



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

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DEGRADAÇÃO DE
MICOTOXINAS

ELIZA RODRIGUES ACOSTA

Prof^a Dr^a Jaqueline Garda Buffon

Orientadora

Prof^a Dr^a Caroline da Ros Montes D'oca

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2020

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

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA: CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E DE
MICOTOXINAS

ELIZA RODRIGUES ACOSTA

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof^a Dr^a Jaqueline Garda Buffon

Orientadora

Prof^a Dr^a Caroline da Ros Montes D'oca

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2020

Ficha Catalográfica

A185f Acosta, Eliza Rodrigues.

Fermentação alcoólica: caracterização metabólica e de
Micotoxinas / Eliza Rodrigues Acosta. – 2020.
108 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Jaqueline Garda Buffon.

Coorientadora: Dra. Caroline da Ros Montes D'oca.

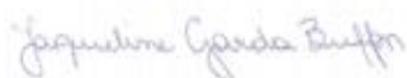
1. Detoxificação 2. Micotoxinas 3. Tricotecenos 4. QuEChERS
5. Mosto Cervejeiro I. Buffon, Jaqueline Garda II. D'oca, Caroline da
Ros Montes III. Título.

CDU 663

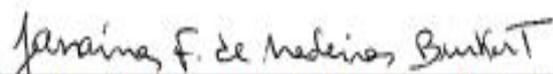
Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Eliza Rodrigues Acosta, com orientação da Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon e coorientação da Dra. Caroline Montes da Rosa D'Oca e aprovada em 25 de junho de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



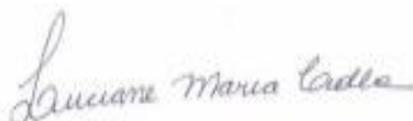
Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG



Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert – FURG



Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos– FURG



Profa. Dra. Luciane Maria Colla – UPF

Dedico:
Aos meus pais, Erdisson Amado
Gonzales Acosta e Gilda Silvair
Rodrigues Acosta e ao meu esposo/melhor
amigo Rafael Santos Cavalleiro, por
sempre me apoiarem e motivarem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Jaqueline Garda-Buffon, por toda imensa paciência, disposição e conhecimento científico passado incansavelmente.

Agradeço a minha co-orientadora Prof^a Dr^a Caroline da Ros Montes D'oca pela ajuda e atenção.

Aos meus pais Erdisson e Gilda que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me em todos os momentos da minha vida com amor, carinho, força, compreensão e confiança. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu esposo Rafael Santos Cavalheiro, agradeço pelo amor, carinho, atenção, compreensão, respeito e lealdade, construindo a base para a execução e continuidade deste trabalho. Te amo!

Ao meu irmão Erlisson e sobrinho Samuel e aos meus sogros Moisés e Marilaine, pelo apoio e carinho.

Essa vitória é por vocês!

A amiga Gabriela (Gabi), apelidada carinhosamente de Bolívia, pela amizade! E as minhas afilhadas de coração Corina, Joelma e Marioxis. Obrigada pela amizade meninas!!!

À professora Eliana Badiale-Furlong agradeço pela receptividade no laboratório e ensinamentos passados durante a minha trajetória no laboratório.

À amiga Maristela pelas palavras de carinho e amizade, pela dedicação ao laboratório e pela troca de experiência!

Às amigas Sabrina, Carmen, Rafaela, Cíntia e Kelly pela amizade, pelas conversas descontraídas e por toda ajuda nos experimentos e nos trabalhos! Obrigada meninas!!

Aos demais colegas de laboratório Verônica, Elisa, João, Marcy, Gabriela, Larine, Anelise, Andressa, Thaísa, Francine, Wesclen e Francisco agradeço pela parceria no laboratório, pelos momentos de aprendizagem e momentos de descontração.

Ao amigo Roque pelo carinho e pelos deliciosos momentos gastronômicos!

Aos iniciantes científicos Giuliana, Brian, Ana Flávia, Diean e Carol Colazzo que estavam sempre dispostos para ajudar nos experimentos e também por todos os momentos alegres vividos no laboratório.

A todos os colegas e professores do curso pela caminhada e companheirismo.

A Pós-Graduação Engenharia e Ciência de Alimentos, FURG, CNPq e CAPES por financiar este trabalho.

Agradeço a Deus por colocar todas estas pessoas no meu caminho e por me amparar nos momentos felizes e difíceis, dando-me forças para continuar sempre e concluir este trabalho.

E por fim, agradeço a todos que torceram por mim. Obrigada!!!

*A força não provém da capacidade física.
Provém de uma vontade indomável.*
Mahatma Gandhi

RESUMO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil e no mundo. Portanto, as matérias-primas utilizadas em sua produção devem apresentar boa qualidade. Entretanto, os insumos cervejeiros podem ser comprometidos pela presença de contaminantes como as micotoxinas, deoxinivalenol (DON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON). A redução da concentração destes contaminantes pode ser resultado de processos físicos como a adsorção da micotoxina pela parede da levedura ou reações metabólicas de transformação de xenobióticos no meio. Assim, o mecanismo de defesa usual da levedura pode ocorrer pela ativação de sistemas enzimáticos, como a glutathiona (GSH) e a peroxidase (PO). Diante o exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos nos quais a levedura *Saccharomyces cerevisiae* atua como agente biológico na descontaminação de DON e 15-ADON. Para o desenvolvimento deste, utilizou-se a fermentação alcoólica, avaliando a ausência e a presença de DON e 15-ADON, nas concentrações de 0,2 (tratamento 1) e 0,8 µg/mL (tratamento 2), quando adicionados em 200 mL de mosto cervejeiro. A fermentação foi conduzida adicionando à levedura *S. cerevisiae* US-05 (0,115 g) ao mosto cervejeiro e após foi mantida em câmara incubadora a 19 °C por 96 h. Amostragens foram realizadas cada 24 h para a caracterização bioquímica, cinética e físico-química, além de avaliação da morfologia das células da levedura, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e extração e quantificação de DON e 15-ADON. Os resultados indicaram que o método QuEChERS empregado na quantificação das micotoxinas demonstrou eficiência nas recuperações de DON (105%) e 15-ADON (89%). Durante a fermentação alcoólica foi observado a redução da concentração de DON e 15-ADON, 33 e 56%, respectivamente, em 48 h para o tratamento 1, e 41 e 27%, respectivamente, para o tratamento 2 em 72 h. A concentração de biomassa, após 72 h de fermentação, na presença de DON e 15-ADON em ambos os tratamentos, apresentou redução de 36 e 28%, respectivamente, em comparação ao controle. Todas as reduções estão relacionadas à atividade enzimática da PO e a presença de GSH, concomitante a elevação da síntese proteica. As células de levedura no tempo final de fermentação para os tratamentos 1 e 2 apresentaram alterações morfológicas na parede celular da levedura quando comparado ao controle. A PCA e o RMN confirmaram a correlação entre os parâmetros fermentativos estudados e a contaminação por DON e 15-ADON durante o processo fermentativo alcoólico. Portanto, as alterações promovidas pela presença de DON e 15-ADON evidenciaram a sensibilidade da levedura *S. cerevisiae* quanto à toxicidade, sendo este um micro-organismo mitigador de DON e 15-ADON.

PALAVRAS-CHAVE: Detoxificação. Micotoxinas. Tricotecenos. QuEChERS. Mosto cervejeiro.

ALCOHOLIC FERMENTATION: METABOLIC AND MYCOTOXIN CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Beer is the most consumed alcoholic beverage in Brazil and in the world. Therefore, the raw materials used in its production must be of good quality. However, brewing supplies can be compromised by the presence of contaminants such as mycotoxins, deoxynivalenol (DON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15-ADON). The reduction in the concentration of these contaminants can be the result of physical processes such as mycotoxin adsorption by the yeast wall or metabolic reactions of transformation of xenobiotics in the medium. Thus, the usual defense mechanism of yeast can occur through the activation of enzymatic systems, such as glutathione (GSH) and peroxidase (PO). Given the above, the present study aimed to investigate the mechanisms in which the yeast *Saccharomyces cerevisiae* acts as a biological agent in the decontamination of DON and 15-ADON. For its development, alcoholic fermentation was used, evaluating the absence and presence of DON and 15-ADON, in concentrations of 0.2 (treatment 1) and 0.8 $\mu\text{g/mL}$ (treatment 2), when added in 200 mL of brewing must. The fermentation was carried out by adding *S. cerevisiae* US-05 (0.115 g) to the brewing must and afterwards it was kept in an incubator at 19 °C for 96 h. Sampling was carried out every 24 h for the biochemical, kinetic and physical-chemical characterization, in addition to the evaluation of yeast cell morphology, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and the extraction and quantification of DON and 15-ADON. The results indicated that the QuEChERS method used in the quantification of mycotoxins demonstrated efficiency in the recovery of DON (105%) and 15-ADON (89%). During alcoholic fermentation, a reduction in the concentration of DON and 15-ADON was observed, 33 and 56%, respectively, in 48 h for treatment 1, and 41 and 27%, respectively, for treatment 2 in 72 h. The concentration of biomass, after 72 h of fermentation, in the presence of DON and 15-ADON in both treatments, showed a reduction of 36 and 28%, respectively, compared to the control. All reductions are related to the enzymatic activity of PO and the presence of GSH, concomitant to the increase in protein synthesis. Yeast cells in the final fermentation time for treatments 1 and 2 showed morphological changes in the yeast cell wall when compared to the control. PCA and NMR confirmed the correlation between the studied fermentative parameters and contamination by DON and 15-ADON during the alcoholic fermentation process. Therefore, the changes promoted by the presence of DON and 15-ADON showed the sensitivity of the yeast *S. cerevisiae* to toxicity, which is a microorganism that mitigates DON and 15-ADON.

KEYWORDS: Detoxification. Mycotoxins. Trichothecenes. QuEChERS. Brewing wort.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Emprego de diferentes espécies de <i>Saccharomyces</i> para produção de diferentes tipos de cervejas.....	36
Tabela 2 – Incidência de micotoxinas em cervejas.....	40
Tabela 3 – Experimentos empregando diferentes volumes de solvente extrator e adsorventes na etapa de limpeza do mosto cervejeiro pelo método QuEChERS.....	56
Tabela 4 – Composição do mosto cervejeiro em base seca.....	63
Tabela 5 - Parâmetros de validação do método analítico QuEChERS em mosto cervejeiro...	68
Tabela 6 – Recuperação (R%), precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária para DON e 15-ADON.....	69
Tabela 7 - Concentração de GSH, atividade da PO, percentual e degradação específica redox na ausência (C) e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2).	71
Tabela 8 - Fatores de conversão obtidos durante a fermentação alcoólica por <i>S. cerevisiae</i> na ausência (C) e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2).....	73
Tabela 9 – Caracterização da fermentação alcoólica na ausência (C) e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2).	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química dos tricotecenos: deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON).	38
Figura 2 – Etapas realizadas no estudo.	53
Figura 3 – Recuperação (%) de DON e 15-ADON do mosto cervejeiro pelo método QuEChERS empregando diferentes volumes de solvente extrator e sais adsorventes.	66
Figura 4 - Concentração de biomassa (A) e viabilidade celular (B) da <i>S. cerevisiae</i> durante a fermentação alcoólica do mosto cervejeiro na ausência (controle) e na presença de 0,2 (tratamento 1) e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON (tratamento 2).	70
Figura 5 – Superfície celular da <i>S. cerevisiae</i> em 96 h de fermentação na ausência (A) e na presença de 0,2 (B) e 0,8 µg/mL (C) de DON e 15-ADON observada em MEV (4000 X).	74
Figura 6 - Gráfico da PCA na ausência (A) e na presença de 0,2 (B) e 0,8 µg/mL (C) de DON e 15-ADON ao longo da fermentação alcoólica (entre 0 e 96 h).	79
Figura 7 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, D ₂ O) obtidos ao longo do processo de fermentação alcoólica.	82
Figura 8 – PCA dos perfis espectrais das amostras: C1: açúcares, C2: etanol e C3: ácido acético	83
Figura 9 – Espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, D ₂ O) representativos do grupo C1.	84
Figura 10 - Espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, D ₂ O) representativos do grupo C2.	85
Figura 11 - Espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, D ₂ O) representativos do grupo C3.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

- Abs – Absorbância
- a.C. – Antes de Cristo
- ADONs - 15-Acetil-Deoxinivalenol e 3-Acetil-Deoxinivalenol
- AFs – Aflatoxinas
- AFB1 - Aflatoxinas B1
- AFB2 - Aflatoxinas B2
- AFG1 - Aflatoxinas G1
- AFG2 - Aflatoxinas G2
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC - Associação Internacional de Químicos Analíticos, do inglês *Association of Official Analytical Chemists International*
- A_{PO}- Atividade da enzima peroxidase
- AR – Açúcar redutor
- At – Acidez total
- BOD - Câmara germinativa, do inglês *Biochemical Oxygen Demand*
- °Brix - Sólidos solúveis totais
- C - Controle
- c - Espessura da cubeta
- CEME-SUL - Centro de Microscopia Eletrônica do Sul
- CEN - Comitê Europeu de Normalização, do inglês *European Committee For Standardization*
- CG - Cromatógrafo a gás
- CIA - Centro Integrado de Análises
- Cnv - Células não viáveis.
- CO₂ - Gás carbônico
- Conc - Concentração de DON e 15-ADON
- Conc1 – Concentração determinada após a contaminação
- Conc2 - Concentração determinada na amostra não contaminada
- Conc3 - Concentração esperada para o nível de contaminação
- Cv - Células viáveis
- C18 - Octadecilsilano
- DAD - Detector de arranjo de diodos
- ρ - Densidade aparente

δ - Deslocamento químico
D₂O – Óxido de deutério (Água deuterada)
DER - Degradação específica redox
DMS - Dimetil-sulfeto
DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
DNS -Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DON – Deoxinivalenol
DON-3G - Deoxinivalenol-3-Glicosídeo
DTNB - Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzólico
 ϵ - Absortividade molar
 ϵ_{470} - Absortividade molar do guaiacol
E.C. – Comissão de enzimas, do inglês *Enzyme Commission Numbers*
EC – Comitê de regulamentação Europeia, do inglês *Commission Regulation*
[E] – Concentração de etanol
EM – Efeito matriz
EUA – Estados Unidos da América
f - Fator de correção do hidróxido de sódio
FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*
FB1 - Fumonisinias B1
FB2 - Fumonisinias B2
FC - Faixa de contaminação
FID - Detector por ionização de chama
FMs - Fumonisinias
FURG - Universidade Federal do Rio Grande
[GSH] - Concentração de glutathiona
GRAS - Geralmente Reconhecidos Como Seguros, do inglês *Generally Recognized as Safe*
GSH - Glutathiona
HCl – Ácido Clorídrico
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HFB1 - Fumonisinina hidrolisada B1
HT-2 – Toxina HT-2
Hz - Hertz

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

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

J - Constante de acoplamento

JECFA - Comitê de Aditivos Alimentares, do inglês *Committeeon Food Additives*.

k - Coeficiente específico

LAMCA - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos

LC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

M - Molaridade do hidróxido de sódio

MeCN - Acetonitrila

MEL – Genes Melibiase

MEV - Microscópio eletrônico de varredura

MgSO₄ - Sulfato de magnésio anidro

$\mu_{\text{máx}}$ - Velocidade máxima de crescimento

MM - Massa molar de DON e 15-ADON

NA - Números de amostras analisadas

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NIV - Nivalenol

NP - Números de amostras positivas

O₂ - Oxigênio

OMS - Organização Mundial da Saúde

OTA – Ocratoxinas

PAT- Patulina

PCA – Análise dos componentes principais, do inglês *Principal Component Analysis*

pH - Potencial hidrogeniônico

PO - Peroxidase

ppm – Partes por milhão

PSA - Amina primária-secundária

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

15-ADON - 15-Acetil-Deoxinivalenol

R(%) – Percentual de recuperação de micotoxinas

R – Coeficiente de correlação

R² -Coeficiente de determinação

RE – Resolução

RDC - Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN de ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

RSD% - Erro relativo percentual

Saccharomyces cerevisiae - *S. cerevisiae*

[S] – Concentração de substrato

t - Tempo coleta de amostra do processo fermentativo

T2 - Tratamento 2

T-2 – Toxina T-2

TMS – Tetrametilsilano

3-ADON - 3-acetil-deoxinivalenol

TRIC(%) - Percentual da concentração de DON ou 15-ADON determinados no meio fermentado

TSP - Trimetilsilil-propionato de sódio

TTBGov - Manual do Governo dos Estados Unidos - Departamento de Comércio e Tributação de Álcool e Tabaco, do inglês *The United States Government Manual – Alcohol and Tobacco Taxand Trade Bureau*

T1 - Tratamento 1

U – Uma unidade da enzima peroxidase

UV-Vis - Ultravioleta visível

v - Volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

V - Volume da amostra

V_r - Volume do reator (200 mL)

[X] – Concentração de Biomassa

X₂ - Inclinação da curva obtida pela injeção da solução analítica preparada no solvente

X₁ - Inclinação da curva obtida pela injeção da solução analítica preparada no extrato da matriz

Y_{E/X} - fatores de conversão de biomassa em etanol

$Y_{E/S}$ - fatores de conversão de substrato em etanol

$Y_{GSH/S}$ - fatores de conversão de substrato em glutatona

$Y_{GSH/X}$ - fatores de conversão de biomassa em glutatona

YPD - Ágar Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose, do inglês *Yeast Peptone Dextrose*

$Y_{X/S}$ - fatores de conversão de substrato em biomassa

WHO - Organização Mundial de Saúde Animal, do inglês *World Organization for Animal Health*

ZEAs – Zearalenonas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1. PROCESSAMENTO CERVEJEIRO	33
3.2. LEVEDURAS CERVEJEIRAS	35
3.3. MICOTOXINAS	37
3.3.1. Tricotecenos: DON e 15-ADON	38
3.4. DEGRADAÇÃO DE TRICOTECENOS POR <i>S. cerevisiae</i>	42
3.5. EFEITOS DE MICOTOXINAS NO PROCESSO CERVEJEIRO.....	44
3.6. DETERMINAÇÕES DE MICOTOXINAS.....	45
3.7. ESPECTROSCOPIA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. MATERIAL	51
4.2. MÉTODOS	51
4.2.1. Preparo dos padrões de micotoxinas	51
4.2.2. Mosto cervejeiro	51
4.2.3. Fermentação alcoólica do mosto cervejeiro	52
4.3. EFEITOS DAS MICOTOXINAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	53
4.3.1. Composição do mosto cervejeiro	53
4.3.2. Extração e quantificação de micotoxina do mosto e do meio fermentado	55
4.3.3. Caracterização bioquímica e cinética da fermentação alcoólica	57
4.3.4. Caracterização físico-química da fermentação alcoólica	59
4.3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	60
4.3.6. Análise estatística	60
4.3.7. Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidrarias	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO	63
5.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS DO MOSTO E DO MEIO FERMENTADO	65
5.3. EFEITOS DAS MICOTOXINAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	70
5.3.1. Caracterização bioquímica e cinética da fermentação alcoólica	70
5.3.2. Caracterização físico-química da fermentação alcoólica	75
5.4. CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS FERMENTATIVOS E A CONTAMINAÇÃO POR DON E 15-ADON.....	78
5.5. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS POR RMN de ¹ H	82

6. CONCLUSÃO	87
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica obtida pela fermentação do mosto cervejeiro proveniente do malte de cevada e água potável, por ação de leveduras e adição de lúpulo (BRASIL, 2019). A cevada maltada é usualmente utilizada no processo cervejeiro devido à elevada concentração de carboidratos (PASCARI et al., 2018). Entretanto, em alguns países como o Brasil, outros grãos e cereais, denominados adjuntos cervejeiros, ricos em amido podem ser utilizados na produção da bebida, como o trigo, o milho e o arroz (ROSA; AFONSO, 2015).

No entanto, existem micro-organismos capazes de deteriorar e contaminar essas matérias-primas no campo ou durante o armazenamento (BENTO et al., 2012). Dentre eles, destacam-se os fungos filamentosos, como os do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Algumas espécies pertencentes a esses gêneros fúngicos quando submetidos a condições de estresse produzem metabólitos secundários, substâncias químicas tóxicas, denominadas micotoxinas (SONGSERM-SAKUL; RAZZAZI-FAZELI, 2008).

Dentre as micotoxinas, destacam-se pela elevada incidência o deoxinivalenol (DON) e sua forma acetilada, 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) (ALEXANDER et al., 2011; KUZDRALINSKI; SOLARSKA; MUSZYNSKA, 2013) em grãos como cevada, cereais adjuntos e na própria cerveja, podendo provocar o efeito tóxico acumulativo ao consumidor, sendo este potencializado pela presença do álcool na bebida (SEUS-ARRACHÉ, 2019).

O alto consumo de cerveja pelos brasileiros é preocupante devido aos elevados índices de contaminação por micotoxinas na matéria-prima e no produto final. Além disso, o crescente aumento nas importações de grãos cervejeiros provenientes de países onde tipicamente estas toxinas são detectadas intensifica a preocupação com os limites máximos na bebida (BARAJ, 2000; SCOTT 1996).

Como alternativa vem se destacando a descontaminação biológica através de processos fermentativos, que permitem a seleção de micro-organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), para degradar micotoxinas e estabelecer condições fermentativas que possam melhorar as características funcionais de produtos como a cerveja (PASTER et al. 1992; VARGA et al. 2000). O Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LAMCA) da FURG vêm desenvolvendo estudos acerca da utilização de cepas de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* no processo fermentativo alcoólico objetivando a redução dos níveis de diferentes micotoxinas durante o processo cervejeiro e no

produto final (BRETANHA, 2014; BOEIRA, SILVELLO, REMEDI, 2015; COUGO, FONTES, DUARTE, 2015; GARDA-BUFFON, BARAJ, BADIALE-FURLONG, 2010; GARDA-BUFFON, KUPSKI, BADIALE-FURLONG, 2011; GARDA, MACEDO, FURLONG, 2004; GARDA et al., 2005; GARCIA, 2018; GARCIA, 2016; REMEDI, 2017; SEUS-ARRACHÉ, 2019).

No entanto, os mecanismos nos quais a levedura *S. cerevisiae* atua como agente biológico na descontaminação de micotoxinas durante a fermentação alcoólica, não são elucidados na literatura. Durante o processo fermentativo, as leveduras cervejeiras podem atuar como agente detoxificante, reduzindo a concentração das micotoxinas a valores legislados (BATA; LÁSZTITY, 1999; GARCIA; SILVA, 2008; PASTER et al., 1992). Esse potencial pode estar relacionado como mecanismo de defesa ao estresse oxidativo provocado pelas micotoxinas, podendo ativar sistemas enzimáticos e compostos variados, como a glutatona (GSH) e a peroxidase (PO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Portanto, avaliar os metabólitos sintetizados pela *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica é importante para relacionar a presença de micotoxinas e as alterações na bebida que possam comprometer o produto final. Porém, como a cerveja apresenta uma mistura complexa de metabólitos formados, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode auxiliar esta identificação. Esta técnica permite analisar a composição química das amostras e evidenciar o potencial metabólico das leveduras frente aos efeitos das micotoxinas.

Neste contexto, como hipótese deste estudo, tem-se o potencial uso da levedura *S. cerevisiae* na redução e extração de tricotecenos como DON e 15-ADON. Estes dados podem colaborar com o setor produtivo, reduzindo perdas econômicas e prevenindo a intoxicação de humanos por essas toxinas, frequentemente detectadas nos insumos cervejeiros e na cerveja.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos de defesa a partir de sistemas enzimáticos como a glutationa (GSH) e a peroxidase (PO) na descontaminação de DON e 15-ADON durante a fermentação alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Validar o método analítico para extração por QuEChERS, separação e quantificação dos tricotecenos, DON e 15-ADON, em amostras de mosto cervejeiro e meio fermentado por LC-DAD;
- b) Identificar alterações de metabólitos produzidos por *S. cerevisiae* na presença das micotoxinas DON e 15-ADON durante a fermentação alcoólica;
- c) Estimar a redução da concentração de DON e 15-ADON através do sistema de fermentação alcoólica;
- d) Identificar por meio de RMN de ^1H os metabólitos majoritários presentes no processo cervejeiro na presença de DON e 15-ADON.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. PROCESSAMENTO CERVEJEIRO

Há evidências que na Mesopotâmia, há 6.000 anos a.C., havia a produção e o consumo de cerveja empregando cevada maltada, assim como sua utilização em cosméticos e produtos medicinais (KUNZE, 2006; LIMA et al., 2001). Anos mais tarde, a bebida chegou ao Egito e foi difundida entre os povos orientais que a propagaram do Mediterrâneo a Europa. Na Idade Média, os mosteiros produziam a bebida empregando ervas aromáticas, como lúpulo, mirica, rosmarinho, louro, sálvia e gengibre (ROSA; AFONSO, 2015). No século XIV, na Bavária, Alemanha, foi anunciada a lei da pureza da cerveja estabelecendo que a bebida produzida deveria conter exclusivamente malte, lúpulo e água, sem aditivos (VENTURINIFILHO, 2016). Finalmente, em meados de 1808, a bebida chegou ao Brasil, trazida pela Família Real Portuguesa (DANTAS, 2016).

Atualmente, em países como Brasil (BRASIL, 2019) e EUA (TTBGov, 2019), grandes produtores de cerveja, a legislação vigente permite a adição de adjuntos cervejeiros. Estes podem ser cereais maltados ou não, assim como outras fontes de carboidratos. Os adjuntos possibilitam a redução no custo do processo e a elaboração de diferentes estilos de cervejas. A fabricação da bebida é um processo biotecnológico (CERVIERIJÚNIOR et al., 2014) que consiste em malteação, moagem, mosturação, clarificação, fervura, resfriamento, fermentação do mosto, maturação, filtração, envase, pasteurização e armazenamento da bebida (MORADO, 2017; VENTURINIFILHO, 2016).

O processo de produção da cerveja começa com a escolha do tipo de malte, visto que a partir dele são provenientes os nutrientes presentes no mosto e na cerveja. O processo de produção do malte é denominado maltagem, e consiste na umidificação, germinação e secagem dos grãos, sob condições controladas de temperatura (ALMEIDA et al., 2018; VIROLI; VIEIRA; SOUSA, 2014). Os grãos selecionados são depositados em tanques imersos em água, para absorver umidade (cerca de 40-42%) e iniciar a germinação. Com o início da germinação, as reservas dos grãos, como amido, começam a ser metabolizados, ocasionando à formação ou ativação de enzimas essenciais à hidrólise do amido (BRIGGS et al., 2004). O processo enzimático é interrompido pela secagem em estufa ou torrefação dos grãos (BRUNELLI; VENTURINIFILHO, 2013; VIROLI; VIEIRA; SOUSA, 2014).

Após a maltagem, ocorre a brassagem, processo no qual o mosto cervejeiro é produzido. Sendo este, produzido a partir de etapas como moagem, mosturação, filtração, fervura e decantação. A mosturação consiste na solubilização das substâncias presentes no

malte moído misturado com água (LIMA et al., 2001) em condições operacionais pré-estabelecidas (agitação, pH, tempo e temperatura). Logo, as enzimas presentes no malte são ativadas e solubilizam as substâncias insolúveis. A ação das enzimas produz um mosto rico em carboidratos fermentescíveis (70-80%), incluindo glicose, maltose e maltotriose (ALMEIDA et al., 2018; HANS, 2011; VENTURINIFILHO, 2016).

Em seguida, o líquido formado é filtrado para a separação da parte insolúvel (cascas do malte e proteínas coaguladas) do filtrado (mosto) (KUNZE, 1999, RIBEIRO et al., 2018). Ao mosto resultante é adicionado o lúpulo, e posteriormente, a mistura é fervida, provendo a esterilização microbiológica, eliminação de substâncias voláteis que geram sabores indesejáveis, inativação de enzimas e coagulação de complexos proteicos que podem causar turvação no produto final e extração de compostos amargos e aromáticos do lúpulo (KAPLAN; PALMER; DENKE, 2000).

Ao final da fervura, o mosto é enviado ao tanque de clarificação para a decantação do lúpulo e o resfriamento rápido do mosto, para evitar a oxidação, a contaminação por micro-organismos e a formação de dimetil-sulfeto (DMS) (AMORIM, 2005; FIGUEIRÊDO, 2017; KRAMER, 2010). Durante o resfriamento, o mosto é intensamente aerado e ocorre a adição do inóculo da levedura iniciando a fermentação (ESTEVES, 2008; LEÃO, 2005).

A fermentação consiste no ponto central da produção da cerveja e pode ser classificada como fermentação primária ou secundária (maturação). A fermentação primária é lenta, pois a levedura alcoólica, em condições anaeróbicas, metaboliza os carboidratos fermentescíveis convertendo os açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose) em etanol, gás carbônico (CO₂) (FIGUEIRÊDO, 2017; KRAMER, 2010) e outros produtos do metabolismo da levedura (BORDIGA, 2017; VENTURINIFILHO, 2016). As leveduras produzem compostos aromáticos, como subprodutos de seu metabolismo influenciados de acordo com as condições do processo, como concentração e composição do mosto, temperatura do processo fermentativo e o tipo de levedura utilizada (KUNZE, 1999; MORADO, 2017).

Após a fermentação primária, obtêm-se a “cerveja verde” que necessita do processo de maturação (NELSON; COX, 2019). A maturação estabiliza e reduz o diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico presente na bebida (VENTURINIFILHO, 2016). Após este processo a bebida é filtrada, envasada, pasteurizada e armazenada (BORDIGA, 2017).

3.2. LEVEDURAS CERVEJEIRAS

Em meados de 1665, os pesquisadores Van Leeuwenhoek e Hooke constataram que alguns organismos realizavam processos fermentativos (BOURDICHON et al., 2012). Bioquimicamente, o processo fermentativo ocorre com micro-organismos que produzem energia a partir de compostos orgânicos (GRAHAM; STEWART, 2018), convertendo o substrato açucarado em etanol, dentre esses micro-organismos, destacam-se as leveduras (VENTURINIFILHO, 2016).

A partir das matérias-primas cervejeiras e do processo metabólico das leveduras aprimoraram-se diferentes estilos de cervejas baseados no sabor e no aroma, influenciados por diferentes consumidores em diversos países (GRAHAM; STEWART, 2018). Apesar das diversidades cervejeiras, o único fator compartilhado é a exigência quanto à fermentação da levedura. Essas leveduras podem ser caracterizadas com base no comportamento de floculação do processo fermentativo alcoólico, podendo ser classificadas em *Lambic*, *Lager* e *Ale* (BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

As cervejas *Lambics* são fermentadas de forma espontânea por diferentes espécies de bactérias e leveduras naturalmente presentes no ambiente e em utensílios utilizados durante a produção da bebida. Esta bebida é caracterizada pelos aromas e sabores de frutas e grãos das quais foram produzidas (HORNINK; GALEMBECK, 2019). Comumente, a produção de cervejas do tipo *Lager* ocorre com cepas de *S. uvarum*, *S. carlsbergensis* ou *S. pastorianus*, caracterizadas pela fermentação de fundo (LODOLO et al., 2008; MERTENS et al., 2015). Esse processo apresenta temperaturas entre 8 e 15 °C e maturação a 0 °C por cerca de 1 a 3 semanas. Essas bebidas apresentam teor alcoólico entre 4 e 5% e devido às baixas temperaturas de processamento denotam de aromas suaves (LODOLO et al., 2008; MERTENS et al., 2015; MORADO, 2017; SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND, 2012). Atualmente, as cervejas do tipo *Lager* originam estilos como *Pilsen*, *American Lager*, *Malzbier*, *Pale Lager*, entre outros (ROSA; AFONSO, 2015).

Em contrapartida, as cervejas do tipo *Ale* são produzidas com cepas de *S. cerevisiae*, representadas pela fermentação de topo. Estas leveduras atuam com temperaturas entre 16 e 25 °C (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; GRAHAM; STEWART, 2018; SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND, 2012), maturação de 4 °C por cerca de 3 a 4 dias (MORADO, 2017) e teor alcoólico entre 4 e 8%. Estas leveduras convertem a glicose em etanol e CO₂, porém não consomem todo o açúcar contido no mosto e por este motivo a bebida tem sabor frutado e doce (FRANCESCO et al., 2018). Os estilos mais

conhecidos são *IPA*, *Weiss*, *Stout*, *Porter*, *Pale Ale*, *Trippel* e *Witbier* (ROSA; AFONSO, 2015).

A diferenciação bioquímica entre as cepas ocorre pela presença ou ausência de um gene. As cepas do tipo *Lager* apresentam a expressão transcricional dos genes “MEL” (melibiase) da via catabólica da galactose-melibiase durante a fermentação alcoólica. Esses genes são responsáveis pela síntese proteica da melibiase, responsável pela transformação da melibiose em glicose e galactose. A melibiase é chamada de α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22) responsável por hidrolisar as ligações α -1,6 presentes nos oligossacarídeos como a rafinose e a estaquiase (GRAHAM; STEWART, 2018). Na Tabela 1 é possível observar as diferentes espécies de *Saccharomyces* responsáveis por produzir as cervejas do tipo *Ale* e *Lager*.

Tabela 1- Emprego de diferentes espécies de *Saccharomyces* para produção de diferentes tipos de cervejas.

Tipos de cerveja	Espécies de <i>Saccharomyces</i>	Referência
Cerveja sem álcool (<i>Lager</i>)	<i>S. ludwigii</i>	Francesco et al. (2018).
		Mohammad et al. (2011).
		Szilágyi et al. (2018).
<i>Lager</i>	<i>S. rouxii</i>	Francesco et al. (2015).
		Mohammad et al. (2011).
		Sohrabvandi et al. (2009).
	<i>S. pastorianus</i> (<i>S. carlsbergensis</i>)	Bogacka et al. (2018).
		Lauterbach et al. (2018).
<i>S. uvarum</i>	Liu et al. (2018).	
<i>Ale</i>	<i>S. eubayanus</i>	Karmelić et al. (2011).
		Schulz et al. (2018).
		Eizaguirre et al. (2018).
<i>Ale</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Nikulin; Krogerus; Gibson (2018).
		Boeira; Silvello; Remedi (2015).
		Lauterbach et al. (2018).
		Richter et al. (2018).

Ainda que existam diferenciações bioquímicas e tecnológicas, o setor cervejeiro, geralmente utiliza as espécies de levedura do tipo *S. cerevisiae* (ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999; VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 1993) por apresentarem estrutura celular simples e aspectos genéticos conhecidos (SHERMAN, 2002). Embora a produção de cerveja apresente parâmetros operacionais como tempo, pH e temperatura, para a obtenção de um produto com características organolépticas e sensoriais semelhantes, fatores como linhagem de levedura, tipo e proporção de adjunto, modelo de fermentador, concentração do mosto e contaminação por micotoxinas podem afetar o processo metabólico comprometendo a qualidade da bebida (BENNETT; KLICH, 2003; MORADO, 2017).

3.3. MICOTOXINAS

Algumas espécies de fungos filamentosos quando submetidos a condições de estresse, produzem, como mecanismo de defesa, metabólitos secundários tóxicos de baixa massa molar, denominados micotoxinas (BENNETT; KLICH, 2003). Dentre as micotoxinas mais comumente identificadas em grãos e cereais estão as aflatoxinas (AFs), as ocratoxinas (OTA), as fumonisinas (FMs), as zearalenonas (ZEAs) e os tricotecenos (DON, nivalenol (NIV) e toxina T-2 (T-2)) (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016; FOROUD; EUDES, 2009; MEERDINK, 2002).

A contaminação de grãos e cereais por micotoxinas pode ocorrer em diversas etapas, como na pré-colheita devido às condições climáticas, presença de insetos e deficiência de nutrientes no solo (ARAÚJO et al., 2010; RICHARD, 2007; SANTIN; DIAZ, 2005). No entanto, na pós-colheita e no armazenamento, a contaminação fúngica e a produção de micotoxinas são resultados da interação entre umidade (75 a 95%), temperatura (20 a 30 °C) (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016), concentração de oxigênio (O₂) e CO₂ e presença de pragas. Além disso, durante o armazenamento e o transporte, os grãos contaminados podem entrar em contato com os grãos saudáveis, favorecendo a disseminação de fungos (ARAÚJO et al., 2010; RICHARD, 2007; SANTIN; DIAZ, 2005).

A contaminação de micotoxinas em humanos pode ocorrer pela ingestão direta ou indireta de alimentos infectados por essas toxinas. A forma direta ocorre pelo consumo de cereais, de oleaginosas e de derivados contaminados e a forma indireta ocorre pela ingestão de produtos de origem animal que se contaminaram através da sua alimentação (MAZIERO; BERSOT, 2010). Assim, as micotoxinas provocam doenças denominadas de micotoxicoses, que muitas vezes não são diagnosticadas (PLEADIN; FRECE; MARKOV, 2019), pois os

efeitos dependem da dose e da frequência com que os alimentos contaminados são consumidos, podendo ocasionar efeitos carcinogênicos, teratogênicos e estrogênicos em humanos e animais (ROCHA et al., 2014; SPEIJERS; SPEIJERS, 2004; ZAIN, 2011).

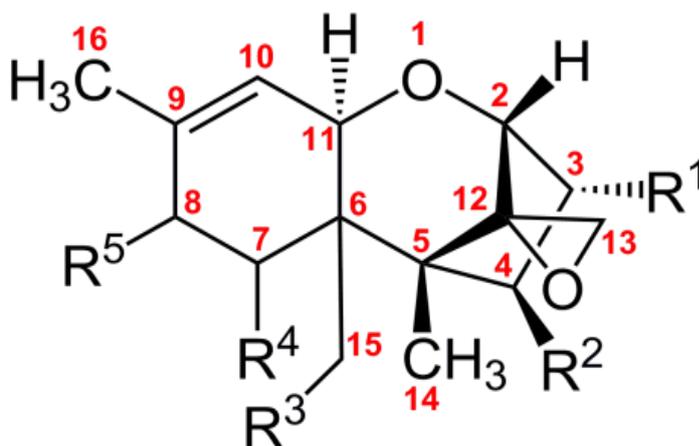
3.3.1. Tricotecenos: DON e 15-ADON

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por uma ampla variedade de espécies de fungos do tipo *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys*. Estas micotoxinas apresentam uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 e possuem um grupamento epóxido nas posições 12 e 13 da estrutura molecular (HE et al., 2010; PESTKA, 2007; ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005).

A função epóxido é responsável pela toxicidade da molécula, pois inibe a síntese de proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) (BENSASSI et al., 2009). Além disso, os tricotecenos podem provocar a apoptose da célula, pois permeiam a membrana plasmática interagindo com grande número de alvos, como ribossomos e mitocôndrias (SUDAKIN, 2003).

Os tricotecenos podem ser classificados em quatro grupos diferentes (A, B, C e D), de acordo com as características de seus grupos funcionais (COLE; COX, 1981; HE et al., 2010). As micotoxinas pertencentes ao grupo dos tricotecenos do tipo B (entre eles o DON e o 15-ADON) apresentam a carbonila na posição C-8 (PESTKA, 2007; KOCH, 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química dos principais tricotecenos do tipo B: nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON), 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON).



(Continuação)

Composto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Nivalenol(NIV)	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
Deoxinivalenol(DON)	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3-Acetil-Deoxinivalenol (3-ADON)	-OCOCH ₃	-H	-OH	-OH	=O
15-Acetil-Deoxinivalenol (15-ADON)	-OH	-H	-OCOCH ₃	-OH	=O

Fonte: He et al., 2010.

Dentre os tricotecenos, destaca-se o DON, um sesquiterpenóide tetracíclico com sete centros estéreos. Esta micotoxina é formada através da ciclização do intermediário farnesil-pirofosfato para tricodieno por uma ciclase com subseqüentes reações de oxidações, isomerizações, ciclizações e esterificações (ALEXANDER; PROCTOR; MCCORMICK, 2009; KIMURA et al., 2007; MOSS; THRANE, 2004). Portanto, a partir dele são produzidos os derivados acetilados, como o 15-ADON, que possui um grupamento acetil na posição 15 da molécula de DON (ALEXANDER et al., 2011).

O DON e seus acetilados são comumente encontrados em culturas de cereais e grãos de inverno, incluindo a cevada, principal matéria-prima utilizada para produção de cerveja (PETSKA, 2007). Embora, estudos sobre a produção dos acetilados tenha se tornado importante para a caracterização de algumas espécies do gênero *Fusarium* em relação à sua agressividade e produção global (PURI; ZHONG, 2010), a presença da micotoxina DON pode indicar possível contaminação por outros tricotecenos (VELÍSEK; HAJŠLOVÁ, 2009).

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) a ocorrência de DON pode ocasionar diversas alterações como redução do peso, imunotoxicidade, diarreia, vômito, anorexia, leucocitose, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, podendo ocasionar a morte (FAO/WHO, 2007; JECFA, 2011), além disso, pode causar efeitos neurotóxicos, embriotóxicos e teratogênicos (PESTKA, 2007), assim como imunossupressão (ROBBANA-BARNAT et al., 1988). Outra informação relevante é que o DON é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no Grupo 3, ou seja, não apresenta efeito carcinogênico em humanos (IARC, 2016).

Logo, os níveis desses contaminantes devem ser monitorados e legislados para garantir um produto final de qualidade, inócuo a saúde e seguro ao consumo (AMARAL; MACHINSKI, 2006). No entanto, apesar do efeito nocivo, a legislação brasileira e a legislação internacional não estabelecem níveis máximos tolerados para DON em cervejas.

Contudo, no Brasil, a RDC Nº 138 regulamenta valores para cevada maltada de 750 µg de micotoxina por kg de grão tendo como base o uso deste insumo na produção, sendo considerados os níveis de degradação e diluição no processo cervejeiro (BRASIL, 2017b).

Portanto, apesar do controle desses compostos no processo produtivo, inúmeros estudos relatam a presença de micotoxinas em cerveja (Tabela 2).

A contaminação amostral de DON em cervejas foi superior a 80%, representando altos níveis de contaminação na bebida. Entretanto, frequentemente detecta-se mais de um tipo de micotoxina em um produto (Tabela 2), pois a maioria das espécies fúngicas produz mais de um tipo de metabólito tóxico, indicando que a contaminação cruzada ocorre naturalmente, quando as espécies de fungos toxigênicos estão em contato com os alimentos (EYNI et al., 2016).

Tabela 2 – Incidência de micotoxinas em cervejas.

Micotoxina	NA	NP(%)	FC (µg/L)	País	Referência
NIV	85	19	26,2–44,4	Brasil	Seus-Arraché (2019).
DON		46	22,2–79,1		
ADONs		15	25,2–71,6		
T-2		4,7	11,5–14,3		
ZEA		16	11,1–37,2		
OTA		13	1,2–4,8		
DON	31	61,3	0,3-52,8	Brasil	Garcia (2018).
ADONs		6,4	1,35-3,14		
ZEA		48,4	0,03-3,64		
T-2		48,4	1,33-17,95		
NIV		35,5	0,54-2,5		
OTA		93,3	2,04-8,4		
AFB ₁		46,7	2,92-9,22		
AFB ₂		70	0,12-0,43		
AFG ₂		9,7	1,3-1,57		
NIV	100	56	0,5-7,6	Polônia	Bryla et al. (2018).
DON		83	1,0–73,6		
DON-3G		67	2,0–35,8		

(Continuação)

DON	99	65	61-255	Nigéria	Chilaka et al. (2018).
15-ADON		4	24-25		
3-ADON		7	17-37		
ZEA		9	18-107		
FB ₂		22	70-519		
HFB ₁		11	66-152		
DON-3G		2	23-53		
DON	114	*	-	Brasil	Piacentini et al. (2017).
FB ₁		50	201,7-1568,6		
DON	44	75	2,2-20,0	Alemanha	Bauer et al. (2016).
ZEA		100	0,35-2,0		
DON	154	60	17,2-47,7	Espanha	Rodriguez-Carrasco et al. (2015).
T-2		9	2,8-38,2		
DON-3G	374	93	1,5-3,2	Diversos	Varga et al. (2013).
DON		77	2,7-4,4	países	
3-ADON		*	-		
T-2	49	6	6,0-12,1	Irlanda	Rubert et al. (2013).
OTA		12	3,6-6,9	Espanha	
AFB ₁	115	4,3	0,015-0,031	República	Benesová et al. (2012).
AFB ₂		1,7	0,005-0,011	Checa	
OTA	106	67,9	0,040-0,189	Europa	Bertuzzi et al. (2011).
DON		66,0	0,5-18,6		
FB ₁		97,0	0,1-30,3		
FB ₂		57,6	0,1-3,9		
AF		*	-		
OTA	115	39	0,001-0,0544	República Checa	Beláková et al. (2011).

DON	72	5,3	50–336	Brasil	Garda, Macedo,
T-2		4,5	114–249		Furlong (2004).

(*): Amostras sem contaminação pela micotoxina estudada; NA: Números de amostras analisadas; FC: Faixa de contaminação (µg/mL); NP(%): Números de amostras positivas; AF: Aflatoxinas; AFB₁: Aflatoxinas B1; AFB₂: Aflatoxinas B2; AFG₂: Aflatoxinas G2; FMs: Fumonisininas; FB₁: Fumonisininas B1; FB₂: Fumonisininas B2; HFB₁: Fumonisinina hidrolisada B1; OTA: Ocratoxina A; DON: Deoxinivalenol; ADONs (15-ADON e 3-ADON); 15-ADON: 15-Acetil-Deoxinivalenol; 3-ADON: 3-Acetil-Deoxinivalenol; DON-3G: Deoxinivalenol-3-Glicosídeo; NIV: Nivalenol; T-2: Toxina T-2 e ZEA: Zearalenona.

3.4. DEGRADAÇÃO DE TRICOTECENOS POR *S. cerevisiae*

Há várias estratégias aplicadas para a mitigação dos níveis de micotoxinas, que incluem os métodos físicos (JALILI et al., 2010; MATUMBA et al., 2015; TIBOLA; FERNANDES; GUARIENTI, 2016), os métodos químicos (JALILI; JINAP, 2012; SAVI et al., 2014) e os métodos biológicos (FAZELI et al., 2009; HASSAN et al., 2017). Os métodos biológicos se destacam por consistirem no desenvolvimento de tecnologias que utilizam micro-organismos e/ou enzimas para degradar contaminantes em compostos menos tóxicos ou não tóxicos. Em função disso, vários estudos destacam a identificação de micro-organismos, dentre eles bactérias, leveduras, fungos filamentosos e suas enzimas produzidas como agentes capazes de detoxificar micotoxinas (PATHARAJAN et al., 2011).

Dentre as leveduras, destaca-se a *S. cerevisiae*, capaz de reduzir os efeitos tóxicos das micotoxinas durante a fermentação alcoólica (KABAK; DOBSON; VAR, 2006). Segundo Jamieson (1998) a *S. cerevisiae* é altamente tolerante ao estresse oxidativo provocado por alguns contaminantes durante o processo fermentativo.

Portanto, além da capacidade de metabolização da micotoxina pela levedura, há também a possibilidade da ligação das micotoxinas em diferentes locais, como a parede celular da levedura. Esta interação se dá através de carboidratos complexos presentes na parede celular da *S. cerevisiae* que apresentam a capacidade de adsorver diferentes micotoxinas (STANLEY et al., 1993).

Tendo em vista os efeitos patológicos das micotoxinas em bebidas, como a cerveja, estudos vêm aplicando essas leveduras como agentes detoxificantes desses contaminantes. A partir das rotas metabólicas, os micro-organismos são capazes de degradar e/ou modificar a estrutura dessas toxinas e estabelecer condições fermentativas que possam melhorar as características funcionais da bebida (BATA; LÁSZTITY, 1999; GARCIA; SILVA, 2008; PASTER et al., 1992). Portanto, a redução da concentração de micotoxinas

pode ser atribuída, tanto pela capacidade de adsorção destes compostos por constituintes da parede da levedura, como pela ação enzimática característica do seu metabolismo (FLESH; VOIGHT-SCHERUERMAN, 1994 apud BATA; LÁSZTITY, 1999).

Outro fato importante em relação às leveduras, é que em condições de estresse como na presença de contaminantes, pode ocorrer o aumento no consumo de energia pelas leveduras, o que pode induzir a mudanças no metabolismo e ao acúmulo de algumas moléculas protetoras (SHIMIZU et al., 1991). A resposta oxidativa da levedura inclui a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de antioxidantes empregados na degradação de xenobióticos. A *S. cerevisiae* pode realizar a regulação destes compostos através de várias enzimas, como catalases, citocromo C peroxidase, glutathione peroxidase, glutaredoxinas e peroxiredoxinas (COLLINSON; GRANT, 2003; GRANT, 2001; JAMIESON, 1998).

Garda et al. (2005) avaliaram o comportamento de DON e Toxina T-2 durante a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* (120 h a 14 °C) e observaram redução dos níveis totais de contaminação de 53% para as micotoxinas avaliadas indicando que a degradação pode ser uma medida de redução do estresse celular provocado pelas toxinas. Boeira, Silvello e Remedi (2015) avaliaram a redução da contaminação de NIV durante o processo cervejeiro com aplicação de campos magnéticos. Os autores reportaram a significativa redução da micotoxina NIV em 56% no produto fermentado final.

Garda et al. (2010) estudaram a cinética de degradação da micotoxina DON (1 µg/mL) durante a fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae*. A degradação com *R. oryzae* ocasionou a maior diminuição na concentração de DON, 90% em 240 h, enquanto *A. oryzae* 74% de redução em 96 h, e velocidade de degradação de 0,62 e 0,54 µg/h, respectivamente. Campagnollo et al. (2015) investigaram a redução de micotoxinas na cerveja durante a etapa de fermentação e observaram alta porcentagem de redução de ZEA (75,1%), AFB₁ (48,1%) e OTA (59,4%), em contrapartida a redução de DON atingiu apenas 11,6%.

No entanto, estudos mais aprofundados ainda são necessários sobre o destino de cada micotoxina, principalmente relacionado ao processo cervejeiro (PASCARI et al., 2018). Além disso, há poucos estudos sobre os metabólitos formados durante o processo de degradação da micotoxina ao longo da fermentação alcoólica e consequentemente sua toxicidade. A partir desses dados é possível realizar a avaliação de perdas e de possíveis benefícios pelas estratégias de descontaminação.

3.5. EFEITOS DE MICOTOXINAS NO PROCESSO CERVEJEIRO

Inúmeros estudos relatam os efeitos provocados pela presença de micotoxinas no processo cervejeiro, comprometendo a qualidade do produto final (BOEIRA; SILVELLO; REMEDI, 2015; GARDA et al., 2005; KLOSOWSKI; MIKULSKI, 2010; SHAO; ZHOU; MCGARVEY, 2012). Boeira, Silvello e Remedi (2015) comprovaram que a fermentação alcoólica na presença de NIV (0,2 µg/mL) provocou o aumento na produção de butanol (35,3%) em 24 h de fermentação, etanol (0,4%) em 48 h e metanol (5,5%) e propanol (13,6%) em 72 h.

Klosowski e Mikulski (2010) observaram características diferenciadas nos compostos voláteis na bebida fermentada quando o malte de milho foi contaminado por multimicotoxinas (FM, OTA, ZEA, AF e DON). Os autores identificaram o aumento na concentração de acetaldeído e de metil-álcoois (30 a 100%) quando contaminado com DON, decréscimo na concentração de ésteres e do 3-metil-1-butanol (32%) e redução das micotoxinas OTA (11,2%) e FB₁ (12,6%), e a presença de AFs diminuiu a concentração de 2-metil-1-butanol (14,9%).

Garda-Bufferon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) relataram o aumento da atividade de enzimas α e β -amilases na presença de DON e Toxina T-2 (27,6 e 19,5, respectivamente) presentes nos maltes de cevada (1000 ng/g de malte). Shao, Zhou e McGarvey (2012) realizaram a fermentação empregando *S. cerevisiae* e avaliaram a metabolômica das células da levedura com e sem adição de patulina (PAT). Os autores identificaram que os metabólitos como aminoácidos livres, intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico e glicerol tiveram os níveis aumentados entre 10 e 60% na presença da micotoxina. No entanto, a cisteína e a GSH apresentaram concentrações reduzidas nas células, de aproximadamente 5 e 55%, respectivamente, indicando taxa mais lenta de síntese proteica e a indução do estresse oxidativo nas células com PAT.

Flores (2013) avaliou a fermentação submersa por *S. cerevisiae* em meio sintético *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) na presença de DON (1 µg/mL) e observou o aumento de 11% no conteúdo total de proteínas em 22 h de fermentação. Além disso, o autor apontou a formação de biomarcadores como catalase e PO, na faixa de 50 a 35 kDa após 47 h de cultivo na presença de DON.

Bretanha (2014) avaliou a produção de biomarcadores, sintetizados por *S. cerevisiae* de alta e de baixa fermentação na presença de DON (1 µg/mL). A comparação entre as cepas quanto a produção de marcadores micotoxicológicos indicou que a levedura de

alta fermentação em condições de anaerobiose a 26 °C durante 96 h apresentou perfil de alguns metabólitos (PO e GSH) alterados na presença de DON, visto que em 72 h de fermentação ocorreu aumento da atividade enzimática da PO (71%) e também da produção de GSH (62%) quando comparadas ao controle. Além disso, a autora também evidenciou a sensibilidade da levedura quanto à toxicidade, sendo a *S. cerevisiae* um produtor de biomarcadores como GSH e proteínas intracelulares caracterizadas por massa molecular de 47 e 54 kDa.

Cougo, Fontes e Duarte (2015) estudaram o processo fermentativo com *S. cerevisiae* em meio sintético contaminado com NIV (0,1 µg/mL). Os resultados apontaram aumento na produção proteica (33,8 mg/mL) em 24 h, redução de 28% de lipídios (ácido linoleico) e redução da concentração de GSH de 60% em 96 h de cultivo, na presença de NIV.

3.6. DETERMINAÇÕES DE MICOTOXINAS

Os métodos analíticos são importantes para a determinação de micotoxinas em matrizes alimentares. Devido à multiplicidade de variáveis e estruturas desses compostos, não é possível usar um método padrão para detectar todas micotoxinas, pois cada uma exigirá um método diferente para obter o melhor desempenho (SIEGEL; BABUSCIO, 2011; TURNER et al., 2009).

Dentre as técnicas, pode-se destacar o método QuEChERS (nome acrônimo rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro) (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2015). Este método envolve a extração de micotoxinas com solventes orgânicos (acetonitrila (MeCN), acetato de etila ou acetona) e partição utilizando diferentes sais isolados ou combinados (sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e cloreto de sódio (NaCl)). Após, ocorre às etapas de agitação e centrifugação e uma alíquota da fase orgânica é submetida à etapa de limpeza (octadecilsilano (C18), alumina, carvão ativado, MgSO₄, entre outros) (MAJORS, 2008; PEREIRA, FERNANDES; CUNHA, 2015).

A utilização de MgSO₄ na etapa de extração/separação de fases deve-se à sua elevada capacidade de remoção do volume de água e sua hidratação resulta no aquecimento da amostra, favorecendo a extração de substâncias apolares (ANASTASSIADES et al., 2003). A combinação dos sais como NaCl e MgSO₄ favorece a transferência de substâncias polares para a fase orgânica (PRESTES, 2019). Consequentemente, a etapa de limpeza é uma etapa importante na eliminação de compostos interferentes, sendo a amina primária-secundária (PSA) e o C18, os sorventes mais utilizados na extração de micotoxinas de amostras de

alimentos (FERNANDES et al., 2015; LI et al., 2015; MICHLIG et al., 2016; RODRÍGUEZ-CARRASCO et al., 2015; VEPRIKOVA et al., 2015).

O método QuEChERS vem sendo amplamente utilizado para a extração de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares como cervejas (RODRÍGUEZ-CARRASCO et al., 2015) e adjuntos cervejeiros como milho (FERREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2012), arroz (BEMVENUTI et al., 2012), cevada (RUBERT et al., 2013) e trigo (SEUS-ARRACHÉ et al., 2018). Rubert et al. (2013) determinaram 32 micotoxinas (entre as quais DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV) presentes em amostras de cevada empregando QuEChERS. O método mostrou-se adequado, apresentando recuperações entre 65-85% e desvio padrão relativo inferior a 17,4% para todas as micotoxinas.

Seus-Arraché et al. (2018) realizaram a determinação simultânea de tricotecenos do tipo B (DON, ADONs e NIV) em amostras de trigo e obtiveram recuperações entre 76-88% e desvios padrão relativos entre 3,3 e 9,8% utilizando o método QuEChERS. Pascari et al. (2018) empregaram QuEChERS para a determinação de 23 micotoxinas em 64 amostras de cerveja. A toxina mais frequente detectada na matriz foi a ZEA, sendo quantificada em 65% das amostras positivas, com níveis variando de 8,24 a 62,96 µg/L.

No entanto, os valores de micotoxinas podem ser subestimados, visto que na composição da cerveja, há uma ampla gama de compostos de baixo peso molecular, como açúcares, pigmentos, ácidos orgânicos, considerados interferentes e que podem provocar efeito significativo de matriz na etapa de detecção das micotoxinas (ZACHARIASOVA et al., 2010). A grande vantagem da utilização do método QuEChERS é a eliminação de compostos interferentes, não necessitando a diluição da amostra (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). Entretanto, devido a variedade de compostos diferentes presentes na cerveja há a necessidade da diluição de amostra para minimizar as interações da matriz com esses interferentes (PETERS et al., 2017; VARGA et al., 2013).

Outra vantagem do QuEChERS é eficácia na extração de analitos com diferentes polaridades em concentração de traços nas amostras (HACKBART, 2012; SIRHAN, 2011). Assim, este procedimento torna-se promissor para extração de toxinas distintas em diversas matrizes, como mosto cervejeiro e cerveja (BEMVENUTI et al., 2012).

Tamura, Uyama e Mochizuki (2011) aplicaram o método QuEChERS em bebidas à base de cerveja (cerveja, cerveja com baixo teor de malte e não alcoólica) comercializadas no Japão para a determinação de multimicotoxinas (PAT, NIV, DON, AFs, T-2, HT-2, ZEA, FMs, OTA, entre outras), utilizando para a detecção a cromatografia líquida de desempenho ultra-alta, acoplada à espectrometria de massa em tandem. As micotoxinas foram extraídas

utilizando MeCN com NaCl, MgSO₄ e citrato de sódio, e foram então purificados com um cartucho de extração em fase sólida incluindo C18. As determinações produziram altos coeficientes de correlação de 15 micotoxinas (coeficiente de correlação, $R > 0,99$) e taxas de recuperação variando de 70,3 a 110,7% com boa repetibilidade (erro relativo percentual, $RSD < 14,6\%$).

Portanto, na identificação dos compostos presentes na cerveja, bem como na autenticação e controle dos processos produtivos, podem ser empregadas técnicas analíticas, tais como espectroscopia na região do infravermelho (BIANCOLILLO et al., 2014; PINTO et al., 2015), espectrometria de massas (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2014; MARTÍNEZ-HUÉLAMO et al., 2014), cromatografia gasosa (LANGOS et al., 2016; RASCÓN et al., 2019) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) (ALMEIDA et al., 2006; KHATIB et al., 2006), sendo esta última utilizada neste estudo.

3.7. ESPECTROSCOPIA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H

Outra técnica que vem se destacando é a RMN de ¹H, utilizada para a determinação de estruturas de moléculas orgânicas em amostras líquidas. Segundo Duarte et al. (2002) esta técnica permite caracterizar a composição e o perfil metabólico de bebidas, como a cerveja.

A espectroscopia de RMN baseia-se no princípio da propriedade dos núcleos atômicos, chamada spin, representado pela capacidade do elétron em girar sobre seu próprio eixo (FREITAS, BONAGAMBA, 1999). Quando na presença de um campo magnético externo, os núcleos com spin $I=1/2$, se orientam a favor ou contra a este campo, originando dois níveis de energias (α e β) (ATKINS, PAULA, 2006). No entanto, a emissão do fóton de mesma energia que provoca a separação entre estes níveis causará a absorção e a excitação dos spins. Portanto, quando incidida uma onda de radiofrequência sobre a molécula ocorre a perturbação do sistema, que coincide com a diferença dos níveis de energia entre os spins, chamada de condição de “ressonância” (WESTBROOK, 2000).

Após, cessar a excitação magnética, o sistema retorna ao equilíbrio, emitindo as radiofrequências absorvidas (WESTBROOK, 2000). A energia absorvida apresenta individualidades para cada molécula e dependendo do ambiente químico de cada núcleo ocorre à obtenção de sinais em diferentes regiões do espectro, denominado deslocamento químico (δ), dados em ppm (partes por milhão), permitindo a identificação e a elucidação estrutural de diversos compostos. A diferença de ambiente pode ocorrer pela maior ou menor

blindagem do próton pela carga dos elétrons na região ao qual se encontra o próton. Assim, quanto mais blindado estiver o núcleo menor será o deslocamento químico e quanto menos blindado maior o valor do sinal (EWING, 1972).

Portanto, o deslocamento químico, representa as áreas referentes aos sinais proporcionais ao número de prótons que originam o sinal, conseqüentemente, os sinais apresentados nos gráficos de RMN serão de tamanhos diferentes. Logo, a área sobre a curva a partir da linha sobreposta ao espectro original pode ser determinada com o cálculo de integral. Os degraus de integração irão apresentar alturas diferentes que serão proporcionais à intensidade fornecida pela área do sinal e esta altura é proporcional ao número de prótons que dá origem ao sinal (PAVIA et al., 2010).

Os espectros de RMN de ^1H podem ser adquiridos com solventes deuterados como o óxido de deutério (D_2O), visto que estes podem apresentar trocas rápidas de deutério com o hidrogênio da amostra eliminando o sinal de uma série de grupos ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$). Para tal, o deslocamento químico, deve apresentar um sinal de referência dado pelo tetrametilsilano (TMS), dados em ppm, comumente empregado para obter espectros de hidrogênio e carbono, pois apresenta sinal único (WESTBROOK, 2000).

Conseqüentemente, a escolha do solvente adequado considerando sua polaridade e aromaticidade é essencial na otimização da separação do sinal, pois, conduz a mudanças consideráveis no deslocamento químico, dispersão do sinal, padrão da linha de base, complexidade global do espectro, bem como, na constante de acoplamento (J), grandeza que mede o grau da interação entre núcleos vizinhos, dado em Hertz (Hz) (FREITAS, BONAGAMBA, 1999; WESTBROOK, 2000).

Apesar de ser mais comumente aplicada na área farmacêutica, a RMN desempenha um papel importante em áreas de alimentos, física, biologia, química, entre outras. A técnica pode identificar e quantificar as moléculas presentes nas bebidas como a cerveja, assim é possível determinar os componentes majoritários comumente encontrados no mosto cervejeiro como açúcares (glicose, maltose, maltotriose), aminoácidos, peptídeos, entre outros, e na cerveja, composta por etanol, álcoois superiores, diacetil, ésteres, compostos de enxofre e ácidos carboxílicos (ATKINS, PAULA, 2006; EWING, 1972; PAVIA et al., 2010).

Duarte et al. (2002) utilizando a técnica de espectrofotometria de RMN de ^1H de alta resolução e análise multivariada no controle de qualidade de 17 cervejas (6 *Lagers* e 11 *Ales*) obtiveram o espectro de infravermelho, na região entre 1200 e 800 cm^{-1} o que possibilitou separar as cervejas sem álcool das demais. A avaliação do espectro ainda permitiu a identificação de álcoois (propanol, isobutanol e isopentanol), ácidos orgânicos alifáticos

(cítrico, málico, láctico, pirúvico, acético e succínico) e aminoácidos (alanina, ácido γ -aminobutírico e prolina), valina, leucina e isoleucina.

Em meados de 2003, Duarte et al. (2003) identificaram os carboidratos presentes nas cervejas do tipo *Ale* e *Lager*, por meio das técnicas de cromatografia líquida acoplada à RMN e os compostos foram identificados pela espectrometria de massas. Os autores utilizaram dois rótulos de cervejas do tipo *Lager* (1 e 2) e um de *Ale* (1). A técnica analítica possibilitou identificar que as cervejas *Lager* (1) e *Ale* (1) apresentaram oligossacarídeos de glicose, enquanto a *Lager* (2) apresentou monômeros de glicose.

Almeida et al. (2006) empregaram a RMN de ^1H para verificar diferenças em uma marca de cerveja em três diferentes plantas fabris (A, B e C). Os autores verificaram o conteúdo de ácidos láctico (49, 117 e 48 mg/L, respectivamente) e pirúvico (120, 168 e 156 mg/L, respectivamente), e observaram boa reprodutibilidade na planta A, mas não nos locais B e C. As cervejas do local B foram distinguidas pela predominância de dextrinas lineares (5,0 mg/L), enquanto nas cervejas A e C prevaleceram as dextrinas ramificadas (5,8 mg/L). Além disso, as plantas fabris foram distinguidas quanto ao conteúdo de adenosina/inosina (71, 52 e 82 mg/L, respectivamente), uridina (112, 149 e 134 mg/L, respectivamente) e tirosina/tirosol (198, 229 e 235 mg/L, respectivamente).

Rodrigues et al. (2011) avaliaram o espectro de RMN de ^1H em conjunto com a análise multivariada, para monitorar as alterações químicas na cerveja *Lager* exposta ao envelhecimento forçado (a 45 °C por 18 dias). Os autores observaram que o 5-hidroximetil furfural foi o marcador de envelhecimento mais significativo, mostrando uma variação de 150% entre os dias 0 e 18, juntamente com aumentos de álcoois (5%) e ácidos orgânicos (5%) (ácidos acético, pirúvico e succínico), além de diminuições do ácido γ -aminobutírico (6%) e dextrinas (39%).

Pereira et al. (2016) avaliaram cervejas comerciais brasileiras de 8 diferentes marcas, para a detecção de fraude derivada da troca de rótulos e tampas de cervejas do estilo *American Lager* de baixo custo pelas de maior valor. Os sinais desses açúcares foram identificados no modo positivo na forma de adutos (produto da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto de reação contendo todos os átomos de todos os componentes iniciais.) de sódio e potássio, enquanto que no negativo na forma de cloretos e dihidrogenofosfatos.

Argentina et al. (2019) utilizaram a técnica de espectroscopia de RMN de ^1H para discriminar amostras de cerveja *Lager* Padrão e *Premium*, de acordo com seu estilo e

informações fornecidas no rótulo. As amostras de cerveja *Premium* apresentaram malto-oligossacarídeos. Por outro lado, as dextrinas estavam presentes em cervejas Padrão.

A partir dos estudos mencionados observa-se que a RMN é empregada para identificar substâncias químicas presentes nas cervejas e diferenciar os tipos da mesma. Entretanto, além das diferenças químicas existentes, devidos aos diferentes processos industriais, matérias-primas e adulterações intencionais, a cerveja pode apresentar alterações por contaminações, como as provocadas por micotoxinas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

A fermentação alcoólica foi feita com o uso da levedura comercial liofilizada *S. cerevisiae* US-05 de alta fermentação, adquirida da empresa WE Consultoria. Os padrões de micotoxinas (DON e 15-ADON) e o adsorvente C18 foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

A água ultrapura foi obtida de um sistema de água Milli-Q Direct-Q UV[®] da Millipore Corp. (Alemanha). A acetonitrila e o tolueno (grau LC) foram adquiridos da PanReac (Espanha).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo dos padrões de micotoxinas

As soluções analíticas estoque de tricotecenos (DON e 15-ADON) foram preparadas a partir de 1 mg de cada micotoxina. Após, as soluções de trabalho de 50 µg/mL de DON e 15-ADON foram preparadas em tolueno:acetonitrila (95:5, v/v) e armazenadas a 4 °C. A confirmação da concentração das soluções de trabalho em acetonitrila foi feita em espectrofotômetro UV-Vis (FEMTO Cirrus-80) em comprimento de onda de 220 nm e absorvidade molar de 6808 para DON e 6895 para 15-ADON, de acordo com a Equação 1. Onde, Conc é a concentração de DON e 15-ADON (µg/mL), Abs é a Absorbância (nm), k é o coeficiente específico, MM é a massa molar de DON (296,3 g/mol) e 15-ADON (338,4 g/mol), ε é a absorvidade molar (L/mol cm) e c é a espessura da cubeta (cm) (BENNETT, SHOTWELL, 1990; KRŠKA et al., 2007).

$$\text{Conc (g/mL)} = \frac{1000 \text{ Abs } k \text{ MM}}{\epsilon c} \quad (1)$$

4.2.2. Mosto cervejeiro

O mosto cervejeiro (10 L) do tipo *American Pale Ale* foi doado por uma microcervejaria localizada na cidade de Rio Grande, RS, Brasil. Este foi previamente preparado na microcervejaria empregando 750 L de água potável, 88 kg de malte *Pilsen*, 2 kg de malte *Carared* e 90 kg de malte de *Munique* tipo II, resultando em um mosto com

densidade inicial de 1057 g/cm³. A composição do mosto cervejeiro foi determinada no item 4.3.1.

4.2.3. Fermentação alcoólica do mosto cervejeiro

A fermentação alcoólica do mosto cervejeiro foi conduzida na presença dos tricotecenos, DON e 15-ADON. O processo fermentativo foi realizado para investigar a síntese de metabólitos pela levedura *S. cerevisiae* como consequência da contaminação por DON e 15-ADON. Portanto, foram determinados os parâmetros cinéticos, bioquímicos e físico-químicos.

A fermentação alcoólica foi feita conforme o procedimento descrito por Foszczynska et al. (2008) com modificações empregando reatores tipo Erlenmeyer (500 mL). A levedura liofilizada foi hidratada previamente ao cultivo pela adição de 1 g de levedura e 10 mL de mosto cervejeiro, previamente agitado em agitador orbital por 10 min. Após um volume correspondente a 0,115 g de levedura foi adicionado ao reator contendo mosto cervejeiro de forma a obter volume final de 200 mL de meio fermentativo.

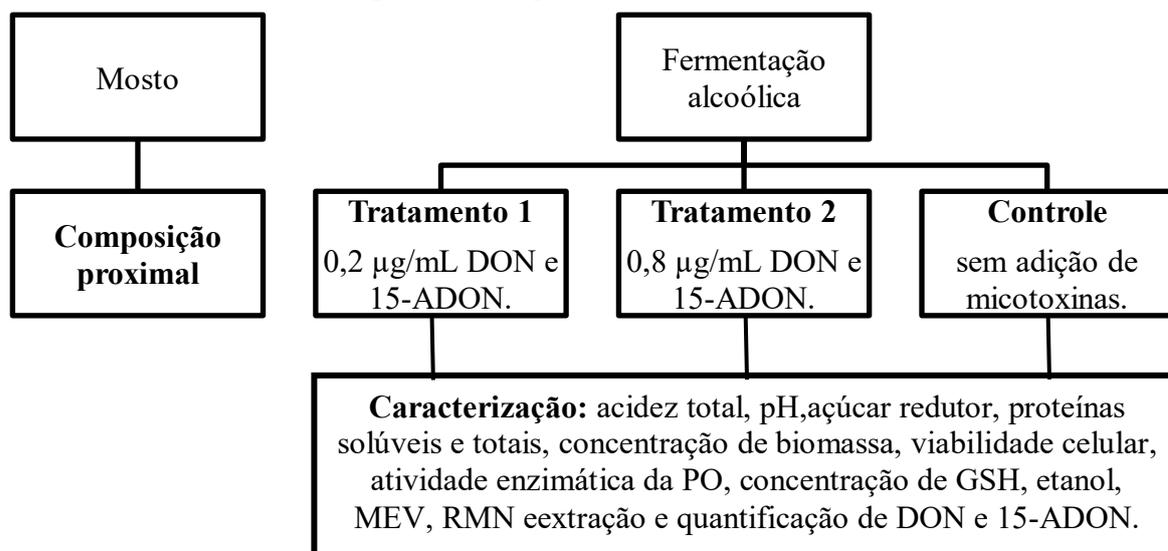
Durante a fermentação alcoólica o efeito dos tricotecenos (DON e 15-ADON) foi determinado em dois ensaios com concentrações diferentes de micotoxinas, denominados tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2) e um ensaio controle (C) no qual ocorreu à fermentação sem a adição das micotoxinas. Para acompanhamento, um ensaio sem a adição de levedura e micotoxina foi feito para avaliar o meio fermentativo.

No tratamento 1 foi adicionado ao reator 0,2 µg/mL e no tratamento 2 foi adicionado 0,8 µg/mL, tanto para DON quanto para 15-ADON. A menor concentração avaliada considerou a proporção de malte/água (0,2 kg/L) utilizada no processo de mosturação e a concentração de 750 µg/kg de DON no malte, limite máximo regulamentado pela ANVISA (BRASIL, 2017b). Para o cálculo da concentração de micotoxinas empregadas no tratamento 2 utilizou-se 4 vezes a concentração do tratamento 1.

As soluções de micotoxinas foram adicionadas ao reator e o solvente evaporado em banho de areia a 60 °C, após foi adicionado o mosto cervejeiro e mantido sob agitação em banho ultrassônico por 10 min para a solubilização das micotoxinas. Em seguida, foi adicionado à levedura e os reatores foram incubados em câmara germinativa (BOD) a 19 °C durante 96 h. A fermentação alcoólica ocorreu com amostragens retiradas assepticamente a cada 24 h de cultivo para o acompanhamento do potencial hidrogeniônico (pH), viabilidade celular, acidez total, atividade enzimática da PO, concentração de biomassa, de açúcares

redutores (AR), de GSH, de proteína solúvel, de proteína total, de etanol e de DON e 15-ADON, além da realização da RMN. Ao final de 96 h de fermentação foi feita a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células de levedura. As etapas executadas no estudo estão demonstradas na Figura 2.

Figura 2 – Etapas realizadas no estudo.



4.3. EFEITOS DAS MICOTOXINAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

4.3.1. Composição do mosto cervejeiro

A caracterização química do mosto cervejeiro foi feita de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists International* – AOAC (AOAC, 2000). O teor de umidade foi determinado empregando gravimetria com secagem em estufa, pela perda de massa da amostra, quando aquecida a 105 °C por 24 h, pelo método nº 935.29. A determinação de cinzas foi feita por gravimetria, através de incineração das amostras em mufla a 550 °C, como descrito no método nº 923.03. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, pela conversão do nitrogênio quantificado para proteína empregando o fator de conversão (6,25), conforme o método nº 992.23.

O pH foi determinado potenciométricamente em pHmetro. A acidez total foi determinada segundo Akan et al. (2016) modificado, no qual 5 mL da amostra, 15 mL de água destilada e 3 gotas do indicador fenolftaleína foram misturados, após a amostra foi titulada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,097 M. Para o cálculo da acidez total utilizou-se a Equação 2. Onde, At é a acidez total, f é o fator de correção do NaOH (1,75), v representa o

volume da solução de NaOH 0,097 M gasto na titulação (mL), M refere-se ao valor da molaridade do NaOH e V representa o volume da amostra (mL).

$$At \quad \frac{1000 f v M}{v} \quad (2)$$

Os sólidos solúveis foram mensurados em refratômetro digital e o resultado expresso em unidade de °Brix, que relaciona a quantidade de açúcar (em gramas) contida em 100 mL de mosto cervejeiro (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A densidade aparente (ρ) foi determinada utilizando picnômetro. Neste foi adicionado água destilada a 24 °C (ρ 1,063 g/mL). A densidade aparente do mosto foi calculada a partir da Equação 3 (BUENO; DEGREVE, 1980).

$$\rho \text{ mosto (g/mL)} \quad \frac{\text{Massa da amostra}}{\text{volume de água}} \quad (3)$$

Os lipídios foram determinados de acordo com o procedimento descrito por Folch, Lees e Stanley (1957), que consistiu na agitação de 5 mL de mosto cervejeiro em banho ultrassônico durante 5 min com 40 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1), sendo centrifugada a 2240 x g por 10 min. O sobrenadante foi separado e transferido para um funil de separação. A fase inferior separada foi submetida à secagem em balão de fundo chato em rota-evaporador (70 °C). Em seguida, o balão foi colocado em estufa a 65°C por 12 h e pesado, após foi calculado o teor de lipídios, conforme Equação 4.

$$\text{Lipídios (\%)} \quad \left(\frac{\text{Massa final da amostra} - \text{Massa do balão tarado}}{\text{Massa da amostra}} \right) 100 \quad (4)$$

A concentração de proteínas solúveis no mosto cervejeiro foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina. Em tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de mosto cervejeiro diluído na proporção 1:50 (v/v) em água, 0,5 mL de NaOH (1 mol/L) e 4 mL de solução alcalina. Depois de 10 min foi adicionado 1,0 mL do reagente de fenol Folin-Ciocalteau e os tubos foram mantidos no escuro durante 30 min, após a absorbância foi lida em espectrofotômetro (FEMTO Cirrus-80) a 660 nm.

A quantificação dos açúcares não redutores (sacarose) foi feita com prévia hidrólise ácida (HCl) conforme o método descrito por Zoecklein et al. (2001). Após, foi feita a determinação de açúcares redutores pelo método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Em tubo de ensaio foi adicionado 1,0 mL de amostra, 1 mL de NaOH (2 M) e 1 mL do reagente DNS. Posteriormente, o tubo foi aquecido em banho-maria a 100 °C por 5 min, resfriado em banho de gelo por 5 min, adicionado 7 mL de água destilada e feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (FEMTO Cirrus-80) a 540 nm. O branco da solução consistiu em substituir o volume de amostra por água destilada (1,0 mL) (MILLER, 1991).

4.3.2. Extração e quantificação de micotoxina do mosto e do meio fermentado

A extração de DON e 15-ADON do mosto foi feita pelo método QuEChERS de acordo com Pascari et al. (2019) com modificações. Para a extração dos analitos foram feitos 9 experimentos contendo 1 mL de amostra e diferentes volumes de MeCN, após foram homogeneizados em vórtex por 1 min e levados ao banho ultrassônico por 3 min. Na etapa de partição foram adicionados 0,4 g de MgSO₄ e 0,1 g de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 s, sonicada por 3 min e então centrifugada a 4725 x g durante 5 min. O sobrenadante (1600 µL) foi removido para etapa de limpeza que consistiu em adicionar diferentes adsorventes (alumina, C18, MgSO₄ e carvão) e massas. A mistura foi submetida à agitação em vórtex e centrifugação a 4725 x g durante 5 min. O sobrenadante (800 µL) foi recolhido e evaporado em banho de areia a 60 °C. O extrato seco foi ressuspenso em 1 mL de fase móvel composta por água ultrapura:acetonitrila (70:30, v/v), seguido da centrifugação a 8944 x g durante 5 min e injeção cromatográfica (20 µL). As etapas de extração e limpeza utilizadas no método QuEChERS são apresentadas na Tabela 3.

A detecção e quantificação de DON e 15-ADON foram efetuadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD-10AXL) operando a 220 nm com sistema de bombas (LC-20AT), degaseificador de fase móvel (DGU-20A5), controlador (CBM-20A), injetor automático (SIL 20A-HT) e programa LC-10 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi feita em coluna C18 de fase reversa (Gemini®, Phenomenex) 250 x 4,5 mm (5 µm). A fase móvel foi constituída por MeCN e água Mili-Q (30:70, v/v), com vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL (SOUZA et al., 2015).

Tabela 3 – Experimentos empregando diferentes volumes de solvente extrator e adsorventes na etapa de limpeza do mosto cervejeiro pelo método QuEChERS.

Experimento	Solvente de extração* (mL)	Adsorvente (g)
1	0,5	Carvão ativado (0,01), celite (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
2	1,0	Carvão ativado (0,01), celite (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
3	2,0	Carvão ativado (0,04), celite (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
4	2,0	Celite (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
5	1,0	C18 (0,04), celite (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
6	2,0	C18 (0,04), celite (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
7	2,0	C18 (0,04), alumina (0,01) e MgSO ₄ (0,09)
8	2,0	Alumina (0,04) e MgSO ₄ (0,09)
9	1,0	Alumina (0,04) e MgSO ₄ (0,09)

*Acetonitrila

A validação do método foi feita de acordo com o preconizado pela União Europeia (Diretiva 2002/657/EC) (EC, 2002) e pela ANVISA (RE nº166 de 24/07/17) (BRASIL, 2017a). Os seguintes parâmetros de validação foram estudados a fim de avaliar a eficácia do método analítico: linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, precisão e efeito matriz.

Para avaliar a linearidade foram construídas curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por superposição de matriz. O LOD e o LOQ foram estimados pela relação sinal/ruído, considerando a concentração da solução com o padrão que gerou no mínimo um sinal de 3 e 10 vezes maior que o sinal gerado pela linha de base (ruído), respectivamente. As concentrações das soluções analíticas utilizadas para a construção das curvas foram: 0,042 – 5,0 µg/mL para DON e 15-ADON.

A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação. Amostras de mosto (isentas de micotoxinas) foram contaminadas nos níveis de 1,25, 2,5 e 5,0 µg/mL para os tricotecenos, DON e 15-ADON, a partir da adição de volume conhecido de solução trabalho de cada micotoxina a 1 mL de amostra.

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermediária. A seletividade foi determinada pelo sinal do analito gerado em LC-DAD e pelo espectro de absorção do sinal do analito comparado ao do padrão.

Para a quantificação dos tricotecenos foi utilizada a padronização por superposição de matriz e os cálculos para expressar a porcentagem de recuperação (R%) de cada micotoxina, DON e 15-ADON, foram realizados de acordo com a Equação 5. Onde, Conc1 é a concentração determinada após a contaminação, Conc2 é a concentração determinada na amostra não contaminada (branco) e o Conc3 é a concentração esperada para o nível de contaminação.

$$R(\%) = \left(\frac{\text{Conc1} - \text{Conc2}}{\text{Conc3}} \right) 100 \quad (5)$$

O efeito de matriz foi determinado com curva analítica no solvente e curva analítica na matriz, em que foram analisadas as inclinações das retas, conforme Equação 6. Onde, X₁ corresponde à inclinação da curva obtida pela injeção da solução analítica de DON e 15-ADON, preparada no extrato da matriz (mosto cervejeiro) e X₂ refere-se à inclinação da curva obtida pela injeção da solução analítica de DON e 15-ADON, preparada no solvente ((70:30)/(água ultrapura:MeCN)) (ECONOMOU et al., 2009).

$$EM(\%) = \left(\frac{X_1}{X_2} \right) 100 \quad (6)$$

O método QuEChERS avaliado e validado foi aplicado para a determinação dos tricotecenos DON e 15-ADON no mosto cervejeiro e no meio fermentado.

4.3.3. Caracterização bioquímica e cinética da fermentação alcoólica

A concentração de biomassa foi avaliada em espectrofotômetro (FEMTO Cirrus-80) pela medida da densidade óptica a 600 nm. O crescimento da biomassa foi avaliado através da razão entre a concentração celular máxima e a concentração celular inicial (CHANG et al., 2018).

A viabilidade celular foi feita pelo método de exclusão com o corante azul de trypan (0,2%). A uma alíquota de amostra (500 µL) foi adicionado o corante azul de trypan (20 µL). Após 1 min, uma gota desta solução foi colocada em câmara de Neubauer e feita a contagem de células viáveis em microscópio. Os cálculos de viabilidade celular foram feitos em conformidade com a relação entre as células viáveis e o número total de células de cada

experimento, representado pela Equação 7 (FRESHNEY, 1987). Onde, C_v representa por Células viáveis e C_{nv} representa as Células não viáveis.

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \left(\frac{C_v - C_{nv}}{C_v} \right) 100 \quad (7)$$

A atividade enzimática da PO foi avaliada de acordo com Garda-Buffon, Kupski e Furlong (2011). Ao meio fermentado (1 mL) foi adicionado tampão fosfato (1,5 mL, 5 mmol/L, pH 6,0), água destilada (2 mL), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,08% (1 mL) e guaiacol 1% (0,5 mL). A mistura foi incubada por 30 min em banho-maria a 30 °C e a absorbância determinada em espectrofotômetro (FEMTO Cirrus-80) a 470 nm. Uma unidade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar ou hidrolisar 1 μ mol de substrato por min (FELTRIN et al., 2017) e foi considerado a absorvidade molar do guaiacol (ϵ_{470}) de 26600/(M cm).

A GSH intracelular foi quantificada a partir do método colorimétrico determinado por Owens e Belcher (1965). Primeiramente, 1,5 mL de meio fermentado foi centrifugado e nas células sedimentadas foi realizada a extração da GSH adicionando 1,5 mL de solução de etanol 40% (v/v), mantida a 30°C durante 2 h e centrifugação a 1804 x g por 10 min. Para a reação colorimétrica foram utilizados 0,5 mL de sobrenadante, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,5 mol/L (pH 8,0) e 0,03 mL de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). Após 3 min a absorbância foi medida em espectrofotômetro (FEMTO Cirrus-80) a 412 nm. Para o ensaio branco, a solução de etanol 40% substituiu o sobrenadante. A concentração de GSH (mg/L) foi calculada usando a curva padrão, de L-glutationa reduzida.

A concentração de GSH e a atividade da PO na célula da levedura foram utilizados para calcular a degradação específica redox (DER) (U h/L) de DON e 15-ADON do meio fermentado, estimado empregando a Equação 8. Onde: TRIC(%) é o percentual da concentração de DON ou 15-ADON determinados no meio fermentado; [GSH] é a concentração de GSH (mg/L), A_{PO} é a atividade da peroxidase (U_{Total}), V_r é o volume do reator (200 mL) e t é o tempo coleta de amostra do processo fermentativo (h).

$$\text{DER(\%degradação/mg}_{GSH} U_{PO} h) = \frac{RIC(\%)}{[GSH] A_{PO} V_r t} \quad (8)$$

A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi obtida pela regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento (HAMIDI-ESFAHANI et al., 2007) e os fatores de

conversão de substrato em glutatona ($Y_{GSH/S}$), substrato em etanol ($Y_{E/S}$), substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), biomassa em glutatona ($Y_{GSH/X}$), biomassa em etanol ($Y_{E/X}$) e etanol em GSH ($Y_{GSH/E}$) foram estimados empregando as equações 9, 10, 11, 12, 13 e 14 respectivamente (LIMA et al., 2001), nos tempos 0 e 96 h de fermentação alcoólica. Onde: [GSH] é a concentração de GSH, [E] é a concentração de etanol, [S] é a concentração de substrato (glicose), [X] é a concentração de biomassa e AR é o açúcar redutor.

$$Y_{GSH/S}(\text{mg}_{GSH}/\text{mg}_{AR}) = \frac{([GSH]_h - [GSH]_{0h})}{([S]_{0h} - [S]_h)} \quad (9)$$

$$Y_{E/S}(\text{mg}_{Etanol}/\text{mg}_{AR}) = \frac{([E]_h - [E]_{0h})}{([S]_{0h} - [S]_h)} \quad (10)$$

$$Y_{X/S}(\text{mg}_{Biomassa}/\text{mg}_{AR}) = \frac{([X]_h - [X]_{0h})}{([S]_{0h} - [S]_h)} \quad (11)$$

$$Y_{GSH/X}(\text{mg}_{GSH}/\text{mg}_{Biomassa}) = \frac{([GSH]_h - [GSH]_{0h})}{([X]_{0h} - [X]_h)} \quad (12)$$

$$Y_{E/X}(\text{mg}_{Etanol}/\text{mg}_{Biomassa}) = \frac{([E]_h - [E]_{0h})}{([X]_{0h} - [X]_h)} \quad (13)$$

$$Y_{GSH/E}(\text{mg}_{GSH}/\text{mg}_{Etanol}) = \frac{([GSH]_h - [GSH]_{0h})}{([E]_{0h} - [E]_h)} \quad (14)$$

Ao final de 96 h de fermentação foi realizada a avaliação das células da levedura por MEV. As alíquotas do precipitado celular foram mantidas durante 48 h a 4 °C em 1 mL de solução de glutaraldeído (3%) e em tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8). As amostras foram lavadas com água destilada e desidratadas com lavagens sucessivas de etanol (30, 50, 70 e 95%), permanecendo 20 min em cada concentração e 45 min em etanol absoluto. Após, foram colocadas em *stubs* e cobertas com ouro paládio com espectro de energia dispersiva a 25 kV e com magnitude de 1000 a 5000 X (TAO; JIA; ZHOU, 2014) e visualizadas em MEV, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

4.3.4. Caracterização físico-química da fermentação alcoólica

O pH, a acidez total, a concentração de açúcar redutor e de proteínas foram determinadas conforme descrito no item 4.3.1.

O conteúdo de etanol foi quantificado de acordo com Klaric et al. (2015) por cromatógrafo a gás (CG-2010 Shimadzu) equipado com injetor Split/Splitless e detector de ionização de chama, coluna Crossbond de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de 75% de película-fenil-metilpolisiloxano. O volume de injeção manual empregado foi 1 µL, no modo Split (1:100), a temperatura de entrada 230 °C, a pressão da coluna de 2,33 psi e a vazão do gás de arraste de nitrogênio 0,5 mL/min. A velocidade média do gás de nitrogênio de 10 cm/s. A temperatura do forno foi mantida a 26 °C durante 7 min e em seguida aumentou de 26 para 50 °C a uma taxa de 1 °C/min e finalizando com 200 °C (taxa de 15 °C/min) durante 4 min. A temperatura do detector por ionização de chama (FID) foi 250 °C e o fluxo do gás transportador de nitrogênio foi 25 mL/min. O etanol foi identificado pela curva padrão de etanol diluído em água ultrapura e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Metabólitos como açúcares, etanol e ácido acético foram determinados em RMN de alto campo (Bruker Avance 400 MHz, Alemanha), disponível no Centro Integrado de Análises (CIA) da FURG. Este opera em frequência de 400,13 MHz para o núcleo de hidrogênio, utilizando probe de 5 mm de detecção inversa. Os experimentos foram feitos a 25 °C, utilizando-se cerca de 400 µL de amostra, acrescidos de 100 µL de D₂O. Os deslocamentos químicos foram especificados de acordo com o padrão de referência, trimetilsilil-propionato de sódio (TSP). Os parâmetros utilizados para a aquisição dos espectros foram devidamente otimizados, partindo-se de janela espectral de 5.000 Hz, número de pontos 64 k, número de *scans* de 8 a 16. Os tempos de relaxação foram determinados pelas medidas de T1 a partir da sequência de inversão-recuperação para fins quantitativos.

O processamento dos espectros foi feito a partir da aplicação de um fator de multiplicação exponencial de 0,3 Hz anterior à transformada de Fourier, cuja correção de fase e linha de base foi manualmente ajustada e as regiões de interesse integradas manualmente. Todas as sequências de pulso e *softwares* de processamento são fornecidas pela Bruker (DUARTE et al., 2002).

4.3.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita por teste de Tuckey, ao nível de significância de 5 , utilizando o programa “tística” (versão 7.0, *StatSoft*, Inc., Tulsa,

USA), tendo concentração de biomassa (mg/mL), viabilidade celular (%), atividade específica da PO (U/mg), concentração de GSH (mg/L), açúcares redutores (g/L), proteínas solúveis (g/L) e proteínas totais (%) como resposta para a fermentação alcoólica na ausência e na presença de DON e 15-ADON.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e físico-químicos para cada um dos tratamentos foram avaliados por análise de componentes principais (PCA) feita no *Software* PAST 2.04 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.3.7. Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidrarias

Para a limpeza das vidrarias e utensílios foram utilizadas soluções contendo 0,3% de hipoclorito de sódio, com a imersão do material por 20 min. Este reagente garante a degradação da estrutura química e a ausência de contaminação ambiental pelo descarte indevido do material. A acetona utilizada foi armazenada em vidros âmbar e posteriormente submetida à recuperação em destilador de solventes, Tecnal – TE- 012. Os demais solventes e reagentes foram descartados conforme norma estabelecida pela FURG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

A composição do mosto cervejeiro é fundamental para a avaliação da fermentação alcoólica, sendo esta apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição do mosto cervejeiro em base seca.

Componentes	Média das triplicatas \pm erro padrão
Açúcares totais (%)	48,85 \pm 0,79
Açúcares redutores (%)	21,37 \pm 0,51
Proteínas solúveis (g/L)	23,79 \pm 0,80
Proteínas totais (%)	1,37 \pm 0,01
Cinzas (%)	3,73 \pm 0,10
Lipídios (%)	0,69 \pm 0,22
Acidez total (mEq/L)	25,50 \pm 0,05
Sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix)	14,36 \pm 0,01
pH	5,10 \pm 0,01
Densidade aparente (ρ) (g/mL)	1,06 \pm 0,0

Há poucos dados na literatura referentes à composição de mostos cervejeiros. Portanto, buscou-se relacionar os dados obtidos neste estudo com a composição da cerveja. Os açúcares presentes no mosto cervejeiro e na cerveja são provenientes do malte de cevada e de adjuntos cervejeiros. Estes compostos são fundamentais para a produção da bebida, pois contribuem com o sabor e com a formação de etanol ao final da fermentação (MARTÍNEZ et al., 2011). O mosto cervejeiro apresentou elevados teores de açúcares redutores (21,37%) e totais (48,85%), bem como a quantidade aproximada de açúcares, representado pelos sólidos solúveis (14,36 $^{\circ}$ Brix), extraídos durante a etapa de mosturação e a ρ (1,06 g/mL) (Tabela 4).

Estes dados corroboram com o exposto por Dinslaken (2014) que inferiu que quanto mais denso o mosto cervejeiro, maior é a concentração de carboidratos, resultando em um mosto rico em açúcares, originando uma cerveja com maior teor alcoólico. Os açúcares ainda podem influenciar no valor calórico da bebida (LEIPER; STEWART; MCKEOWN, 2003), por exemplo, 300 mL de cerveja podem apresentar baixos níveis de açúcar (geralmente menor que 1 g), pois os açúcares do mosto foram consumidos durante a fermentação (CARVALHO, 2016).

Assim como os açúcares, as proteínas presentes no mosto e na cerveja são derivadas principalmente dos grãos de malte (PAPAZIAN, 2014). Assim como os açúcares, as proteínas presentes no mosto e na cerveja são derivadas quase que exclusivamente dos grãos de malte, extraídos durante o processo de produção da cerveja. Desta forma, a concentração de proteínas presentes no mosto cervejeiro foi 23,7 mg/mL (Tabela 4). Durante a produção da cerveja a concentração de proteínas diminui, podendo esta redução ser por hidrólise ou transformação enzimática característica do micro-organismo (KUNZE, 1999). Portanto, a cerveja, apresenta uma concentração peptídica de aproximadamente 0,5 mg/mL (LEIPER; STEWART; MCKEOWN, 2003).

Entretanto, foi observado um baixo teor de lipídios (0,69%) no mosto (Tabela 4), provenientes da transferência dos grãos de cevada. Em contrapartida, os lipídios quando identificados na cerveja podem ser provenientes tanto dos grãos de cevada, quanto da oxidação do lúpulo e do metabolismo da levedura. Assim, a cerveja apresenta em média 0,72% de lipídios (BRUNELLI; VENTURINIFILHO, 2013). O baixo teor de lipídios, tanto no mosto quanto na cerveja, também está relacionado a polaridade do meio aquoso e consequentemente uma menor transferência desta classe de compostos.

Durante a fermentação, as leveduras podem produzir quantidades e tipos diferentes de lipídios, que contribuem com a variação de sabores e estilos de cerveja, além disso, inibem a formação de ésteres desagradáveis produzidos pela combinação de álcoois e ácidos do mosto (ZSCHOERPER, 2009). Contudo, os lipídios podem atuar na redução da espuma e no envelhecimento da cerveja, pois são facilmente oxidados (BRUNELLI; VENTURINIFILHO, 2013).

O mosto cervejeiro também foi avaliado quanto ao teor de cinzas, pois este pode ser influenciado pelo extrato primitivo. Assim, o teor de cinzas obtido no mosto cervejeiro foi 3,73% (Tabela 4), indicando baixa concentração de resíduos minerais (como cálcio, selênio, cobre, zinco e fósforo). No entanto, as cervejas elaboradas apenas com malte podem apresentar elevados teores de cinzas (0,20 g) em função dos componentes do extrato (açúcares, minerais, etc.) (RUSCHEL, 2019).

O valor de pH (concentração do íon H^+) é um parâmetro importante no processo de produção da cerveja, pois apresenta influência sobre a etapa de sacarificação, na qual ocorre a atuação otimizada das enzimas (PRIEST; STEWART, 2006). Os íons (H, Ca, Mg, entre outros) contidos no mosto podem alterar o pH da solução, pois reagem com os componentes do malte, afetando o pH da mosturação (KUNZE, 1999; WUNDERLICH; BACK, 2009).

Como observado na Tabela 4, o pH do mosto cervejeiro foi 5,3, dado que corrobora com a faixa ideal de pH (entre 5,3 a 5,5) apresentada por Kunze (2006). Em contrapartida, a cerveja apresenta valores de pH que variam entre 4,0 e 4,5 (BRIGGS et al., 2004; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Outro parâmetro importante para o controle de qualidade em cervejas é a determinação de acidez. Esta é utilizada para detecção de fraudes, padronização de bebidas e acompanhamento de estabilidade (OLIVEIRA, 2012). No entanto, os parâmetros para acidez total não são regulamentados pela legislação vigente (BRASIL, 2009a). Assim, a acidez total do mosto cervejeiro determinado neste estudo foi 25,5 mEq/L podendo aumentar durante a fermentação devido ao metabolismo e produção de ácidos característicos do processo cervejeiro (Tabela 4).

Diante do exposto, pode-se concluir que o mosto cervejeiro empregado neste estudo apresenta características desejáveis para produção de uma cerveja de boa qualidade e alto teor alcoólico.

5.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS DO MOSTO E DO MEIO FERMENTADO

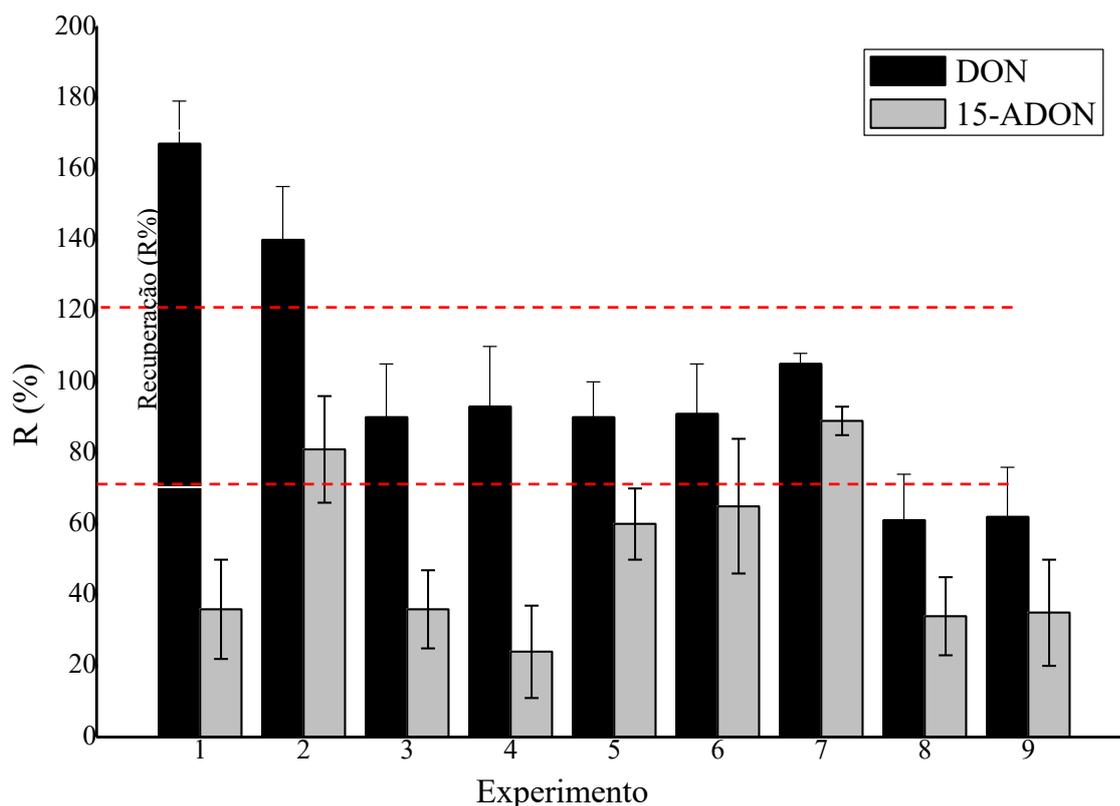
A contaminação por micotoxinas pode ser comprovada por métodos analíticos que permitem a determinação desses compostos em diferentes matrizes, contribuindo com a segurança dos alimentos (CHILAKA et al., 2018; RODRIGUEZ-CARRASCO et al., 2015; TAMURA et al., 2011).

A eficiência da extração de micotoxinas empregando o método QuEChERS utilizando solventes orgânicos pode ser afetada pela presença da água na cerveja. Assim, para evitar a coeluição de DON e 15-ADON com os constituintes do mosto cervejeiro e otimizar o desempenho do método foram avaliados o volume de solvente extrator e a limpeza do extrato com adsorventes (Figura 3).

Considerando à complexidade de nutrientes presentes no mosto cervejeiro, como açúcares, proteínas, lipídios e carboidratos, constatou-se que a maior eficiência na recuperação de DON e 15-ADON, ocorreu quando foi utilizado o maior volume de solvente extrator, 2 mL de MeCN (Figura 3). De acordo com Mastovská e Lehotay (2004) este solvente é comumente empregado e sua eficiência, quando comparado a outros usualmente empregados na extração de micotoxinas possibilita a extração de menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra.

Na segunda etapa do método QuEChERS envolvendo limpeza do extrato, os melhores valores de recuperação foram observados na presença de MgSO_4 (0,09 g), C18 (0,04 g) e alumina (0,04 g) (Figura 3).

Figura 3 – Recuperação (%) de DON e 15-ADON do mosto cervejeiro pelo método QuEChERS empregando diferentes volumes de solvente extrator e sais adsorventes.



Faixa de recuperação aceitável na faixa entre 70 e 120% (BRASIL, 2017a; EC, 20002) e desvio padrão.

Experimento 1: 0,5 mL de MeCN, 0,01 g de carvão ativado, 0,04 g de celite e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 2: 1,0 mL de MeCN, 0,01 g de carvão ativado, 0,04 g de celite e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 3: 2,0 mL de MeCN, 0,01 g de carvão ativado, 0,04 g de celite e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 4: 0,5 mL de MeCN, 0,04 g de celite e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 5: 1,0 mL de MeCN, 0,04 g de C18, 0,04 g de celite e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 6: 2,0 mL de MeCN, 0,04 g de C18, 0,04 g de celite e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 7: 2,0 mL de MeCN, 0,04 g de C18, 0,04 g de alumina e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 8: 2,0 mL de MeCN, 0,04 g alumina e 0,09 g de MgSO_4 ;

Experimento 9: 2,0 mL de MeCN, 0,04 g alumina e 0,09 g de MgSO_4 .

O C18 e a alumina são sorventes comumente empregados na extração de micotoxinas em amostras de alimentos, apresentando importante efeito sobre os carboidratos e as proteínas (FERNANDES et al., 2015; LI et al., 2015; MICHLIG et al., 2016; RODRÍGUEZ-CARRASCO et al. 2015; VEPRIKOVA et al., 2015). O sorvente C18 pode ser usado para remover os componentes gordurosos e não polares da matriz, enquanto o PSA é

usado principalmente para a remoção de ácidos orgânicos, pigmentos e fenol, entre outros (SUN et al., 2016).

Assim, este método demonstrou ser eficiente para extração de ambos os tricotecenos do tipo B (DON e 15-ADON) do mosto cervejeiro, apresentando faixas de recuperações de 105 e 89% para DON e 15-ADON, respectivamente. Os valores de recuperação encontrados neste estudo corroboram com os dados do *European Committee For Standardization* (CEN) que indicam que as faixas de recuperações aceitáveis devem estar entre 70 e 120%.

Sun et al. (2016) realizaram a quantificação simultânea de 25 micotoxinas em cereais e utilizaram o método QuEChERS para a extração. As amostras foram extraídas com solução contendo 80% de MeCN e 0,1% de ácido fórmico e a etapa de limpeza foi feita com C18 e PSA na faixa de 10, 20, 50 e 100 mg. Os autores observaram que quando a quantidade de PSA aumentava, a recuperação da maioria das micotoxinas diminuía, desta maneira obtiveram recuperações entre 60,2 e 115,8%, com RSD variando de 0,7 a 19,6%

Han et al. (2013) determinaram simultaneamente múltiplas micotoxinas em vinhos por espectrometria de massas e obtiveram recuperações aceitáveis para algumas micotoxinas empregando a adição de 2 g de NaCl, 0,25 g de MgSO₄ à mistura MeCN (20 mL) e vinho (2,5 mL) e a limpeza foi feita usando C18. As recuperações estimadas para as micotoxinas foram 75, 97, 83, 90, 88, 85, 57 e 45% para DON, PAT, AFG1, AFG2, AFB1, AFB2, OTA e ZEA, respectivamente, e RSD entre 1,2 e 21,1%.

Rodríguez-Carrasco et al. (2015) estudaram a ocorrência de micotoxinas em cerveja. Eles empregaram o método QuEChERS usando 5 mL de MeCN como solvente extrator e para a limpeza usaram MgSO₄ (900 mg) e C18 (300 mg), obtendo recuperações entre 70 e 109% para as micotoxinas DON, ADONs, NIV, FM, ZEA, T-2 e Toxina (HT-2).

Garcia (2018) otimizou o método de QuEChERS para a extração de micotoxinas para cerveja, usando na etapa de extração 10 mL de amostra e 10 mL de MeCN e na etapa de limpeza celite (0,3 g) e MgSO₄ (0,9 g) e obteve recuperações de 84, 101, 101, 77, 93 e 88% para as micotoxinas NIV, DON, ADONs, Toxina T-2, ZEA e OTA, respectivamente, com nível de contaminação de 100 µg/L para cada contaminante.

Segundo Seus-Arraché (2019) o método de QuEChERS apresentou recuperações eficientes para todas as micotoxinas (ZEA, OTA, NIV, DON, ADONs e Toxina T-2) estudadas no processo cervejeiro, com valores de recuperação entre 70 e 95%, com solvente de extração MeCN (5 mL) e a limpeza com MgSO₄ (0,9 g) e C18 (0,3 g).

Pascari et al. (2019) estudaram a transferência de micotoxinas de *Fusarium* do malte para o mosto fervido, utilizando o método de QuEChERS para a extração, tendo como solvente MeCN (10 mL). Na etapa de limpeza utilizaram MgSO₄ (1,2 g), PSA (0,4 g), C18 (0,4 g) e carvão ativado (0,4 g). Como resultado de estudo houve redução de DON (60%), ZEA (99%) e FM (90%) no mosto cervejeiro.

Neste estudo foi otimizado o método QuEChERS para determinação de DON e 15-ADON em mosto cervejeiro, utilizando o método de separação por LC-DAD. Recuperações aceitáveis pelo CEN (105 e 89%) foram obtidas sob as seguintes condições de extração: 1 mL de amostra e 2 mL de MeCN como solvente extrator, seguido de MgSO₄ (0,09 g), C18 (0,04 g) e alumina (0,04 g) como adsorventes na etapa de limpeza.

O desenvolvimento de um método analítico envolve muitas etapas, entre elas a etapa de validação que comprova a eficiência do procedimento (BRITO et al., 2003). A validação, através de estudos experimentais, garante a confiabilidade do método analítico atendendo às exigências das aplicações analíticas (BRASIL, 2017a). Os parâmetros de linearidade (faixas de calibração e coeficientes de correlação) obtidos para DON e 15-ADON por LC-DAD estão expressos na Tabela 5. Para o efeito dos interferentes presentes na matriz durante a quantificação foi empregada a curva na matriz.

Com os resultados obtidos em relação à construção das curvas analíticas em LC-DAD foi possível concluir que o modelo de regressão linear se mostrou adequado para as determinações em estudo. A equação da reta é considerada adequada quando o coeficiente de determinação (R^2) apresenta valor acima de 0,90 (INMETRO, 2016). Os coeficientes de correlação (R) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações do EURACHEM (2012).

Tabela 5- Parâmetros de validação do método analítico QuEChERS em mosto cervejeiro.

Parâmetros	DON	15-ADON
Faixa de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	0,14 – 1,25	0,042 - 2,5
Equação da curva no solvente	$y = 37524x - 874,9$	$y = 2424x - 354,5$
R	0,996	0,995
Equação da curva na matriz	$y = 34669x + 5456$	$y = 35087x + 2623$
R	0,997	0,991
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,075	0,075
LOD _(m) ($\mu\text{g/mL}$)	0,042	0,042
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,14	0,14

(Continuação)

LOQ _(m) (µg/mL)	0,075	0,075
EM(%)	-8	45

R: Coeficiente de correlação; LOD: Limite de detecção do método; LOQ: Limite de quantificação do método; LOD_m: Limite médio de detecção do método; LOQ_m: Limite médio de quantificação do método e EM(%): Efeito matriz (inclinação da curva preparada no extrato da matriz - inclinação da curva preparada no solvente/inclinação da curva preparada no solvente) x 100.

Quando os valores encontrados para o cálculo do efeito matriz estiverem entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e -20% ou entre 20 e 50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU, 2009).

O efeito matriz para 15-ADON (45%) foi mediano e mostrou enriquecimento do sinal, necessitando a curva na matriz para a quantificação do analito. Entretanto, DON apresentou efeito matriz de -8%, logo foi considerado baixo. O efeito matriz foi avaliado pela comparação da inclinação da curva analítica preparada no solvente e no extrato.

A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação e a precisão do método foi mensurada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Os valores de recuperação e erro relativo percentual (RSD%) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Recuperação (R%), precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária para DON e 15-ADON.

	Exatidão e repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	1,25 µg/mL	2,5 µg/mL	5,0 µg/mL	1,25 µg/mL	2,5 µg/mL	5,0 µg/mL
Micotoxina	R (RSD)	R (RSD)	R (RSD)	R (RSD)	R (RSD)	R (RSD)
DON	79,5 (1,19)	73,1 (6,05)	77,6 (3,61)	79,5 (5,5)	95,8 (12,8)	77,6 (5,1)
15-ADON	74,2 (1,09)	78,3 (4,37)	71,5 (0,40)	74,1 (3,3)	78,3 (7,6)	79,3 (0,5)

R%: coeficiente de correlação; RSD%: desvio padrão relativo percentual.

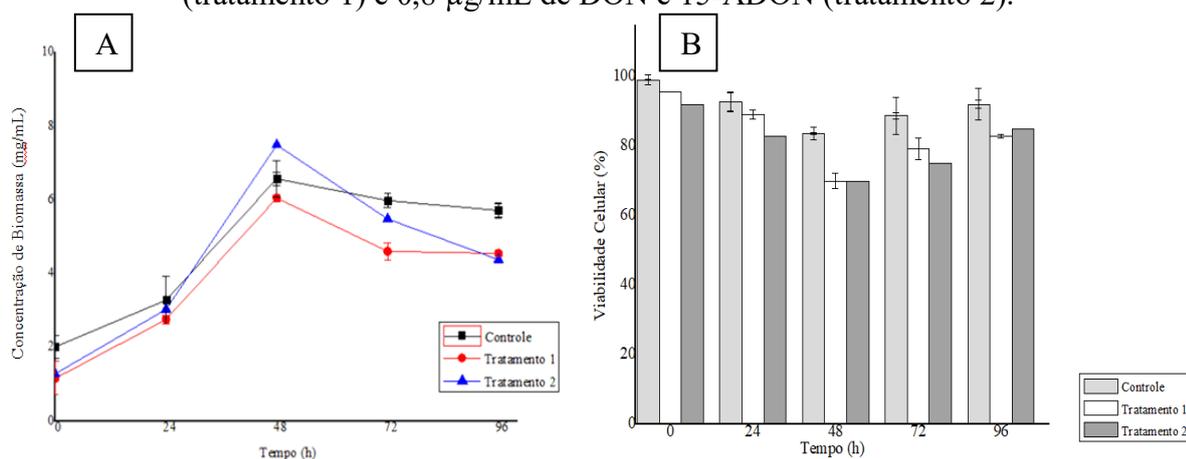
O método analítico QuEChERS, empregando a MeCN (2 mL) como solvente extrator e os sais MgSO₄ (0,09 g), C18 (0,04 g) e alumina (0,04 g) na etapa de limpeza do extrato, apresentou valores de recuperações entre 71,5 e 95,8% com RDS<13% (Tabela 6). Os resultados obtidos no estudo indicam que os dados são exatos e precisos estando de acordo com INMETRO (2016) e SANTE (2017) para análises de traços em amostras complexas como a cerveja.

5.3. EFEITOS DAS MICOTOXINAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

5.3.1. Caracterização bioquímica e cinética da fermentação alcoólica

A curva de crescimento de biomassa é fundamental para avaliação dos efeitos inibitórios das micotoxinas como resposta às células de leveduras (SUKROONGREUNG et al., 1984). Logo, informações sobre o crescimento de biomassa e a viabilidade celular são cruciais para avaliar a fermentação alcoólica empregando *S. cerevisiae*, verificando se há influência das micotoxinas sob o cultivo realizado comparativamente com grupo controle. A concentração de biomassa (Figura 4A) e a viabilidade celular (Figura 4B) foram avaliadas durante a fermentação alcoólica na ausência e na presença de DON e 15-ADON.

Figura 4 - Concentração de biomassa (A) e viabilidade celular (B) da *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica do mosto cervejeiro na ausência (controle) e na presença de 0,2 (tratamento 1) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ de DON e 15-ADON (tratamento 2).



Na Figura 4A, observa-se que em 48 h de fermentação alcoólica na presença de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ de DON e 15-ADON ocorreu o aumento de 15% de concentração de biomassa da levedura *S. cerevisiae*, quando comparado ao controle. Porém, no mesmo período para o tratamento com 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de DON e 15-ADON, observa-se a redução de 15% da concentração de biomassa, quando comparada ao controle. O aumento da concentração de biomassa em 48 h quando na presença da maior concentração de DON e 15-ADON pode ser explicado pelo uso destes contaminantes como fonte de substrato para as leveduras, e que por induzir o aumento de defesas ocasionou um aumento da concentração de biomassa como tentativa de redução a toxicidade do meio. Em contrapartida, ao final das 96 h de fermentação ocorreu a redução de 20 e 23% da concentração de biomassa, nos tratamentos com 0,2 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em relação ao controle, evidenciando que a concentração de

DON e 15-ADON podem interferir na fase de crescimento das leveduras ao final da fermentação.

Na Figura 4B, observa-se que em 48 h de fermentação alcoólica na presença de micotoxinas nas concentrações de 0,2 e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON, ocorreu a redução de 18% da viabilidade celular, quando comparado ao controle. No entanto, em 96 h de fermentação ocorreu a redução de aproximadamente 10% da viabilidade celular nos tratamentos usando 0,2 e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON, quando comparado ao controle.

A presença de micotoxinas como o DON durante a fermentação, provoca alteração no crescimento de biomassa e/ou na viabilidade celular das leveduras, pois estes contaminantes podem ocasionar a inibição da síntese proteica como resposta tóxica, possibilitando variações no metabolismo energético durante a ativação das rotas metabólicas e consequentemente, alterações na multiplicação celular (ABOLMAALI et al.; 2008; LUONGO et al., 2008). Portanto, a fim de manter a viabilidade da célula, a levedura aciona seu mecanismo de defesa visando a detoxificação das micotoxinas. Dentre esses mecanismos, destacam-se a atividade enzimática da PO e a produção de GSH, relacionadas com o processo redox, podendo reduzir a concentração de micotoxinas do meio (LASH, 2005).

A concentração de GSH e atividade da PO nas células das leveduras mensuradas a partir da relação entre si e destas com a concentração de micotoxinas no meio são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de GSH, atividade da PO, percentual e degradação específica redox na ausência (C) e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2).

Tra	Tempo	GSH	PO	DON	DER (%deg/ mg _{GSH} U _{PO} h) (DON)	15- DON (%)	DER (%deg/ mg _{GSH} U _{PO} h) (15-ADON)
t	(h)	(mg/L)	(U/mL)	(%)			
	0	14,93 ^c ±0,1	1,62 ^b ±0,10	100	-	100	-
	24	19,18 ^b ±0,4	1,70 ^b ±0,25	84	0,0027	97	0,619
T1	48	24,09 ^a ±0,3	2,55 ^a ±0,08	67	0,0006	44	0,075
	72	21,88 ^b ±0,2	1,40 ^c ±0,17	75	0,0008	51	0,115
	96	20,46 ^b ±0,2	1,49 ^c ±0,18	73	0,0006	47	0,081
	0	14,69 ^a ±0,1	1,61 ^b ±0,59	100	-	100	-
	24	11,98 ^b ±0,4	1,80 ^b ±0,15	81	0,0040	91	0,879
T2	48	11,66 ^b ±0,9	1,75 ^b ±0,09	76	0,0019	60	0,306
	72	15,45 ^a ±0,4	2,32 ^a ±0,16	75	0,0007	59	0,114

(Continuação)

	96	17,24 ^a ±0,3	2,31 ^a ±0,08	73	0,0005	65	0,085
	0	1,02 ^d ±0,2	1,68 ^b ±0,03	0	-	0	-
	24	3,88 ^a ±0,1	2,19 ^a ±0,02	0	-	0	-
C	48	2,30 ^c ±0,3	2,02 ^a ±0,02	0	-	0	-
	72	1,26 ^d ±0,4	1,78 ^b ±0,03	0	-	0	-
	96	4,87 ^a ±0,1	2,14 ^a ±0,01	0	-	0	-

Resultados apresentados como média±erro padrão; Deg: degradação; Trat: Tratamento; GSH: glutatona; PO: peroxidase; DER(%deg/mg_{GSH} U_{PO} h): percentual de degradação específica redox; C: fermentação alcoólica na ausência de DON e 15-ADON; T1: fermentação alcoólica na presença de 0,2 µg/mL de DON e 15-ADON e T2: fermentação alcoólica na presença de 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON. Letras minúsculas na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os tempos de fermentação alcoólica em cada tratamento (p<0,05).

O experimento controle em 24 h de fermentação apresentou a maior atividade de PO e em 96 h a maior concentração de GSH, mesmo não havendo contaminação do meio por DON e 15-ADON, ocorreu a produção destas moléculas, pois a levedura sintetiza estas moléculas como resultado de rotas metabólicas características da fermentação alcoólica. Entretanto, no tratamento com 0,2 µg/mL de DON e 15-ADON foi observado o aumento da atividade da PO e da produção de GSH, concomitante a maior degradação de DON e 15-ADON de 33 e 56%, respectivamente. Porém, no tratamento com 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON, estas relações foram observadas a partir de 72 h de fermentação, podendo ser resultado de um estresse gerado pela maior toxicidade do meio (Tabela 7).

Assim, a maior redução da concentração de DON e 15-ADON foi 27 e 41%, coincidindo com a elevação da atividade enzimática da PO e o aumento da produção de GSH. Contudo, a maior degradação específica redox foi observada em 24 h de fermentação alcoólica para DON e 15-ADON em ambos os tratamentos (0,2 e 0,8 µg/mL), confirmando que a oxirredução dos compostos pode estar relacionada com o potencial das células da levedura de produzirem moléculas específicas (GSH e PO) visando à manutenção da atividade metabólica da levedura (Tabela 7).

O aumento dessas moléculas (GSH e PO) pode provocar mudanças no metabolismo e a presença de micotoxinas pode gerar aumento no consumo de energia das leveduras (DONG et al., 2007). A presença das micotoxinas nas fermentações alcoólicas em até 48 h pode ativar as rotas metabólicas da levedura para reduzir a toxicidade no meio de cultura, preservando a célula durante o processo fermentativo (GARDA-BUFFON; BARAJ; BADIALE-FURLONG, 2010).

A redução também pode estar relacionada à capacidade adsortiva da levedura *S. cerevisiae*. A ativação das rotas redox reverte o estresse celular e provocam o aumento da viabilidade celular da levedura e conseqüentemente redução nas concentrações de DON e 15-ADON (MECA; BLAIOTTA; RITIENE, 2010).

Neste estudo, não foi observado um aumento da concentração de DON em função da hidrólise do 15-ADON. Este efeito está relacionado à especificidade de enzimas hidrolíticas, sendo observado neste estudo o aumento da ação de enzimas oxidativas.

Os efeitos tóxicos das micotoxinas durante a fermentação do mosto cervejeiro por *S. cerevisiae* também podem ser evidenciados através dos fatores de conversão avaliados entre os diferentes ensaios (controle, tratamento 1 e tratamento 2) realizados conforme dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Fatores de conversão obtidos durante a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* na ausência (C) e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2).

Trat	$Y_{GSH/S}$ (mg _{GSH} / mg _{AR})	$Y_{X/S}$ (mg _X / mg _{AR})	$Y_{GSH/X}$ (mg _{GSH} / mg _X)	$Y_{E/S}$ (mg _{Et} / mg _{AR})	$Y_{E/X}$ (mg _{Et} / mg _X)	$Y_{GSH/E}$ (mg _{GSH} / mg _{Et})	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)
C	0,0001	0,09	0,001	0,126	1,32	0,0008	0,029
T1	0,0002	0,10	0,002	0,122	1,18	0,0014	0,027
T2	0,0001	0,10	0,001	0,121	1,32	0,0006	0,027

Trat: tratamento; $Y_{GSH/S}$: rendimento de substrato em GSH; $Y_{X/S}$: rendimento de substrato em biomassa; $Y_{GSH/X}$: rendimento de biomassa em GSH; $Y_{E/S}$: rendimento de substrato em etanol; $Y_{E/X}$: rendimento de biomassa em etanol; $Y_{GSH/E}$: rendimento de GSH em etanol; $\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade específica máxima de crescimento; GSH: glutationa; Et: etanol; X: biomassa; AR: açúcar redutor; C: fermentação alcoólica na ausência de DON e 15-ADON; T1: fermentação alcoólica na presença de 0,2 µg/mL de DON e 15-ADON e T2: fermentação alcoólica na presença de 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON.

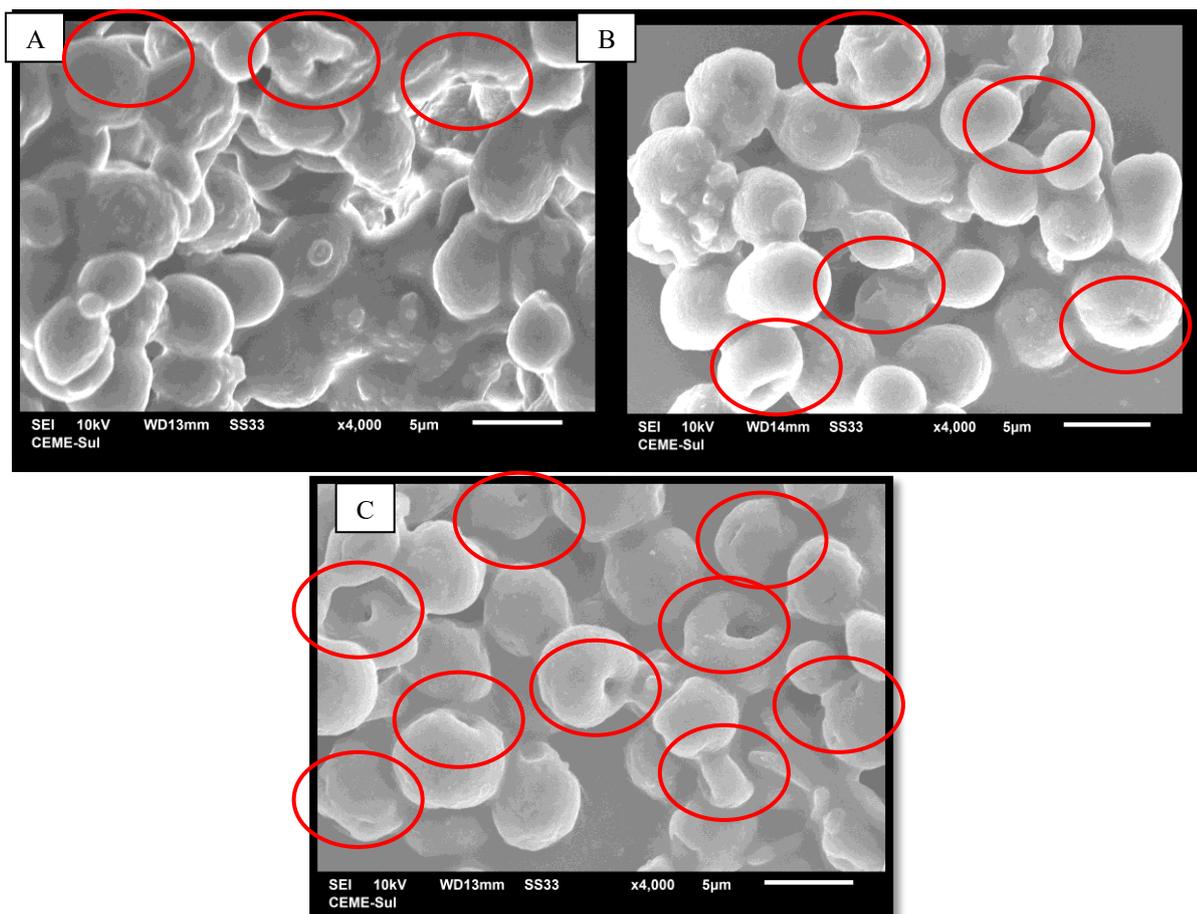
Na Tabela 8, os resultados obtidos para o fator de conversão de substrato, biomassa e etanol em GSH foram o dobro no tratamento com a menor concentração de micotoxina (0,2 µg/mL) quando comparado ao controle e ao tratamento com a maior concentração de micotoxina (0,8 µg/mL). A eficiência de substrato e biomassa em etanol na presença de micotoxinas (T1 e T2) foi aproximadamente 5% menor quando comparado ao controle, demonstrando que a presença de micotoxinas pode interferir no processo biológico da levedura de conversão de substrato, glicose, em produto, etanol, tendo em vista que a conversão de substrato em biomassa foi eficaz em todos os tratamentos. Logo, a $\mu_{m\acute{a}x}$ de crescimento apresentou um pequeno decréscimo quando sob tratamentos em ambas as concentrações (0,2 e 0,8 µg/mL) de micotoxinas (0,027) quando comparado ao controle

(0,029), reforçando que a presença de micotoxinas pode interferir no processo metabólico da levedura e no rendimento dos produtos.

Outro parâmetro importante é a morfologia das células da *S. cerevisiae* verificada em MEV (com aumento de 4000 vezes) em 96 h de fermentação alcoólica, tanto na ausência (Figura 5A) como na presença de 0,2 (Figura 5B) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5C) DON e 15-ADON.

A morfologia das células foi alterada de acordo com o tratamento a que foram submetidas. A contaminação do meio com DON e 15-ADON em ambos os tratamentos (0,2 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$) promoveram deformações morfológicas e rupturas na parede celular da levedura (Figura 5B e 5C), quando comparadas ao controle (Figura 5A), ou seja, nas Figuras 5, demonstrado por círculos em vermelho, observa-se que houve o aumento de lesões nas células da *S. cerevisiae* concomitante ao aumento da concentração de micotoxinas.

Figura 5 – Superfície celular da *S. cerevisiae* em 96 h de fermentação na ausência (A) e na presença de 0,2 (B) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (C) de DON e 15-ADON observada em MEV (4000 X).



A) C: fermentação alcoólica (96 h) na ausência de DON e 15-ADON; B) T1: fermentação alcoólica (96 h) na presença de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de DON e 15-ADON e C) T2: fermentação alcoólica (96 h) na presença de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ de DON e 15-ADON.

A variação na composição e a quantidade de polissacarídeos da parede celular durante a autólise em resposta ao estresse provocado pelas micotoxinas causam impactos significativos nas células da levedura (WANG et al., 2018). Logo, a ruptura pode estar relacionada com o aumento dos níveis de proteínas e com o substrato não consumido (TORRESI et al., 2011). Além disso, a redução do pH e o aumento da biomassa, podem estar relacionados a liberação de nutrientes no meio, a partir de células que estavam em processo de lise provocada pela toxicidade e estresse gerado pela presença das micotoxinas.

No entanto, faltam dados na literatura que visem explicar o mecanismo de alteração na parede celular da levedura frente às condições de estresse testadas no presente estudo. O estresse provocado por altas concentrações de micotoxinas demonstram causar efeito inibidor na concentração de biomassa e na viabilidade das leveduras ao final da fermentação alcoólica (PESTKA; BONDY, 1990; YANG et al., 2000).

5.3.2. Caracterização físico-química da fermentação alcoólica

A caracterização físico-química foi realizada para avaliar a relação entre a concentração de micotoxinas e as propriedades físico-químicas da amostra, verificando o perfil da fermentação alcoólica utilizando *S. cerevisiae* na presença de DON e 15-ADON (0,2 e 0,8 µg/mL). Para acompanhamento do meio, um ensaio sem a adição de levedura e da micotoxina foi realizado, porém não apresentou alterações em nenhum dos parâmetros ao longo do tempo. Os parâmetros concentração de proteínas solúveis e totais, de açúcar redutor, de etanol e acidez total e pH foram avaliados a cada 24 h durante 96 h de fermentação apresentados na Tabela 9.

Na Tabela 9, verifica-se que durante o processo fermentativo ocorreu o declínio de pH tanto no experimento controle quanto nos tratamentos usando 0,2 e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON. Este fato deve-se ao processo fermentativo alcoólico, uma vez que o pH ideal para o desenvolvimento das leveduras deve estar na faixa entre 4,5 e 5 (LIMA et al., 2001). No entanto, quando se compara o experimento na ausência com os ensaios com micotoxinas (DON e 15-ADON) observa-se que ocorreu a maior redução de pH em menor tempo de fermentação (Tabela 9), provavelmente devido ao estresse gerado pela presença dos tricotecenos no processo fermentativo, pois a presença da micotoxina pode gerar uma inibição da síntese proteica, podendo ocasionar alterações no metabolismo energético e consequentemente na multiplicação celular, pela inibição da manifestação do DNA. Isto tem como consequência, uma menor concentração celular e maior redução de pH decorrente da

maior concentração de ácido pirúvico e outros ácidos próprios da fermentação, o que resulta em menor concentração de substrato no final do processo (AKIN et al., 2008; BRETANHA, 2014).

Nos tratamentos na presença de 0,2 e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON foi verificada ao final da fermentação a maior acidez total (43,9 e 46,6 mEq/L, respectivamente), quando comparado ao controle na ausência de micotoxina (32,2 mEq/L). Estes dados reforçam o menor pH obtido para o tratamento com 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON. Estas alterações também foram observadas em relação à concentração de açúcares redutores. Em 48 h de fermentação, foi observado o consumo de 95% de açúcares redutores no processo fermentativo sem adição de micotoxinas. Entretanto, ambos os ensaios na presença de DON e 15-ADON, apresentaram redução de açúcar de aproximadamente 70%. Em 96 h de fermentação, no experimento controle ocorreu o consumo de 97% do substrato pela levedura, comprovando a eficiência da fermentação. Em contrapartida, o mesmo comportamento não foi verificado nos tratamentos na presença de DON e 15-ADON em ambas as concentrações, confirmado através da presença de açúcar residual no meio fermentado (consumo do substrato de 82 e 76% para ambas as concentrações de DON e 15-ADON) (Tabela 9).

Tabela 9 – Caracterização da fermentação alcoólica na ausência (C) e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2).

Parâmetros	Trat	Tempo de fermentação alcoólica (h)				
		0	24	48	72	96
Proteínas solúveis (mg/mL)	C	40,4 ^{bA} ±1,80	41,4 ^{bB} ±0,51	40,9 ^{bB} ±0,90	42,8 ^{aB} ±0,62	40,7 ^{bB} ±0,32
	T1	40,2 ^{cA} ±1,42	44,8 ^{bA} ±2,23	48,1 ^{aA} ±1,52	45,2 ^{bA} ±0,75	45,8 ^{bA} ±2,60
	T2	40,2 ^{cA} ±4,40	45,0 ^{bA} ±2,36	49,1 ^{aA} ±1,23	45,6 ^{bA} ±2,76	46,1 ^{bA} ±0,61
Proteínas totais (%)	C	0,73 ^{cA} ±0,02	0,82 ^{bA} ±0,02	0,88 ^{bA} ±0,01	0,93 ^{aA} ±0,03	0,97 ^{aA} ±0,03
	T1	0,72 ^{cA} ±0,01	0,77 ^{cAB} ±0,03	0,80 ^{bB} ±0,04	0,81 ^{bB} ±0,05	0,91 ^{aB} ±0,02
	T2	0,72 ^{bA} ±0,02	0,74 ^{bB} ±0,01	0,76 ^{bB} ±0,01	0,81 ^{aB} ±0,02	0,89 ^{aB} ±0,01
Açúcar redutor (mg/mL)	C	41,5 ^{aA} ±1,10	27,6 ^{bB} ±0,22	1,7 ^{cC} ±0,13	1,6 ^{cC} ±0,11	1,4 ^{cC} ±0,18
	T1	40,6 ^{aA} ±2,52	30,8 ^{bAB} ±0,90	12,5 ^{cB} ±0,44	8,5 ^{dB} ±0,82	7,2 ^{dB} ±0,65
	T2	42,9 ^{aA} ±1,35	34,6 ^{bA} ±1,46	21,1 ^{cA} ±0,16	14,1 ^{dA} ±1,47	10,5 ^{dA} ±1,00
Etanol (mg/mL)	C	0,14 ^{dA} ±0,03	0,40 ^{dB} ±0,02	2,86 ^{cB} ±0,90	4,58 ^{abA} ±0,33	5,00 ^{aA} ±0,12
	T1	0,17 ^{cA} ±0,02	0,93 ^{cA} ±0,20	3,17 ^{bA} ±0,11	3,30 ^{bB} ±0,02	4,61 ^{aAB} ±1,12
	T2	0,19 ^{cA} ±0,05	0,89 ^{cA} ±0,03	2,77 ^{bB} ±0,45	2,82 ^{bC} ±0,71	4,28 ^{aB} ±0,33

(Continuação)

Acidez total (mEq/L)	C	19,8 ^{bcA} ±0,02	20,5 ^{bb} ±0,93	20,8 ^{bb} ±0,08	30,2 ^{ab} ±0,03	32,2 ^{ab} ±0,04
	T1	20,8 ^{ca} ±0,91	24,1 ^{ca} ±0,12	27,5 ^{caB} ±0,13	37,1 ^{ba} ±0,42	43,9 ^{aa} ±0,50
	T2	21,4 ^{ca} ±0,01	24,8 ^{ca} ±0,06	32,2 ^{ba} ±0,08	37,5 ^{ba} ±0,05	46,6 ^{aa} ±0,51
Ph	C	5,45 ^{aa} ±0,01	4,88 ^{ba} ±0,01	4,66 ^{ba} ±0,02	4,32 ^{ba} ±0,10	4,21 ^{ba} ±0,02
	T1	5,22 ^{aa} ±0,10	4,42 ^{bb} ±0,12	4,14 ^{bb} ±0,01	4,06 ^{baB} ±0,03	4,01 ^{ba} ±0,05
	T2	5,15 ^{aa} ±0,02	4,48 ^{bb} ±0,03	4,11 ^{bb} ±0,06	3,79 ^{cb} ±0,15	3,72 ^{caB} ±0,17

Resultados apresentados como média ± erro padrão. Trat: Tratamento; C: fermentação alcoólica na ausência de DON e 15-ADON; T1: fermentação alcoólica na presença de 0,2 µg/mL de DON e 15-ADON e T2: fermentação alcoólica na presença de 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON. Letras minúsculas na mesma linha correspondem a diferenças significativas entre os tempos de fermentação alcoólica em cada tratamento ($p < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos ao longo da fermentação ($p < 0,05$).

Os açúcares residuais podem provocar a refermentação indesejável quando as leveduras encontram matéria nitrogenada, podendo ocasionar a variação das características organolépticas do produto final desejado. Além disso, no processo industrial quando a levedura encontra dificuldades para consumir o substrato, adicionam-se insumos (como nutrientes) aumentando os gastos produtivos (BORGES, 2008),

Estudos também demonstraram que a exaustão de glicose do meio pode acarretar a maior síntese de proteínas, visto que podem exercer função protetora contra o estresse oxidativo causado pelas micotoxinas (FRANCESCA et al., 2010). Diante do exposto, foi avaliada a concentração de proteínas solúveis e proteínas totais. Em 24 h de fermentação, foi observado o aumento na concentração de proteínas solúveis de 8% em ambos os tratamentos com micotoxinas, quando comparado ao experimento controle. A elevação da síntese proteica ao final das 96 h de fermentação ocorreu concomitante ao aumento da produção de GSH, apresentando aumento de 26 e 23 na presença de 0,2 e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON, respectivamente (Tabela 9).

A presença de micotoxinas também pode alterar a concentração de álcoois comprometendo a sua produção e consequentemente qualidade do produto final (KLOSOWSKI; MIKULSKI, 2010). Portanto, o perfil de álcoois (etanol, butanol, metanol, propanol, isobutanol e isopropanol) foi avaliado para verificar as possíveis alterações no metabolismo da levedura frente a contaminação com DON e 15-ADON. Na Tabela 9 observa-se que a relação entre a concentração de tricotecenos e a concentração de etanol foi inversamente proporcional, quanto maior a concentração de DON e 15-ADON menor foi a síntese de álcoois pelas leveduras. Assim, ao final da fermentação, o meio fermentado na

presença de 0,2 e 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON, apresentou teor de álcool 8 e 14% menor, respectivamente, quando comparado ao controle, comprovando que os níveis de DON e 15-ADON no mosto cervejeiro influenciaram a concentração de etanol no meio fermentado. Em contrapartida, os demais álcoois avaliados no estudado (butanol, metanol, propanol, isobutanol e isopropanol) não apresentaram alterações significativas ao longo da fermentação. Logo, ao final da fermentação também é possível observar que nas proteínas solúveis e totais e na acidez total os tratamentos na presença de micotoxina (0,2 e 0,8 µg/mL) apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle. Porém o mesmo não foi observado para os parâmetros açúcar redutor, concentração de etanol e pH (Tabela 9).

Segundo Klosowski e Mikulski (2010) os tricotecenos afetam o desempenho da fermentação inibindo a atividade da enzima desidrogenase durante a síntese de álcoois devido as interações entre o anel epóxido do tricoteceno e os grupos tiol da enzima amilase.

5.4. CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS FERMENTATIVOS E A CONTAMINAÇÃO POR DON E 15-ADON

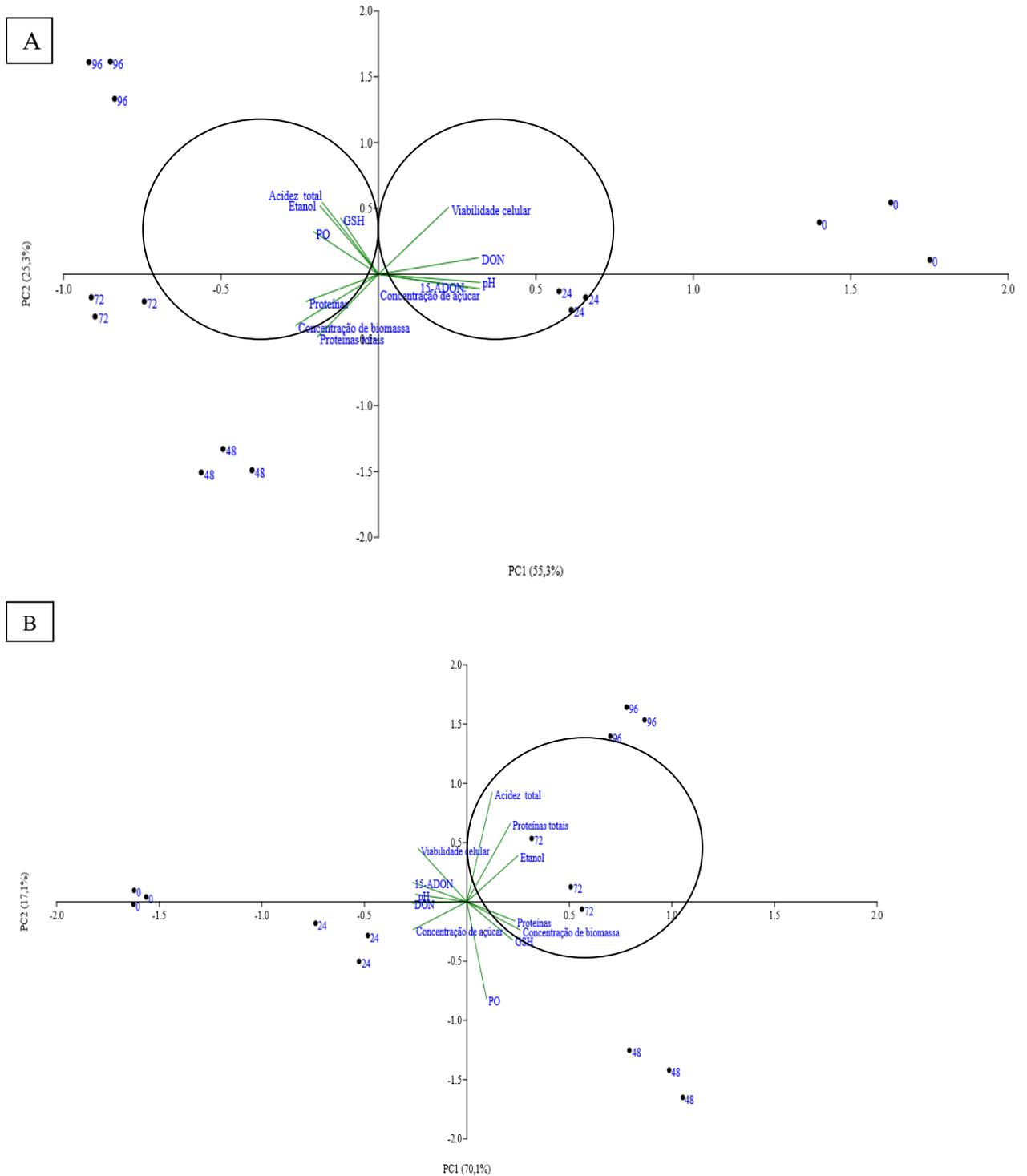
Após a normalização dos dados através da subtração da média de cada uma das dimensões que caracterizam o conjunto de dados, de modo a obter um novo conjunto (KHATTREE; NAIK, 2000), foi feita a avaliação da correlação de Pearson, apresentadas com $p < 0,05$ e PCA (gráfico dos *scores* e gráfico dos *loadings*). Desta forma, com o gráfico dos *loadings* é possível observar o comportamento das variáveis diante da presença das micotoxinas, as quais de acordo com o posicionamento no gráfico dos *scores* indicam os tempos de fermentação (0 a 96 h).

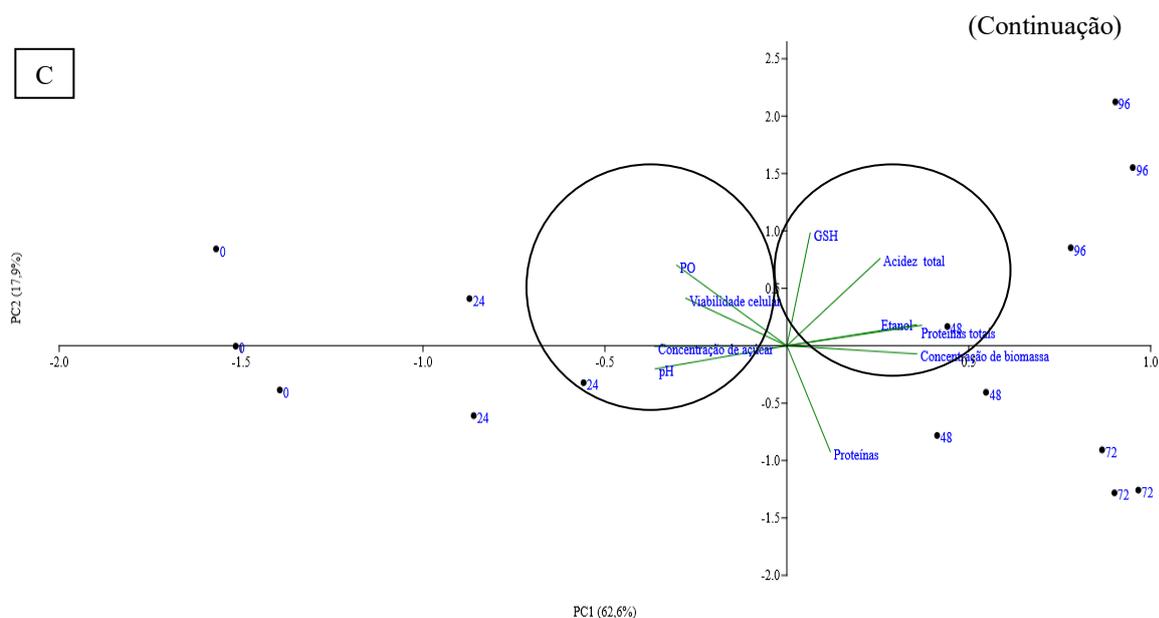
A Figura 6 apresenta os gráficos de PCA para o meio fermentado entre os tempos 0 e 96 h, na ausência e na presença de DON e 15-ADON (T1 e T2), respectivamente. Assim, é importante salientar que na análise do tratamento controle as variáveis DON e 15-ADON não foram representadas, visto que se neste tratamento não foram adicionadas micotoxinas.

O ensaio controle em 24 h de fermentação alcoólica apresentou correlação positiva entre o pH e o açúcar redutor total (0,8453) e correlação negativa do pH com a acidez total (-0,7534), o etanol (-0,9001) e as proteínas totais (-0,9871). Neste período, também foi observada a correlação positiva da PO com a concentração de açúcar redutor (0,7401) e a viabilidade celular (0,7269), e correlação negativa entre a PO, as proteínas solúveis (-0,6965) e a concentração de etanol (-0,6820) possivelmente relacionado ao estresse gerado pela alta concentração deste ao final da fermentação. No entanto, em 48 h de fermentação observou-se

a correlação positiva entre a concentração de biomassa, o etanol (0,8046) e a produção de proteínas totais (0,8694). Em contrapartida, nenhuma correlação foi observada em relação a GSH (Figura 6A).

Figura 6 - Gráfico da PCA na ausência (A) e na presença de 0,2 (B) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (C) de DON e 15-ADON ao longo da fermentação alcoólica (entre 0 e 96 h).





A) C: fermentação alcoólica (entre 0 e 96 h) na ausência de DON e 15-ADON; B) T1: fermentação alcoólica (entre 0 e 96 h) na presença de 0,2 µg/mL de DON e 15-ADON e C) T2: fermentação alcoólica (entre 0 e 96 h) na presença de 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON.

Durante a fermentação alcoólica as leveduras consomem os açúcares presentes no meio e através das rotas metabólicas sintetizam proteínas, enzimas como a PO, etanol e alguns ácidos, tais como acético, láctico, pirúvico e succínico, reduzindo o pH e a viabilidade celular e elevando a acidez total do meio (RIBEIRO et al., 2018), explicando os resultados encontrados no estudo.

No tratamento com 0,2 µg/mL de DON e 15-ADON, observou-se que em 24 h a micotoxina DON está correlacionada positivamente com a viabilidade celular (0,8604), o pH (0,8343), o açúcar redutor total (0,9566) e a presença de 15-ADON (0,9162). A correlação negativa com DON foi observada quanto a concentração de biomassa (-0,9468) e de GSH (-0,7504) em 48 h, e etanol (-0,9092), proteínas solúveis (-0,7697) e totais (-0,7411) em 72 h. No entanto, correlações positivas e negativas semelhantes foram encontradas para 15-ADON (Figura 6B), visto que este é precursor da micotoxina DON (BENSASSI et al., 2009).

Os tricotecenos, mesmo em baixa concentração, podem inibir a síntese de proteínas, de DNA e RNA das leveduras podendo provocar a morte celular. A peroxidação lipídica causada pelos tricotecenos é acompanhada de redução da concentração de GSH e da atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e glutatona redutase (SURAI; DVORSKA, 2005), explicando os dados obtidos no estudo. Outras correlações também foram observadas como a

concentração de biomassa com a GSH (0,8185), a proteína total com a acidez total (0,8888), o etanol (0,8935) e a concentração de açúcar redutor com o pH (0,8836) (Figura 6B).

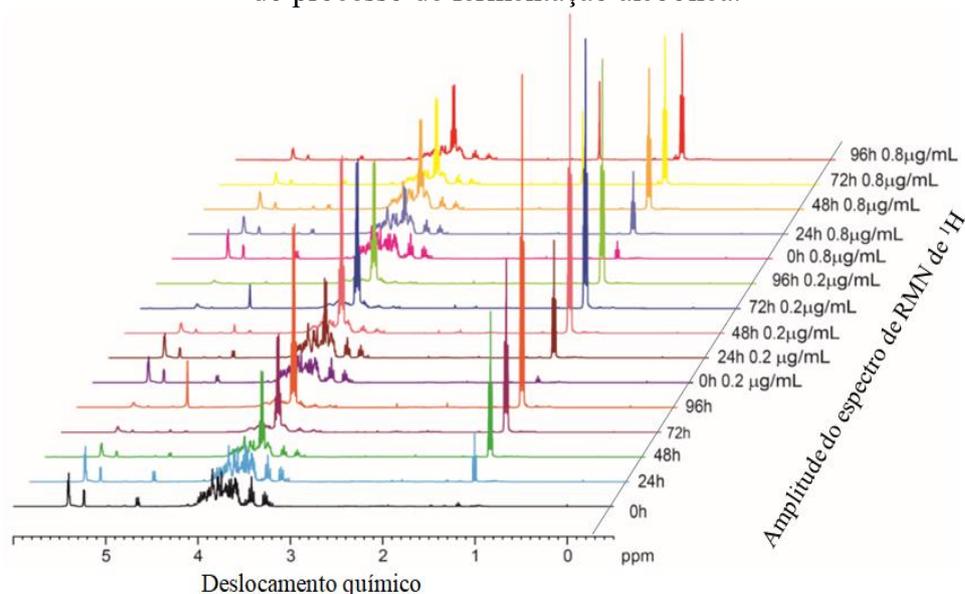
No tratamento com a maior concentração de micotoxina, 0,8 µg/mL de DON e 15-ADON, observa-se que os resultados obtidos foram semelhantes ao tratamento com menor concentração de micotoxina (0,2 µg/mL). Assim, em 24 h de fermentação alcoólica, DON está correlacionado positivamente com a viabilidade (0,7785), o pH (0,9218), os açúcares redutores totais (0,9367) e 15-ADON (0,7446). Portanto, em 48 h a correlação negativa com DON foi observada quanto a concentração de biomassa (-0,8883) e as proteínas totais (-0,7221). Entretanto, 15-ADON estava correlacionado positivamente com o pH (0,9174) e os açúcares redutores totais (0,8270). Assim, a correlação negativa (<0,70) não foi observada para este tratamento em relação a 15-ADON. No entanto, outras correlações como concentração de biomassa com viabilidade celular (-0,9361), acidez com etanol em 96 h (0,9815), concentração de biomassa com proteínas totais (0,8077) e concentração de açúcar redutor com pH em 24 h de fermentação alcoólica (0,9672) também foi observado (Figura 6C).

A partir da análise dos dados pode-se inferir que nos tratamentos, a viabilidade celular, o pH e o açúcar redutor total apresentaram correlações positivas significativas correlacionados com as micotoxinas. Em contrapartida, a concentração de biomassa e o conteúdo de proteína total estão correlacionados negativamente, outros metabólitos como a GSH e o etanol. Estes dados reforçam os descritos na caracterização química, pois quanto maior a concentração de DON e 15-ADON detectados menor foi a concentração de biomassa da levedura possivelmente devido ao seu efeito tóxico. Em contrapartida, a maior viabilidade foi observada concomitante a maior concentração de DON e 15-ADON, este fato pode ser explicado pelo efeito tóxico dessas toxinas não provocarem a morte celular. Dentre os parâmetros avaliados destaca-se a correlação negativa da concentração de GSH e de DON em 48 h, comprovando seu efeito no mecanismo de detoxificação desta micotoxina conforme discutido anteriormente. A relação positiva entre as duas micotoxinas também deve ser destacada, na concentração de 0,2 µg/mL para cada micotoxina, a correlação encontrada foi 0,9162, enquanto para a concentração de 0,8 µg/mL, a correlação observada foi menor (0,7446). Este dado indica que em baixas concentrações, a degradação das duas micotoxinas ocorre paralelamente. No entanto, com o aumento da concentração de biomassa, esta relação diminui, sendo observada a maior degradação de DON.

5.5. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS POR RMN de ^1H

A espectroscopia de RMN de ^1H permitiu acompanhar a variação dos constituintes químicos presentes nas amostras submetidas ao processo de fermentação na ausência e na presença de DON e 15-ADON. Nesse estudo, 45 experimentos foram feitos e a comparação representativa do conjunto de espectros é mostrada na Figura 7. Os espectros destes compostos foram analisados individualmente através da biblioteca de espectros do Banco de Dados Espectral para Compostos Orgânicos. Após a obtenção dos espectros, foi feito o tratamento quimiométrico dos dados, a partir da PCA para estimar a diferenciação entre os espectros obtidos. Posteriormente, também foram analisados os gráficos de *loadings* de PCA, que identifica quais deslocamentos químicos (e, conseqüentemente, quais compostos) foram mais influentes para determinadas distinções. Logo, a partir dos resultados obtidos nos espectros de RMN de ^1H , a PCA foi aplicada sobre o conjunto de dados a fim de discriminar estatisticamente os dados. Os 45 espectros resultaram em um conjunto de 213 pontos, subdivididos em 4 componentes principais, com variância de 98,3% em um intervalo de confiança de 90%. A partir dos espectros de RMN de ^1H , adquiridos para as amostras na ausência e na presença de DON e 15-ADON, explorados por PCA, foi possível observar diferenças significativas com relação aos compostos químicos presentes.

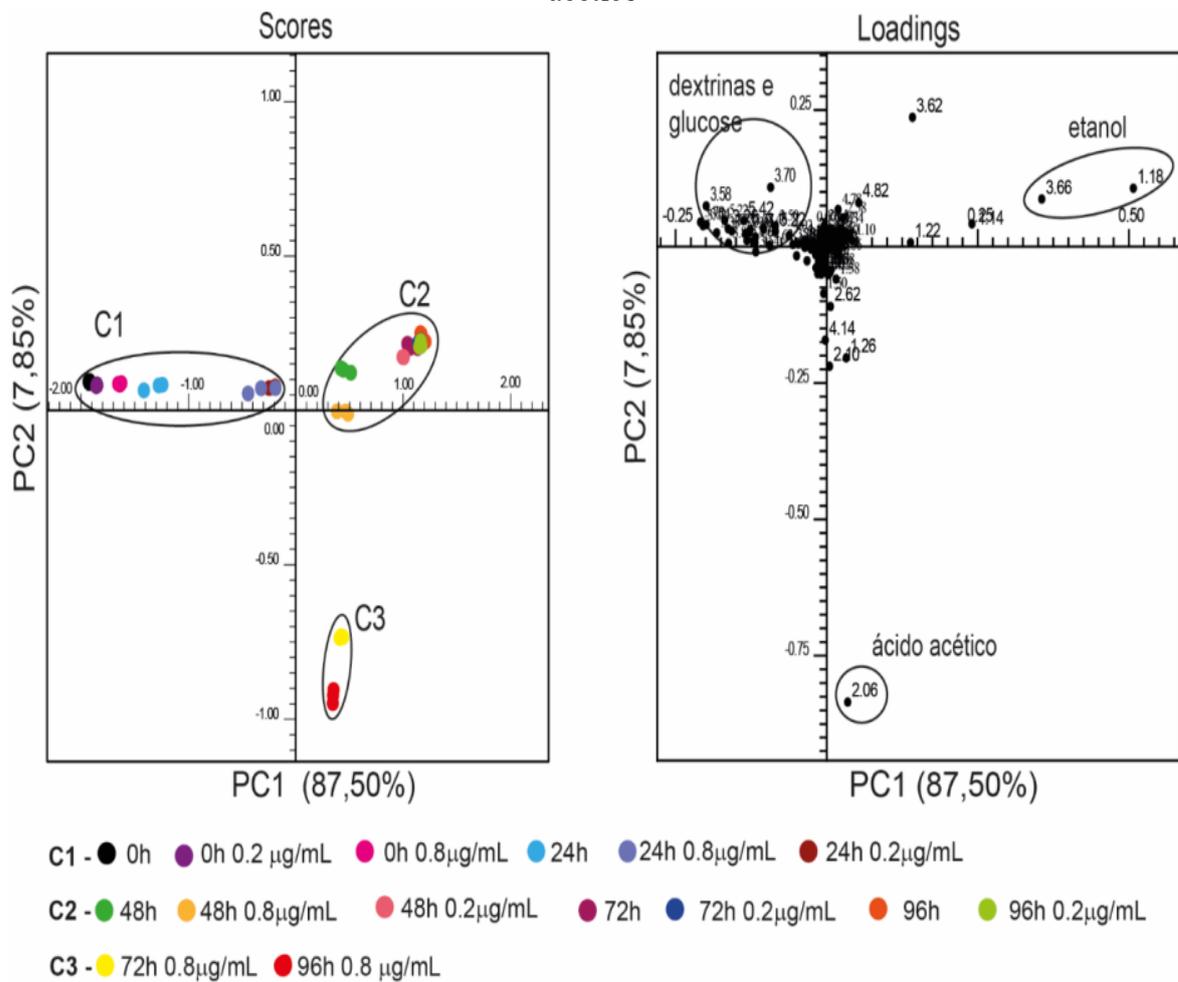
Figura 7 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) obtidos ao longo do processo de fermentação alcoólica.



Cores diferentes representam diferentes experimentos.

A análise por PCA permitiu agrupar o conjunto de dados em 3 grupamentos distintos representados pela presença de açúcares (C1), de etanol (C2) e de ácido acético (C3), conforme a Figura 8.

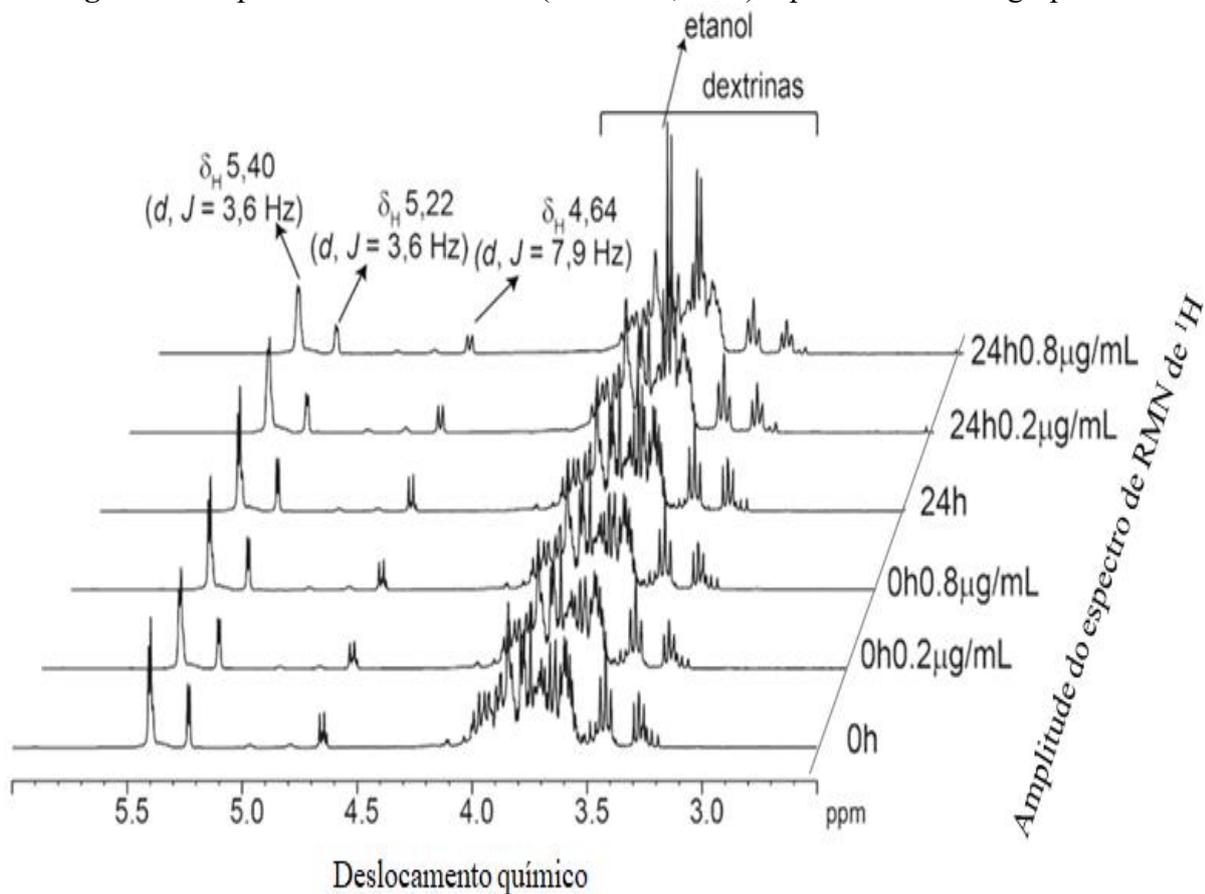
Figura 8 – PCA dos perfis espectrais das amostras: C1: açúcares, C2: etanol e C3: ácido acético



O grupo C1 é caracterizado pela presença majoritária de açúcares, identificados pela presença dos sinais observados em 5,22, 5,42 e 4,66 ppm e 5,42 ppm, característicos da dextrina e glicose, respectivamente (Figura 8). Portanto, fazem parte deste grupo (t=0 h) as amostras na ausência e na presença de DON e 15-ADON em ambos os tratamentos. Estas amostras não apresentaram diferenças significativas de composição após 24 h de fermentação, permanecendo no mesmo conjunto C1 (Figura 9). Estes resultados sugerem que a presença das micotoxinas não afetou significativamente a composição química dos substratos após 24 h de fermentação, permanecendo a constituição majoritária de açúcares no meio.

O espectro de NMR de ^1H do meio fermentado mostra a predominância de picos fortemente sobrepostos decorrentes de vários carboidratos. Os componentes menores são claramente observados nas regiões alifáticas e aromáticas do espectro (Figura 9).

Figura 9 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) representativos do grupo C1.

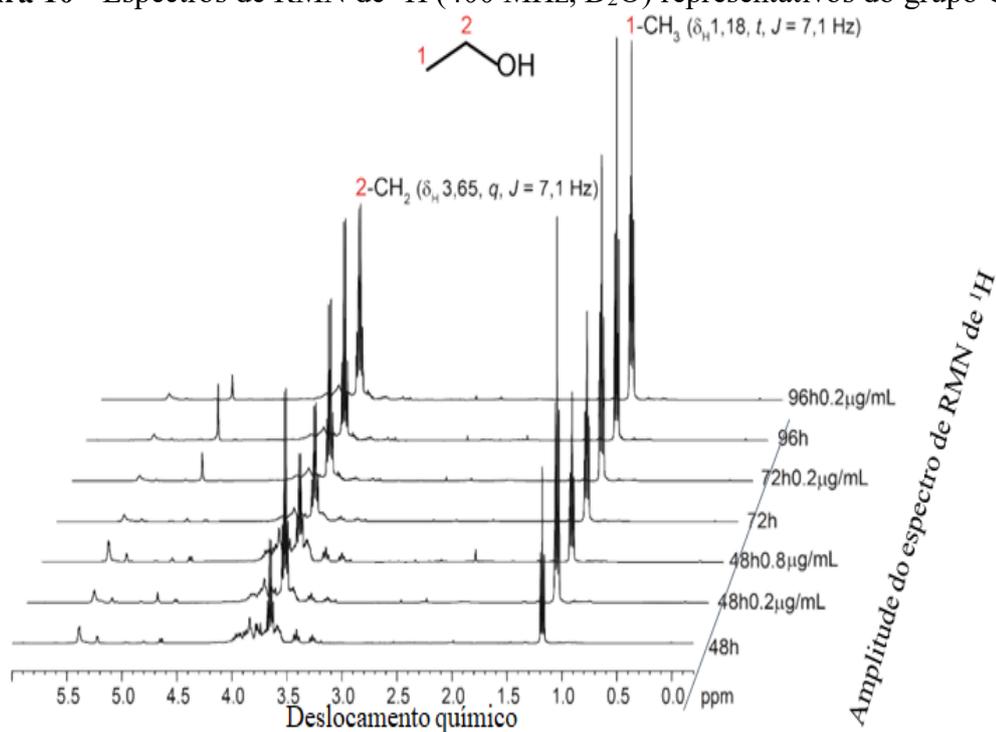


Um segundo conjunto de dados foi agrupado em C2, cujo componente majoritário é o etanol. Os sinais característicos do composto são observados na forma de um triplete em 1,18 ppm e um quarteto em 3,66 ppm (Figura 8).

Na Figura 10 apresenta o agrupamento das amostras relacionadas ao aumento da intensidade dos sinais relativos ao etanol.

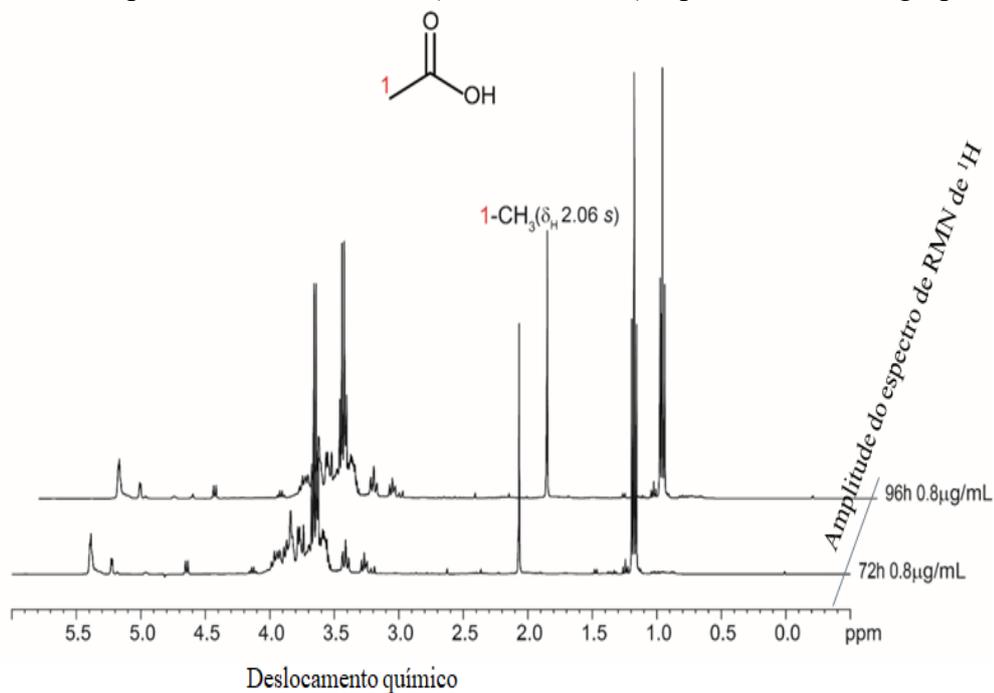
Fazem parte deste grupo as amostras controle, após 48, 72 e 96 h de fermentação alcoólica, e as amostras contaminadas com DON e 15-ADON nas concentrações de 0,2 (48, 72 e 96 h) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (48 h). Estes resultados permitem inferir que a presença das micotoxinas na concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ não promoveu diferenças significativas com relação ao grupo controle. Entretanto, para a amostra contendo 0,8 $\mu\text{g/mL}$ de micotoxina, o comportamento permaneceu semelhante apenas até 48 h de fermentação (Figura 10).

Figura 10 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) representativos do grupo C2.



Na Figura 11, são apresentados os espectros característicos do grupo C3.

Figura 11- Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) representativos do grupo C3.



Estas amostras se diferenciaram das demais pelo aumento na intensidade do sinal em 2,06 ppm, atribuído à presença de ácido acético no meio. Fazem parte deste grupo as amostras contaminadas com DON e 15-ADON na concentração de 0,8 µg/mL, nos tempos de

72 e 96 h. Este fato sugere que na maior concentração (0,8 µg/mL) ocorreu aumento do estresse da levedura provocado pela presença da micotoxina sinalizado pela produção de ácido acético. Também podem ser observados sinais na região dos açúcares, indicando um processo de fermentação incompleto (Figura 11).

Desta forma, o acompanhamento do processo por RMN permitiu relacionar a presença dos sinais majoritários na amostra, classificando grupos significativamente diferentes através da análise por PCA. Cabe salientar que os experimentos envolveram preparo mínimo de amostra, permitindo avaliar os componentes presentes de forma não direcionada. Em suma, este estudo demonstrou que a RMN pode ser utilizada para caracterizar a complexa composição química da cerveja durante a fermentação alcoólica na ausência e na presença de DON e 15-ADON, permitindo a rápida identificação dos compostos, presentes em diferentes concentrações. A exploração dos dados obtidos em espectros bidimensionais para identificação de mais compostos presentes encontra-se em andamento.

6. CONCLUSÃO

O método QuEChERS apresentou eficiência na extração de DON e 15-ADON, com recuperações de 105 e 89%, respectivamente, estando de acordo com as figuras de mérito, apresentando boa linearidade, recuperação e exatidão. Desta forma, a fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* pode ser considerada uma alternativa promissora como método de detoxicação para DON e 15-ADON. O processo de fermentação alcoólica na menor concentração de micotoxina (0,2 µg/mL) causou a redução de 33% de DON e 56% de 15-ADON. No entanto, na concentração de 0,8 µg/mL a redução foi 27 e 41% de DON e 15-ADON, respectivamente. A redução da concentração de DON e 15-ADON pela ação das leveduras esta relacionada à elevada atividade da PO e da GSH, concomitante a elevação da síntese proteica. A PCA e o RMN confirmaram a correlação entre os parâmetros fermentativos estudados e a contaminação por DON e 15-ADON durante o processo fermentativo alcoólico. Além disso, alterações morfológicas e redução no crescimento da levedura evidenciaram a sensibilidade da levedura *S. cerevisiae* quanto à toxicidade, sendo este um micro-organismo mitigador dessas toxinas envolvendo o complexo PO e GSH.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Este estudo abre caminho para o desenvolvimento de outras investigações sobre o assunto, considerando que o processo de degradação desenvolvido é um potencial candidato na aplicação da remoção de tricotecenos da cerveja com aplicação no processo industrial cervejeiro. Para dar continuidade a esse trabalho, propõe-se:

- a) Realizar a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* utilizando diferentes estilos de mostos cervejeiros;
- b) Avaliar as moléculas bioquímicas (PO e GSH) assim como os compostos fenólicos a fim de verificar se outras micotoxinas (e quais micotoxinas) alteram a produção dessas moléculas ao longo do processo cervejeiro empregando mosto cervejeiro;
- c) Estudar a fermentação alcoólica em diferentes concentrações de DON e 15-ADON;
- d) Estudar o efeito de diferentes meios extratores no método de QuEChERS na fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* utilizando;
- e) Acompanhar a concentração de micotoxinas durante as etapas de filtração e fervura do mosto cervejeiro;
- f) Avaliar o dano celular acompanhado pela quantificação de componentes da membrana celular e a presença da micotoxina no meio;
- g) Correlacionar em amostras comerciais o teor de GSH associado à contaminação micotoxicológica;
- h) Avaliar biomarcadores em fermentação alcoólica a partir de açúcares fermentáveis oriundos do malte, para detecção da contaminação na matéria prima;
- i) Desenvolver metodologia para detoxificação micotoxicológica baseada em mosto cervejeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLMAALI, S.; MITTERBAUER, R.; SPADIUT, O.; PERUCI, M.; WEINDORFER, H.; LUCYSHYN, D.; ELLERSDORFER, G.; LEMMENS, M.; MOLL, W. D.; ADAM, G. Engineered bakers yeast as a sensitive bioassay indicator organism for the trichothecene toxin deoxynivalenol. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 3, p. 306–312, 2008.

AKAN, A. P.; TEMUGE, I. D.; OZDIL, A. M. A.; UGURLU, A. **The environmental chemistry laboratory manual**. Environmental engineering department Chemistry (CEV207), 2016.

AKIN, H.; BRANDAM, C.; MEYER, X. M.; STREHAIANO, P. A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical engineering and Processing**, v. 47, p. 1986-1993, 2008.

ALEXANDER, N. J.; McCORMICK, S. P.; WAALWIJK, C.; LEE, T. V. D.; PROCTOR, R. H. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 5, p. 485-495, 2011.

ALEXANDER, N. J., PROCTOR, R. H., McCORMICK, S. P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 198-215, 2009.

ALMEIDA, C.; DUARTE, I. F.; BARROS, A.; RODRIGUES, J.; SPRAUL, M.; GIL, A. M. Composition of beer by ¹H NMR spectroscopy: effects of brewing site and date of production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 700, 2006.

ALMEIDA, F. S.; SILVA, C. A. A.; LIMA, S. M. L.; SUAREZA, Y. R.; ANDRADE, L. H. C. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. **Food Chemistry**, n. 263, p. 112–118, 2018.

AMARAL, K. A. S.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. **Revista analítica**, São Paulo, v. 5, n. 24, p. 56-58, 2006.

AMORIM, H. V. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*. Piracicaba. São Paulo. **Fermentec**, p. 448, 2005.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of Association Official Analytical Chemistry International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDRÉS-IGLESIAS, C.; BLANCO, C. A.; BLANCO, J.; MONTERO, O. Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers. **Food Chemistry**, v. 157, n. 205, 2014.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.

ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of International**. Gaithersburg, 17 ed., v. 2, 2000.

ARAÚJO, A. G. S.; SANTOS, T. M. C.; ESPÍNDOLA FILHO, A. M.; CALHEIROS, A. K. A.; MONTALDO, Y. C. **Ocorrência de fungos de campo e de armazenamento em ingredientes e ração para Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Zootecnia) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2010.

ARGENTINA, LUIS; MARIATA, AUGUSTO; FLUMIGNAN, DANILO; TININIS, ARISTEU; PEZZA, HELENA; PEZZA, LEONARDO. Discrimination of Brazilian lager beer by ¹H NMR spectroscopy combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 272, p. 488-493, 2019.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Physical Chemistry**. 8th ed. W.H. Freeman, 2006.

BARAJ, E. **Interferência dos tricotecenos no processo fermentativo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2000.

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

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

BELAKOVA, S.; BENESOVA, K.; MIKULIKOVA, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, p. 321-325, 2011.

BEMVENUTI, R. H.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, n.º6, p. 1-6, 2012.

BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 73, p. 270-275, 1990.

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

BENESOVÁ, K.; BELÁKOVÁ, S.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, v. 25, p. 626-630, 2012.

BENSASSI, F.; GOLLI-BENNOUR, E.; ABID-ESSEFI, S.; BOUAZIZ, C.; HAJLAOUI, M. R.; BACHA, H. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. **Toxicology**, v. 264, p. 104-109, 2009.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L., CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. J. Occurrence of fungi and aflatoxins in maize kernels. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 41-49, 2012.

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

BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. L.; MAGRÌ, A. D.; MARINI, F. Data-fusion for multiplatform characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication. **Analytica Chimica Acta**, v. 820, n. 23, 2014.

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, 2015.

BOEIRA, L. S.; BRYCE, J. H.; STEWART, G. G.; FLANNINGAN, B. Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeasts. 2. deoxynivalenol and nivalenol. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 105, n. 6, 1999.

BOGACKA, E. K.; BOGDAN, P.; PRZYBYLSKA, K. P.; MICHALOWSKA, D. Suitability of unmalted quinoa for beer production. **Journal Science Food Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 5027-5036, 2018.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. Microbiology and molecular biology reviews. **American society for microbiology**, v. 77, p. 157-172, 2013.

BORDIGA, M. **Post-Fermentation and - Distillation Technology: Stabilization, Aging, and Spoilage**. CRC Press, 2017.

BORGES, E. P. **ABC ilustrado da vinha e do vinho**. Rio de Janeiro: Mauad Editora Ltda, 2ªed., 2008.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; TER SCHURE, E.; VAN BOVEN, A.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **The International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 87–97, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 04 de Julho de 2009. Regulamentação Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2017a.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 138, de 8 de Fev. de 2017, ANEXO IV - Aplicação em 01º de Jan. de 2019. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, 2017b.

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

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing science and practice. **Woodhead Publishing Limited**, 2004.

BRITO, N. M.; AMARENTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003

BRUNELLI, L. T.; VENTURINI-FILHO, W. G. Análise energética de cerveja elaborada com mel. **Energia na Agricultura**, v. 28, n. 2, p. 122-128, 2013.

BRYLA, M.; KSIENIEWICZ-WOŹNIAK, E.; WAŚKIEWICZ, A.; ZYMCZYK, K.; JEDRZEJCZAK, R. Natural occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and deoxynivalenol-3-glucoside in Polish winter wheat. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 81, 2018.

BUENO, A. W.; DEGREVE, L. Manual de laboratório de físico-química. **Mcgraw-Hill**, São Paulo, 1980.

CAMPAGNOLLO, F. B.; FRANCO, L. T.; ROTTINGHAUS, G. E.; KOBASHIGAWA, E.; LEDOU, D. R.; DAKO, IĆ, A.; OLIVEIRA, C. A. F. *In vitro* evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. **Food Research International**, v. 77, p. 643–648, 2015.

CARVALHO, F. A. C. **O livro negro do açúcar: Algumas verdades sobre a indústria da doença**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://portal.unisepe.com.br/saolourenco/wp-content/uploads/sites/10005/2018/09/Fernando-Carvalho-O-livro-negro-do-acucar.pdf>. Acesso: em 10 de Nov. de 2019.

CERVIERI-JÚNIOR, O.; TEIXEIRA JUNIOR, J. R.; GALINARI, R.; RAWET, E. L.; SILVEIRA, C. T. J. O setor de bebidas no Brasil. Departamento de bens de consumo, comércio e serviços da área industrial do BNDES. **BNDES Setorial**, v. 40, p. 93-130, 2014.

CHANG, Y. H.; CHANG, K. S.; CHEN, C. Y.; HSU, C. L.; CHANG, T. C.; JANG, H. D. Enhancement of the efficiency of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* via

gradually batch-wise and fed-batch increasing the glucose concentration. **Fermentation**, v. 4, p. 45, 2018.

CHILAKA, C. A., DE BOEVRE, M., ATANDA, O. O., DE SAEGER, S. Quantification of *Fusarium* mycotoxins in Nigerian traditional beers and spices using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **Food Control**, v. 87, p. 203-210, 2018.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia manuseio. 2º ed. Lavras: **ESALQ/FAEPE**, 2005.

COLE, R. J., COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press, p. 987, 1981.

COLLINSON, E. J.; GRANT, C. M. Role of yeast glutaredoxins as glutathione *S*-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22492–22497, 2003.

COUGO, C.; FONTES, M., DUARTE, V. **Identificação de biomarcadores de exposição para nivalenol durante fermentação alcoólica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

DANTAS, V. N. **A trajetória da cultura cervejeira e sua introdução no Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado Interdisciplinar em Ciências Humanas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

DINSLAKEN, D. **Açúcar na produção de cerveja**. Blog Concerveja, 2014. Disponível em: <https://concerveja.com.br/acucar/>. Acesso em: 15 Nov. de 2019.

DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 226-230, 2007.

DONG, W.; PESTKA, J. J. Persistent dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse following with drawal of dietary vomitoxin (deoxynivalenol). **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 20, p. 38-47, 1993.

DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P. S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GIL, A. M. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2475-2481, 2002.

DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; SPRAUL, M.; GIL, A. M. Application of NMR spectroscopy and LC-NMR/MS to the identification of carbohydrates in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4847, 2003.

EBLINGER, H.; NARZIB, L. Beer. In: **Encyclopedia of Industry Chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012.

EC. European Commission. Commission Regulation N° 1881/2006 of 19 December, 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. **Official Journal of the European Union**, v. 364, n. 99, p. 5–24, 2006.

EC. European Commission. Commission Regulation N° 657/2002, 12 August, 2002. Commission Decision Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European**, 2002.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multiclass pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

EIZAGUIRRE, J. I.; PERIS, D.; RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; RÍOS, P. L.; HITTINGER C. T., LIBKIND, D. Phylogeography of the wild lager- brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagônia. **Environmental Microbiology**, v. 20, 10th ed., 2018.

ESTEVES, E. Guia dos trabalhos práticos de análise sensorial. **Área Departamental de Engenharia Alimentar**, Universidade do Algarve, Faro, 2008.

EURACHEM. Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry. CITAC GUIDE CG 4. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 3 ed., 2012.

EYNI-NARGESEH, H.; DEIHIMFARD, R.; SOUFIZADEH, S.; HAGHIGHAT, M.; NOURI, O. Predicting the impacts of climate change on irrigated wheat yield in fars province using APSIM model. **Electronic Journal of Crop Production**, v. 8, p. 203-224. 2016.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 296, 1972.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Mycotoxins in grains**, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/wairdocs/x5012o/x5012o01.htm>. Acesso em: 20 de Dez. de 2019.

FAZELI, M. R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M. R.; VAGHARI, E.; POURAGAH, S. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.

FELTRIN, A. C. P.; GARCIA, S. D. O.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Characterization and application of the enzyme peroxidase to the degradation of the mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 10, p. 777-783, 2017.

FERNANDES, P. J.; BARROS, N.; SANTO, J. L.; CÂMARA, J. S. High-throughput analytical strategy based on modified QuEChERS extraction and dispersive solid-phase extraction clean-up followed by liquid chromatography-triple- quadrupole tandem mass spectrometry for quantification of multiclass mycotoxins in cereals. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 841-856, 2015.

FERREIRA, I.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography e mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control**, v. 27 p. 188-193, 2012.

FIGUEIRÊDO, A. F. R. **Seleção de leveduras e produção de cerveja artesanal suplementada com selênio.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2017.

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

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOROUD, N. A.; EUDES, F. Trichothecenes in cereal grains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 147-173, 2009.

FOSZCZYNSKA, B.; DZIUBA, E.; CHMIELEWSKA, J.; KAWA-RYGIELSKA, J. Effect of DAS, ZEA and OTA mycotoxins on the fermentation activity of brewing yeast. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 11, n. 1, 2008.

FRANCESCA, G. T.; BORRO, M. SIMMACO, M.; MODESTI, A. Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1516-1525, 2010.

FRANCESCO, G.; TURCHETTI, B.; SILEONI, V.; MARCONI, O.; PERRETTI, G. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxiito* produce low-alcohol beer. **The Institute of Brewing and Distilling**, v. 121, p. 113-121, 2015.

FRANCESCO, G.; SANNINO, C.; SILEONIA, V.; MARCONIA, O.; FILIPPUCCI, S.; TASSELLI, G.; TURCHETTI, B. *Mrakiagelida* in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. **Food Microbiology**, v. 76, 2018.

FREITAS, J. C. C.; BONAGAMBA, T. J. **Fundamentos e aplicações de ressonância magnética nuclear. Os núcleos atômicos e a RMN.** In: J. D. Figueroa Villar (editor), nº1, Rio de Janeiro, AUREMN, 1999.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** New York: Wiley-liss, 1987.

GARCIA, M. **Determinação simultânea multiclasse de micotoxinas em cerveja.** Dissertação (Mestrado em Química Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

GARCIA, D. A. B. E. A.; SILVA, K. P. A. P. Níveis de adsorvente em rações contaminadas por micotoxinas e desempenho de codornas japonesas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 551-560, 2008.

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

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

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.

GRANT, C. M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 533-541, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, P.; SHOJAOSADATI, S. A.; HOOGSCHAGEN, M.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; RINZEMA, A. A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 100- 107, 2007.

HAN, S.; LIU, Y.; WANG, P. Y.; WANG, J. H. Simultaneous and sensitive determination of multiple mycotoxins in wines by UHPLC triple quadrupole mass spectrometry. **Agilent Technologies**, 2013.

HANS, P. S. Early iron age and late mediaeval malt finds from Germany attempts at reconstruction of early celtic brewing and the taste of celtic beer. **Archaeology Anthropology Science**, v. 3, p. 41-48, 2001.

HASSAN, Y. I.; HE, J. W.; PERILLA, N.; TANG, K.; KARLOVSKY, P.; ZHOU, T. The enzymatic epimerization of deoxynivalenol by *Devosia Mutans* proceeds through the formation of 3-*keto*-DON intermediate. **Scientific Reports**, 2017.

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 and Technology**, v. 21, n. 2, p. 67-76, 2010.

HORNINK, G. G.; GALEMBECK, G. **Glossário cervejeiro: da cultura à ciência**. Minas Gerais: Editora Universidade Federal de Alfenas, 2019.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Toxicological Monographs: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: **World Health Organization**, v. 56, p. 489, 2016.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ – CGCRE – 008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasília, p. 1–31, 2016.

JALILI, M.; JINAP, S. Role of sodium hydrosulphite and pressure on the reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black pepper. **Food Control**, v. 27, p. 11-15, 2012.

JALILI, M.; JINAP, S.; NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. **Food Control**, v. 21, p. 1388-1393, 2010.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511-1527, 1998.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Deoxynivalenol, HT-2 and T-2 Toxin. WHO/FAO. **Food and Nutrition**, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/publications>. Acesso em: 24 de Out. de 2018.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593–619, 2006.

KAPLAN, N. M.; PALMER, B. F.; DENKE, M. A. Nutritional and health benefits of beer. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 320, n. 5, p. 320–326, 2000.

KIMURA, M.; TOKAI, T.; TAKAHASHI-ANDO, N.; OHSATO, S.; FUJIMURA, M. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis pathways, genes, and evolution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 2105-2123, 2007.

KHATIB, A.; WILSON, E. G.; KIM, H. K.; LEFEBER, A. W. M.; ERKELENS, C.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, n. 264, 2006.

KHATTREE, R.; NAIK, D. N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS software**. Cary, NC: SAS Institute, p. 588, 2000.

KLARIC, D. A.; KLARIC, I.; MORNAR, A.; NIGOVIC, B. Evaluation of volatile compound and food additive contents in blackberry wine. **Food Control**, v. 50, p. 714-721, 2015.

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, n. 24, p. 9723-7, 2010.

KOCH, P. State of the art of trichothecenes analysis. **Toxicology letters**, v. 153, p. 109-112, 2004.

KRAMER, G. V. **Recuperação de CO₂ em microcervejaria**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETTERSSON, H.; VAN EGMOND H. P.; SCHOTHORST, R. C.; MACDONALD, S.; 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.

KUNZE, W. **La cerveza terminada**. Tecnología para Cerveceros y Malteros. 1. ed., Berlín: VLB Berlin, p. 826-885, 2006.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlin: VLB Berlin, 2. ed., 1999.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic *ascomycetous* yeasts and yeast-like taxa. **The Yeasts**, p. 293–307, 2011.

KUZDRALINSKI, A.; SOLARSKA, E.; MUSZYNSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 22-24, 2013.

LANGOS, D.; GRANVOGL, M. Studies on the simultaneous formation of aroma-active and toxicologically relevant vinyl aromatics from free phenolic acids during wheat beer brewing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 23-25, 2016.

LASH, L. H. Role of glutathione transport processes in kidney function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 329–342, 2005.

LAUTERBACH, A.; WILDE, C.; BERTRAND, D.; BEHR, J.; VOGEL, R. F. Rating of the industrial application potential of yeast strains by molecular characterization. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 6, p. 1759–1772, 2018.

LEÃO, R. M. Fermentação alcoólica ciência e tecnologia. **Fermentec**, p. 448, 2005.

LEIPER, K. A.; STEWART, G. G.; MCKEOWN, I. P.; J. **Institute of Brewing**, v. 109, p. 73, 2003.

LI, Y.; WEN, S.; CHEN, Z.; XIAO, Z.; MA, M. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2, zearalenone and its metabolites in eggs using a QuEChERS based extraction procedure. **Analytical Methods**, v. 7, p. 145-151, 2015.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgar Blucher, v. 3, p. 01-43, 2001.

LIU, C. F.; NIU, C. T.; ZHAO, Y.; TIAN, Y. P.; WANG, J. J.; LI, Q. Genome analysis of the yeast M14, an industrial brewing yeast strain widely used in China. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 76, 4th ed., p. 223-235, 2018.

- LODOLO, E. J.; KOCK, J. L. F.; BARRY C. AXCELL, B. C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, 2008.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUONGO, D.; DE LUNA, R.; RUSSO, R.; SEVERINO, L. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B1, α -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. **Toxicon**, v. 52, p. 156–162, 2008.
- MAJORS, R. E. QuEChERS: A new technique for multiresidue analysis of pesticides in foods and agricultural samples. **LCGC Asia Pacific**, v. 11, p. 22-31, 2008.
- MARTÍNEZ, O.; CARRILLO, R.; VILLAVICENCIO FERRER, M.; CARRILLO, R. D. Utilización de etanol como sustituto de azúcares fermentables em la elaboración de cervezas. **Ciencia y tecnología de los Alimentos**, v. 21, p. 31-34, 2011.
- MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; JÁUREGUI, O.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; CHIVA-BLANCH, G.; VALLVERDÚQUERALT, A.; QUIFER-RADA, P. A Comprehensive characterization of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ). **Food Chemistry**, v. 169, n. 336, 2014.
- MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259–272, 2004.
- MATUMBA, L.; VAN POUCKE, C.; EDIAGE, E. N.; JACOBS, B.; DE SAEGER, S. Effectiveness of hand sorting, flotation/washing, dehulling and combinations thereof on the decontamination of mycotoxin-contaminated white maize. **Food Additives and Contaminants Part A**, v. 32, p. 960-969, 2014.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindústria**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, v. 21, p. 579-583, 2010.
- MEERDINK, G. L. Mycotoxins. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 1, p. 88-93, 2002.
- MERTENS, S.; STEENSELS, J.; SAELS, V.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; VERSTREPEN, K. J. A *Larger* set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in *Lager* beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 8202-8214, 2015.
- MICHLIG, N.; REPETTI, M. R.; CHIERICATTI, C.; GARCÍA, S. R.; GAGGIOTTI, M.; BASÍLICO, J. C.; BELDOMÉNICO, H. R. Multiclass compatible sample preparation for

- UHPLC-MS/MS determination of aflatoxin M1 in raw milk. **Chromatographia**, v. 79, p. 1091-1100, 2016.
- MILLER, J. D. **Significance of grain mycotoxins for health and nutrition**. ACIAR Proc, Editors: Champ BR, Heighley E., p. 126-135, 1991.
- MOHAMMADI, A.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M.; REZAEI, K. A comparison between sugar consumption and ethanol production in wort by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces rouxii* on brewer's spent grain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, 2nd ed., p. 605-615, 2011.
- MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2^o Ed., 2017.
- MOSS, M. O.; THRANE, U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 23-28, 2004.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Basingstoke: Macmillan Education, 7th ed. 2019.
- NIKULIN, J.; KROGERUS, K.; GIBSON, B. Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation. **Yeast Interspecies Hybrids**, v. 35, p. 113–127, 2018.
- OLIVEIRA, S. P. A. **Níveis de congêneres, carbamato de etila e outros contaminantes em runs e uísques de consumo popular no Brasil**. Dissertações (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- OWENS, C. W. I.; BELCHER, R. V. A Colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, p. 705-711, 1965.
- PAPAZIAN, C. **The Complete Joy of Homebrewing**. 4th Ed. New York: Harper Collins, 2014.
- 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. 121-129, 2018.
- PASCARI, X.; RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; JUAN, C.; MAÑES, J.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Transfer of *Fusarium* mycotoxins from malt to boiled wort. **Food Chemistry**, v. 278, p. 700-710, 2019.
- PASTER, N.; MENASHERO, V. M.; LACEY, J.; FANELLI, C. Synergism between methods for inhibiting the spoilage of damp maize during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2, n. 2, p. 163-170, 1992.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC–MS. **Food chemistry**, v. 182, p. 143-149, 2015.

PEREIRA, H. V.; AMADOR, V. S.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, n. 104, 2016.

PESTKA, J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 283-298, 2007.

PETERS, J.; VAN DAM, R.; VAN DOORN, R.; KATERERE, D.; BERTHILLER, F.; HAASNOOT, W.; NIELEN, M. W. F. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. **PLoS One**, v. 12, 2017.

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 B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food Chemistry**, v. 218, p. 64–69, 2017.

PINTO, M.; COELHO, E.; NUNES, A.; BRANDÃO, T.; COIMBRA, M. A. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, n. 215, 2015.

PLEADIN, J.; FRECE, J.; MARKOV, K. Mycotoxins in food and feed. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 89, 2019.

PRESTES, D. N. **Desenvolvimento tecnológico de cervejas com matérias-primas de importância regional**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia e Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of brewing**. Boca Raton: CRC, p. 853, 2006.

PURI, K. D.; ZHONG, S. The 3-ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15-ADON population in spring wheat. **Phytopathology**, v. 100, p. 1007-1014, 2010.

RASCÓN, A. J.; AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Use of semi-automated continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic and nonalcoholic drinks from Andalucía Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 1117, 2019.

RAZZAZI-FAZELI, J. B., K. JARUKAMJORN, J. ZENTEK. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 796, p. 21-33, 2003.

- REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.
- RIBEIRO, B. D.; PEREIRA, K. S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, M. A. Z. **Microbiologia industrial: Alimentos**. e-Book Kindle, GEN LTC, v. 2, 2018.
- RICHARD, J. L. Some major mycotoxin and their micotoxicozes: overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1991, p. 3-10, 2007.
- RICHTER, D.; FOZOUNI, P.; EISEN, M.; KING, N. Gene family innovation, conservation and loss on the animal stem lineage. **eLife**, v. 7, p. 1-43, 2018.
- ROBBANA-BARNAT, S.; LAFARGE-FRAYSSINET, C.; COHEN, H.; NEISH, G. A.; FRAYSSINET, C. Immunosuppressive properties of deoxynivalenol. **Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 155-166, 1998.
- ROCHA, E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159-165, 2014.
- 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.
- RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; FATTORE, M.; ALBRIZIO, S.; BERRADA, H.; MAÑES, J. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. **Food Chemistry**, v. 178, p. 149–155, 2015.
- RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. S.; CARVALHO, B.; BRANDÃO, T.; GIL, A. M. Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 178, 2011.
- ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.
- RUBERT, J.; FAPOHUNDA, S. O.; SOLER, C.; EZEKIEL, C. N.; MAÑES, J.; KAYODE, F. A survey of mycotoxins in random street-vended snacks from Lagos, Nigeria, using QuEChERS-HPLC-MS/MS. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 673–677, 2013.
- RUSCHEL, L. S. **Avaliação da redução de valores calóricos e teores alcoólicos na produção de cerveja artesanal light**. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Engenharia Química) – Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, 2019.
- SANCHEZ, R. G.; SOLODOVNIKOVA, N.; WENDLAND, J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. **Yeast**, v. 29, p. 343-355, 2012.
- SANTE. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**, 2017.

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

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; BITTENCOURT, K. O.; SCUSSEL, V. M. Ozone treatment efficiency of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. **Journal of Store Products Research**, v. 59, p. 245-253, 2014.

SCHULZ, B. L.; PHUNG, T. K.; BRUSCHI, M.; JANUSZ, A.; STEWART, J.; MEEHAN, J.; HEALY, P.; NOUWENS, A. S.; FOX, G. P.; VICKERS, C. E. Process proteomics of beer reveals a dynamic proteome with extensive modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 17, 4th ed., p. 1647–1653, 2018.

SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 4, p. 875-882, 1996.

SEUS-ARRACHÉ, E. R. **Micotoxinas em insumos e produto cervejeiro: desenvolvimento de método analítico e aplicação e adsorventes alternativos**. Tese (Doutorado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

SEUS-ARRACHÉ, E. R.; FONTES, M. R. V.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Trichothecenes in wheat: Methodology, occurrence and human exposure risk. **Journal of Cereal Science**, v. 82, p. 129-137, 2018.

SEUS-ARRACHÉ, E. R. **Micotoxinas em insumo e produto cervejeiro: desenvolvimento de método analítico e aplicação de adsorventes alternativos**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

SHAO, S.; ZHOU, T.; MCGARVEY, B. D. Comparative metabolomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during the degradation of patulin using gas chromatography-mass spectrometry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 789-97, 2012.

SHIMIZU, H.; ARAKI, K.; SHIOYA, S.; SUGA, K. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 196-205, 1991.

SIEGEL, D.; BABUSCIO, T. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1145–1153, 2011.

SOHRABVANDI, S.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M.; MOUSAVI, S. M.; MORTAZAVIAN, A.; REZAEI, K. Application of *Saccharomyces rouxii* for the production of non-alcoholic beer. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, 5th ed., p. 1132-1137, 2009.

SONGSEEM-SAKUL, P., RAZAZI-FAZELI, E. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 31, n. 11-12, p. 1641-1686, 2008.

SOUZA, T. D.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E. Exposure to deoxynivalenol, HT-2 and T-2 toxins by consumption of wheat-based product in southern Brazil. **Food Control**, v. 50, p. 789–793, 2015.

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

STANLEY, V. G.; OJO, R.; WOLDESENBET, S.; HUTCHINSON, D. H., KUBENA, L. F. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, p. 1867-1872, 1993.

SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.

SUKROONGREUNG, S. A.; SCHAPPERT, K., KHACHATOURIANS, G. Survey of sensitivity of twelve yeast genera Toward T-2 toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 416-419, 1984.

SUN, J.; LI, W.; ZHANG, Y.; HU, X.; WU, L.; WANG, B. QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 375, 2016.

SZILÁGYI, T. G.; VECSEI, B. H. V.; KISS, Z.; HAJBA, L.; GUTTMAN, A. Analysis of the oligosaccharide composition in wort samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 256, p. 129-132, 2018.

TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 629–635, 2011.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265-271, 2014.

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C.; GUARIENTI, E. M. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. **Food Control**, v. 60, p. 174-179, 2016.

TORRESI, S.; FRANGIPANE, M. T.; ANELLI, G. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1232–1241, 2011.

TTBGov. Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau, Order 1135.25, Delegation of the Administrator's Authorities in 27 CFR Part 25, Beer. **Department of the Treasury**. Beer Laws, Regulations, and Public Guidance, T.D. TTB-21, 70 FR 235, 2005.

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

VACLAVIKOVA, M.; MALACHOVA, A.; VEPRIKOVA, Z.; DZUMAN, Z.; ZACHARIA O A, M.; HAJ LO A, 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.

VARGA, E.; MALACHOVA, A.; SCHWARTZ, H.; KRŠKA, R.; BERTHILLER, F. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 30, n. 1, 2013.

VARGA, E.; GLAUNER, T.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R.; SÜLYÖK, M. Development and validation of a (semi-) quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5087-5104, 2013.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 113-119, 1993.

VELISEK, J.; HAJŠLOVA, J. **Chemie potravin II**. OSSIS, Havlickuv Brod, 2009.

VENTURINIFILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas**. Ciência e tecnologia. 2nd ed., São Paulo: Edgard Blucher, v. 1, 2016.

VEPRIKOVA, Z.; ZACHARIASOVA, M.; DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, A.; FENCLOVA, M.; SLAVIKOVA, P.; VACLAVIKOVA, M.; MASTOVSKA, K.; HENGST, D.; HAJŠLOVA, J. Mycotoxins in plant-based dietary supplements: hidden health risk for consumers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 6633-6643, 2015.

VIROLI, S. L. M.; VIEIRA, J. T. F.; SOUSA, L. M. C. Corn-based craft beer production and analysis. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 1, n. 3, p. 8789. 2014.

WALTHER, A.; HESSELBART, A.; WENDLAND, J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, world's first pure culture Lager yeast. **G3, Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, p. 783-793, 2014.

WANG, Y.; ZHAO, W.; HAO, J.; XU, W.; LUO, Y.; WU W.; YANG, Z.; LIANG, Z.; HUANG, K. Changes in biosynthesis and metabolism of glutathione upon ochratoxin A stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p.10-18, 2014.

WANG, J.; LI, M.; ZHENG, F.; NIU, C.; LIU, C.; LI, Q.; SUN, J. Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 137, 2018.

WESTBROOK, C.; KAUT, C. **Ressonância Magnética Prática**. Segunda Edição. Guanabara Koogan, 2000.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. **Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria**. In: (Ed.). Beer in Health and Disease Prevention. Freising-Weißenstephan, 2009.

ZACHARIASOVA, M., LACINA, O., MALACHOVA, A., KOSTELANSKA, M., POUŠTKA, J., GODULA, M. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 51-61, 2010

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZOECKLEIN, B. W.; FULSEGANG, K. C.; GUMP, B. H. E.; NURY, F. S. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.