



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

EFEITO DA PRESENÇA DE TRICOTECENOS DURANTE A ETAPA DE
MOSTURAÇÃO DO PROCESSO CERVEJEIRO

RAFAEL DIAZ REMEDI

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

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

RIO GRANDE, RS

2018

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

EFEITO DA PRESENÇA DE TRICOTECENOS DURANTE A ETAPA DE
MOSTURAÇÃO DO PROCESSO CERVEJEIRO

RAFAEL DIAZ REMEDI

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

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

RIO GRANDE, RS

2018

Ficha catalográfica

R386e Remedi, Rafael Diaz.
Efeito da presença de tricotecnos durante a etapa de mosturação do processo cervejeiro / Rafael Diaz Remedi. – 2018.
75 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.
Orientadora: Dra. Jaqueline Garda Buffon.

1. Tricotecnos 2. Enzimas 3. Mosturação 4. Cerveja I. Buffon, Jaqueline Garda II. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

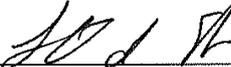
Dissertação defendida por Rafael Diaz Remedie aprovada em 23 de março de 2018,
pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



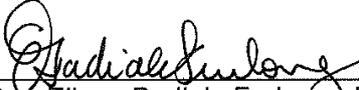
Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG



Profa. Dra. Luciane Maria Colla - UPF



Profa. Dra. Luciellen Oliveira dos Santos - FURG



Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, agradeço pelo dia de hoje, pelos bons e maus momentos que me fizeram quem sou hoje em dia.

Aos meus pais **Silvia Raquel Diaz Remedi** e **Cláudio Camargo Remedi**, agradeço pelo carinho, amor e dedicação. Vocês me mostraram por qual caminho devo levar a vida, tudo que sou hoje devo a vocês. Amo vocês!!!

À minha irmã **Carolina**, o maior presente que tive na vida, obrigado por sempre estar ao meu lado, incentivando, ensinando e apoiando, te amo mana!

À toda minha família, **avôs e avós, tios e tias, dinda, primos e primas**, em especial a **Gladys** e a **Cuca**, mesmo longe o apoio de vocês foi essencial para mim!

À minha namorada **Carolina**, por toda ajuda e suporte, tu estiveste ao meu lado em todos os momentos felizes e difíceis dessa jornada acadêmica, com certeza não estaria aqui se não fosse por ti. Te amo!!!

À minha orientadora, **Jaqueline**, por ir além da grande profissional que é, você é uma verdadeira incentivadora e amiga. Sou grato pelos ensinamentos técnicos e principalmente pela amizade que construímos ao longo dos anos. Boss, muito obrigado!!!

À **Prof. Eliana**, por ser um exemplo de dedicação e empenho no trabalho e na vida. Obrigado por me tirar tantas dúvidas e me passar tanto conhecimento durante esses anos. Tens toda minha admiração e respeito!

Agradeço aos colegas e amigos do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, **Ana, Sabrina, Kelly, Wesclen, Marina, Maristela, Anelise e Maicon**, em especial aos estrangeiros do LAMCA **Keven** e **Karen**. Cada um de vocês foi importante nesse mestrado, obrigado pela disposição e ajuda de cada um de vocês. Com certeza esses dois anos foram muito melhores e engraçados por ter vocês como amigos, torço muito para que cada um alcance seus sonhos!!!

Aos meus amigos/irmãos que a FURG me deu o prazer de conhecer, **Guta, Igor e Bruno**. Não tenho dúvida de que mesmo com a distância essa amizade não tem como enfraquecer.

RESUMO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida mundialmente e dentre os insumos utilizados na sua produção destaca-se o malte de cevada. Os fungos das espécies *Fusarium*, são potenciais agentes contaminantes desses grãos e quando submetidos a condições de estresse podem produzir micotoxinas, metabólitos secundários que apresentam efeitos patológicos em animais e humanos. Dentre as micotoxinas detecta-se o Deoxivalenol (DON), tricoteceno com maior ocorrência e o 15-acetil-deoxivalenol (15-ADON) forma acetilada do DON. Durante o processo cervejeiro a redução dos níveis de micotoxinas já foi observada na etapa de mosturação, entretanto não há estudos que evidenciem o motivo dessa redução. Além disso, sabe-se que a atividade das enzimas amilolíticas pode ser afetada pela presença de alguns tricotecenos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da concentração dos tricotecenos DON e 15-ADON na atividade das enzimas hidrolíticas envolvidas na etapa de mosturação como também a ação enzimática relacionada a redução da concentração destas micotoxinas. Para a etapa de mosturação, foi utilizado cevada maltada na concentração de 0,2 kg L⁻¹ e três rampas de temperaturas (50, 60 e 70 °C) referente as enzimas hidrolíticas, proteases, β-amilase e α-amilase, respectivamente. O extrato enzimático obtido de cada temperatura foi avaliado quanto a sua atividade em meio sintético na presença das micotoxinas DON e 15-ADON e na ausência de contaminação. Também foi avaliado a concentração das micotoxinas durante a ação enzimática. Os resultados evidenciaram que a presença dos tricotecenos, DON e 15-ADON, retarda e altera a atividade máxima de cada enzima. A redução da concentração 15-ADON pela ação das enzimas foi observada (p<0,05), apresentando valores abaixo do limite de detecção do método quando a concentração inicial foi de 0,23 µg mL⁻¹ e 74, 72 e 92 % para 0,85 µg mL⁻¹ quando sob ação das enzimas proteolíticas, β-amilases e α-amilases respectivamente. Para o tricoteceno DON não foi observado redução da concentração pela ação das enzimas. Em contrapartida, sua concentração foi incrementada cerca de 45, 30 e 8% pela ação das enzimas proteolíticas, β-amilases e α-amilases respectivamente. Logo, mesmo que o malte apresente a concentração dessa toxina abaixo do limite máximo estabelecido pelos órgãos fiscalizadores, nada garante que o produto final não apresente maiores concentrações da mesma. Diante do exposto, a mosturação cervejeira mostrou-se um método promissor para redução da micotoxina 15-ADON, mas não foi eficaz na redução da concentração de DON. Além disso, a contaminação de micotoxina durante a mosturação pode afetar a atividade enzimática e com isso modificar o rendimento do processo, causando assim perdas econômicas ou alterações no produto.

Palavras-chave: Contaminação. Deoxivalenol. Enzimas. 15-acetil-deoxivalenol

EFFECT OF TRICHOHECENE ON MASHING STEP OF THE BREWING
PROCESS
ABSTRACT

Beer, which the most consumed alcoholic drink worldwide, uses barley malt as its main input. *Fusarium* fungi are potential contaminants of these grains and when exposed to stress conditions, they can produce mycotoxins, that are secondary metabolites with pathological effects on animals and humans. Among the mycotoxins, the deoxynivalenol (DON), that is the trichothecene with highest occurrence, and 15-acetyl-deoxyivalenol (15-ADON) which is DON's acetylated form, are emphasized. During the brewing process, the mycotoxin reduction has been reported in the mashing step, however there are no studies showing the reasons of reduction. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of trichothecenes DON and 15-ADON concentration on the activity of the hydrolytic enzymes involved in the mashing step. In the mashing step, malted barley was used at 0.2 kg L⁻¹ concentration and three temperature ramps (50, 60 and 70 ° C) were applied to hydrolytic enzymes protease, β -amylase and α -amylase, respectively. Enzymatic extract obtained at each temperature were evaluated regarding their activity in a buffer system with DON and 15-ADON mycotoxins and without contamination. Mycotoxin concentrations during the enzyme activity action was also evaluated. Results showed that the presence of trichothecenes, DON and 15-ADON, slows down and alters the maximum activity of each enzyme. Reduction in 15-ADON concentration by the enzyme activity was observed ($p < 0.05$), values were below the detection limit when the initial concentration was 0.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 74, 72 and 92% at 0.85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ when under the activity of protease, β -amylase and α -amylase respectively. Trichothecene DON, no reduction in concentration was observed. In contrast, its concentration was increased in 45, 30 and 8% by protease, β -amylase and α -amylase respectively. Therefore, even if the malt shows the concentration of this toxin below the maximum limit established by the inspection agencies, there is no guarantee that the final product will not high DON concentration. The mashing has shown to be a promising method of reducing mycotoxin 15-ADON, but it was not effective in reducing the DON concentration. In addition, mycotoxin contamination during mashing can affect enzyme activity and thereby modify the yield of the process, thus causing economic losses or changes in the product.

Key-words: Contamination. Deoxynivalenol. Enzymes 15-Acetyl-deoxyivalenol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações máximas de micotoxinas em grãos de acordo com a ANVISA.....	31
Tabela 2 - Métodos de extração de DON e 15-ADON do mosto cervejeiro.....	45
Tabela 3 - Influência da granulometria da moagem na liberação de açúcar do processo de mosturação.....	49
Tabela 4 – Perfil Granulométrico da malte após a moagem.....	50
Tabela 5 - Atividade da protease no mosto cervejeiro	51
Tabela 6 - Recuperação (%) de DON e 15-ADON em mosto cervejeiro para diferentes métodos de extração.....	53
Tabela 7 - Recuperação de DON e 15-ADON em meio sintético.....	55
Tabela 8 - Atividade relativa das enzimas em meio sintético (%)	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos tricotecenos mais frequentemente encontrados, tipos A T2 (a) e tipo B NIV (b), (DON) (c), 3-ADON (d) e 15-ADON (e).....	29
Figura 2 - Etapas realizadas no trabalho.....	38
Figura 3 - Vistas do equipamento de mosturação e filtração	39
Figura 4 - Esquema do equipamento que foi utilizado na etapa mosturação	40
Figura 5 - Meio filtrante da etapa de mosturação.....	50
Figura 6 - Acompanhamento da etapa de mosturação.....	52
Figura 7 - Cromatogramas de recuperações de tricotecenos em mosto cervejeiro	54
Figura 8 - Absorção máxima do DON através do HPLC-DAD.....	54
Figura 9 - Absorção máxima do 15-ADON através do HPLC-DAD.....	54
Figura 10 - Atividade enzimática em meio sintético para todas as enzimas	57
Figura 11 - Relação entre a concentração de DON e 15-ADON em dois níveis de contaminação e atividade enzimática de protease.	59
Figura 12 - Relação entre a concentração de DON e 15-ADON em dois níveis de contaminação e atividade enzimática de β -amilase.	60
Figura 13 - Relação entre a concentração de DON e 15-ADON em dois níveis de contaminação e atividade enzimática de α -amilase.	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVO ESPECÍFIO	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 PROCESSO CERVEJEIRO	23
3.2 MICOTOXINAS.....	27
3.2.1 Tricotecenos.....	28
3.2.2 Efeitos de micotoxinas em etapas do processamento cervejeiro.....	31
3.2.3 Degradação de tricotecenos por enzimas.....	32
3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.2.1 Construção da tina de mosturação.....	38
4.2.2 Preparo do malte.....	39
4.2.3 Etapa de mosturação	40
4.2.4 Coleta das Amostras	40
4.2.5 Extrato enzimático	41
4.2.6 Condições das reações enzimáticas em meio sintético	41
4.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	42
4.3.1 Caracterização química.....	42
4.3.2 Determinação da Atividade da Protease.....	42
4.3.3 Determinação de β-amilase	43
4.3.4 Determinação de α-amilase	44
4.3.5 Quantificação de Tricotecenos no malte.....	44
4.3.6 Quantificação de tricotecenos no mosto cervejeiro.....	45
4.3.7 Determinação de tricotecenos em meio sintético.....	45
4.3.8 Validação do método de extração.....	46
4.4 TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS E LIMPEZA DE VIDRARIAS	46
4.5 RECUPERAÇÃO DE SOLVENTE ORGÂNICO	47
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS NO MALTE.....	49
5.2 EFEITO DA MOAGEM NO RENDIMENTO DA MOSTURAÇÃO.....	49
5.3 ACOMPANHAMENTO DA ETAPA DE MOSTURAÇÃO.....	51
5.4 RECUPERAÇÃO DE TRICOTECENO NO MOSTO CERVEJEIRO	52
5.5 RECUPERAÇÃO DE TRICOTECENO EM MEIO SINTÉTICO	55

5.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO SINTÉTICO NA PRESENÇA DE DON E 15-ADON	56
5.7	DETECÇÃO DAS MICOTOXINAS DON E 15-ADON DURANTE AS REAÇÕES EM MEIO SINTÉTICO.....	58
5.7.1	Protease	58
5.7.2	β – amilase	60
5.7.3	α – Amilase	61
5.7.4	Considerações finais	62
6	CONCLUSÃO	63
7	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são produzidas pelo metabolismo secundário de fungos principalmente por algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Dentre as micotoxinas podem-se destacar as aflatoxinas (AFLA), fumosinas (FBS), ocratoxina A, patulina e a classe dos tricotecenos (BENNETT; KLICH, 2003). As micotoxinas da classe dos tricotecenos, com destaque para o deoxinivalenol (DON), 3-acetil-deoxivalenol (3-ADON), 15-acetil-deoxivalenol (15-ADON), Nivalenol (NIV) e toxina T-2 (T-2) por sua toxicidade, podem inibir o crescimento de plantas (BRUINS et al., 1993; MCLEAN, 1996) e quando ingeridos causar vômitos (ROTTER, 1996), inibição de síntese proteica (WEAVER et al., 1978), apoptose celular (YANG et al., 2000), entre outras complicações (ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005).

Uma vez que essas micotoxinas são produzidas, elas são de difícil remoção, visto que são estáveis sob condições usuais empregadas na conservação ou processamento de alimentos. Além disso, a presença de micotoxinas causam perdas na qualidade de grãos e efeitos tóxicos à saúde humana e animal (MEERDINK, 2002). Há estudos que visam prevenir a contaminação fúngica e conseqüentemente a produção de micotoxinas (KUPSKI; QUEIROZ; BADIALE-FURLONG 2018). No entanto uma vez detectada a contaminação, tem-se como opção utilizar métodos que degradem ou reduzam as concentrações destes compostos tóxicos (HATHOUT, ALY 2014).

A presença de micotoxinas pode interferir em diversos processos alimentícios, principalmente aqueles em que organismos como bactérias e leveduras são utilizados. Dentre estes, a produção de cerveja se destaca pela grande variedade de matrizes alimentares que podem estar presentes na sua produção, como também seu elevado consumo (66,9 litros/ano pessoa) e alto faturamento (R\$ 70 bilhões no ano de 2014) (CERVBRASIL, 2015).

Entende-se por cerveja a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (Lei Federal nº 8.918/94, regulamentada pelo Decreto 2.314/97). O malte de cevada é o cereal mais utilizado mundialmente para produção dessa bebida, entretanto outros cereais maltados como trigo, arroz, milho e aveia podem substituir parte do malte de cevada utilizado para produção de cerveja (VENTURINI FILHO, 2010).

Vários fatores podem afetar a contaminação desses grãos, como o clima, o solo e a suscetibilidade das cultivares a contaminação fúngica. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, cerca de 25 % da produção mundial de grãos

está contaminada por fungos produtores de micotoxinas (FAO, 1993; FAO 2016). O órgão que regulamenta os limites legais para presença de micotoxinas em alimentos no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A única micotoxina integrante da classe dos tricotecenos presente na RDC nº 7/2011 é o DON, isso pode estar relacionado com a maior ocorrência dessa micotoxina frente as demais. Entretanto, sabe-se que as demais micotoxinas dessa classe também causam modificações em processos fermentativos, como já foi descrito por Garda et al. (2005), Kłosowski e Mikulski (2010) e Boeira, Silvello e Remedi (2016).

Devido a essa contaminação, associado a estudos que relatam a ocorrência de micotoxinas em cervejas, diversos autores como Garda et al. (2005), Inoue et al. (2013) e Hathout e Aly (2014) avaliaram a degradação e destino de diversas micotoxinas durante as etapas de mosturação, filtração, fervura e fermentação obtendo resultados positivos na redução da concentração dessas toxinas. Além disso, segundo Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) a contaminação das micotoxinas DON e da toxina T-2 alteram as atividades das enzimas α e β amilases presentes nos maltes de cevada. E como essas enzimas são as principais responsáveis pela etapa de mosturação do processo cervejeiro, existe a possibilidade de que o rendimento da etapa de sacarificação do mesmo seja alterado.

Diante do exposto, informações sobre o efeito que a presença de tricotecenos causam na etapa de mosturação podem auxiliar o setor produtivo a reduzir perdas econômicas associadas a esses contaminantes. Corroborando com este aspecto, este estudo pretende avaliar se há relação entre contaminação dos tricotecenos DON e 15-ADON e as enzimas envolvidas durante a mosturação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da concentração dos tricotecenos DON e 15-ADON na atividade das enzimas hidrolíticas envolvidas na etapa de mosturação como também a ação enzimática relacionada a redução da concentração destas micotoxinas.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFIO

- Verificar se a presença das micotoxinas DON e 15-ADON causam alterações na atividade enzimática das enzimas proteolíticas e amilolíticas.
- Relacionar a atividade das enzimas hidrolíticas envolvidas na etapa de mosturação com a possível alteração dos níveis de DON e 15-ADON

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROCESSO CERVEJEIRO

A cerveja é obtida a partir de um processo essencialmente simples. Inicialmente a cevada maltada é moída e o substrato obtido é colocado em infusão. Nessa etapa, diversas enzimas atuam nos grãos liberando açúcares e proteínas para o meio líquido. Em seguida, o meio é filtrado, fervido com lúpulo e resfriado para etapa de fermentação. Após a fermentação é realizada a etapa de maturação onde a levedura é separada do líquido, a cerveja passa por alguns processos de acabamento e está apta para o consumo (PRIEST; STEWART, 2006).

Segundo dados do Barth Haas Group (2014), o Brasil no ano de 2013 alcançou produção de 13,5 bilhões de litros de cerveja, ocupando o terceiro lugar no ranking mundial, atrás apenas da China e Estados Unidos. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2015), o Brasil faturou R\$ 70 bilhões no ano de 2014, sendo que o país ocupa apenas 27ª posição mundial no consumo anual de cerveja, com 66,9 litros por ano por pessoa. Segundo dados do Euromonitor International o Brasil apresentou queda no consumo percapta de cerveja no ano de 2017 (60,7 litros). Entretanto devido ao aumento no consumo de cervejas premium, o faturamento do setor cervejeiro continua em crescimento.

Tendo em vista à importância econômica desse segmento no mercado, é de interesse reduzir as perdas econômicas associadas à contaminação por micotoxinas ocorrentes tanto nos cereais malteados utilizados no processo cervejeiro, como também na bebida. Segundo a FAO (2016), estima-se que em média 1 bilhão de toneladas ao ano de cultivares alimentares são perdidas pela contaminação micotoxicológica.

No Brasil, a cerveja é regulamentada pelo Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, que define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do majoritariamente de malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. A fabricação de cerveja requer água de boa qualidade, cevada maltada, cereais não maltados e fermentescíveis, também denominados adjuntos, e o lúpulo (*Humulus lupulus*) responsável pelo amargor característico da cerveja (PAPAZIAN, 2003). A levedura capacidade fermentativa, é fundamental para a produção da cerveja e influência de forma marcante no produto final (BERNER; JACOBSEN; ARNEBORG, 2013).

A maltagem é a primeira etapa necessária para produção da cerveja, nela ocorre a transformação dos grãos de cevada em malte e tem como objetivo ativar e produzir as enzimas que estarão ativas na etapa de mosturação. O processo de maltagem pode ser subdividido em três

etapas: maceração onde há aumento da umidade dos grãos; germinação onde ocorre o desenvolvimento embrionário, bem como transformações bioquímicas, ativação e produção de enzimas e a secagem, etapa que confere estabilidade e determinará o tipo de malte produzido (AQUARONE et al., 2001; PORTO, 2011).

Muitas das características da cerveja são determinadas na escolha do malte, visto que a partir dele são provenientes quase que a maioria dos nutrientes presentes na cerveja. Mestres cervejeiros utilizam tanto maltes especiais, responsáveis pela coloração e outras características sensoriais, quanto maltes base, responsáveis pela alta concentração de enzimas as quais degradarão o amido em açúcares (PORTO, 2011). Os maltes especiais por passarem por processo de torrefação mais severos onde há reações envolvendo proteínas e carboidratos, apresentam atividade antioxidantes, cor e sabor do distintos (WOFFENDEN; AMES; CHANDRA, 2001).

Pela grande variedade de paladar dos consumidores, além do custo benefício para a indústria cervejeira, o malte de cevada geralmente é substituído em parte por outro cereal, sendo eles maltados ou não. Por exemplo, no Brasil a prática de substituir parte da cevada por milho ou arroz já é comumente utilizada pelas grandes cervejarias, sendo essa troca responsável por diminuir os custos da matéria prima e pela característica de leveza da cerveja brasileira (D'AVILA et al., 2012; VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

A um conjunto de operações responsáveis pela elaboração do mosto cervejeiro, no processo o amido e as proteínas contidos no malte são solubilizados e degradados gerando o mosto. As principais operações realizadas no processo são moagem, mostura, filtração, fervura, separação do trub e resfriamento do mosto (PRIEST; STEWART, 2006).

A moagem do malte tem como objetivo quebrar os grãos e expor o amido, proteínas e aminoácidos contidos no seu interior, e para esse fim geralmente são utilizados moinhos de rolo ou martelo (LEWIS; YOUNG, 1995). A moagem completa do malte obtendo partículas finas de amido melhora a fermentabilidade. Contudo, tamanhos de partículas muito pequenos podem ter um impacto negativo ao diminuir os rendimentos de filtração aumentando a turbidez do mosto (KUNZE, 2006). Está etapa do processo não apresenta benefícios na redução de micotoxinas, mas provavelmente a moagem promova maior homogeneidade das micotoxinas de todo o lote de malte e sua posterior solubilização em água. (PASCARI et al., 2018).

A operação seguinte é a mosturação, fase de produção do mosto utilizado na fermentação. Os grãos maltados e moídos são embebidos em água e submetidos a diferentes temperaturas por períodos de tempos determinados, nesta etapa diferentes enzimas como amilases e proteases são ativadas, sendo elas responsáveis por hidrolisar o amido e as proteínas

em açúcares fermentescíveis, dextrinas, peptídeos e aminoácidos. Como resultado, obtém-se uma solução adocicada, denominada mosto, que ainda contém o bagaço do malte (TSE et al., 2003).

Nesta etapa são definidas muitas das qualidades sensoriais, químicas e físicas da cerveja. Como relatado por Priest e Stewart (2006) e Barth (2013), maiores períodos na faixa de temperatura da α -amilase proporcionam concentrações mais elevadas de açúcares não fermentescíveis (dextrinas), e conseqüentemente um produto mais encorpado. Já maiores intervalos na faixa de temperatura das β -amilase proporcionam ao mosto concentrações maiores de maltose, carboidrato fermentescível, sendo assim, o percentual alcoólico da cerveja será maior e está apresentará maior leveza.

As enzimas amilolíticas são consideradas as mais importantes durante essa etapa de mosturação, entretanto há atuação de outras como proteases, celulasas e β -glucanasas. As amilases atuam sobre o amido e demais polissacarídeos hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. Elas podem ser divididas em vários tipos, dentre elas endo-amilases, exo-amilases e amilases maltogênicas de ambas as especificidades (JANEČEK, 2009).

As α -amilases (EC 3.2.1.1) são consideradas endoglicosidades que hidrolisam as ligações α -1,4 presentes na amilose e amilopectina de forma aleatória, resultando em uma mistura de diversas moléculas lineares e ramificadas. Em contraste, as β -amilases (EC 3.2.1.2) são exo-enzimas que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4 do amido, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de maltose, dissacarídeo redutor (KOBELITZ, 2013). Estas enzimas atuam de maneira coordenada, enquanto a α -amilases proporciona novas extremidade redutoras, a β -amilases atacam a nova extremidade não redutora.

Existem vários estudos na literatura que relataram a importância dessas enzimas, dentre eles Evans et al. (2003 e 2010) que elaboraram uma forma mais simples de previsão de fermentabilidade de malte pela medida da atividade das enzimas envolvidas no processo de mosturação. Além disso, os autores evidenciam o efeito da termo-estabilidade da α e β amilase, como também o limite da dextrinase durante a etapa de mosturação.

As proteases (EC 3.4) pertencem ao grupo das hidrolases, elas catalisam ligações peptídicas das proteínas e também podem apresentar atividade sobre éster e amidas (KOBELITZ, 2013). Durante a mosturação, as proteases agem degradando as proteínas em aminoácidos e peptídeos pequenos para fornecer nutrientes suficientes para que as leveduras sejam cultivadas, mas uma degradação completa não é desejável, pois as proteínas contribuem para a capacidade de formação de espuma entre outras qualidades sensoriais desejadas (JONES, 2005)

Lei et al. (2013) ressaltaram a importância que a protease apresenta no processo cervejeiro. Os autores mostraram que dependendo dos aminoácidos e peptídeos liberados durante a etapa de mosturação há alterações no tempo e perfil de álcoois da fermentação.

A filtração tem como objetivo remover sólidos insolúveis do mosto líquido e dar as características mais translúcida à cerveja. Atualmente dois tipos de filtração são utilizados, cervejarias com grandes produções utilizam filtros de placa e cervejarias de menor porte utilizam tinas de clarificação. Essa última possui uma espécie de peneira conhecida por fundo falso, sendo ela a responsável por sustentar o verdadeiro elemento filtrante (cascas do malte). No processo de filtração, geralmente ocorre reciclo do meio líquido, a fim de extrair uma maior parcela de açúcares como também obter um mosto mais límpido (FONSECA; TEIXEIRA, 2007; VENTURINI FILHO, 2010). Nessa etapa, os resíduos da filtração podem reter uma certa quantidade de micotoxinas, conforme descrito por Malachova et al. (2010).

A operação de fervura tem por objetivo conferir estabilidade biológica, bioquímica e coloidal ao mosto. Microrganismos e enzimas presentes são inativados devido à alta temperatura. Os taninos e proteínas são coagulados (trub) e separados. Nessa etapa é adicionado o lúpulo, o responsável pelo amargor e aroma da cerveja. Além disso, ocorre o desenvolvimento da cor, aroma e sabor devido a caramelização do açúcar e reações com os aminoácidos presentes no mosto. Posteriormente a etapa de fervura, o mosto deve ser resfriado até a temperatura de inoculação da levedura, em geral são utilizados trocadores de calor para esse fim e esta é a última etapa de brassagem (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004).

Há relatos na literatura que os lúpulos são susceptíveis a contaminação por fungos, mas como a quantidade adicionada ao mosto é baixa, seu impacto pode ser descartado (VACLAVIKOVA et al., 2013). Quanto ao impacto da fervura do mosto no conteúdo de micotoxinas, estudo realizado por Kostelanska et al. (2009) não a identificaram como tendo importância significativa. Entretanto, segundo Pascari et al. (2018), o efeito da temperatura de fervura nos níveis de micotoxinas não deve ser totalmente descartado. Levando em conta que a temperatura de ebulição do mosto está acima de 100 °C e que o tempo médio de ebulição é de cerca de 1 h, uma diminuição da concentração de micotoxinas pode ocorrer.

Como próxima etapa tem-se a inoculação da cultura da levedura, a qual será responsável pela fermentação do mosto. Esta etapa consiste basicamente nas transformações dos açúcares em dióxido de carbono (CO₂), etanol e outros produtos do metabolismo da levedura. Na primeira etapa da fermentação como há elevados níveis de açúcares fermentescíveis e oxigênio, ocorre a respiração celular tendo como objetivo a multiplicação das células, quando os níveis

de oxigênio diminuem inicia-se a fase anaeróbia, onde há a produção de etanol e CO₂ (PRIEST; STEWART, 2006).

A maturação é a última etapa do processo antes do acabamento final da cerveja (filtração, carbonatação e envase). Também denominada segunda fermentação, essa etapa tem por objetivo iniciar a clarificação da bebida por decantação, diminuir os teores de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico que dão a cerveja gosto desagradável, além de promover a estabilização química da bebida (AQUARONE et al., 2001).

3.2 MICOTOXINAS

Diversas espécies de fungos quando expostos a condições de estresse, produzem, como mecanismo de defesa, metabólitos secundários de baixa massa molecular, os quais podem causar diversas reações em animais e vegetais, e esses metabólitos são conhecidos como micotoxinas. Dentre os fungos produtores de micotoxina pode-se destacar os *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (BENNETT; KLICH, 2003; MARIN et al., 2013). O risco devido a ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas vem sendo relatado desde a década de 1940, onde no Japão ocorreu uma epidemia chamada doença do arroz amarelo, a doença foi atribuída à citreoviridina, micotoxina cardiotoxica produzida por fungos do gênero *Penicillium* (FAO, 1993).

A contaminação animal de micotoxinas pode ocorrer de forma direta, pelo consumo de diversas matrizes alimentares, sendo elas cereais (cevada, trigo, milho, arroz, entre outros), frutas e leguminosas ou de forma indireta, a partir de produtos obtidos dessas matrizes, como a cerveja, pães, sucos entre outros (MARIN et al., 2013). Contudo, a presença de micotoxinas em alimentos não possui relação direta com a contaminação fúngica, visto que, estas toxinas geralmente são produzidas quando os microrganismos estão sob condições de estresse (MEERDINK, 2002; SCHMIDT-HEYDT et al., 2008).

As contaminações com fungos toxigênicos pode ocorrer em diversas etapas do processamento de alimentos, na pré-colheita devido a condições climáticas como secas, por intempéries causado danos mecânicos, presença de pragas e insetos, deficiência de nutrientes no solo que também resultam em perda de vigor da planta, predispondo-a a colonização de fungos toxigênicos. Na pós-colheita e no armazenamento a contaminação fúngica e a produção de micotoxinas são resultados da interação entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos, além disso, durante o armazenamento e o transporte, grãos contaminados entram em contato com os outros,

favorecendo assim a disseminação de fungos e conseqüentemente a produção de micotoxinas (RICHARD, 2007; SANTI; DIAZ, 2005)

Aproximadamente, 300 a 400 compostos são reconhecidos como micotoxinas, uma vez produzidas as micotoxinas são estáveis sob condições normais e causam perdas na qualidade de grãos, além de efeitos tóxicos (BENNETT; KLICH, 2003; MEERDINK, 2002). Dentre as micotoxinas mais comumente detectadas em grãos de cereais estão as aflatoxinas (AFLA), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FBS), zearalenona (ZON) e os tricotecenos (FOROUD; EUDES, 2009; MEERDINK, 2002). As propriedades químicas e biológicas dessas classes de micotoxinas são diferentes e os seus efeitos tóxicos são extremamente variáveis, dentre eles pode-se citar efeito hepatotóxico, nefrotóxico, carcinogênicos, teratogênicos e imunotoxicidade (BENNETT; KLICH, 2003; SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).

3.2.1 Tricotecenos

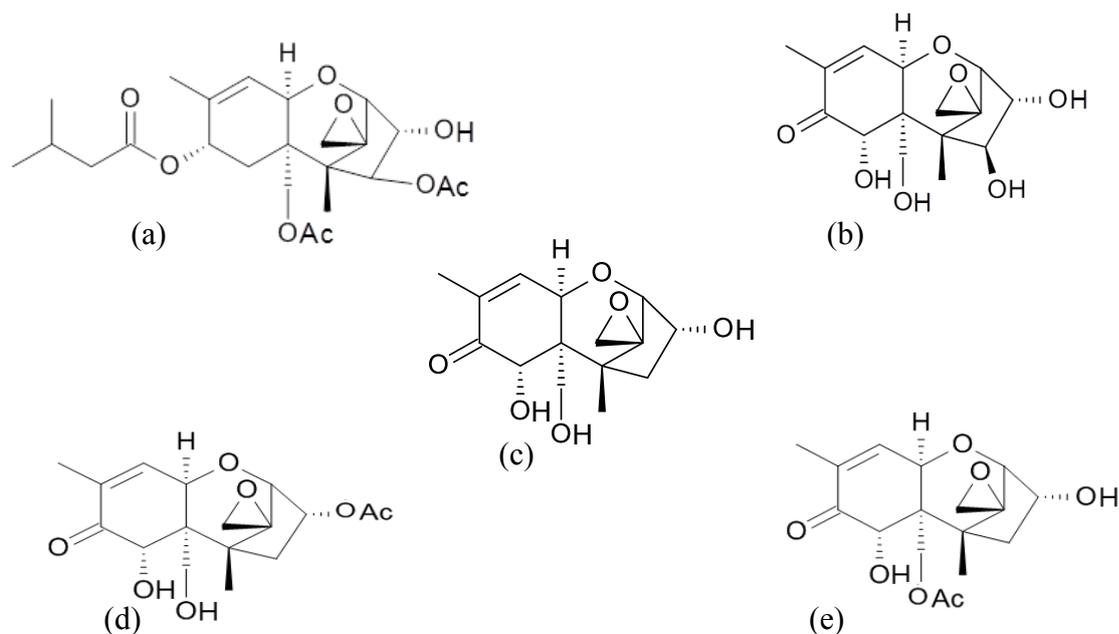
As micotoxinas podem ser agrupadas de acordo com o fungo produtor ou sua estrutura molecular, dentre as micotoxinas destaca-se a classe dos tricotecenos, que são produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium* e *Trichothecium*. Os tricotecenos apresentam baixa massa molecular (200 a 500 Da), possuem em comum um grupamento epóxido nas posições 12 e 13 da estrutura molecular e uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 (ALGARRA, 2010; PESTKA, 2007; ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005).

Os tricotecenos podem ser divididos em quatro grupos (tipos A, B, C e D), sendo que, os grupos A e B apresentam maior destaque na literatura pois são identificados com maior frequência. Sua diferença está no grupo funcional presente no carbono C-8, os tricotecenos do Tipo A se caracterizam pela presença de um grupo funcional que não seja uma carbonila, nesse grupo está a toxina T-2; os do Tipo B apresenta carbonila na posição C-8, sendo o DON e o NIV integrantes desse grupo (PESTKA, 2007; KOCH, 2004). Os tipos C e D incluem tricotecenos de menor relevância (MARIN et al., 2013).

Nos Tipos A e B, destacam-se a toxina T-2 por ser a mais tóxica, o DON por ser o detectado com maior frequência, as variações acetiladas do DON (3-ADON e 15-ADON) e o NIV por apresentarem em co-ocorrência com o DON, as estruturas dessas micotoxinas estão apresentadas na Figura 1 (BENNETT; KLICH, 2003; PESTKA, 2007). Essas micotoxinas são comumente associados a inibição da síntese proteica em eucarióticos, interferindo nas fases de iniciação, alongação e terminação, pois se ligam à subunidade ribossômica 60S e interagem

com a enzima peptidiltransferase levando à inibição da formação de ligação peptídica (CUNDLIFFE; DAVIES, 1977).

Figura 1 - Estruturas químicas dos tricotecenos mais frequentemente encontrados, tipos A T2 (a) e tipo B NIV (b), (DON) (c), 3-ADON (d) e 15-ADON (e)



Fonte: ChemSpider, 2018

As toxinas T-2 e HT-2 apresentam hematotoxicidade e a imunotoxicidade, o DON pode induzir o vômito, causar redução alimentar, reduzir taxas de crescimento e conversão alimentar. Estudos de alimentação indicam que os suínos são os mais sensíveis a essas toxinas, em comparação com outros animais da agropecuária (ERIKSEN; PETTERSSON, 2004). As diferenças em sua toxicidade são devidas à sua estrutura química e solubilidade, além disso, a concentração da micotoxina e a duração da exposição podem afetar a sua toxicidade (UENO, 1985).

Dentre as matérias-primas que podem estar contaminadas com tricotecenos estão a aveia, o centeio, o milho, o trigo e a cevada (CONTAM, 2013; PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999). Dentre os insumos citados, a cevada é a principal matéria prima utilizada para produção de cerveja e, segundo Laitila (2015), os níveis de micotoxinas podem ser incrementados durante o processo de malteação, visto que, o grão é exposto a condições de umidade e temperatura propícia para o crescimento de fungos e consequente produção de micotoxinas.

Segundo Ibáñez-Vea et al. (2012), em estudo realizado na Espanha, os tricotecenos do Tipo-A e Tipo-B geralmente apresentam co-ocorrência em malte. Os autores relataram que 77% das amostras estavam contaminadas com duas ou mais micotoxinas. Entretanto, todas as amostras apresentavam níveis inferiores ao permitidos na União Europeia (referência da UE).

Segundo dados apresentados Placinta, D'mello e Macdonald (1999) é possível observar diferentes concentrações de micotoxinas em malte de diversos países: na Noruega o malte de cevada apresentava contaminações por DON de 2,2 a 13,33 mg kg⁻¹ e NIV de 0,77 mg kg⁻¹, nos Estados Unidos a contaminação DON estava entre 0,5 e 26 mg kg⁻¹ e no Canadá a contaminação de malte de trigo era superior a 0,5 mg kg⁻¹.

No Brasil, o estudo realizado por Piacentini et al. (2015b) observou a presença diversas espécies fúngicas, produtoras de micotoxinas, em amostras nacionais de malte, com destaque para o *Fusarium graminearum* que estava presente em 26 % das amostras. Além disso, de um total de 16 amostras, o autor detectou a presença das micotoxinas DON, FB₁ e FB₂ em 9, 5 e 1 amostras de maltes, respectivamente.

Diversos autores como Malachova et al. (2010) e Bolechová et al. (2015) veem relatando a ocorrência de micotoxinas na cevada maltada e como descrito por Meerdink et al. (2002) uma vez produzidas, as micotoxinas são estáveis sob condições normais e causam perdas na qualidade de grãos, além de efeitos tóxicos à saúde humana e animal. Pela característica de estabilidade das micotoxinas, a sua ocorrência em produtos obtidos a partir de cereais vem sendo relatado por vários autores.

O órgão que regulamenta os limites legais para presença de micotoxinas em alimentos no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo que na RDC nº 7/2011 (BRASIL, 2011) estão presentes os níveis máximos tolerados de micotoxinas em matérias-primas e nos alimentos obtidos a partir das mesmas. Os valores em µg.kg⁻¹ para as matrizes alimentares e os produtos obtidos a partir dessas, regulamentados pela RDC, estão presentes na Tabela 1. Percebe-se que a única micotoxina integrante da classe dos tricotecenos presentes na RDC é o DON, isso pode estar relacionado com a maior ocorrência dessa micotoxina frente as demais.

Bertuzzi et al. (2011) verificaram a ocorrência de diversas micotoxinas em cervejas comercializadas em diferentes países da Europa, sendo que de um total de 106 amostras 72 apresentavam contaminação de OTA e 70 contaminação com DON. Além disso, os autores relataram que de 33 cervejas obtidas com ajunto de milho, 32 apresentaram contaminação com FB₁ e 19 com FB₂.

Piacentini et al. (2015a) e Piacentini et al. (2017) pesquisaram a ocorrência de micotoxinas em amostras artesanais e industriais de cervejas brasileiras, os autores relataram

ocorrência DON e FB₁ em 32 e 15,1% das amostras artesanais, respectivamente, já nas amostras industriais os autores detectaram a micotoxina FB₁ em aproximadamente 50% das cervejas analisadas (56 de 114 amostras).

Tabela 1- Concentrações máximas de micotoxinas em grãos de acordo com a ANVISA

Micotoxinas	Alimento	LMT* ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada maltada	5
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> , biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada maltada	1250
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, <i>crackers</i> e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada maltada	400

*LMT – limite máximo tolerado

Fonte: BRASIL (2011)

3.2.2 Efeitos de micotoxinas em etapas do processamento cervejeiro

Segundo Kłosowski e Mikulski (2010), características diferenciadas foram observadas quando malte contaminado com AFLA, OTA, ZON, FB₁ e DON foi utilizado na fermentação alcoólica. Dentre elas identificou-se maior produção de acetaldeído e de metil-álcoois e decréscimo na concentração de ésteres, evidenciando que a contaminação gera um distúrbio metabólico nas células da levedura que pode afetar as características do produto final.

Garda (2002) e Boeira, Silvello e Remedi (2016) demonstraram que o perfil de alcoóis no final da fermentação em mosto cervejeiro foi alterado quando na presença de DON e NIV, entretanto os níveis das micotoxinas foram reduzidos ao final da fermentação. Além disso, Boeira, Silvello e Remedi (2016) relataram modificações no perfil proteico da levedura

S. cerevisiae, como também maior aporte de substrato pela célula durante a fermentação em meio sintético YPD quando havia contaminação com NIV.

Inoue et al. (2013) avaliaram a redução da contaminação de 14 micotoxinas diferentes presentes em malte de cevada durante as diferentes etapas do processo cervejeiro (maceração, filtração, fervura e fermentação). Os autores obtiveram reduções aproximadas de 80 % nos níveis de aflatoxinas, ocratoxina A, patulina e zearalenona, sendo o destino principal dessas micotoxinas a adsorção no bagaço, utilizado na etapa de filtração. No entanto, os autores evidenciaram que os resultados de redução da contaminação dos tricotecenos não foram tão satisfatórios.

Vaclavikova et al. (2013) verificaram o destino das micotoxinas emergentes e dos tricotecenos durante a produção do mosto cervejeiro. Os autores relataram que as micotoxinas emergentes não apresentam solubilidade compatível com o meio líquido, por isso praticamente todas estas micotoxinas permaneceram associadas aos grãos da camada filtrante. Já os tricotecenos e seus conjugados, são normalmente transferidos dos grãos de cevada contaminados para cerveja final em uma extensão relativamente alta.

Garra-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) verificaram que a contaminação da DON e toxina T-2 alteravam as atividades das enzimas α e β amilases presentes nos maltes de cevada. Além disso, os autores relatam aumento da atividade enzimática quando havia altos níveis dessas micotoxinas.

3.2.3 Degradação de tricotecenos por enzimas

De acordo com Tian et al. (2016) e He et al. (2010), as principais reações enzimáticas envolvidas na transformação e/ou desintoxicação de tricotecenos são: de-epoxidação, oxidação, epimerização, desacetilação e glicosilação.

Fuchs et al. (2002) utilizaram a cepa bacteriana *Eubacterium* BBSH 797 para degradar tricotecenos do tipo A e B e verificaram que a mesma apresentava capacidade de romper de forma específica o anel epóxido da estrutura de alguns tricotecenos, reduzindo assim sua toxicidade. No estudo, as micotoxinas DON, NIV e toxina T-2 foram transformadas em seus metabólitos menos tóxicos DOM-1, de-epóxi NIV e epóxi T2-tetraol, respectivamente.

Corroborando com o trabalho anterior, Young et al. (2007), a partir de microrganismos isolados do intestino de frangos verificaram a degradação de 12 tricotecenos distintos por duas vias de transformação, sendo elas, desacetilação e de-epoxidação. Os autores relataram que em tricotecenos não acetilados a reação predominante foi a de-epoxidação, já para os acetilados (3-

ADON, 15-ADON) o ataque aconteceu inicialmente no grupo acetil e posteriormente e em menor quantidade no grupo epóxido. A redução da quebra da ligação epóxido pode ser explicada pelo impedimento estérico causado pelo grupo acetil, o qual impede a ação das enzimas.

Poppenberger et al. (2003) identificaram uma enzima da classe das UDP-glicosiltransferase denominada desoxinivalenol-glicosiltransferase (DOGT1) obtida a partir planta *Arabidopsis thaliana* capaz de desintoxicar DON e seus derivado acetilado (15-ADON) entretanto nenhuma atividade foi observada para o NIV. Segundo os autores, a variação no padrão de substituição do esqueleto dos tricotecenos pode afetar o mecanismo de desintoxicação das micotoxinas.

Cheng et al. (2010), a partir de 59 microrganismos, isolaram duas cepas de bactérias capazes de detoxificar DON. O cultivo de *Bacillus subtilis* ZZ e o *Bacillus licheniformis* DY durante 12 h a 37 °C e 180 rpm apresentaram desintoxificação de 98% e 72,2% de DON, respectivamente. Além disso, os autores verificaram que, com o aumento da temperatura do meio, o potencial de desintoxificação foi reduzido, sendo a cepa de *B. licheniformis* DY a que apresentou maior resistência ao aquecimento. Considerando as diferentes estabilidades das duas cepas frente a detoxificação do meio, as bactérias poderiam estar produzindo enzimas diferentes que desempenham funções diferentes na detoxificação. Entretanto, a partir de estudos preliminares, as enzimas não foram as únicas responsáveis pela variação no percentual de detoxificação.

Yu et al. (2010), isolaram bactérias do intestino de frangos, e obtiveram 10 cepas pertencentes aos gêneros *Clostridiales*, *Anaerofilum*, *Collinsella* e *Bacillus* que apresentavam capacidade de transformar a estrutura do DON a sua forma menos tóxica DOM-1 (deepóxi-4-deoxinivalenol). Segundo o autor, não está claro se a transformação da micotoxina está relacionada a uma enzima ou isoenzimas idênticas que apresentam a capacidade de transformação.

Garda et al. (2010), estudaram a cinética de degradação da micotoxina DON durante a fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae*. A degradação ocorreu ao longo da fermentação, tendo maiores valores em 96 e 240 h para *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae*, respectivamente. Os autores relataram que a maior degradação de DON estava diretamente associada a maior atividade da enzima peroxidase. Nos estudos realizados por Gautério et al. (2017) e Feltrin et al. (2017) os autores relataram reduções de aproximadamente 81% de DON quando estes eram expostos a peroxidases, sendo que essa redução estava

associada tanto à adsorção dessa micotoxina pela enzima quanto pelos mecanismos oxidativos da mesma.

Sato et al. (2012) isolaram 13 cepas de bactérias capazes de transformar DON, dentre as cepas nove eram gram-positivas pertencentes ao gênero *Nocardioides* e outras quatro gram-negativas do gênero *Devosia*. De acordo com os autores, os metabólitos da transformação do DON foram dependentes do gênero da bactéria, embora todas as estirpes tenham produzido 3-epóxideoxinivalenol. Além disso, as bactérias gram-positivas apresentaram capacidade de utilizar o DON como fonte de carbono. Quando estas foram pré-incubadas em meios contendo DON, maior atividade de degradação da micotoxina foi observado, sugerindo que essas bactérias possuem algum sistema regulador para a expressão de enzimas de degradação da micotoxina em estudo.

Wu et al. (2011), verificaram que o gene recombinante CYP3A29 de suínos foi capaz de converter as toxinas T-2 e HT-2 em altas taxas de 3'-OH-T-2 e 3'-OH-HT-2, respectivamente. Os autores verificaram que ambas as enzimas CYP450 e carboxilesterase desempenham um papel no metabolismo da toxina T-2. Corroborando com o estudo anterior, Lin et al. (2015) demonstraram o papel da família das enzimas do citocromo P450 e da carboxilesterases no metabolismo da toxina T-2, produzindo como metabólitos primários HT-2 e 3'-OH T-2, respectivamente. Como resultado os autores relataram que a carboxilesterase desempenha o papel principal no metabolismo da toxina T-2, seguido pelas enzimas do CYP450, sendo a isoenzima CYP3A4 a principal responsável por metabolizar a toxina T-2 da família do citocromo.

Schmeitzl et al. (2015) isolaram e caracterizaram enzimas carboxilesterases obtida da planta *Brachypodium distachyon* que apresentavam capacidade de desacetilar tricotecenos como o 3-ADON, 15-ADON e T2, os autores obtiveram 100% de desacetilação após 24 h de atuação das enzimas sob os substratos. A enzima carboxilesterase apresentou maior afinidade sobre a micotoxina 15-ADON do que seu próprio substrato (*p*-nitrofenilbutirato).

Como visto vários estudos vêm aplicando microrganismos como agente para a detoxificação de micotoxinas, uma vez que esses, a partir de sua rota metabólica, são capazes de degradar e/ou modificar a estrutura dessas toxinas. Entretanto, pouco se conhece sobre a aplicação de enzimas específicas na degradação de tricotecenos, além disso, ainda não está claro se a degradação ocorre por ação de uma enzima específica ou de um conjunto delas.

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por mais que haja regulamentações dos níveis máximos tolerados para algumas micotoxinas no Brasil e no mundo, ainda há relatos de contaminações acima das toleradas para diversas matrizes alimentares. Corroborando com isso, os estudos de degradação dessas micotoxinas pela ação de enzimas vem ganhando destaque na literatura nos últimos anos. Sabe-se também que algumas das etapas do processo de produção de cerveja reduzem as concentrações de micotoxinas presentes nos grãos, dentre elas a etapa de mosturação, entretanto, os mecanismos dessas reduções ainda não são conhecidos. Desta forma, há a necessidade de um aprofundamento para avaliar a relação que essa micotoxinas tem no processo inibição ou ativação enzimática, como também o destino e mecanismos de degradação das mesmas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A cevada maltada foi adquirida de uma empresa brasileira e foi mantida sob refrigeração a 2 °C até o momento da utilização.

Os padrões de tricotecenos (DON e 15-ADON) foram adquiridos da empresa *Sigma Chemical Company* e dissolvidos em benzeno:acetonitrila (95:5). A concentração foi determinada por espectrofotometria segundo o método de Bennett e Shotwell (1990) e Krska et al. (2007).

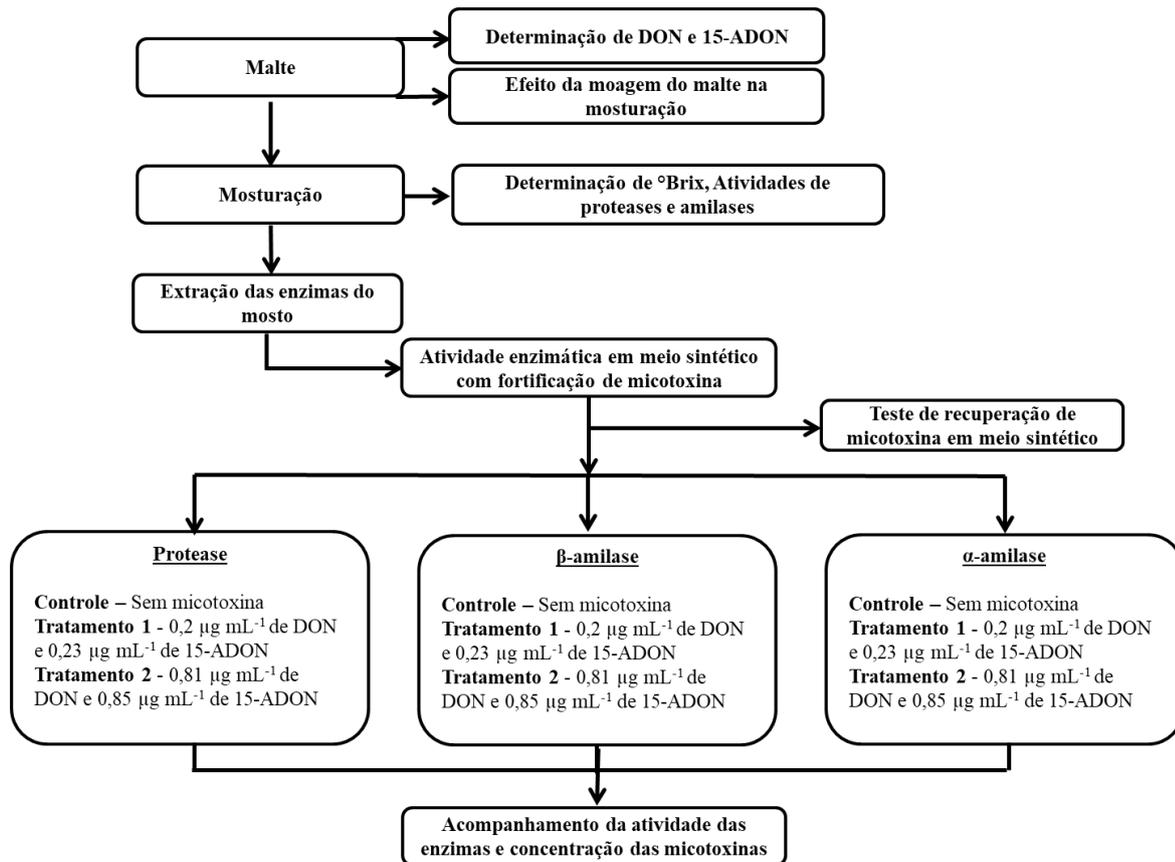
Para a construção do equipamento utilizado na fabricação do mosto (tina de mosturação e filtração) foram utilizados: tubo de cobre ¼”, registro ¼” de 3 vias, mangueira cristal 1”, solda, porca de ¼”, vareta Foscooper, solda de estanho, fios flexível de 2,5mm, cilindro de alumínio de 1,35 L, chapa de alumínio de 0,01 m², termostato (35 a 120 °C), 2 chaves on/off de 3 A e eletrobomba d’água Brastemp de 220 V.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para este estudo, foi desenvolvido um equipamento em escala laboratorial para realização da etapa de mosturação do processo cervejeiro. Após foi verificado a ocorrência das micotoxinas DON e 15-ADON no malte utilizado e avaliado a influência da moagem dos grãos no rendimento da etapa de mosturação.

Durante a mosturação, foi avaliado a atividade de enzimas hidrolíticas, proteases e amilases, segundo rampas de tempo e temperatura utilizadas industrialmente. Num segundo momento, as enzimas em estudo foram extraídas durante a mosturação, nas rampas de temperatura característica de ação de cada enzima estudada. Após a extração, as enzimas foram avaliadas em meio sintético na presença de micotoxinas, verificando se havia aumento ou redução da atividade enzimática bem como alterações nas concentrações das micotoxinas adicionadas. A Figura 2 mostra as principais etapas realizadas durante esse trabalho.

Figura 2 - Etapas realizadas no trabalho



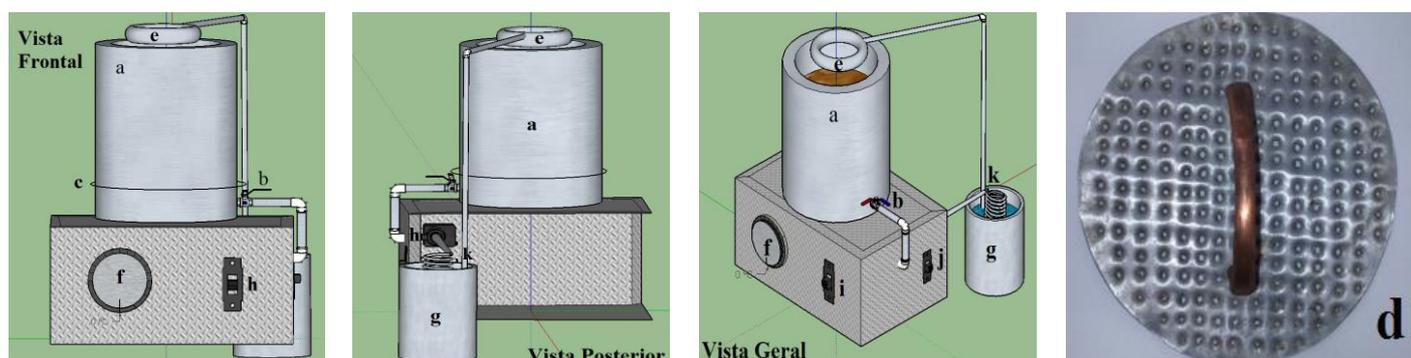
4.2.1 Construção da tina de mosturação

A construção do equipamento (Figura 3) que foi utilizado nas etapas de mosturação está descrita a seguir:

- A um cilindro de alumínio de diâmetro 11,3 cm e altura 13,5 cm (a) foi acoplado um registro de cobre de ¼” com 2 vias (b), sendo esse posicionado a 1,3 cm do fundo da tina de mosturação.
- Logo acima do registro foi adicionada placa circular de alumínio com diâmetro de 11,2 cm, que contém orifícios de 0,1 cm² em média, separados a uma distância de 0,5 cm cada (c). A placa tem por objetivo reter as cascas do cereal e assim formar a camada filtrante do processo (d).
- Na parte superior da tina de mosturação foi desenvolvido um dispersor com tubo de cobre de ¼” em formato circular, no qual foram realizados cortes transversais de 1 cm a cada 3 cm de distância (e).

- O controlador de temperatura (f), o banho termostático (g) e a bomba para recirculação (h) foram acoplados a duas chaves on/off (i,j), dessa forma foi possível utilizar os dois equipamentos de forma independente.
- A tubulação de cobre de 1/4", na qual o líquido escoava, possui 3 m de comprimento, sendo apenas 1,8 m (k) utilizados para troca de calor, o restante da tubulação foi isolado termicamente pelo do isolante Ilumaflex.

Figura 3 - Vistas do equipamento de mosturação e filtração



Legenda: (a) tina de mosturação; (b) registro; (c) local do meio filtrante; (d) suporte do meio filtrante; (e) dispersor; (f) controlador de temperatura; (g) banho termostático; (h) bomba de recirculação; (i,j) chaves on/off; (k) tubulação

O volume de trabalho do equipamento foi mantido em 800 mL, a massa de malte em 160 g, a vazão de recirculação em $1,12 \text{ mL min}^{-1} \pm 0,05$. Para melhor controle da temperatura, o bulbo do termostato foi definido na posição central do trocador de calor (Figura 3– k) apresentando assim resultados com desvio de $\pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2 Preparo do malte

O malte utilizado para produção de cerveja Pilsen foi triturado em moinho de discos Guzzo, foram testadas 4 distâncias entre os discos do moinho (0,5; 1; 1,5 e 2 mm), com o objetivo de regular a granulometria do malte de forma que o conteúdo de amido fosse disponibilizado sem degradar a casca do grão. Os resultados foram analisados de acordo com a concentração de °Brix e análise visual.

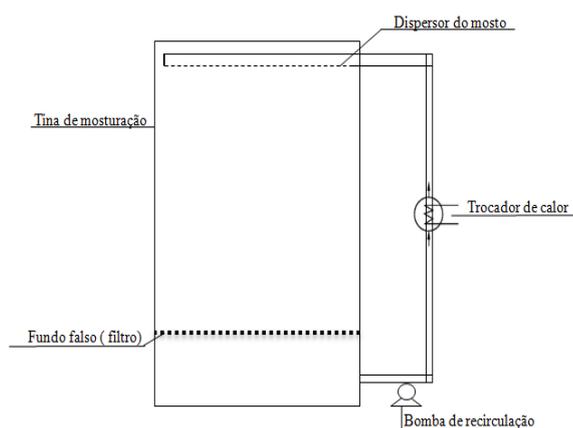
Para a melhor resposta obtida no teste anterior foi realizado análise do perfil granulométrico do malte. Para tanto, 100 g de malte moído foram peneirados em diferentes

diâmetros, 8, 14, 25, 30 e 35 mesh e analisada a massa residual em cada peneira após a agitação manual por 5 min.

4.2.3 Etapa de mosturação

A etapa de mosturação foi realizada em tina de mosturação conforme ilustrada na Figura 4. Os grãos já triturados (160 g) foram colocados na tina de mosturação com fundo falso (Figura 4). Logo após foi adicionado água previamente aquecida à temperatura da primeira rampa de mosturação (800 mL). A manutenção da temperatura das rampas e a transição entre as mesmas foi realizada mediante recirculação do mosto pelo do trocador de calor.

Figura 4 - Esquema do equipamento que foi utilizado na etapa mosturação



As temperaturas e tempos utilizados na mosturação foram 50 °C durante 10 min para a classe de enzimas proteolíticas, 60 °C durante 30 min para as β -amilases e 70 °C durante 30 min para as α -amilases. O incremento de temperatura entre uma rampa e outra foi de 2 °C/ min e a amostragem foi realizada no início, meio e fim de cada rampa de temperatura.

4.2.4 Coleta das Amostras

Os extratos obtidos do início, meio e fim de cada rampa de temperatura foram centrifugados a $3220 \times g$ durante 10 min e posteriormente filtrados em papel filtro qualitativo. Todos os extratos foram armazenados sob congelamento até momento das análises de aminoácidos livres, maltose e °Brix. As amostras dos tempos intermediários de cada rampa de

temperatura também foram submetidas a extração enzimática para posterior reação na presença e ausência das micotoxinas em meio sintético.

4.2.5 Extrato enzimático

Os extratos brutos obtidos nos tempos intermediários foram submetidos à concentração proteica por precipitação de acordo com método de Boer et al. (2006) adaptado por Feltrin et al 2017. Para isto, foi empregado solvente orgânico, acetona na proporção 1:3 (extrato enzimático bruto: acetona). A mistura foi mantida sob refrigeração por 24 h, seguido de centrifugação a $3220 \times g$, 4°C durante 10 min, com posterior solubilização dos precipitados em tampão fosfato 5 mmol L^{-1} pH 5 para as enzimas proteolíticas e pH 5,5 para as amilases.

4.2.6 Condições das reações enzimáticas em meio sintético

Foram realizados 2 ensaios com concentrações diferentes de micotoxinas (Tratamento 1 e Tratamento 2) para cada enzima estudada, além desses, foi realizado um ensaio controle no qual não foi adicionado nenhuma micotoxina (Controle). A coleta de amostra foi realizada assepticamente a cada 5 min, para o acompanhamento da atividade enzimática e concentração de micotoxinas, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

- **Tratamento 1** - adição de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DON e $0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 15-ADON, essas concentrações foram baseadas no limite máximo legislado no país (ANVISA, 2013) para a micotoxina DON. Para o cálculo da concentração levou-se em consideração a proporção de malte/água ($0,2 \text{ kg L}^{-1}$) utilizada no processo de mosturação e a concentração de $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$ de DON no malte.
- **Tratamento 2** - adição de $0,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DON e $0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 15-ADON. Para o cálculo da concentração de micotoxinas empregadas no Tratamento 2 utilizou-se em média 4 vezes a concentração do Tratamento 1.

As reações enzimáticas da protease em meio sintético foram realizadas em frascos *Erlenmeyer* (50 mL), contendo 25 mL do extrato enzimático dissolvidos em tampão fosfato 5 mmol L^{-1} pH 5, além de 550 mg de albumina para se obter a concentração desejada, as reações ocorreram em banho termostaticado a 50°C , sem agitação, durante 35 min, com amostragem de 1 mL a cada 5 min. Para a protease utilizou-se como substrato albumina bovina na concentração

de $0,22 \text{ mg mL}^{-1}$, estipulada de acordo com a concentração de proteína (11%) presente no malte pilsen e sua concentração ($0,2 \text{ kg L}^{-1}$) utilizada durante a mosturação.

As reações enzimáticas da α -amilase e β -amilase foram realizadas em frascos *Erlenmeyer* (50 mL), contendo 25 mL do extrato enzimático dissolvidos em tampão fosfato $5,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 5,5, além de 3850 mg de amido para se obter a concentração desejada, as reações ocorreram em banho termostaticado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ para a β -amilase e $70 \text{ }^\circ\text{C}$ para a α -amilase, sem agitação, durante 35 min, com amostragem de 1 mL a cada 5 min. Para as enzimas amilolíticas utilizou-se como substrato amido na concentração de 154 mg mL^{-1} , estipulada de acordo com a concentração de amido presente no malte pilsen (77%) e sua concentração ($0,2 \text{ kg L}^{-1}$) utilizada durante a mosturação.

4.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.3.1 Caracterização química

A determinação da densidade do mosto durante a mosturação foi realizada a partir de refratômetro com escala de 0 - 32 °Brix. A escala Brix (°Bx) é uma escala numérica que quantifica a concentração de sólidos solúveis totais de uma solução (QUIMIS, 2014).

A determinação do pH será realizada pela leitura da amostra em potenciômetro, calibrado com soluções tampões de pH 4 e 7, de acordo com a AOAC (2000).

A determinação de açúcares redutores (AR) foi realizada por espectrofotometria conforme descrito por Miller, 1959. A quantificação dos açúcares foi realizada por regressão linear obtida por curva padrão de maltose, açúcar majoritário no mosto cervejeiro ($0 \text{ a } 1 \text{ mg mL}^{-1}$).

4.3.2 Determinação da Atividade da Protease

O acompanhamento da atividade proteolítica foi realizado pela determinação do aminoácido tirosina. Essa determinação foi realizada nas amostras obtidas do mosto, conforme descrito no item 4.2.4 e nas amostras obtidas da reação da protease em meio sintético a 50°C , conforme descrito no item 4.2.6.

A determinação de aminoácidos foi realizada adicionando em 0,5 ml da amostra, 0,5 mL de água, 5ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (p/v), seguido de

centrifugação a $2240 \times g$ por 5 min a 4°C . Em 3mL do sobrenadante foi adicionado 2 mL de NaOH (4 M) e 1 mL do reagente de Folin Ciocalteu (1 M). Após repouso de 10 min, a absorbância do cromóforo foi determinada por espectrometria a 660 nm e sua concentração estimada por curva padrão de tirosina.

A atividade enzimática específica (UA) foi estimada pela da diferença entre a concentração de aminoácidos durante os tempos de amostragem, conforme Equação 1. Os resultados foram expressos em mg de tirosina liberada e atividade relativa de UA protease (%), na qual a maior UA protease de cada experimento foi considerada 100 %.

$$\text{UA protease} = \frac{\text{mg Tirosina}(\text{tempo } i+1) - \text{mg Tirosina}(\text{tempo } i)}{\text{mg malte} \cdot \text{min}} \quad (1)$$

4.3.3 Determinação de β -amilase

O acompanhamento da atividade de β -amilase foi realizado pela determinação de maltose. Essa determinação foi realizada nas amostras obtidas do mosto, conforme descrito no item 4.2.4 e nas amostras obtidas da reação da β -amilase em meio sintético a 60°C , conforme descrito no item 4.2.6.

o mosto durante a etapa de mosturação e durante a atividade no meio sintético a 60°C .

A concentração de maltose ao longo do tempo foi estimada pelo método colorimétrico do ácido 3,5 dinitrosalicílico (3,5 DNS) (MILLER,1959). No qual em 1 mL de amostra foi adicionado 1 mL do reagente DNS, a mistura foi levada ao banho termostático durante 5 min a 100°C e logo após ao banho de gelo. Foram adicionados 8 mL de água destilada em cada ensaio, a absorbância do complexo formado foi determinada em espectrofotômetro a 546 nm e sua concentração estimada por curva padrão de maltose.

A atividade enzimática ($\text{UA}\beta$) foi estimada pela da diferença entre a concentração de açúcares redutores durante os tempos de amostragem Equação 2. Os resultados foram expressos em mg de maltose liberada e atividade relativa de $\text{UA}\beta$ (%), na qual a maior $\text{UA}\beta$ de cada experimento foi considerada 100 %.

$$\text{UA } \beta\text{-amilase} = \frac{\text{mg maltose}(\text{tempo } i+1) - \text{mg maltose}(\text{tempo } i)}{\text{g malte} \cdot \text{min}} \quad (2)$$

4.3.4 Determinação de α -amilase

O acompanhamento da atividade de β -amilase foi realizado pela determinação da amido. Essa determinação foi realizada nas amostras obtidas da reação da α -amilase em meio sintético a 70°C, conforme descrito no item 4.2.6.

A atividade enzimática de α -amilase foi determinada pela concentração de amido degradado, sendo esta concentração estimada por método iodométrico (BARAJ, GARDA-BUFFON e BADIALEFURLONG, 2010). Para essa determinação foi adicionado 0,1 ml de iodo (0,3 % de I₂ em solução KI 3%) a 1 mL de amostra e 13,9 ml de água destilada. Após 15 min, a absorbância do complexo formado foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm.

A atividade enzimática específica (UA α) foi estimada pela diferença entre a concentração de amido durante os tempos de amostragem, conforme Equação 2. Os resultados foram expressos em mg de amido hidrolisado e atividade relativa de UA α (%), na qual a maior UA α de cada experimento foi considerada 100 %.

$$UD \alpha \left(\frac{\text{mg amido}}{\text{min}} \right) = \frac{ABS(\text{tempo } i) * \text{mg amido}(\text{tempo } i) - ABS(\text{tempo } i+1) * \text{mg de amido}(\text{tempo } i)}{ABS(\text{tempo } i) * \text{mg amido}(\text{tempo } i) * \text{min}} \quad (3)$$

4.3.5 Quantificação de Tricotecenos no malte

As amostras de malte foram trituradas em moinhos de facas durante 2 min e a extração dos tricotecenos DON e 15-ADON foi realizada pelo método de QueChERS modificado por Seus (2014). O procedimento foi realizado a partir de 10 g de amostra, sendo estas trituradas e peneiradas em malha de 32 mesh e homogeneizadas manualmente com 20 mL de água destilada. Após, a mistura foi lavada com 10 mL de hexano por duas vezes. O hexano foi retirado com uso de pipeta. Foram adicionados 20 mL de acetonitrila e a mistura foi homogeneizada em agitador orbital por 20 min a 800 xg. Após, o material foi agitado em vortex por 2 min com 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de cloreto de sódio. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 3220 xg. Em 10 mL do sobrenadante foram adicionados 0,3g de sulfato de magnésio e 0,1g de C₁₈. A mistura foi homogeneizada em vortex por 30 seg e centrifugada novamente por 5 min a 3220 xg. Foram recolhidos 3 mL de sobrenadante, o qual foi seco sob corrente de N₂.

A identificação e quantificação dos tricotecenos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (SHIMADZU - HPLC-UV), sendo a

quantificação realizada por regressão linear entre a área do pico e a concentração de cada micotoxina.

4.3.6 Quantificação de tricotecenos no mosto cervejeiro

Para a eficiência da extração dos tricotecenos DON e 15-ADON medida pela recuperação e limpeza do extrato foram empregados métodos já desenvolvidos descrito na literatura. As amostras de mosto foram previamente fortificadas com $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para avaliação. A Tabela 2 apresenta os métodos de extrações estudados assim como os solventes empregados na extração, todos os métodos citados apresentam como princípio a partição líquido-líquido.

Tabela 2 - Métodos de extração de DON e 15-ADON do mosto cervejeiro

Métodos	Solventes de extração (Volume de Solvente/ Volume de mostra)	Adsorventes
Carrasco et al. (2015)	Acetonitrila(1/2)	C18/
Tanaka et al (2000)	Acetonitrila (7/3)	N/C18/PSA*
Bauer et al. (2016)	Acetato de Etila (4/1)	C18/N

*Foram realizadas alterações nos métodos adicionando, adicionando ou modificando a etapa de limpeza com dição de 0,1g de C18 ou PSA.

4.3.7 Determinação de tricotecenos em meio sintético

A extração das micotoxinas do meio racional foi realizada utilizando partição líquido-líquido conforme descrito por Feltrin et al. (2017) modificado Feltrin (2018). Para isto, em 0,5 ml de amostra foi adicionado 1 ml de acetonitrila (1:2). A mistura foi agitada no vortex durante 1 min, no banho ultrassônico de 40 kHz durante 5 min, logo após, mantida sob refrigeração a $-5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para separação das fases. A fase superior composta por acetonitrila foi retirada e centrifugada durante 5 min a 10000 rpm, para posterior quantificação das micotoxinas por cromatografia.

A identificação das micotoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (SHIMADZU - HPLC-U), conforme descrito por (FELITRIN et al., 2017). Sendo a quantificação realizada por regressão linear entre a área do pico e a concentração de cada micotoxina.

4.3.8 Validação do método de extração

As condições de separação e quantificação das micotoxinas empregadas neste estudo foram as estabelecidas por Feltrin et al. (2017) modificado por Feltrin (2018), onde a exatidão do método empregado foi avaliada pelo percentual de recuperação das micotoxinas avaliadas.

A verificação do percentual de recuperação do método foi realizada com a fortificação dos meios reacionais com os padrões de DON e 15-ADON. Alíquotas de cada padrão foram transferidas para frascos âmbar, seguida da evaporação do solvente, adição de alíquotas de extrato enzimático hidrolisado a 100°C e os substratos referentes a cada enzima. Foram utilizados três níveis de fortificação nas concentrações, 0,74; 1,10 e 1,48 µg mL⁻¹ para DON e 0,62; 1,21 e 1,89 µg mL⁻¹ para 15-ADON.

A extração foi realizada pelo método de partição líquido/líquido e a quantificação por HPLC-UV, conforme descrito no item 4.3.7. O percentual de recuperação foi estimado relacionando a concentração de cada micotoxina encontrada, com a concentração esperada, conforme indicado na Equação 4.

$$R (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) * 100 \quad (4)$$

Onde: R representa o percentual de recuperação; C 1 indica a concentração determinada na amostra fortificada; C 2 a concentração determinada na amostra não fortificada (branco) e C 3 a concentração do padrão utilizada para a fortificação.

4.4 TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS E LIMPEZA DE VIDRARIAS

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

A descontaminação da tina de mosturação não ocorreu conforme descrito acima, pois a tina apresentava sinais de oxidação elevados com longos períodos de exposição ao hipoclorito de sódio (3%). Para isso foi realizada recirculação de soluções contendo a concentração de 3% de hipoclorito de sódio durante 10 min, seguida da recirculação de água destilada por 5 min, esse processo era repetido duas vezes.

4.5 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.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e pela relação das médias, teste de médias, obtidos pela comparação das triplicatas dos experimentos. As diferenças serão testadas a um intervalo de confiança de 95 %.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS NO MALTE

A quantificação de tricotecenos no malte foi realizada de acordo com o método QueChERS modificado por Seus (2014), onde o percentual de recuperação foi 84 % para o 15-ADON e 72 % para o DON, resultados similares aos descritos por Seus (2014). O malte pilsen utilizado para o presente trabalho não apresentou contaminação de DON e concentração de 15-ADON abaixo do limite de quantificação do método.

5.2 EFEITO DA MOAGEM NO RENDIMENTO DA MOSTURAÇÃO

O processo de mosturação consiste principalmente da utilização das enzimas amilolíticas presentes no malte para degradar o amido em açúcares fermentescíveis, isso faz com que a concentração de sólidos solúveis como carboidratos aumentem gradativamente. Segundo Baxter e Hughes (2011), esse processo de hidrólise do amido tem grande relação com a granulometria do grão. Dentre as formas mais comum de acompanhamento desse processo tem-se a determinação de °Brix, °Plato e densidade.. Assim, foram testadas 4 distâncias entre os discos do moinho, obtendo os resultados conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Influência da granulometria da moagem na liberação de açúcar do processo de mosturação.

Tratamento	Distância em mm	° Brix
1	0,5	15,4
2	1	13,8
3	1,5	11,5
4	2	11

Percebe-se pela Tabela 3 que a maior liberação de açúcares, maior ° Brix, está associada a menor distância entre os discos (Tratamento 1), aonde o endosperma do malte (amido) apresenta uma menor granulometria, e conseqüentemente há uma maior solubilidade do mesmo em água, como também maior exposição a ação das enzimas amilolíticas. Entretanto, segundo Lewis e Young (1995) e Kunze, (2006) uma moagem mais eficiente não garante um processo de maior qualidade, pois durante a moagem as cascas também são moídas, dificultando assim

a etapa de filtração, bem como a separação de taninos e outros compostos indesejáveis. Levando isso em consideração, foi adotado 1 mm de distância entre os discos.

A concentração de °Brix do mosto obtido no Tratamento 2 está dentro da faixa industrial de densidade de cervejas do tipo pilsen, conforme Noonan (2003); Priest e Stewart, (2006). Além disso, e estudos acadêmicos como os de Espinoza-Ramírez et al (2014), Kong et al (2016) e Nathanail et al (2016) iniciaram as fermentações com densidades de 12 a 12,5 °Brix aproximadamente, valores inferiores ao encontrado no presente trabalho. Na Figura 5 é possível visualizar a camada filtrante após a etapa de mosturação.

Figura 5 - Meio filtrante da etapa de mosturação



A maior parte dos sólidos ficou retido nas peneiras de mesh 14 e 25 (Tabela 4), nessas peneiras estavam contidas quase a totalidade das cascas que compõem o meio filtrante, como também os grânulos de amido de maior diâmetro. Na peneira de mesh 8 ficaram retidos os grãos de malte que não foram moídos (5 %), e nas demais a farinha obtida majoritariamente de amido. O alto coeficiente de variação deve-se a dificuldade de regular a distância entre os discos do moinho.

Tabela 4 – Perfil Granulométrico da malte após a moagem

Granulometria	Abertura (mm)	Massa (g)* (%)**	CV
8 mesh	2,3800	5,4 (5)	6,8
14 mesh	1,4100	27,1 (29)	1,7
25 mesh	0,0331	25,9 (28)	15,2
30 mesh	0,0234	8,1 (8)	28,6
35 mesh	0,0197	7,4 (8)	24,5
>35 mesh	<0,0197	19,9 (19)	19,8
Total		93,9 (100)	13,7

*Resultados expressos com a média das massas obtidas;** Indica a porcentagem retida em cada mesh, levando em consideração o total encontrado; CV: coeficiente de variação (n=3).

5.3 ACOMPANHAMENTO DA ETAPA DE MOSTURAÇÃO

A primeira rampa de temperatura de uma mosturação é referente ao repouso proteolítico, responsável pela hidrólise de proteínas em aminoácidos e proteínas de menor massa molecular, os dados referentes a atividade enzimática da protease durante esta rampa da mosturação estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade da protease no mosto cervejeiro

Tempo (min)*	Tirosina (mg mL ⁻¹)
0	0,504±0,08 ^a
5	1,209±0,11 ^b
10	1,109±0,07 ^b
15	1,130±0,12 ^b

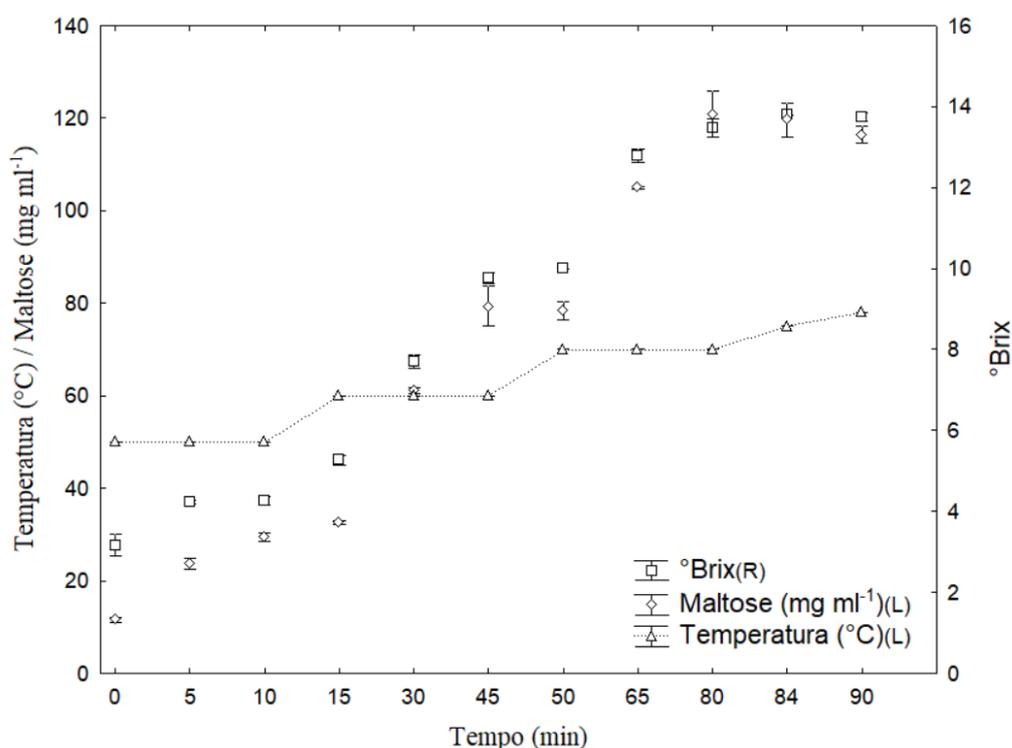
Legenda: *A partir de 15 min não houve variação na concentração de aminoácidos livres. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$)

Lei et al. (2013) estudaram a suplementação de protease durante a etapa de mosturação e verificaram alterações significativas no desempenho de fermentação da levedura. A suplementação de proteases durante a purificação do mosto melhorou o rendimento do extrato, o nível de aminoácidos e de pequenos peptídeos, obtendo valores de 1815,3 mg L⁻¹ de aminoácidos totais, para um mosto de aproximadamente 12,5 °Brix. A fim de comparação, o mosto obtido no presente estudo, o qual não havia suplementação de proteases apresentou concentração inferior de 1130 mg L⁻¹, essa diferença está de acordo com o esperado, visto que, essa concentração está associada a fatores como tempo de repouso na rampa de protease, tipo de malte, granulometria do malte, temperatura da rampa, diferença no método de análise, entre outros.

A enzima β -amilase é responsável pela quebra das cadeias de amido em maltose, açúcar majoritário durante o processo de mosturação, portanto, a principal fonte de energia para a levedura durante a etapa de fermentação (He et al, 2014). No presente estudo, essa enzima apresentou maior atividade a partir do tempo de 15 min de mosturação, conforme esperado, visto que, a partir desse tempo a temperatura do mosto se encontrava na faixa recomendada para as enzimas da classe amilolítica (Figura 6).

Na Tabela 5 e Figura 6 mostra-se que a mosturação ocorreu de forma satisfatória, apresentando resultados semelhantes aos da literatura (ESPINOZA-RAMÍREZ et al. 2014; KONG et al. 2016; LEI et al. 2013).

Figura 6 - Acompanhamento da etapa de mosturação



No presente trabalho não foi possível quantificar essa biomolécula, visto que, a solubilidade do amido, como também sua degradação pelas ações enzimática era afetada com o passar do tempo. Sendo assim, o complexo colorimétrico formado entre o amido e o iodo não apresentava respostas coerentes com o processo. Usualmente a determinação de amido é empregada para identificar o tempo final de mosturação, entretanto, trata-se de uma determinação qualitativa.

5.4 RECUPERAÇÃO DE TRICOTECENO NO MOSTO CERVEJEIRO

Distintos métodos de extração de tricotecenos em mosto cervejeiro foram testados, dentre eles: Carrasco et al. (2015) que utilizavam acetonitrila e apresentavam uma etapa de limpeza com C18, Tanaka et al. (2000) que também utilizava acetonitrila, e Bauer et al. (2016) que utilizava acetato de etila como solvente de extração. Para o método de Tanaka et al. (2000) foram realizados testes com etapas de limpeza, adicionando 0,1 g de C18 ou PSA.

Nenhum dos métodos descritos acima se mostrou eficiente para quantificação simultânea dos tricotecenos DON e 15-ADON no mosto cervejeiro (Tabela 6), acredita-se que isso ocorreu pela elevada complexidade de nutrientes presentes nessa solução, como amido, carboidratos (glicose, maltose, maltotriose, dextrinas, entre outros), proteína e ácidos graxos. Além disso, no presente estudo os testes de recuperações foram realizados com o mosto obtido da última rampa de temperatura, entretanto, caso os métodos fossem eficientes, haveria a necessidade de avaliação dos níveis de recuperação ao final de cada rampa de temperatura, visto que, durante o processo de mosturação a composição do mosto é diferente.

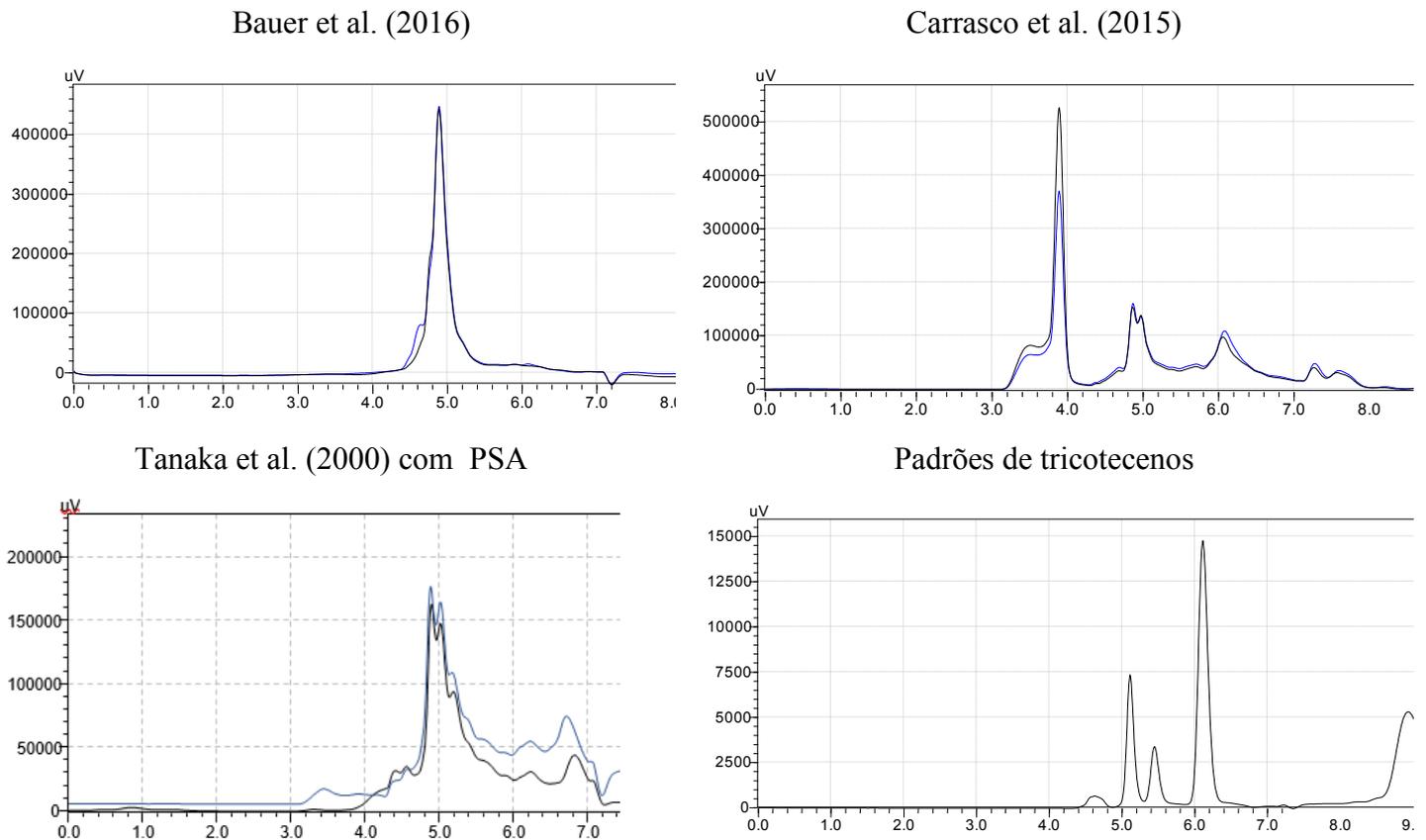
Na figura 7 é possível visualizar os cromatogramas obtidos pelos diferentes métodos de extração testados, como também o cromatograma de eluição dos padrões DON e 15-ADON, que para as condições de cromatografias utilizadas apresentam tempo de retenção de 5,4 e 6,1 min respectivamente. Na Tabela 6 estão apresentados os dados de porcentagem recuperação para cada método testado.

Tabela 6 - Recuperação (%) de DON e 15-ADON em mosto cervejeiro para diferentes métodos de extração

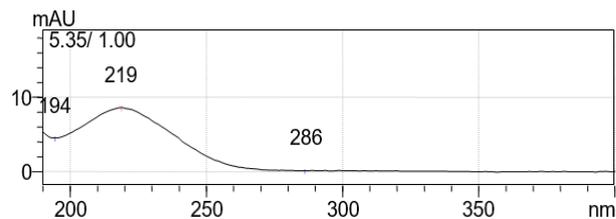
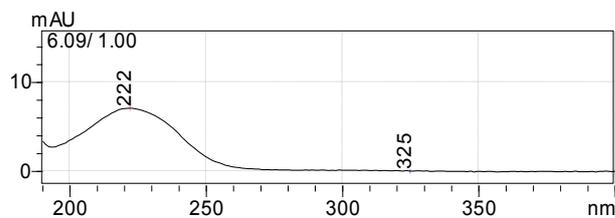
Micotoxina	Bauer et al. (2016)	Carrasco et al. (2015)	Tanaka et al. (2000)	
	N	C18	C18	PSA
DON (%)	5	5	245	230
15-ADON(%)	0	83	60	20

Legenda: N – Não foram testadas etapas de limpeza; C18 – etapa de limpeza com 0,1g de C18; PSA – Etapa de limpeza com 0,1g de PSA

Havia a hipótese que o pico de DON pudesse estar se sobrepondo a interferentes e tendo um aumento de absorção no detector UV, isso foi verificado através da injeção das amostras obtidas pelos métodos de Carrasco et al. (2015) e Tanaka et al. (2000) nas mesmas condições, do cromatógrafo líquido de alta performance com detecção de matriz de diodos (HPLC-DAD). Através dessa análise provou-se que os picos não eram referentes ao DON pois não apresentavam absorção no mesmo comprimento de onda do padrão (Figura 8). O pico referente ao 15-ADON apresentavam a absorção máxima de 221 nm, semelhante ao obtido pelo padrão dessa micotoxina (Figura 9).

Figura 7 - Cromatogramas de recuperações de tricotecenos em mosto cervejeiro

Linhas coloridas indicam adição de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de NIV, DON e 15-ADON no mosto antes dos processos de extração.

Figura 8 - Absorção máxima do DON através do HPLC-DAD**Figura 9 - Absorção máxima do 15-ADON através do HPLC-DAD**

Não foram encontrados trabalhos na literatura que apresentassem quantificação de micotoxinas em mosto cervejeiro através de HPLC-UV, atualmente a espectrometria de massa é a mais utilizada para esse tipo de matriz. Vaclavikova et al. (2013) encontram recuperação de

DON e algumas micotoxinas emergentes na faixa de 85 a 100% em mosto, Inoue et al (2013) obtiveram recuperação de 77 e 64 % para NIV e DON respectivamente.

5.5 RECUPERAÇÃO DE TRICOTECENO EM MEIO SINTÉTICO

Como o objetivo do estudo era relacionar a concentração de tricotecenos com a atividade das micotoxinas e não validar uma metodologia analítica para quantificação de micotoxinas em mosto cervejeiro, optou-se por realizar as reações enzimáticas em meio reacional sintético que simulava as concentrações de amido e proteína presente no processo real. Para a recuperação em meio sintético foi utilizado o método de Feltrin et al. (2017) modificado por Feltrin (2018), os resultados de porcentagem de recuperação para cada enzima estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Recuperação de DON e 15-ADON em meio sintético

Micotoxina	Nível ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Meio sintético		
		β -amilase % (CV)*	α -amilase % (CV)*	Protease % (CV)*
DON	1° (0,74)	100 (7)	109 (5)	132 (10)
	2° (1,10)	113 (12)	106 (2)	144 (23)
	3° (1,48)	132 (10)	118 (6)	133 (17)
15-ADON	1° (0,62)	81 (9)	67 (10)	110 (4)
	2° (1,21)	112 (5)	119 (5)	114 (7)
	3° (1,89)	114 (4)	105 (8)	112 (5)

Legenda: amilases α e β amilases (solução de amido 154 mg mL^{-1} , enzimas amilolíticas inativas em tampão fosfato 5 mmol L^{-1} , pH 5.5; proteases (solução de proteína 22 mg mL^{-1} , proteases inativas em tampão fosfato 5 mmol L^{-1} , pH 5; as extrações ocorreram após período de incubação de 35 min a temperatura de cada enzima *Resultados expressos com Média das recuperações, CV-coeficiente de variação (n=3).

Para a Comissão Europeia (2006) e ANVISA (2003), os intervalos aceitáveis de recuperação, para análise de compostos traços, devem corresponder a faixa entre 70% e 120% com coeficiente de variação de até $\pm 20\%$. Através da Tabela 7 percebe-se que somente a micotoxina DON no meio sintético da protease e o primeiro nível de contaminação do 15-ADON no meio sintético da α -amilase apresentaram níveis de recuperação fora da faixa aceitável, entretanto, como todas as demais recuperações estavam dentro da faixa, optou-se por prosseguir como o trabalho. A alta recuperação pode estar correlacionada a um efeito de matriz de aminoácidos aromáticos presentes. Além disso, há trabalhos na literatura em mosto cervejeiros que apresentam níveis de recuperação de DON fora da faixa recomendada, por exemplo, Inoue et al. (2013) encontraram recuperações em mosto cervejeiro de 64, 54 e 34 % para as micotoxinas DON, HT-2 e T-2, respectivamente.

5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO SINTÉTICO NA PRESENÇA DE DON E 15-ADON

Após a avaliação da recuperação dos tricotecenos DON e 15-ADON nos meios sintéticos de cada enzima, foram realizados testes para verificar se a presença dessas micotoxina e suas concentrações afetavam a atividade enzimática das amilases e proteases obtidas do mosto cervejeiro. A Figura 10 e a Tabela 8, expõem os resultados da atividade enzimática de ambas enzimas na presença e ausência de ambos contaminantes. As reações foram realizadas nos meios sintéticos ideais de cada enzima, e nas mesmas condições empregadas no processo de mosturação.

A ação das enzimas proteolíticas no Tratamento 2 resultou em uma maior liberação de aminoácidos (Figura 10 - (a) Δ) quando comparada aos demais ensaios ($p < 0,05$). Percebe-se também que essa maior liberação ocorreu no tempo de 15 min para todos os ensaios, mesmo tempo obtido durante a mosturação. Através da análise da Tabela 8 é possível constatar que o menor nível de contaminação (Tratamento 1) modificou o tempo de maior atividade relativa, quando comparado aos demais ensaios ($p < 0,05$), além disso, a presença de micotoxinas independentemente do Tratamento, manteve a atividade relativa das enzimas proteolíticas em valores maiores quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

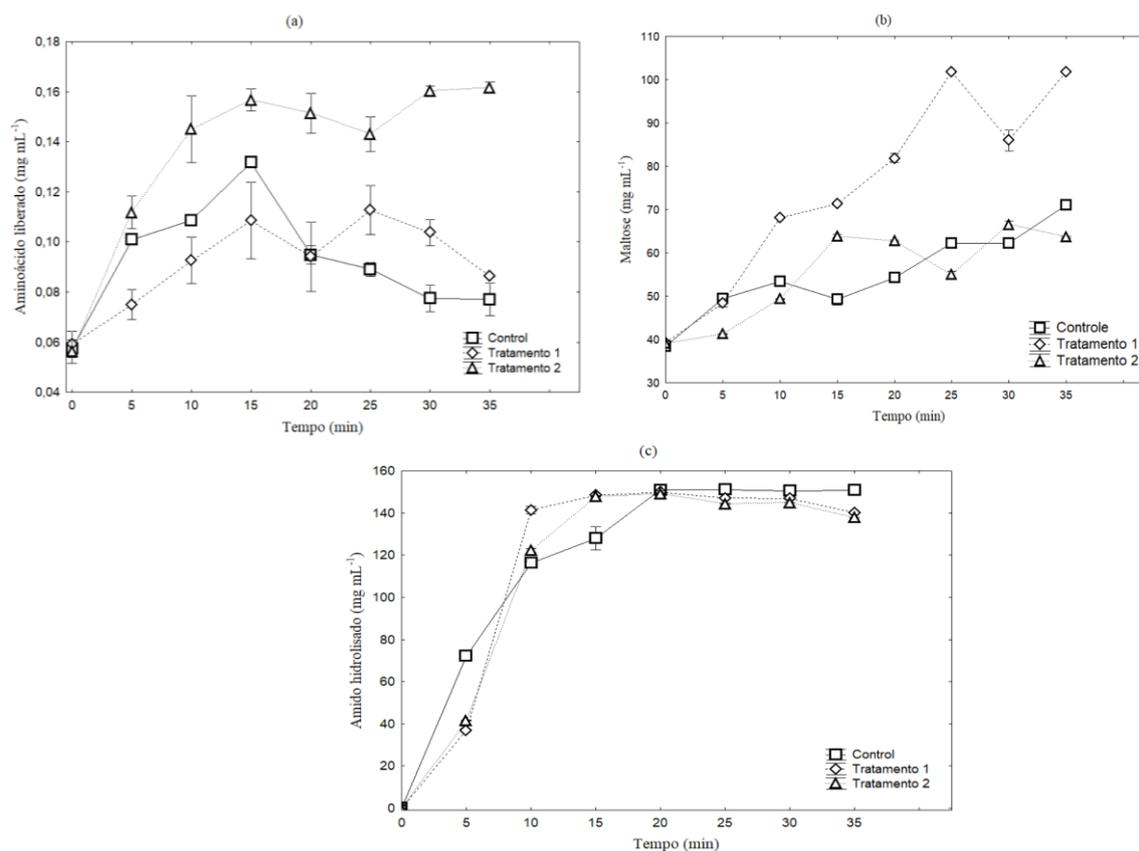
Tabela 8 - Atividade relativa das enzimas em meio sintético (%)

Time (min)	Protease			β -amilase			α -amilase		
	Controle	Tratamento		Controle	Tratamento		Controle	Tratamento	
		1	2		1	2		1	2
5	100 ^{aA}	95 ^{aB}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	63 ^{aB}	53 ^{aC}	100 ^{aA}	52 ^{aB}	68 ^{aC}
10	59 ^{bA}	100 ^{aB}	91 ^{aB}	69 ^{bA}	100 ^{bB}	71 ^{bA}	81 ^{bA}	100 ^{bB}	100 ^{bB}
15	57 ^{bA}	71 ^{bcA}	61 ^{bA}	33 ^{cA}	74 ^{cB}	100 ^{cC}	59 ^{cA}	70 ^{cB}	80 ^{cC}
20	22 ^{cA}	52 ^{bcB}	43 ^{cB}	36 ^{cdA}	74 ^{cB}	72 ^{bB}	52 ^{dA}	53 ^{aA}	61 ^{dB}
25	13 ^{dA}	57 ^{bB}	31 ^{cC}	41 ^{eA}	75 ^{dB}	46 ^{dA}	40 ^{eA}	39 ^{dA}	45 ^{eB}
30	8 ^{eA}	45 ^{cB}	32 ^{cC}	36 ^{cdA}	54 ^{eB}	55 ^{aB}	35 ^{eA}	35 ^{dA}	40 ^{eB}
35	6 ^{eA}	24 ^{dB}	28 ^{dB}	43 ^{deA}	62 ^{aB}	42 ^{dA}	30 ^{fA}	28 ^{fA}	32 ^{fB}

Legenda: Controle: Atividade enzimática sem adição de micotoxina; Tratamento 1: atividade enzimática com 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e 0,23 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON; Tratamento 2: atividade enzimática com 0,81 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e 0,85 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON; Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos, letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os experimentos ($p < 0,05$).

Ao contrário do observado para as enzimas proteolíticas, a β -amilase (Figura 10 (b)) apresentou maior liberação de maltoses no Tratamento 1(\diamond), além disso, quanto maior a contaminação de DON e 15-ADON maior o tempo necessário a β -amilase alcançar sua maior atividade relativa (Tabela 8), mostrando diferenças significativas quando comparado aos ensaios ($p < 0,05$). Resultados semelhantes ao encontrado foram relatados por Garda-Bufferon, Baraj e Badiale-Furlong (2010), os autores verificaram que o efeito sinérgico das micotoxina T2 e DON aumentam a atividade de β -amilase, quando os níveis de contaminação de toxinas no malte foram altos ($1 \mu\text{g g}^{-1}$ de malte), resultado semelhante ao encontrado no presente estudo, no qual na mesma concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tratamento 1) houve aumento na atividade das enzimas.

Figura 10 - Atividade enzimática em meio sintético para todas as enzimas



Legenda: (a) Atividade enzimática da protease medida pela liberação de aminoácidos a 50 °C; (b) atividade enzimática da β -amilase medida pela liberação de maltose a 60°C; (c) atividade enzimática da α -amilase medida pela hidrólise do amido inicial a 70°C; Controle: Atividade enzimática sem adição de micotoxina; Tratamento 1: atividade enzimática com $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e $0,23 \mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON; Tratamento 2: atividade enzimática com $0,81 \mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e $0,85 \mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON.

A degradação do amido pelas α -amilases está apresentada na Figura 10 (c), percebe-se que os Tratamentos 1 e 2 apresentaram praticamente o mesmo perfil, mostrando diferenças

estatísticas ($p < 0,05$). No momento inicial, maior atividade relativa foi observada no controle, no entanto, em 10 min, a adição de micotoxinas resultou no aumento da atividade. No estudo realizado por Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) os autores também obtiveram maior atividade dessa enzima quando na presença de DON e toxina T-2. Como conclusão os autores relatam que esses tricotecenos interferem o desempenho de amilases, mas a concentração dessas micotoxinas não afeta a atividade das mesmas de forma linear.

A contaminação com DON e 15-ADON afeta as enzimas envolvidas na etapa de mosturação do processo cervejeiro, podendo causar aumento de atividade ou mudanças na composição do mosto. Os autores Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010), formularam uma hipótese que as micotoxinas DON e T-2 podem formar uma associação física que cause alteração na configuração terciária de outras proteínas solúveis do malte cervejeiro, sendo assim, na presença de maiores quantidades dessas toxinas, haveria um elevado número de pequenas proteínas que se associavam a essas micotoxinas, deixando assim as amilases mais livres para atuar.

Não foram encontrados outros estudos que relacionam a atividade dessas enzimas com a presença de DON e 15-ADON. É possível constatar que a presença de tricotecenos afeta na atividade das enzimas envolvidas durante o processo de mosturação. Entretanto esse efeito não é linear, visto que dependendo da concentração do contaminante e enzima avaliada pode ocorrer um maior incremento da atividade enzimática. A redução da atividade somente foi observada para a α -amilase a partir de 20 minutos de reação. Outro aspecto importante é que a contaminação tende a causar um atraso na atividade máxima das enzimas (Tabela 8).

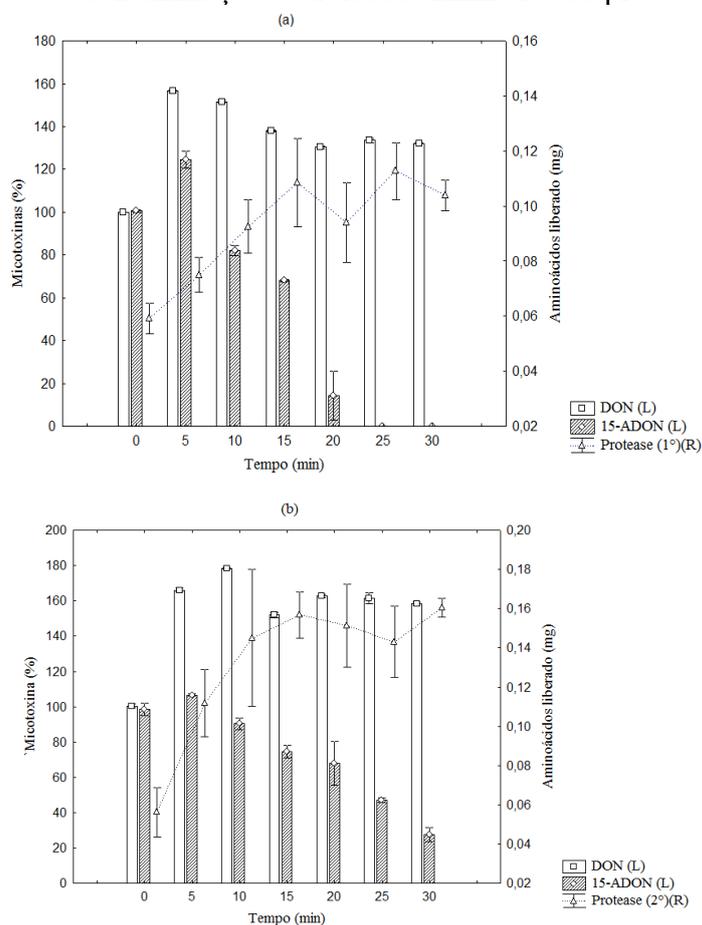
5.7 DETECÇÃO DAS MICOTOXINAS DON E 15-ADON DURANTE AS REAÇÕES EM MEIO SINTÉTICO

5.7.1 Protease

Houve redução na concentração da micotoxina 15-ADON ao longo do tempo da reação enzimática da protease, obtendo valores de redução de 100 e 70% para o Tratamento 1 e Tratamento 2 respectivamente no final do processo (Figura 11). O contrário do observado para a micotoxina DON, onde houve aumento nas concentrações de 30 e 55 %, para o Tratamento 1 e Tratamento 2 respectivamente. Possivelmente alguma das proteases possui a capacidade de desacetilar a radical acetila presente na molécula de 15-ADON formando a micotoxina DON.

Visto que, a concentração de 15-ADON não reduz na mesma proporção que a concentração de DON aumenta, possivelmente também haja degradação dessas micotoxinas.

Figura 11 - Relação entre a concentração de DON e 15-ADON em dois níveis de contaminação e atividade enzimática de protease.



Legenda: (a) Atividade enzimática da protease com 0,2 µg ml⁻¹ de DON e 0,23 µg ml⁻¹ de 15-ADON;
(b) atividade enzimática da protease com 0,81 µg ml⁻¹ de DON e 0,85 µg ml⁻¹ de 15-ADON.

A maior liberação de DON durante as reações enzimáticas está relacionada com a maior atividade enzimática (Figura 11). Quando essa atividade estabilizava ou cessava a concentração de DON também se mantinha constante, entretanto, esse efeito não foi observado para a concentração de 15-ADON.

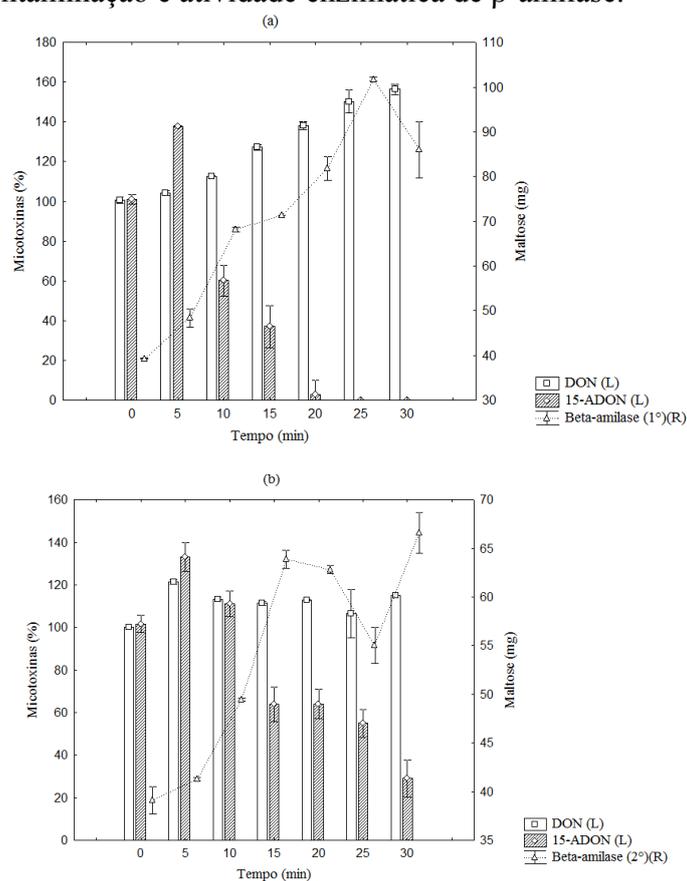
O aumento na concentração de DON durante alguns processos já foi relatado na literatura, Zhou et al. (2008) detectaram aumento de 8 a 18% nas concentrações de DON em amostras de cevada após o tratamento com protease. Vidal et al. (2016) encontraram maiores liberações de DON durante a primeira fermentação de pães quando estes era suplementados com algumas enzimas (α -amilase, celulase, protease e glicose oxidase), segundo os autores

essas enzimas podem atuar sobre micotoxinas ligadas a amido, polissacarídeos e proteínas, aumentando assim suas concentrações durante o processo.

5.7.2 β – amilase

A Figura 12 (a) e (b) apresentam os teores de micotoxinas determinados durante a reação da β -amilase em dois níveis de contaminação (Tratamento 1 e 2), nota-se um perfil semelhante ao apresentado pelas proteases, onde há redução de 15-ADON e aumento de DON. Entretanto, quando comparado ao Tratamento 2 a concentração de DON não apresenta grandes varrições se mantendo na faixa de 100 a 120 % durante a atividade de β -amilase.

Figura 12 - Relação entre a concentração de DON e 15-ADON em dois níveis de contaminação e atividade enzimática de β -amilase.



Legenda: (a) Atividade enzimática da β -amilase com 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e 0,23 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON; (b) atividade enzimática da β -amilase com 0,81 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e 0,85 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON.

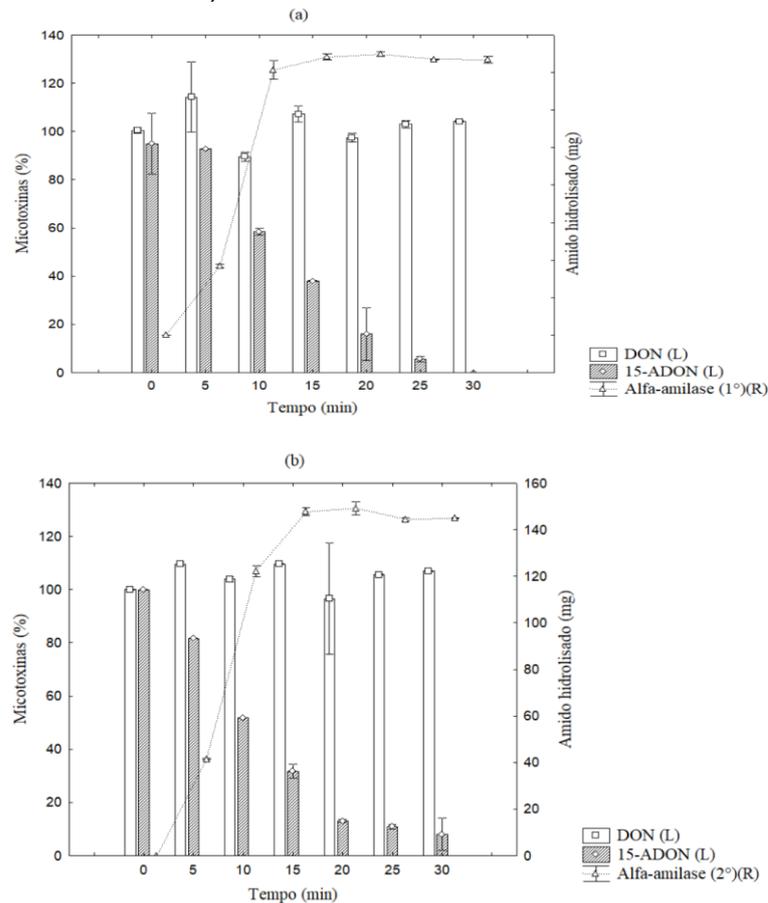
Existe a possibilidade de que as proteases ainda estivessem agindo, visto que, a reação da β -amilase ocorrer a 60 $^{\circ}\text{C}$ e pH 5,5, enquanto as condições de reação da protease foram de

50 °C e pH 5. Logo, mesmo possuindo menor atividade, a ação da protease não deve ser descartada quando avaliado o aumento da concentração de DON. Não foram encontrados na literatura dados que relacionem a degradação de tricotecenos mediante a atividade de β -amilase.

5.7.3 α – Amilase

As reduções nas concentrações de 15-ADON, entretanto, a concentração de DON se manteve praticamente constante em relação à inicial, apresentando variações de no máximo 12% ($p < 0,05$) entre os tempos (Figura 13 (a) e (b)).

Figura 13 - Relação entre a concentração de DON e 15-ADON em dois níveis de contaminação e atividade enzimática de α -amilase.



Legenda: (a) Atividade enzimática da α -amilase com 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e 0,23 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON ; (b) atividade enzimática da α -amilase com 0,81 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DON e 0,85 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de 15-ADON.

Vidal et al. (2016) verificaram a adição de α -amilase durante a fermentação de pães, sendo que a adição dessa enzima, diminui a redução de DON durante a fermentação. Além disso, aumentos na concentração de DON foram encontrados quando a α -amilase apresenta

maior atividade. Esses resultados veem de encontro com o obtido no Tratamento 1 do presente trabalho (Figura 13 (a)), onde há um incremento na concentração DON quando a enzima apresentava alta atividade.

Além disso diversos autores verificaram a influência da concentração de DON durante fermentações de pães, tendo como resultado que quanto maior o tempo de fermentação utilizando α -amilase, maior foi o nível detectado dessa micotoxina. Simsek et al. (2012) relataram aumento nas concentrações de DON no final da fermentação (180 min a 30 ° C) de quase 100 %. Bergamini et al. (2010) relataram um aumento de 38% em DON (85 min a 40 ° C), enquanto Suman et al. (2012) relataram um aumento de 10-14% no DON em biscoitos (4 min a 30 ° C). Segundo Vidal et al. (2016) esses resultados sugerem que a α -amilase tem um impacto no equilíbrio DON durante o processo de panificação, pois o DON pode ser liberado de ligações com o amido, conjugados proteicos ou degradação de DON acetilado (3-ADON e 15-ADON).

5.7.4 Considerações finais

Pela análise das Figuras 11, 12 e 13 pode-se concluir que a micotoxina DON não é degradada pelo processo de mosturação, além do mais, sua concentração é incrementada cerca de 45, 30 e 8% pela ação das enzimas proteolíticas, β -amilase e α -amilase respectivamente. Logo, mesmo que o malte apresente a concentração máxima legislada por lei (Tratamento 1), nada garante que o produto final apresente maiores concentrações dessa micotoxina.

A concentração do tricotecenos 15-ADON é reduzido significativamente ($p < 0,05$) durante a atividade das enzimas, apresentando valores abaixo do limite de detecção do método para o Tratamento 1, e valores de 26, 28 e 8% pela ação das enzimas proteolíticas, β -amilases e α -amilases respectivamente.

Para as enzimas amilolíticas e proteolíticas, a conversão do tricoteceno 15-ADON em DON não ocorre linearmente, visto que, a concentração de 15-ADON não reduziu na mesma ordem que a concentração de DON aumentou. Isso pode indicar que a ação das enzimas presente no processo de mosturação pode estar relacionado a formação de conjugados com outras moléculas presentes, preferencialmente com DON, uma vez que a redução de 15-ADON resultou em pequeno aumento da concentração de DON. Estes conjugados podem ocorrer com moléculas de amido, polissacarídeos ou proteínas, mascarando assim sua quantificação. Essa reação já foi relatada em diversos estudos na literatura com o de Zhao et al. (2014) e Khaneghah et al. (2018).

6 CONCLUSÃO

As concentrações dos tricotecenos DON e 15-ADON afetam as atividades das enzimas amilolíticas e proteolíticas envolvidas no processo de mosturação. Nos ensaios com contaminação observou-se atrasos e alterações nas atividades máximas de cada enzima.

A concentração 15-ADON é reduzida significativamente ($p < 0,05$) pelas enzimas presentes na etapa de mosturação, apresentando valores abaixo do limite de detecção do método para o Tratamento 1 e reduções de 74, 72 e 92 % na concentração inicial de 15-ADON pelas enzimas proteolíticas, β -amilases e α -amilases respectivamente no Tratamento 2.

O tricoteceno DON não é degradado pelo processo de mosturação, além disso, sua concentração é incrementada pelas enzimas da etapa de mosturação. Logo, mesmo que o malte apresente a concentração dessa toxina dentro da estabelecida por lei, nada garante que o produto final não apresente maiores concentrações da mesma.

Diante do exposto, a mosturação cervejeira mostrou-se um método promissor para redução da micotoxina 15-ADON e não foi eficaz na concentração de DON. Além disso, a contaminação de micotoxina durante a mosturação pode afetar as características do produto final, como também afetar o rendimento do processo, causando assim perdas econômicas.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste estudo possibilitaram a avaliação da influência da presença de micotoxinas durante a etapa de mosturação. A partir das considerações já apresentadas sugere-se para trabalhos futuros:

- Realizar mais estudos de recuperação de tricotecenos em mosto cervejeiro, a fim de acompanhar a concentração de micotoxinas durante a etapa de mosturação, e assim verificar se os resultados são reprodutivos;
- Verificar o efeito de outras micotoxinas presentes no malte no processo de mosturação;
- Acompanhar a concentração de micotoxinas durante as etapas de filtração e fervura;
- Percebeu-se que a contaminação de DON e 15-ADON altera a atividade das enzimas, devido a isso, seria interessante analisar o perfil de açúcares e aminoácidos de mostos obtidos por maltes contaminado por micotoxinas;
- Avaliação da biodegradação do DON e 15-ADON durante a mosturação verificando assim se há produção de metabólitos tóxicos derivados dessas micotoxinas;
- Avaliar a associação de micotoxinas com as macromoléculas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGARRA, F. M. Evaluación del Peligro **Potencial y Real de la Presencia de Ocratoxina A, Tricotecenos B y Patulina en Trigo y Manzana Mediante Técnicas Microbiológicas y Cromatográficas**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universitat de València, València, 2010.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of International**. 17th, 2000.1 CD-ROM.
- 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: 15 de julho de 2017.
- 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.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. 1.ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. 4V.
- BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J. BADIÁLE-FURLONG, E. Effect of Deoxynivalenol and T-2 Toxin in Malt Amylase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 53, n.3, 2010.
- BARTH, R. The chemistry of beer. **American Chemical Society**, 2013. p. 37-47.
- BARTH-HAAS GROUP. The barth report, Disponível em: <http://barley-malt.ru/wp-content/uploads/2015/08/barthreport_2014-2015_en.pdf>. Acesso em: 10/09/2016
- BAUER, J. I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**, 63, 135-139, 2016.
- BAXTER, E. D.; HUGHES, P. S. An overview of the malting and brewing processes. **Beer**. p. 1-13, 2001.
- BERGAMINI, E.; CATELLANI, D.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R.; SUMAN, M. Fate of Fusarium mycotoxins in the cereal product supply chain: the deoxynivalenol (DON) case within industrial bread-making technology. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 5, p. 677-687, 2010.
- BENNET, G. A.; SHOTWELL, O. Criteria for determining purity of Fusarium mycotoxins. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 270-275, 1990.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.
- BERNER, T. S.; JACOBSEN, S.; ARNEBORG, N. The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 215- 221, 2013.

BERTUZZI, T.; RASTELLI, S.; MULAZZI, A.; DONADINI, G.; PIETRI, A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. **Food Control**, V. 22, N.12, p. 2059-2064, 2011.

BOEIRA, C. Z.; SILVELLO, M.A.C.; REMEDI, R. D. **Redução da contaminação de Nivalenol durante fermentação alcoólica com aplicação de campos magnéticos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

BOER, C. G.; OBICI, L.; DE SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M.; Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1203-1207, 2006.

BOLECHOVÁ, M.; BENEŠOVÁ, K.; BĚLAKOVÁ, S.; ČÁSLAVSKÝ, J.; POSPÍHALOVÁ, M.; MIKULÍKOVÁ, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, v. 47, p. 108-113, 2015.

BRASIL. Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho de 2009. **Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 04 jun. 2009.

BRASIL. Resolução – RDC nº7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 09 mar. 2011. Seção 1, p. 66.**

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; **Stevens, R. Brewing science and practice**. Cambridge: CRC Press, 2004.

BRUINS M. B. M.; KARSAI I.; SCHEPERS J.; SNIJDERS C. H. A. Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to in vitro selection for *Fusarium* head blight resistance. **Plant Science** v. 94, p. 195–206, 1993.

CARVALHO, L.G. 2007. **Dossiê Técnico: Produção de Cerveja**. Rio de Janeiro, REDETEC Rede Tecnológica do Rio de Janeiro, 54 p.

CARRASCO, R. 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.

CERVBRASIL, Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - Anuário 2014. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/2014/04/a-cerveja-como-contribuicao-economica>>. Acesso em: 26 set, 2016.

CHEMSPIDER, **Search and share chemistry**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 26 janeiro, 2017.

COMISSÃO EUROPEIA (CE)- Regulamento nº 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 outubro de 2017.

CONTAM, Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, **European Food Safety Authority Journal**, v. 11, n. 6, p. 1-119, 2013.

CHENG, B.; WAN, C.; YANG, S.; XU, H.; WEI, H. U. A.; LIU, J.; Zeng, M. Detoxification of deoxynivalenol by Bacillus strains. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 3, p. 599-614, 2010.

CUNDLIFFE, E.; DAVIES, J. E. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 11, n. 3, p. 491-499, 1977.

D'AVILA, R. F.; LUVIELMO, M.; MENDONÇA, C. R. B.; JANTZEN, M. M. **Adjuncts used for beer production: Features and applications**. Estudos Tecnológicos em Engenharia, v. 8, n. 2, p. 60-68, 2012.

ESPINOSA-RAMÍREZ, J.; PÉREZ-CARRILLO, E.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Maltose and glucose utilization during fermentation of barley and sorghum lager beers as affected by β -amylase or amyloglucosidase addition. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 602-609, 2014.

ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, n. 1, p. 205-239, 2004.

EVANS, D. E.; VAN WEGEN, B.; MA, Y.; EGLINTON, J. The impact of the thermostability of alpha-amylase, beta-amylase, and limit dextrinase on potential wort fermentability. **Journal-American Society Of Brewing Chemists**, v. 61, n. 4, p. 210-218, 2003.

EVANS, D. E., DAMBERGS, R.; RATKOWSKY, D.; LI, C.; HARASYMOW, S.; ROUMELIOTIS, S.; EGLINTON, J. K. Refining the prediction of potential malt fermentability by including an assessment of limit dextrinase thermostability and additional measures of malt modification, using two different methods for multivariate model development. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 1, p. 86-96, 2010

EUROMONITOR INTERNATIONAL- Disponível em: <http://www.euromonitor.com/>. />. Acesso em: 10 janeiro. 2018.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **Micotoxinas**. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>>. Acesso em: 10 setembro. 2017.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos**. Food & Agriculture Org, 1993.

- FELTRIN, A. C. P. **Degradação de trico tecenos A e B por ação enzimática** (título provisório). 2018. Tese (Doutorado em andamento em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.
- FELTRIN, A. C. P., FONTES, M. R. V., GRACIA, H. D. K., BADIALE-FURLONG, E., & GARDA-BUFFON, J. Peroxidase from soybean meal: obtention, purification and application in reduction of deoxynivalenol levels. **Química Nova**, v. 40 n. 8, p. 908-915, 2017.
- FLORES, F. F.; MYRA, E.; GONZÁLEZ, P. E. An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. **Food chemistry**, v. 218, p. 378-385, 2017.
- FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores Biológicos, Fundamentos e Aplicações. 1.** ed. Lisboa: Editora Lidel, 2007.
- FOROUD, N. A.; EUDES, F. Trichothecenes in cereal grains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 147-173, 2009.
- FUCHS, E.; BINDER, E. M.; HEIDLER, D.; KRŠKA, R. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 4, p. 379-386, 2002.
- GARDA, J. **Micotoxinas em cervejas: metodologia, ocorrência e influencia no processo fermentativo.** Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, 2002.
- GARDA-BUFFON, J.; BARAJ, E.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 505-511, 2010.
- GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G. C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.
- GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 8, p. 1998-2008, 2017.
- HATHOUT, A. S.; ALY, S. E. Biological detoxification of mycotoxins: a review. **Annals of microbiology**. v. 64, n. 3, p- 905-919, 2014.
- HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, P. M.; Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science & Technology**, V. 21, n. 2, p. 67-76, 2010.
- IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; DE CERAIN, A. L. Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. **Food Control**, V. 25, n. 1, p. 81-88, 2012.

- INOUE, T., NAGATOMI, Y., UYAMA, A., MOCHIZUKI, N. (2013). Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 7, p. 1410-1415, 2013.
- JANEČEK, S. Amylolytic enzymes-focus on the alpha-amylases from archaea and plants. **Nova biotechnol**, v. 9, n. 1, p. 5-25, 2009.
- JONES, B. L. Endoproteases of barley and malt, **J. CEREAL SCI.** N. 42, p. 139–156, 2005.
- KHANEGHAH, A. M.; MARTINS, L. M.; VON HERTWIG, A. M.; BERTOLDO, R.; SANT'ANA, A. S. Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing-A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 13-24, 2018.
- KLOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D. The effect of raw material contamination with mycotoxins on the composition of alcoholic fermentation volatile by-products in raw spirits. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9723-9727, 2010.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicação prática**. Rio De Janeiro, RJ, 2013.
- KOCH, P. State of the art of trichothecenes analysis. **Toxicology letters**, v. 153, p. 109-112, 2004.
- KONG, Z.; LI, M.; AN, J.; CHEN, J.; BAO, Y.; FRANCIS, F.; DAI, X. The fungicide triadimefon affects beer flavor and composition by influencing *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Scientific reports**, v. 6, p. 33552, 2016.
- KOSTELANSKA, M.; HAJŠLOVA, J.; ZACHARIASOVA, M.; MALACHOVA, A.; KALACHOVA, K.; POUŠTKA, J.; KRŠKA, R. Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n. 8, p. 3187–3194, 2009.
- KUPSKI, L; QUEIROZ, M. I.; BADIÁLE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase A to a baking process to mitigate contamination of wheat flour by ochratoxin A. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 248-254, 2018.
- KUNZE, W. **Tecnología para cerveceros y malteros** (1 ed.). Berlin: Westkreuz-Duckerei Ahrens KG, 2006
- KRŠKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETTERSSON, H.; CHAN, D. Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 5-6, p. 1215-1226, 2007.
- LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing** (1 ed.). Norwich: Page Bros. 1995.
- LAITILA, A. Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. **Brewing microbiology**, p. 107-139, 2015.

- LEI, H.; ZHENG, L.; WANG, C.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International journal of food microbiology**, v. 161, n. 2, p. 76-83, 2013.
- LIN, N. N.; CHEN, J.; XU, B.; WEI, X.; GUO, L.; XIE, J. W. The roles of carboxylesterase and CYP isozymes on the in vitro metabolism of T-2 toxin. **Military Medical Research**, v. 2, n. 1, p.13, 2015.
- MCLEAN, M. The phytotoxicity of Fusarium metabolites: An update since. **Mycopathologia**, v. 133, n. 3, p. 163-179, 1996.
- MALACHOVA, A.; CERKAL, R.; EHRENBERGERIVA, J.; DZUMAN, Z.; VACULOVA, K.; HAJLSLOVA, J. Fusarium mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 2495-2505, 2010.
- MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.
- MEERDINK, G.L. Mycotoxins. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 1, p. 88-93, 2002.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILANI, J.; MALEKI, G. Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2372-2375, 2014.
- NATHANAIL, A. V.; GIBSON, B.; HAN, L.; PELTONEN, K.; OLLILAINEN, V.; JESTOI, M.; LAITILA, A. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms Fusarium trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. **Food chemistry**, v. 203, p. 448-455, 2016.
- NOONAN, G. J. **New Brewing Lager Beer: The Most Comprehensive Book for Home and Microbrewers**. Brewers Publications. 2003.
- PAPAZIAN, C. *The Complete Joy of Homebrewing*. 3.ed. Editora Harper Collins, 2003.
- PESTKA, J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 283-298, 2007.
- PASCARI, X.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S.; SANCHÍS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 121-29, 2017.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks **Animal Feed Science and Technology**, p. 283-298, 2007.
- PIACENTINI, K. C.; ROCHA, L. O.; FONTES, L. C.; CARNIELLI, L.; REIS, T. A.; CORRÊA, B. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B 1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food Chemistry**, v. 218, p. 64-69, 2017.

PIACENTINI, K. C.; SAVI, G. D.; OLIVO, G.; SCUSSEL, V. M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, v. 50, p. 925-929, 2015.

PIACENTINI, K. C.; SAVI, G. D.; PEREIRA, M. E.; SCUSSEL, V. M. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). **Food chemistry**, v. 187, p. 204-209, 2015.

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, p. 21-37, 1999.

PORTO, P. D. **Tecnologia de fabricação de malte: uma revisão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2011.

POPPENBERGER, B.; BERTHILLER, F.; LUCYSHYN, D.; SIEBERER, T.; SCHUHMACHER, R.; KRSKA, R.; KUCHLER, K.; GLÖSSL, J.; LUSCHNIG, C.; ADAM, G. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP- glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, V. 278, n. 48, p. 47905-47914, 2003.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. Handbook of Brewing. **Food Science and Technology**. 2.ed. USA: Editora Taylor and Francis Group, 2006.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxin and their micotoxicoses - na overview. **International Journal of Food microbiology**, v 1991, p. 3-10, 2007.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005.

ROTTER, B. A. Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 48, n. 1, p. 1-34, 1996.

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

SATO, I.; ITO, M.; ISHIZAKA, M.; IKUNAGA, Y.; SATO, Y.; YOSHIDA, S.; TSUSHIMA, S. Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 327, n. 2, p. 110-117, 2012.

SCHMIDT-HEYDT, M; MAGAN, N.; GEISEN, R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 2, p.142-149, 2008.

SEUS, E. R. **Otimização de método para determinação de tricotecenos em amostras de trigo**. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SIMSEK, S.; BURGESS, K.; WHITNEY, K. L.; GU, Y.; QIAN, S. Y. Analysis of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 287-292, 2012.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology letters**, v.153, n. 1, p. 91-98, 2004.

SCHMEITZL, C.; VARGA, E.; WARTH, B.; KUGLER, K. G.; MALACHOVÁ, A.; MICHLMAYR, H.; WIESENBERGER, G.; MAYER, K. F. X.; MEWES, H-W.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R.; BERTHILLER, F.; ADAM, G. Identification and Characterization of Carboxylesterases from *Brachypodium distachyon* Deacetylating Trichothecene **Mycotoxins**. *Toxins*, v. 8, n. 1, p. 6, 2015.

SUMAN, M.; MANZITTI, A.; CATELLANI, D. A Design of Experiments approach to studying Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside evolution throughout industrial production of wholegrain crackers exploiting LC-MS/MS techniques. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 3, p. 241-249, 2012.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1-2, p. 23-28, 2000.

TIAN, Y.; TAN, Y.; LIU, N.; LIAO, Y.; SUN, C.; WANG, S.; WU, A. Functional agents to biologically control deoxynivalenol contamination in cereal grains. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 395, 2016.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e cervejarias: a história, a arte e a tecnologia**. São Paulo: Aden, p. 223, 2001

TSE, K. L.; BOSWELL, C. D.; NIENOW, A. W.; FRYER, P. J. Assessment of the effects of agitation on mashing for beer production in a small scale vessel. **Institution of Chemical Engineers**, v. 81, n. 1, p. 3-12, 2003.

TSUSHIMA, S. Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. **FEMS microbiology letters**, v. 327, n. 2, p.110-117, 2012.

UENO, Y; HSIEH, D. PH. The toxicology of mycotoxins. **CRC critical reviews in toxicology**, v. 14, n. 2, p. 99-132, 1985.

VACLAVIKOVA, M.; MALACHOVA, A.; VEPRIKOVA, Z.; DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; HAJŠLOVA, J. 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 750-757, 2013.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: tecnología, química y microbiología**. Acibia, 1996.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2010. Vol. 1

VIDAL, A.; AMBROSIO, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; & MARÍN, S. Enzyme bread improvers affect the stability of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during breadmaking. **Food chemistry**, v. 208, p. 288-296, 2016.

XU, J.; WANG, H.; ZHU, Z.; JI, F.; YIN, X.; HONG, Q.; SHI, J. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* ZDS-1: Exploring the degradation of Zearalenone by *Bacillus* spp. **Food Control**, v. 68, p. 244-250, 2016.

YOUNG, J. C.; ZHOU, T.; YU, H.; ZHU, H.; GONG, J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 136-143, 2007.

YANG, G. H.; JARVIS, B. B.; CHUNG, Y. J.; PESTKA, J. J. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 164, n. 2, p. 149-160, 2000.

YU, H.; ZHOU, T.; GONG, J.; YOUNG, C.; SU, X.; LI, X-Z.; ZHU, H.; TSAO, R.; YANG, R. Isolation of deoxynivalenol transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. **BMC Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 182, 2010.

ZHAO, Z.; RAO, Q.; SONG, S.; LIU, N.; HAN, Z.; HOU, J.; WU, A. Simultaneous determination of major type B trichothecenes and deoxynivalenol-3-glucoside in animal feed and raw materials using improved DSPE combined with LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 963, p. 75-82, 2014.

ZHOU, B.; SCHWARZ, P.; HE, G.; GILLESPIE, J.; HORSLEY, R. Effect of enzyme pretreatments on the determination of deoxynivalenol in barley. **Journal-american society of brewing chemists**, v. 66, n. 2, p. 103, 2008.

WEAVER, G. A.; KURTZ, H. J.; BATES, F. Y.; CHI, M. S.; MIROCHA, C. J.; BEHRENS, J. C.; ROBISON, T. S. Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. **Veterinary Record**, v. 103, n. 24, p. 531-535, 1978.

WOFFENDEN, H. M.; AMES, J. M.; CHANDRA, S. Relationships between antioxidant activity, color, and flavor compounds of crystal malt extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5524-5530, 2001.

WU, Q.; HUANG, L.; LIU, Z.; YAO, M.; WANG, Y.; DAI, M.; YUAN, Z. A comparison of hepatic in vitro metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens, and carp. **Xenobiotica**, v. 41, n. 10, p. 863-873, 2011.