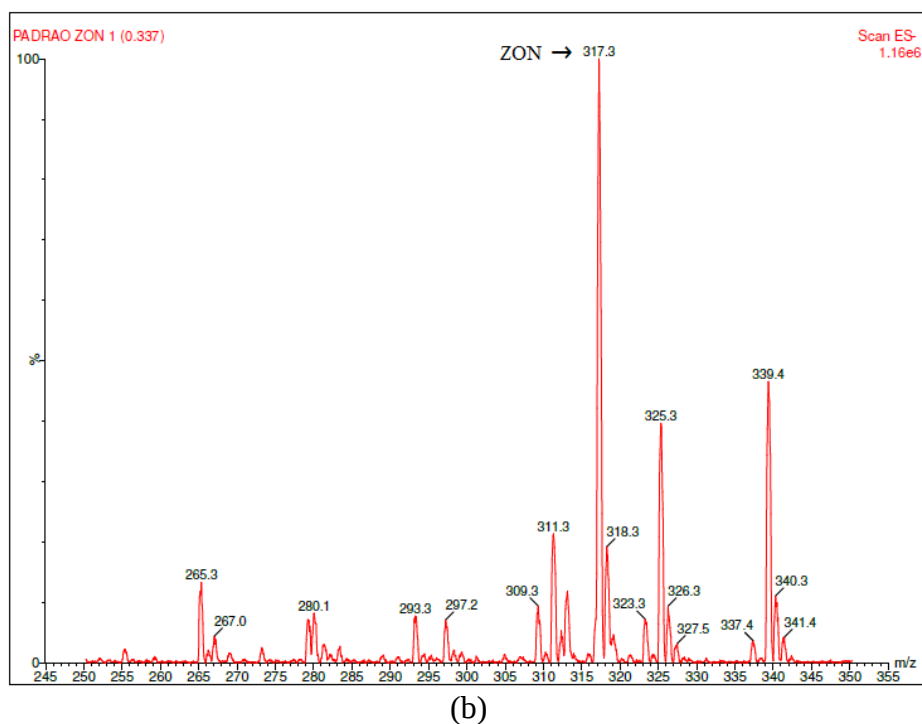
de 1230; 898 a 929; 2858 e 3176; 1396 cm^{-1} , respectivamente. A técnica de FTIR permitiu a caracterização dos grupamentos constituintes da estrutura química da ZON e das amostras em que a mesma foi submetida a redução com a PO. Através das informações obtidas dos espectros pode-se inferir que somente a enzima comercial causou modificações na molécula da micotoxinas, através da oxidorredução das hidroxilas.

A análise cromatográfica por LC-ESI-MS/MS no modo *scan* de ionização Electrospray negativo (ESI-) foi realizada a fim de confirmar o íon molecular correspondente a concentração do padrão de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de ZON, de seu metabólito de degradação (β -ZOL) e também das amostras resultantes dos testes de redução da concentração de ZON pela ação das enzimas. A Figura 10 mostra os espectros de massas do padrão de ZON (espectro b) e β -ZOL (espectro c). Segundo, Buranatragoon et al. (2015) e Qian et al. (2015) a massa molecular de ZON e β -ZOL é de 318,3 e 320,3 g mol^{-1} , respectivamente.

Figura 10- Espectro infravermelho (FTIR) do padrão ZON (a), espectro de massas de ZON em LC-ESI-MS/MS com íon molecular detectado em 317,3 no modo ESI- (b) e espectro de massas de β -ZOL em LC-ESI-MS/MS com íon molecular detectado em 319,3 no modo ESI-

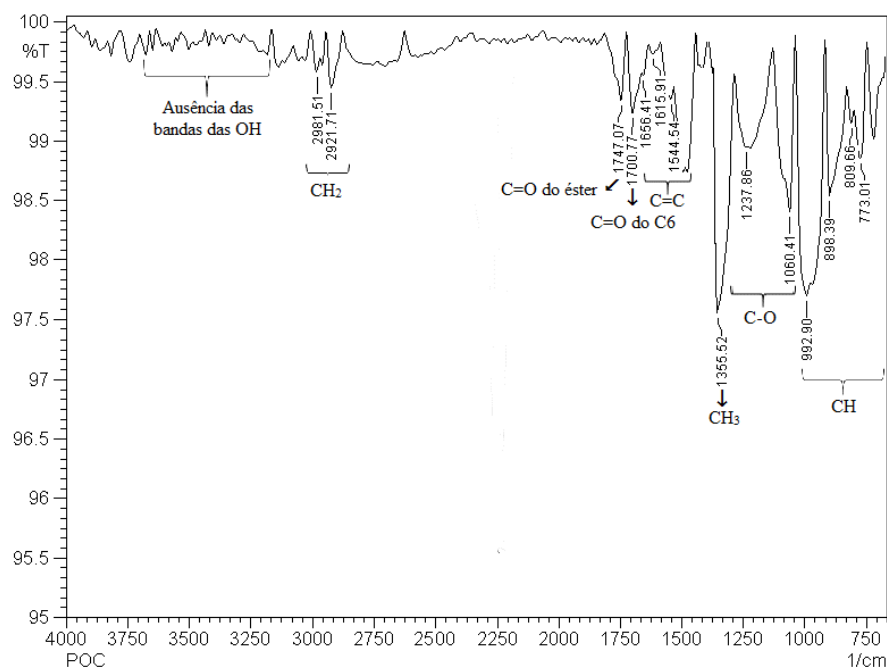


(a)

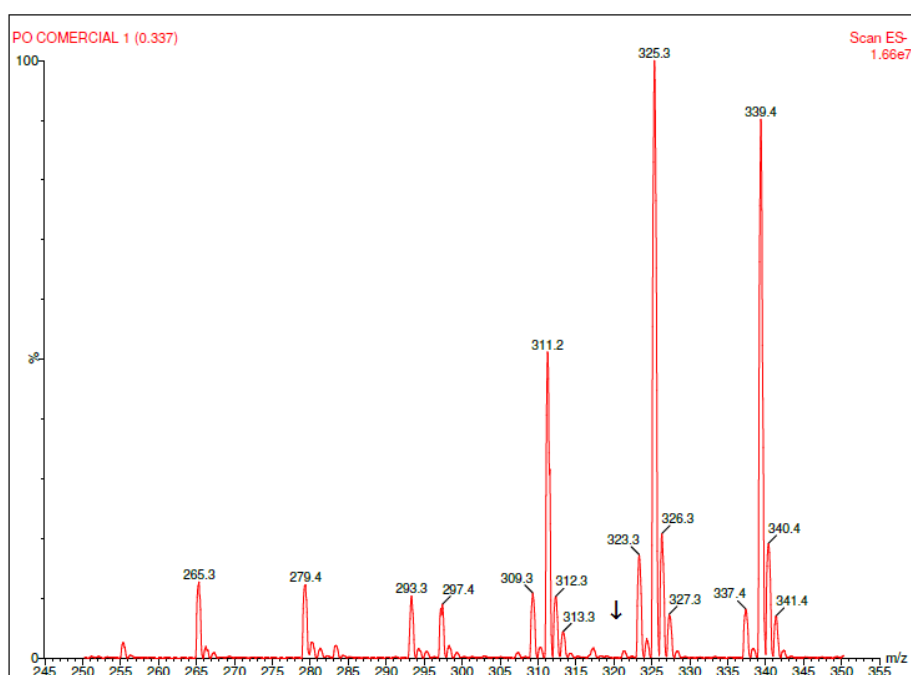


Na Figura 11b, é possível observamos o espectro de massas da amostra de redução de ZON através da aplicação da PO comercial, sendo que não é constatado o pico corresponde ao íon molecular da massa molecular de ZON ($318,3 \text{ g mol}^{-1}$) e tampouco o íon molecular de β -ZOL ($320,3 \text{ g mol}^{-1}$). A ausência do íon molecular se dá pela redução da concentração abaixo do limite de detecção e sensibilidade do equipamento, sendo assim a ZON foi reduzida em um composto que não corresponde a um dos seus metabólitos de degradação.

Figura 11- Espectro infravermelho (FTIR) da ação da PO comercial na ZON (a) e espectro de massas em LC-ESI-MS/MS da ação da PO comercial na ZON no modo ESI- (b)



(a)

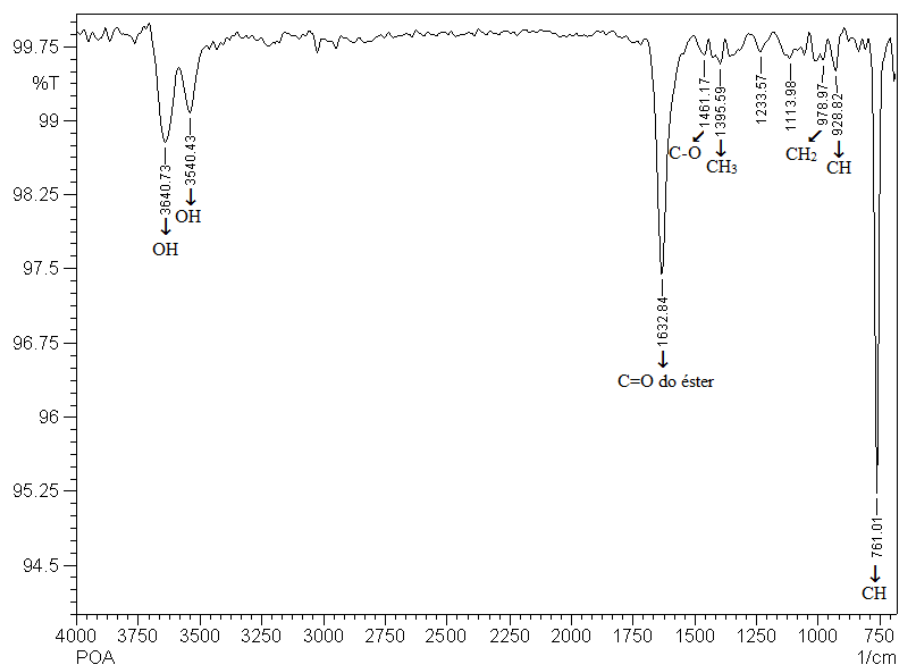


(b)

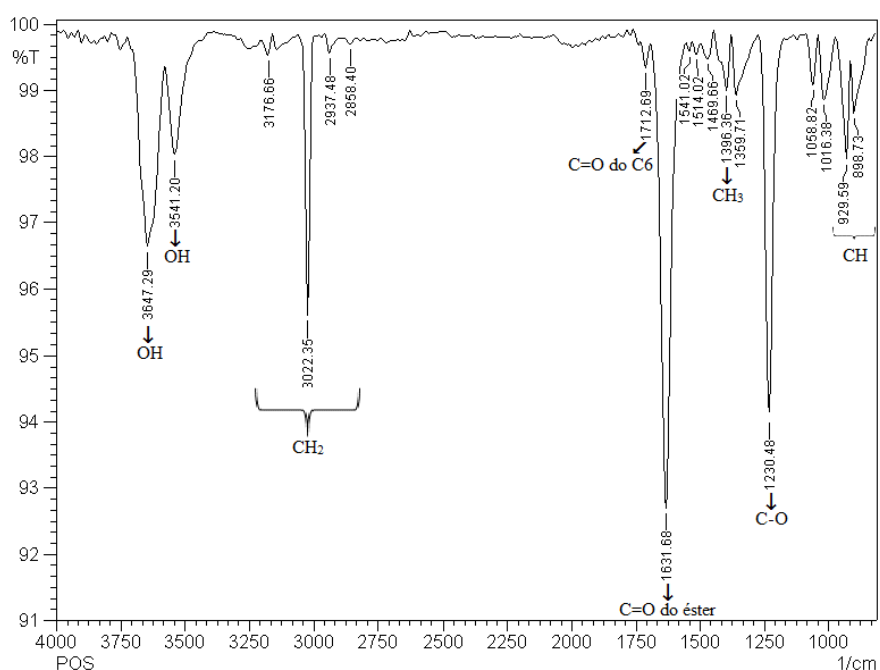
Nas amostras de redução de ZON mediante ação das enzimas PO obtida de FA (Figura 12 c) e de FS (Figura 12 d) o íon molecular pertencente a ZON ($318,3 \text{ g mol}^{-1}$) pode ser observado, porém o pico correspondente ao íon de β -ZOL ($320,3 \text{ g mol}^{-1}$) não foi detectado. A

presença do íon é decorrente da menor redução da concentração de ZON por estas enzimas, dentro da faixa de detecção do íon confirmando a presença da micotoxina no meio reacional.

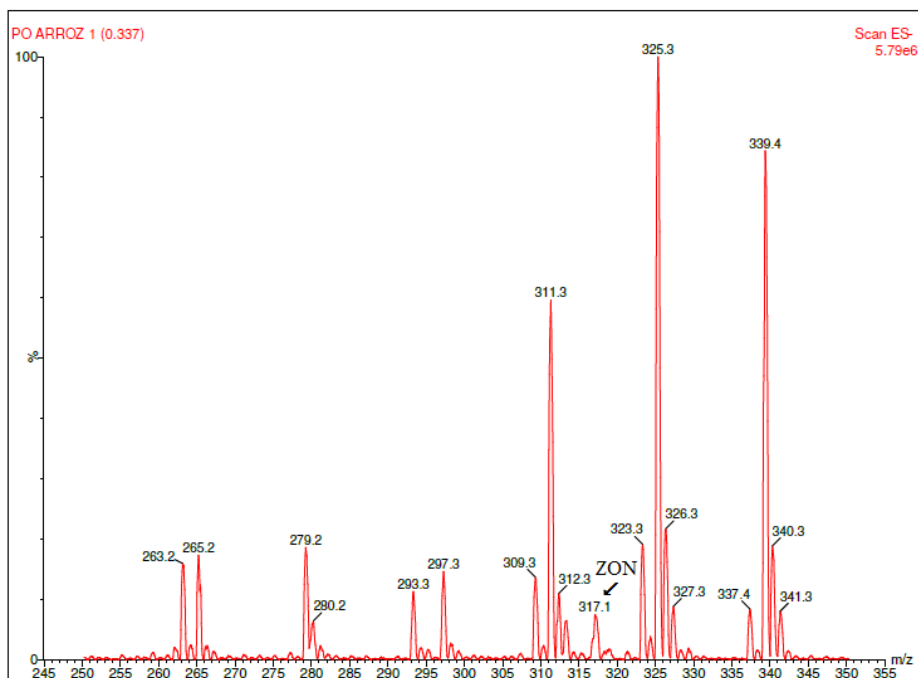
Figura 12- Espectro infravermelho (FTIR) da ação da PO obtida FA (a) e de FS (b) na ZON e espectro de massas em LC-ESI-MS/MS ação da PO obtida de FA (c) e de FS (d)



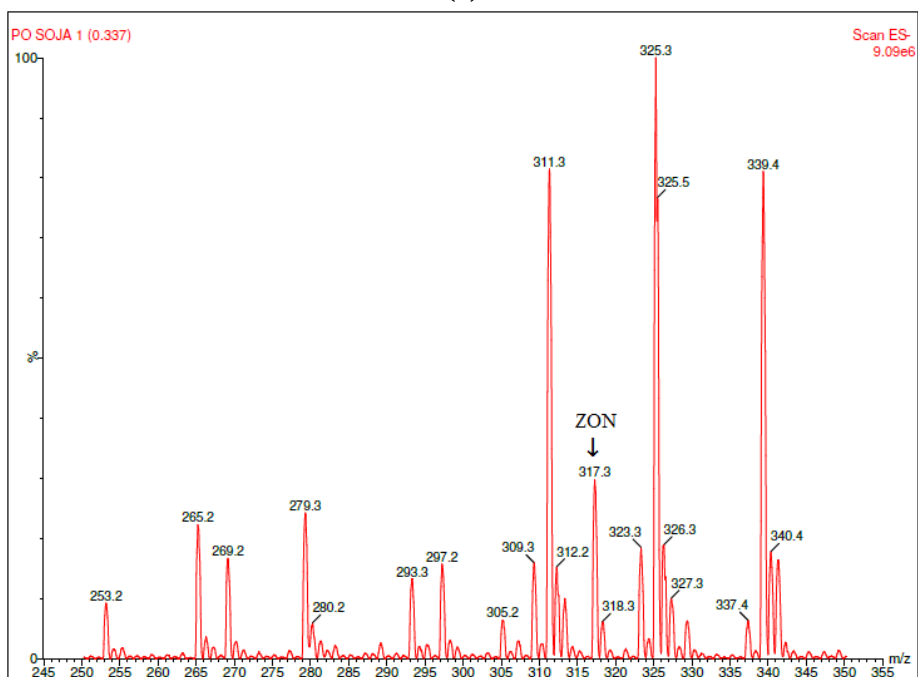
(a)



(b)



(c)



(d)

5.9 ESTUDO DA REDUÇÃO DE ZON EM AMOSTRAS DE CERVEJA

Posteriormente, a compreensão da atuação da PO comercial e PO obtida de FA e de FS foi demonstrado que a enzima comercial, na atividade enzimática de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$, reduziu a concentração de ZON em 68,3 e 69,9% durante 480 e 1440 min, respectivamente. A redução da concentração de ZON na cerveja foi verificada mediante a atuação da PO comercial na

atividade enzimática de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$ durante 480 min, de acordo com a cinética enzimática. A escolha do tempo de redução dos testes foi devido não haver diferença estatística entre 480 e 1440 min (24 h) de reação.

Antecedendo os testes de redução de ZON foi avaliado a recuperação da micotoxina na matriz (cerveja), pois esta se diferencia na composição do meio aquoso e tamponantes utilizado nos testes anteriores. A recuperação foi realizada através da extração por partição líquido-líquido com clorofórmio. A Tabela 14 apresenta os níveis de recuperação de ZON das amostras da cerveja, que estão de acordo os intervalos aceitáveis segundo a Comissão Europeia (2006) e ANVISA (2003), 70 a 120% e precisão de ± 20

Rodríguez-Carrasco e colaboradores (2015) estudaram a ocorrência de micotoxinas produzidas por fungos *Fusarium* em cervejas utilizando para extração o método QuEChERS com acetonitrila e partição pela adição de MgSO_4 e NaCl, seguida de quantificação através de CG/MS. Os níveis de recuperação de ZON avaliados pelos pesquisadores foram de 50, 100 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ com recuperação (%) e desvio padrão relativo (%) de 75 (5); 73 (6) e 69 (9), respectivamente. Rubert et al. (2013) analisaram a extração de ZON e de outras micotoxinas de amostras de cerveja do tipo Stout, Red Ale, Ale e Pale Lager pela técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida usando cartuchos Oasis HLB. A recuperação alcançada neste estudo foi acima de 80% para todos os tipos de cerveja, com desvio padrão relativo menores que 17%. É importante ressaltar a redução de etapas durante a extração de ZON em amostras de cerveja quando comparado com os métodos descritos na literatura, o que resulta em menor custo e rapidez de análise, além da redução do tempo de exposição do analista a solventes e micotoxina.

Tabela 14- Recuperação de ZON de amostras de cerveja tipo Pilsen

Amostra	Recuperação* (%)		
	Níveis de concentração de ZON ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	0,1	0,3	0,9
Cerveja tipo Pilsen	83,1 (17,4)	84,9 (15,1)	97,3 (14,1)

*Resultados expressos como Média (CV). CV-coeficiente de variação (n=3).

A cerveja tipo Pilsen utilizada nos testes de redução da concentração ZON estava naturalmente contaminada pela micotoxina com nível de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. A contaminação de ZON em amostras de cerveja foi semelhante a concentrações citadas na literatura. Antep e Merdivan (2012), Bauer et al. (2016) e Nkwe, Taylor e Siame (2005) detectaram ZON em amostras de cerveja em níveis de 20, 2 e $201 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A redução da concentração da micotoxina foi de 5,8% com coeficiente de variação de 23,2%. O comportamento da PO comercial frente a redução de ZON na cerveja foi prejudicada devido a fatores como pH da amostra e pela complexidade da matriz quando comparada aos meios reacionais.

Segundo Venturini Filho (2010) a cerveja é uma bebida constituída principalmente de água, sais minerais, lipídeos, carboidratos, proteínas, fibras solúveis, vitaminas do complexo B entre outros. Coelho, Salgado e Ribeiro (2008) citam que a velocidade de uma reação enzimática pode ser modificada pela presença de outros compostos diferentes do substrato, que são chamados de reguladores. Os reguladores negativos são inibidores que reduzem a velocidade de reação de forma reversível, enquanto os reguladores inativadores reduzem a velocidade da reação de forma irreversível.

Koblitz (2010) cita que a eficiência da atividade enzimática da PO está relacionada ao pH do meio, visto que, em meios ácidos a desnaturação da enzima é mais rápida. Damoradan et al. (2010) citam que as enzimas têm dependência característica de estabilidade em relação ao pH, e que duas tendências gerais merecem menção: a primeira é que o intervalo de pH de estabilidade enzimática no geral é mais amplo que o intervalo de pH para atividade enzimática, e a segunda é que a estabilidade da enzima diminui rapidamente em valores de pH de desestabilização. Conforme Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), os efeitos do pH na atividade enzimática devem-se à necessidade de manter os grupos críticos do centro ativo no estado de ionização correto para que a reação ocorra, ou seja, neste pH a reação é conduzida em velocidade máxima.

Baseado nestes dados e nas especificações da *Sigma Chemical Company* (2016) onde é descrito que o pH ótimo de estabilidade da PO comercial é de 6 a 6,5 e o pH da atividade enzimática é de aproximadamente 7,5 é admitido que a atuação da PO sobre a ZON pode ter sido influenciada pelo pH da cerveja que era de 4,4. Da mesma maneira, a bebida é uma matriz complexa com a presença de muitos constituintes que podem atuar como inibidores enzimáticos ou como substratos para a enzima. É importante ressaltar a variação da concentração destes compostos, normalmente presentes em gramas para cada 100 mL, quando comprado a presença em trações de ZON fortificada, em torno de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Portanto, apesar da baixa redução de ZON em amostra comercial de cerveja tipo Pilsen (cerca de 5,8%), a aplicação da PO pode ser considerada promissora após otimização das condições de aplicação da enzima em tal bebida, contribuindo com a segurança alimentar e consequentemente diminuição dos riscos à saúde da população quando expostos ao consumo deste produto contaminado.

6. CONCLUSÃO

As condições cromatográficas para detecção, separação e quantificação de ZON e β -ZOL otimizadas em CLAE-FL permitiram a análise das micotoxinas. Os parâmetros de validação demonstraram a eficiência analítica conforme estabelecido na literatura.

A avaliação do meio reacional enzimático evidenciou que a PO obtida de FA e FS apresentaram maior atividade enzimática em meio aquoso e meio tamponante, respectivamente. A concentração de ZON permanece estável durante 24 h de incubação em tais meios reacionais.

A PO obtida de FA em meio reacional aquoso e a PO obtida de FS em meio reacional tamponante com atividade de 6 U mL^{-1} reduziram a concentração de ZON em 47,4 e 30,6%, respectivamente.

A PO comercial com atividade enzimática de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$ em meio reacional tamponante reduziu a concentração de ZON em cerca de 69,9% em 1440 min (24 h). O mecanismo de redução foi confirmado através da identificação dos grupamentos químicos mediante a técnica de FTIR e LC-ESI-MS/MS proporcionando a caracterização da ação da PO comercial, verificando-se que a principal atuação da enzima foi sobre as hidroxilas presentes na molécula da micotoxina, corroborando com a atuação oxidorrredutora da enzima.

A PO comercial reduziu a concentração da ZON em amostras de cerveja tipo Pilsen em 5,8%, necessitando de otimização das condições para ação enzimática neste meio, visando o aumento dos níveis de redução.

Em suma, foi confirmado que a PO comercial apresenta capacidade de redução dos níveis de ZON em sistema modelo e em amostras de cerveja. E que para a utilização das enzimas PO obtida de FA e de FS as mesmas devem ser purificadas eficientemente, afim de aumentar os níveis de redução da micotoxina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBES, S.; SALAH-ABBES, J. B.; OUANES, Z.; HOUAS, Z.; OTHMAN, O.; BACHA, H.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R. Preventive role of phyllosilicate clay on the immunological and biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 8, p. 1251-1258, 2006.
- ABD ALLA, E. S. Zearalenone: toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 41, n. 6, p. 362-365, 1997
- ABID-ESSEFI, S.; OUANES, Z.; HASSEN, W.; BAUDRIMONT, I.; CREPPY, E.; BACHA, H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 4, 467-474, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 28 de janeiro de 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA -ANVISA. Resolução RDC Nº 59, de 26 de fevereiro de 2013. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, n. 252, ISSN 1677-7042, 2013.
- AMISSAH, J.G.N.; ELLIS, W.O.; ODURO, I.; MANFUL, J.T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control**, v. 14, p. 21-24, 2003.
- ANTEP, H. M.; MERDIVAN, M.; Development of new dispersive liquid-liquid microextraction technique for the identification of zearalenone in beer. **Analytical Methods**, v. 4, n. 12, p. 4129-4134, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC INTERNATIONAL: Official Methods of Analysis of International. 16th Edition, v. 2, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC INTERNATIONAL: Official Methods of Analysis of International. 17th, 2000. 1 CD-ROM.
- AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone binding activity of absorbent materials during passage through a dynamics in vitro gastrointestinal model. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 41, n. 10, p.1283-1290, 2003.
- AVANTAGGAI TO, G., SOLFRIZZO, M., VISCONTI, A.. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379–388, 2005.
- BAGCHI, T. B.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, K. Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. **Food Chemistry**, v. 191, p. 21-27, 2016.
- BAKOS, K.; KOVÁCS, R.; STASZNY, Á.; SIPOS, D. K.; URBÁNYI, B.; MÜLLER, F.; CSENKI, Z.; KOVÁCS, B. Developmental toxicity and estrogenic potency of Zearalenona in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, p. 13-21, 2013.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora da UFV, 2007.

BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin- contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.

BAUER, J.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**, v. 63, p. 135-139, 2016.

BELHASSEN, H.; JIMÉNEZ-DÍAZ, I.; GHALI, R.; GHORBEL, H.; MOLINA-MOLINA, J. M.; OLEA, N.; HEDILI, A. Validation of a UHPLC–MS/MS method for quantification of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol and zearalanone in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 962, p. 68-74, 2014.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BETINA, V. **Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification**. Amsterdam: Elsevier, p. 528, 1984.

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 3-4, p. 265-282, 2007.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FABERJ: FCT, 2008.

BRETANHA, C. C. **Caracterização de cultivo submerso com *Saccharomyces cerevisiae* para produção de biomarcadores micotoxicológicos**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

BUENO, D. J.; DI MARCO, L.; OLIVER, G.; BARDÓN, A. In vitro binding of zearalenone to different adsorbents. **Journal of Food Protection**, v. 68, p.613–615, 2005.

BUFFON, J. G. **Biodegradação de deoxinivalenol por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.: um estudo bioquímico de degradação e toxicidade**. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Universidade Federal do Rio Grande, 2008.

BURANATRAGOOL, K.; POAPOLATHEP, S.; ISARIYODOM, S.; IMSILP, K.; KLANGKAEW, N.; POAPOLATHEP, A. Dispositions and tissue residue of zearalenone and its metabolites -zearalenol and -zearalenol in broilers. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 351–356, 2015.

BURNETTE, F. S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: A review. **Journal Food Science**, v.42, n. 1, p.1-6, 1977.

CAMPOS, Â. D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Comunicado Técnico 87, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pelotas, RS, 2003.

CELIUS, T.; HAUGEN, T.B.; GROTMOL, T.; WALTHER, B.T. A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.107, n.1, p.63–68, 1999.

CHANG, W.M; LIN, J.K. Transformation of zearalenone and Zearalenol by rat erythrocytes. **Food Chemistry Toxicology**, v. 22, n.11, p. 887–891, 1984.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas, v. 32, n. 2 p. 167- 171, 1998.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis: EPUB, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP. 2006.

COMISSÃO EUROPEIA (CE)- Regulamento n° 401/2006 da Comissão, de 23 de Fevereiro de 2006. Métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. Disponível em <<http://eur-lex.europa.eu/pt/index.htm>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB)- Acompanhamento da safra brasileira “Grãos” - v 3, Safra 2015, n°5, Quinto levantamento, Fevereiro de 2016. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em 29 de fevereiro de 2016.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, p. 309-313, 2000.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic Peroxidase from Pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 1-2 p. 119-126, 2009.

DORS, G. C.; CALDAS, S. S.; HACKBART, H. C. D. S.; PRIMEL, E.; FAGUNDES, C. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Fungicides and the Effects of Mycotoxins on Milling Fractions of Irrigated Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1985-1990, 2013.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 270–282, 2010.

DUNFORD, M. B. Heme Peroxidases. **John Wiley & Sons**, New York, p. 507, 1999.
EDWARDS, S.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. The effects of zearalenone on reproduction in swine II. **Theriogenology**, v.28, n. 1, p.51-58, 1987.

FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de Deoxinivalenol**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

FINK-GREMMELS, J; MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen Zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 326-341, 2007.

FLORES, J. C. J. **Produção de biomarcadores para Deoxinivalenol por *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo submerso**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; FONTES, M. R. V., GARDA-BUFFON, J. Redução de Zearalenona por Emprego da Enzima Peroxidase. In: Congresso Argentino de Ciencia y Tecnologia de Alimentos (CYTAL), XV, 2015. **Anais, Buenos Aires, Argentina: Associação Argentina de Tcnologos Alimentarios, 2015**. CD, ISBN: 97898722165-7-3.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L., BALIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in a submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p.198-203, 2011.

GARDA-BUFFON, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecnos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n. 4, p.657-663, 2004.

GNONLONFIN, G. J. B.; HELL, K.; ADJOVI, Y.; FANDOHAN, D.; KOUDANDE, D. O.; MENSAH, G. A.; SANI, A.; BRIMER, L. A Review on Aflatoxin Contamination and Its Implications in the Developing World: A Sub-Saharan African Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 349–365, 2013.

GUL, K.; YOUSUF, B; SINGH, A. K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6; p. 24-30, 2015.

HAMID, M.; REHMAN, K. U. Potencial applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177-1186, 2009.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003.

HARKAI, P.; SZABÓ, I.; CSERHÁTI, M.; KRIFATON, C.; RISA, A.; RADÓ, J.; BALÁZS, A.; BERTA, K.; KRISZT, B. Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 108, p. 48-56, 2016.

HASSEN, W.; AYED-BOUSSEMA, I., OSCOZ, A. A.; LOPEZ, A. D. C.; BACHA, H. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. **Toxicology**, v. 232, n. 3, p. 294-302, 2007.

HE, M.; LI, Y.; PI, F.; JI, J.; HE, X.; ZHANG, Y.; SUN, X. A novel detoxifying agent: Using rice husk carriers to immobilize zearalenone-degrading enzyme from *Aspergillus niger* FS10. **Food Control**, v.68, p. 271-279, 2016.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. B. **Inibição de linhagens do complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais e sintéticos**. 2014. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. D. S.; SOUZA, M. M. D.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona em arroz natural e parboilizado e sua frações utilizando QuEChERS E HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1244-1249, 2012.

HOLLINGER, K.; EKPERIGIN, H.E. Mycotoxicosis in food producing animals. The Veterinary clinics of North America. **Food Animal Practice**, v.15, n.1, p.133-165, 1999.

HUANG, L. C.; ZHENG, N.; ZHENG, B. Q.; WEN, F.; CHENG, J. B.; HAN, R. W.; XU, X. M.; LI, S. L.; WANG, J.Q. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and a-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 146, p. 242–249, 2014.

HUBER, C.; PREIS, M.; HARVEY, P. J.; GROSSE, S.; LETZEL, T.; SCHRÖDER, P. Emerging pollutants and plants e Metabolic activation of diclofenac by peroxidases. **Chemosphere**, v. 146, p. 435-441, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, p. 35, 2007. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf>. Acesso: em 15 de janeiro de 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, v. 56, p. 398–432, 1993.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY- IUPAC. Sixth International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Prtoria, Republic of South Africa. Pure and Applied Chemistry, v.58, n. 2, 1986.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; JINAP, S.; RASHID, U. Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 223-226, 2014.

IQBAL, S. Z.; NISAR, S.; ASI, M. R.; JINAP, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. **Food Control**, v. 43, p. 98-103, 2014.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342–362, 2007.

JUAN, C.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.134, p. 2389–2397, 2012.

KIM, H-W.; LEE, Y. J; KIM, Y. H. B. Efficacy of pectin and insoluble fiber extracted from soy hulls as a functional non-meat ingrediente. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 1071-1077, 2015.

KIRINČIČ, S.; ŠKRJANC, B.; KOS, N.; KOZOLC, B.; PIRNAT, N.; TAVČAR-KALCHER, G. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia e Official control of foods in the years 2008 and 2012. **Food Control**, v. 50, p. 157-165, 2015.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends Biotechnology**, v. 15, n. 3. P. 97-101, 1997.

KOBLITZ, M. G. M. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KOHAICH, K.; BAAZIZ, M. New investigations on the guaiacol peroxidase of *Opuntia ficus indica* L. and its modulation by ascorbic acid and copper. Towards an optimization of quantitative and qualitative tests. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 26–32, 2015.

KOSAWANG, C.; KARLSSON, M.; VÉLEZ, H.; RASMUSSEN, P. H.; COLLINGE, D. B.; JENSEN, B.; JENSEN, D. F. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. **Fungal Biology**, v. 118, p. 364-373, 2014.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, n.3, p. 253-306, 1987.

KULYS, J.; GORANINA, R. I. Peroxidase catalyzed phenolic compounds oxidation in presence of surfactant Dynol 604: A kinetic investigation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6-7, p. 368-372, 2009.

KUZDRALIŃSKI, A.; SOLARSKA, E.; MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **Food Control**, v. 29, p. 22-24, 2013.

LACERDA, D. B. C. L; SOARES, M. S. J.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, M. V. L.; SILVA-LOBO, V. L.; CAMPOS, M. R. H.; SIQUEIRA, B. S. Qualidade de farelos de arroz

cru, extrusado e parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4. p. 521-530, 2010.

LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 51-60, 2009.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Editora do Autor, 1997.

LEITE, C. C.; GARDA-BUFFON, J.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Análises quali e quantitativas de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz por CCD e CCDAE. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1955-1960, 2012.

LEMKE, S. L.; MAYURA, K.; OTTINGER, S.E.; MCKENZIE, K. S.; WANG, N.; FICKEY, C.; KUBENA, L. F.; PHILLIPS, T. D. Assessment of the estrogenic effects of zearalenone after treatment with ozone utilizing the mouse uterine weight bioassay. **Journal of Toxicology and Environmental Health – Part A**, v. 56, n. 4, p. 283-295, 1999.

LIU, J-Z.; WANG, T-L.; JI, L-N. Enhanced decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 3-4, p. 81-86, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LU, Q.; LIANG, X.; CHEN, F. Detoxification of Zearalenona by viable and inactivated cells of *Planococcus* sp. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 191-195, 2011.

LUPETTI, K. O. **Utilização de polifenol oxidase e peroxidase de tecidos vegetais em procedimentos analíticos de interesse farmacêutico**. 2000. Dissertação - Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2000.

MACIEL, H. P.F.; GOUVEA, C. M. C. P; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf. com alta atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.4, p. 735-739, 2006.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v.172, n. 1, p.96–102, 2006.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. 1 ed. Santa Maria: Editora Sociedade Vicente Pallotti, 2007.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

MARIN, D. E.; PISTOL, G. C.; NEAGOE, I. V.; CALIN, L.; TARANU, I. Effects of Zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v.58, p.408-415, 2013.

MCKENZIE, K. S.; SARR, A. B.; MAYURA, K.; BAILEY, R. H.; MILLER, D. R.; ROGERS, T. D.; NORRED, W. P.; VOSS, K. A.; PLATTNER, R. D.; KUBENA, L. F.; PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 807-820, 1997.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M.E.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; VISCONTI, A. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n.4-5, p.489-495, 2001.

MINERVINI, F.; GIANNOCARO, A.; CAVALLINI, A.; VISCONTI, A. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. **Toxicology Letters**, v. 159, p. 272-283, 2005.

MOLNAR, O.; SCHATZMAYR, G.; FUCHS, E.; PRILLINGER, H. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp.nov., A new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 661-671, 2004.

MOREAU, R. L. D. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. D. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

NETO, A. J. S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2009.

NICELL, M.; WRIGHT, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 302-310, 1997.

NKWE, D. O.; TAYLOR, J. E.; SIAME, B. A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. **Mycopathologia**, v. 160, p. 177-186, 2005.

NORA, N. S. **Redução dos níveis de Ocratoxina A por ação enzimática – Peroxidase**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, 2015.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OK, H. E.; CHOI, S-W; KIM, M.; CHUN, H. S. HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. **Food Chemistry**, v. 163, p.252-257, 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA- FAO. Manuales para el control de calidad de los alimentos- Capacitación en análisis de micotoxinas. In: Estudio FAO- Alimentacion y nutricion. Roma: FAO, 1991.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. Criterios de salud ambiental Micotoxinas. Organização Panamericana de la Salud, p. 133, 1983.

OTHMEN, Z. O-B.; GOLLI, E. E.; ABIDI-ESSEFI, S.; BACHA, H. Citotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, α – Zearalenol and β -Zearalenol, on cultured Vero cells. **Toxicology**, v. 252, n. 1-3, p. 72-77, 2008.

ÖZER, B.; AKARDERE, E.; ÇELEM, E. B.; ÖNAL, S. Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 110-115, 2010.

PAGNUSSATT, F.A; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina sp.* **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.108, p. 21-26, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIZZO, F.; CALONI, F.; SCHREIBER, N. B.; CORTINOVIS, C., SPICER, L. J. In vitro effects of deoxynivalenol and zearalenone major metabolites alone and combined, on cell proliferation, steroid production and gene expression in bovine small-follicle granulosa cells. **Toxicon**, v.109, p. 70-83, 2016.

PLACINTA, C. M.; D' MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78,n. 1-2, p. 21-37, 1999.

PRELUSKY, D. B.; WARNER, R. M.; TRENHOLM, H. L. Sensitive analysis of the mycotoxins zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 494, p. 276-277, 1989.

QIAN, M.; ZHANG, H.; WU, L.; JIN, N.; WANG, J.; JIANG, K. Simultaneous determination of zearalenone and its derivatives in edible vegetable oil by gel permeation chromatography and gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 166, p. 23–28, 2015.

RAMOS, A. J.; HERNÁNDEZ, E.; PLÁ-DELFINA, J. M.; MERINO, M. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v.128, p.129-137, 1996.

REKIK, H.; NADIA, Z. J.; BEJAR, W.; KOURDALI, S.; BELHOUL, M.; HMIDI, M.; BENKIAR, A.; BADIS, A.; SALLEM, N.; BEJAR, S.; JAOUADI, B. Characterization of a purified decolorizing detergent-stable peroxidase from *Streptomyces griseosporus* SN9. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 253–263, 2015.

RIBEIRO, N. M.C.; SILVA, L. J. G.; PENA, A.; LINO, C. M. Occurrence and risk assessment of zearalenone through broa consumption, typical maize bread from Portugal. **Food Control**, v. 57, p. 147-151, 2015.

RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – Na overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 3-10, 2007.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological interactions**, v. 159, p. 18-46, 2006.

ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. Peroxidases and Catalases in Foods. Oxidative. **Elsevier**, p. 11-47, 1995.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; FATTORE, M.; ALBRIZIO, S.; BERRADA, H.; MAÑES, J. Occurrence of Fusarium mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. **Food Chemistry**, v. 178, p. 149-155, 2015.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MARÍN, R.; JAMES, K. J.; MAÑES, J. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. **Food Control**, v. 30, p. 122-128, 2013.

RYU, D.; JACKSON, L. S.; BULLERMAN, L. B. Effects of processing on zearalenone. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 504, p. 205-216, 2002.

RYU, K.; DORDICK, J. How do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function? **Biochemistry**, v. 31, n. 9, p. 2588-2598, 1992.

SABATER-VILAR, M.; MALEKINEJAD, H.; SELMAN M. H. J.; VAN DER, M. A. M. D.; FINK-GREMMELS, J. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**, v. 163, p. 81-90, 2007.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, p. 225-234, 2005.

SANTOS, M. C.; SOUSA, R. B.; OLIVEIRA, S. E. M.; LIMA, K. S. C.; LIMA, A. L.S. Micotoxinas e seu Potencial como Agentes de Guerra. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 761-778, 2014.

SCHOEVERS, E. J.; SANTOS, R.; COLENBRANDER, B.; FINK-GREMMELS, J.; ROELEN, B. A. J. Transgenerational toxicity of Zearalenone in pigs. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 110-119, 2012.

SCHÜTTMANN, I.; BOUWS, H.; SZWEDA, R. T.; SUCKOW, M.; CZERMAK, P.; ZORN, H. Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 79-84, 2014.

SCOTT, D. Oxidoreductases. In: REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2. ed. New York: Academic Press, Cap. 9. p. 222- 254, 1975.

SERRA, R.M.A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação de com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 399 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2005.

Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/2579>. Acesso em 18 de março de 2016.

SIGMA CHEMICAL COMPANY- **Especificações da enzima Peroxidase Comercial (Peroxidase from horseradish)**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/peroxidasefromhorseradish12345900399011?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 07 de janeiro de 2016.

SIGMA CHEMICAL COMPANY- **Especificações da micotoxina Zearalenona (Zearalenone)**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z2125?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 07 de janeiro de 2016.

SIGMA CHEMICAL COMPANY- **Especificações da micotoxina β -Zearalenol** Disponível em:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z2000?lang=pt®ion=BR&cm_sp=Insite_-_recent_fixed_-_recent5-1>. Acesso em: 07 de janeiro de 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC (Livros Técnicos e Científicos), 2007.

SINGH, P.; PRAKASH, R.; SHAH, K. Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: Prospects for enzyme based applications. **Talanta**, v. 97, p. 204–210, 2012.

SHEHATA, S.; RICHTER, W. I. F.; SCHUSTER, M.; SCHOLZ, W.; NOWAR, M. S. Absorptions of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone in vitro at different pH and adsorbents. **Mycotoxin Research**, v. 16, n. 1, p. 136-140, 2000.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.

SOARES, L, V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri, São Paulo: MANOLE, 2006.

SONGSEMSAKUL, P.; SONTAG, G.; CICHNA-MARKL, M.; ZENTEK, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. Determination of zearalenone and its meabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-APCI-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 843,n. 2, p. 252-261, 2006.

SOYSAL, C.; SÖYLEMEZ, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 349–356, 2005.

SPADIUT, O.; ROSSETTI, L.; DIETZSCH, C.; HERWING, C. Purification of a recombination plant peroxidase in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. **Protein Expression and Purification**, v. 86, n. 2, p.89-97, 2012.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxin. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 91–98, 2004.

STAJIĆ, M.; PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; VUKOJEVIĆ, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases

production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65–73, 2006.

STEVENS, A. J.; SAUNDERS, J. B.; SPENCE, J. B.; NEWHAM, A.G. Investigations into “diseases” of turkey poult. **Veterinary Record**, v. 72, n. 31, p. 627-628, 1960.

STOB, M.; BALDWIN, R. S.; TUIE J.; ANDREWS, F. N.; GILLETTE, K. G. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. **Nature**, v. 29: 1318, 1962.

SUN, X.; XINGXING, E.; XUE, K. S.; LI, Y.; XU, D.; QIAN, E. Biological detoxification of Zearalenone by *Aspergillus niger* FS 10. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p.76-82, 2014.

TAKAHASHI-ANDO, N.; TOKAI, T.; HAMAMOTO, H.; YAMAGUCHI, I.; KIMURA, M. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 838-844, 2005.

TAN, H.; ZHANG, Z.; HU, Y.; WU, L.; LIAO, F.; HE, J.; LUO, B.; HE, Y.; ZUO, Z.; REN, Z.; PENG, G.; DENG, J. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading Zearalenone. **Food Control**, v. 47, p. 285-290, 2015.

TANDJAOUI, N.; ABOUSEOUD, M.; COUVERT, A.; AMRANE, A.; TASSIST, A. A new combined green method for 2-Chlorophenol removal using cross-linked *Brassica rapa* peroxidase in silicone oil. **Chemosphere**, v. 148, p. 55-60, 2016.

TINYIRO, S. E.; WOKADALA, C.; XU, D.; YAO, W. Adsorption and degradation of zearalenone by bacillus strains. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 321-327, 2011.

THIMM, N.; SCHWAIGHOFER, B.; OTTNER, F.; FRÖSCHL, H.; GREIFENENDER, S.; BINDER, E. M. Adsorption of mycotoxins. **Mycotoxin Research**, v. 17, n. 2, p. 219-223, 2001.

TURNER, N. W.; BRAMHMBHATT, H.; SZABO-VEZSE, M.; POMA, A.; COKER, R.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009 - 2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 12-33, 2015.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods of determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.

URRY, W. H.; WEHRMEISTER, H. L.; HODGE, E. B.; HIDY, P. H. The structure of zearalenone. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 27, p. 3109–3114, 1966.

VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Determination of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry (IUPAC)**, v.58, n. 2, p. 315-326, 1986.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food**

Microbiology, v.99, n. 3, p. 321-328, 2005.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Blucher, 2010.

VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). **Food and bioproducts processing**, v. 94, p. 284-289, 2015.

VIERLING, R.A, WILCOX, J.R. Microplate Assay for Soybean Seed Coat Peroxidase Activity. **Seed Science and Technology**, v.24, p.485-494, 1996.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WATTANASIRITHAM, L.; THEERAKULKAIT, C.; WICKRAMASEKARA, S.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, v. 192, p. 156-162, 2016.

WÁSKIEWICZ, A.; BOCIANOWSKI, J.; PERCZAK, A.; GOLINSKI, P. Occurrence of fungal metabolites-fumonisin at the ng/L level in aqueous environmental samples. **Science of the total Environment**, v. 524-525, p.394-399, 2015.

WRIGLEY, C. W. The Composition of Food Grains and Grain-Based Products. **Reference Module in Food Sciences**, p. 1-3, 2016.

WU, J.; ZHAO, R.; CHEN, B.; YANG, M. Determination of zearalenone in barley by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and natural occurrence of zearalenone in functional food. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1508–1511, 2011.

XU, R.; CHI, C.; LI, F.; ZHANG, B. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. **Bioresource Technology**, v.149, p. 111–116, 2013.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHAO, L.; JIN, H.; LAN, J. ZHANG, R.; REN, H.; ZHANG, X.; YU, G. Detoxification of zearalenone by three strains of *Lactobacillus plantarum* from fermented food in vitro. **Food Control**, v. 54, p. 158-164, 2015.

ZHAO, Z.; LIU, N.; YANG, L.; WANG, J.; SONG, S.; NIE, D.; YANG, X.; HOU, J.; WU, A. Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. **Food Control**, v. 75, p. 362-369, 2015.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.