

PEROXIDASE E AMANO LIPASE A COMO AGENTES DE DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM SOLUÇÃO MODELO, MOSTO E CERVEJA

SABRINA DE OLIVEIRA GARCIA

PROF.^a DR.^a JAQUELINE GARDA BUFFON

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2020

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

PEROXIDASE E AMANO LIPASE A COMO AGENTES DE DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM SOLUÇÃO MODELO, MOSTO E CERVEJA

SABRINA DE OLIVEIRA GARCIA

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

PROF.^a DR.^a JAQUELINE GARDA BUFFON Orientadora

RIO GRANDE, RS 2020

Ficha Catalográfica

G216p	Garcia, Sabrina de Oliveira. Peroxidase e amano lipase a como agentes de degrad simultânea de ocratoxina a e zearalenona em solução mod e cerveja / Sabrina de Oliveira Garcia. – 2020. 240 f.	ação Jelo, mosto
	Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grand FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Cie Alimentos, Rio Grande/RS, 2020. Orientadora: Dra. Jaqueline Garda Buffon.	le – ência de
	1. Peroxidase 2. Amano Lipase A 3. Micotoxinas 4. Sol Modelo 5. Mosto 6. Cerveja I. Buffon, Jaqueline Garda II. 1	ução Título.
		CDU 338.45

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

APROVAÇÃO

Tese defendida por Sabrina de Oliveira Garcia, com orientação da Profa. Dra. Jaqueline Guarda Buffon e aprovada em 31 de Agosto de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

Andrew Charles and the

Profa. Dra. Jaqueline Grada Buffon - FURG

Prof." Dr." Susana Juliano Kalil - FURG

Janeira F. Z. Malion Burkert - FURG

Kelen Trechel

Profa. Dra. Helen Treichel - UFFS

Ana lavela P. Feldin

Profa. Dra. Ana Carla Feltrin - Centro Universitário IDEAU

Dedico:

Aos meus pais, Maria e José Alberto (*in memorian*), ao meu irmão Ari e aos anjos que Deus colocou na minha vida Bruno, Nina, Jussara e Daiane, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos. Gratidão por todo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha saúde e por tudo que vivi durante toda minha vida. Ao meu amado pai José Alberto, que se faz presente em meu coração e que me acompanha sempre, pois sei que de onde está sempre me conduziu pelo caminho do bem e do amor. O amor que nos une é além da vida e é inexplicável à razão humana.

À minha mãe Maria, por ter me dado a vida, criado e educado com muito sacrificio, sem nunca me deixar faltar nada. Obrigada por todo o amor, atenção, apoio e ensinamentos a mim dedicado.

Ao meu irmão Ari, mano tu és o meu exemplo. Um homem trabalhador, honesto, persistente e generoso, saiba que todo dia me espelho na sua força de vontade para crescer e vencer na vida.

Aos meus eternos amores: Bruno, tu és um ser humano digno de tudo de melhor neste mundo, agradeço por todo amor, carinho, cuidado, respeito e lealdade dedicados a mim sempre; Nina, meu hiato preferido, tu és a luz da minha vida, agradeço por ter me transformado tanto, por se dedicar tanto a mim e a nós, por fazer parte dos dias mais felizes da minha vida e por

me mostrar o mundo sob a perspectiva do amor, da paz e da gratidão; a Dai, tu és uma guerreira, agradeço por ter se tornado a minha irmã mais velha, por ser a minha confidente, por me motivar a enfrentar os desafios da vida e por compartilhar comigo tua alegria; a Ju, tua existência me faz acreditar num mundo melhor, agradeço por ter me aceito como filha pois és a mãe que eu escolhi nesta vida, agradeço por todo amor sempre. Quero dizer a vocês (Bruno, Dai, Ju e Nina) que me sinto a pessoa mais completa e feliz deste mundo por tê-los comigo

durante essa caminhada. Eu amo vocês, jamais esqueçam disso.

À minha orientadora Prof^a Jaqueline, agradeço por acreditar no meu potencial, ao longo destes 6 anos entre mestrado e doutorado. Te agradeço também pelo apoio, parceria, amizade, compreensão nos momentos difíceis, paciência e principalmente por sempre me motivar quando precisei. Jaque, agradeço por respeitar meus limites, mas acima de tudo por me ajudar a superá-los, pois sempre acreditou no meu desenvolvimento. Essa tese é minha, mas não

seria possível sem sua orientação.

À Prof^a Eliana, obrigada pelo apoio, carinho, respeito e ensinamentos. O afeto que desenvolvemos uma pela outra é recíproco. Prof^a, a senhora me ensinou tanto nestes anos que não cansarei de afirmar que fostes a professora que fez o diferencial na minha formação. Tenho muito orgulho de ter feito parte do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos

(LAMCA) e poder convivido diariamente com a senhora neste período.

À nossa amada laboratorista Maristela, ser iluminado e de um coração inigualável, agradeço pelo vinculo de amizade e confiança que formamos. Agradeço pelo carinho, dedicação, empatia e disposição em me ajudar sempre. Maris, tua presença no LAMCA sempre trouxe leveza, alegria e organização, fazendo com que eu me sentisse bem em ir diariamente para o laboratório, é como se eu tivesse na minha segunda casa, com direito a mate, risada, choro, conselhos e tudo mais.

Às minhas musas científicas: Ana Carla, Taiana, Priscila, Larine, Karen, Rafaela, Lidiane, Elisa Seus, Anelise, Gabriela, Bibiana, Thaísa e Kelly, a cada uma vez vocês agradeço por todo o carinho e ajuda dedicados a mim. Saibam que essa tese tem um pouquinho de cada uma de vocês, a cada uma agradeço pela parceria e amizade formada que será levada comigo. Em especial que agradeço a vocês por terem me ajudado, a superar cada dificuldade durante esse período de convivência no LAMCA. Agradeço também a minha amada partner de representação discente, e que se transformou em amiga. Gabrielle, tu és um exemplo de profissional, que me ensinou inúmeras coisas. Agradeço também, à Milena, Marina, Carmen, Naralice, Cíntia, Rosana, Marcy, Verônica, Francine, Eliza, Andressa e Juliane, por todo apoio e momentos descontraídos. Todas mulheres listadas neste agradecimento, demonstra o quanto a ciência no Brasil é realizada por mulheres únicas, fortes, independentes e empoderadas.

Os meninos do LAMCA, que mais me cativaram durante esses anos: Maicon, Wesclen, Manuel, Rafael, Keven, Bryan, Francisco e João, agradeço por tornarem o ambiente mais leve e alegre, fazendo com que os dias fossem menos complicados. Em especial, deixo meu agradecimento ao Wesclen e Maicon que se tornaram irmãos pra mim, eu amo vocês. Aos iniciantes científicos que auxiliaram no desenvolvimento desta tese, Islaine, Victória, Ana Flávia e Diean, agradeço pela dedicação e paciência, saibam que grande parte desta pesquisa se realizou devido a ajuda de vocês. Em especial, deixo meu muito obrigada aos meus amados Ana Flávia e Diean, levo vocês em meu coração e saibam que de onde eu estiver estarei na torcida pelos os dois.

Agradeço também à todas pessoas que passaram pelo LAMCA nestes 6 anos, entre mestrado e doutorado, e que fizeram diferença no desenvolvimento deste trabalho. Tenham certeza que aprendi com cada um e sempre estarei diposta a ajudar. Agradeço a Prof^a Leonor e a Jesus pelo carinho e alegria a cada visita, as visitas de vocês deixavam os dias mais iluminados. Agradeço, aos meus colegas de mestrado (ingressantes em 2014) e doutorado (ingressantes em 2016) pelo carinho, pelos momentos alegres e apoio nos momentos difíceis, em especial a

Silvia, Paola Martins, Sibele, Cleber e Aline.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, agradeço pela dedicação e comprometimento com a educação e a ciência.

Agradeço, aos demais laboratórios da Escola de Química e Alimentos e ao Centro de Integrado de Análises e os seus respectivos laboratoristas, em especial deixo o meu agradecimento pela parceria e dedicação ao seu trabalho e a ciência, Sergiane, Michele, Ana

Sanzo, Bruno, Sabrine, Aline, Roque, Elisane, Diego e Roseane.

Agradeço, a todos meus amigos e familiares, por terem compreendido minha ausência durante este período. Deixo o meu agradecimento especial, a minha vó, aos pais do Bruno, a minha cunhada e a todos meus amigos Embrapeanos. Também agradeço com o coração cheio de amor à minha família de Guaíba (Josi, Marcelo e Ana) que tanto me apoia e me ama. Sou grata pela vida de cada um e saibam que todos possuem seu espaço reservado no meu coração.

À Universidade Federal do Rio Grande, agradeço pela infraestrutura e qualidade da educação oferecida aos seus discentes.

Aos órgãos CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Aos professores, membros da banca, agradeço pelo aceite do convite e disponibilidade, tenham certeza que todas as contribuições e sugestões serão de grande importância para o enriquecimento deste documento.

"Valeu a pena, ê ê Valeu a pena, ê ê Pescador Acredite nos seus sonhos *brother* Insista Falaram pra gente que não era possível Se começar foi fácil, difícil vai ser parar Valeu a pena, ê ê Valeu a pena, ê ê Pescador".

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO II
Tabela 1 - Atributos típicos para descrição de cores e sabores de maltes especiais
Tabela 2 - Ocorrência de micotoxinas em cerveja de diversos países
Tabela 3 - Limites máximos tolerados (LMT) de ocratoxina A para alimentos segundo a
legislação brasileira
Tabela 4 - Limites máximos tolerados (LMT) de zearalenona em alimentos segundo a
legislação brasileira
Tabela 5 - Degradação enzimática da ocratoxina A 68
Tabela 6 - Degradação enzimática da zearalenona
Tabela 7 - Classificação das enzimas com base em suas reações
Tabela 8 - Principais heme peroxidases, classificação, fontes e funções biológicas77

CAPÍTULO III Artigo 1

Tabela 1 - Parâmetros de validação do método analítico avaliado em CLAE-FL para
quantificação de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA)95
Tabela 2 - Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (H2O2) na degradação da
ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (0,6 U mL ⁻¹) na solução
modelo*100
Tabela 3 - Efeito da adição de íons metálicos na degradação da ocratoxina A (OTA) e
zearalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (0,6 U mL ⁻¹) na solução modelo*102
Tabela 4 - Parâmetros K _M e V _{máx} na degradação de de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA)
por peroxidase comercial (0,6 U mL ⁻¹) em solução modelo*

Artigo 2

Tabela 1 - Parâmetros de validação do método analítico avaliados em CLAE-FL para
ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA)128
Tabela 2 - Efeito da adição de íons metálicos na atividade enzimática de amano lipase A
(0,3 U mL ⁻¹) para degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em solução
modelo*134
Tabela 3 - Parâmetros K _M e V _{máx} na degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA)
pela lipase obtida A (0,3 U mL ⁻¹) em solução modelo*136
Tabela 4 - Cinética de degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela a ação da
amano lipase A (0,3 U mL ⁻¹) em solução modelo*137

Artigo 3

Tabela 1 - Efeito da temperatura na degradação de ocratoxina A (OTA) e zearale	nona (ZEA)
pela ação do mix enzimático* em mosto e cerveja	161
Tabela 2 - Efeito da atividade enzimática de peroxidase comercial (PO) e amano	lipase A na
degradação de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em mosto* e cerveja**	163

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II
Figura 1 - Flor de lúpulo42
Figura 2 - Fluxograma do processamento cervejeiro46
Figura 3 - Grão de cevada
Figura 4 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA) e após hidrólise da ligação amida da OTA
(1) para produzir ocratoxina α (OT α) (2) e fenilalanina (3) considerada a principal via de
degradação/desintoxicação61
Figura 5 - Estrutura química da zearalenona (a) e de seus metabólitos (b) α-zearalenol (R1=OH
e R2=H) e β-zearalenol (R1=H e R2=OH)64
Figura 6 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético
heme e a possível forma de inativação da peroxidase de rábano silvestre78
Figura 7 - Reações enzimáticas catalisadas pela lipase

CAPÍTULO III

Artigo 1

Figura 1 - Efeito do pH da solução modelo* na degradação da ocratoxina A (OTA) e
earalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (PO)96
Figura 2 - Efeito da força iônica da solução modelo * na degradação da ocrotoxina A (OTA) e
earalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (PO)
Figura 3 - Efeito da temperatura na degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA)
ela peroxidase comercial (PO) na solução modelo *99
Figura 4 - Cinética de degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela ação da
peroxidase comercial (0,6 U mL ⁻¹) na solução modelo*105

Artigo 2

Figura 1 - Efeito do pH na solução modelo* para degradação da ocratoxina A (OTA)) e
zearalenona (ZEA) pela amano lipase A (0,3 U mL ⁻¹)1	.29
Figura 2 - Efeito da força iônica da solução modelo* para degradação da ocratoxina A (OT	'A)
e zearalenona (ZEA) pela amano lipase A (0,3 U mL ⁻¹)1	31
Figura 3 - Efeito da temperatura para degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZE	A)
pela amano lipase A (0,3 U mL ⁻¹) em solução modelo*1	.32

Artigo 4

Figura 1 - Análise de Componentes Principais das amostras de cerveja e mosto dos espectros
de RMN ¹ H nas regiões de 0 a 3 ppm (a), de 3 a 6 ppm (b) e de 6 a 10 ppm (c)181
Figura 2 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, 26 °C em água deuterada) das amostras de cervejas
(CME, CM e C)
Figura 3 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, 26 °C em água deuterada) das amostras de mostos
(MME, MM e M)

CAPÍTULO I	24
RESUMO GERAL	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	
2 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
CAPÍTULO II	
3 REVISÃO DA LITERATURA	
3.1 CERVEJA: DEFINIÇÃO, HISTÓRICO, PRODUÇÃO, CONSUMO E ECON	OMIA36
3.1.1 Matérias-primas cervejeiras	
3.1.1.1 Água	
3.1.1.2 Malte e adjuntos	
3.1.1.3 Lúpulo	41
3.1.1.4 Levedura	
3.1.2 Processamento cervejeiro	45
3.1.2.1 Cevada: limpeza, classificação e armazenamento	45
3.1.2.2 Germinação	47
3.1.2.3 Secagem e moagem do malte	
3.1.2.4 Mosturação	
3.1.2.5 Filtração e fervura do mosto	51
3.1.2.6 Clarificação do mosto e resfriamento	
3.1.2.7 Fermentação e recuperação da levedura	
3.1.2.8 Maturação e resfriamento	
3.1.2.9 Finalização: clarificação, estabilização e carbonatação	54
3.1.2.10 Envase e pasteurização	55
3.1.3 Composição da cerveja e seu impacto na saúde humana	56
3.2 MICOTOXINAS	
3.2.1 Micotoxinas na cerveja	59
3.2.2 Ocratoxina A	61
3.2.3 Zearalenona	63
3.2.4 Estratégias de degradação de ocratoxina A e zearalenona	66
3.3 ENZIMAS	67
3.3.1 Peroxidase	76

SUMÁRIO

3.3.2 Lipase	
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
CAPÍTULO III	
ARTIGO 1. PEROXIDASE COMO AGENTE DE DEGRADAÇÃO SIMULTÂN	NEA DE
OCRATOXINA A E ZEARALENONA APLICADA EM SOLUÇÃO MODELO E C.	ERVEJA 84
1 INTRODUÇÃO	
2 MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 AMOSTRAS E REAGENTES	89
2.2 PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE OTA E ZEA	
2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PO	
2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE OTA E Z CLAE-FL	EA POR
2.5 EXTRAÇÃO DE MICOTOXINAS DA SOLUÇÃO MODELO E CERVEJA	
2.6 MÉTODO DE VALIDAÇÃO ANALÍTICO	
2.7 DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA POR PO	
2.7.1 Otimização das condições de reação na solução modelo	
2.7.2 Determinação de parâmetros cinéticos	
2.7.3 Cinética de degradação de OTA e ZEA	
2.7.4 Confirmação de degradação por PO	
2.7.5 Degradação de OTA e ZEA na cerveja	
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMUL DE OTA E ZEA	.TÂNEA 94
3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA EM SOLUÇÃO MODELO	PO NA
3.2.1 Efeito do pH	
3.2.2 Efeito da força iônica	
3.2.3 Efeito da temperatura	
3.2.4 Efeito do peróxido de hidrogênio	
3.2.5 Efeito da adição de íons metálicos	101
3.2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$	103
3.2.7 Cinética de degradação de OTA e ZEA e confirmação da degradação pela PO desnaturada	ação da 104
3.2.8 Degradação de OTA e ZEA em cerveja tipo Pilsen	106
4 CONCLUSÃO	107
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ARTIGO 2. DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZEARALI PELA AÇÃO DA AMANO LIPASE A: CONDIÇÕES E APLICAÇÃO	ENONA
1 INTRODUCÃO	110
2 ΜΑΤΕΡΙΑΙ Ε ΜΈΤΟDOS	120
2 1 ENZIMA PADRÕES DE MICOTOXINAS AMOSTRAS E REAGENTES	122
2.2 PREPARO DE AMOSTRA	
2.2 I RELARO DE AMOSTRA	122 A 123
2.3 I REI ARO DA ENZIMA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMATICA 2.4 DEEDADO DAS SOLUÇÕES DADEÃO DE MICOTOVINAS E ESTIM	$1 \dots 123$
CONCENTRAÇÃO	
2.5 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA POR CLAE-FL	124
2.6 DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA PELA AMANO LIPASE A	124
2.6.1 Otimização das condições de reação para ação da amano lipase A na degrad	lação de
ОТА е ZEA	124
2.6.2 Determinação dos parâmetros cinéticos	125
2.6.3 Cinética de degradação de OTA e ZEA por lipase	126
2.6.4 Degradação do OTA e ZEA na cerveja	126
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	126
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
3.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE OTA	E ZEA
3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO PARA AÇÃO DA AMANO A PARA DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA	LIPASE 127
3.2.1 Efeito do pH	128
3.2.2 Efeito da força iônica	
3.2.3 Efeito da temperatura	131
3.2.4 Efeito da adição de íons metálicos na solução modelo	133
3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos KM e V _{máx}	135
3.2.6 Cinética de degradação de OTA e ZEA por lipase	137
3.2.7 Degradação de OTA e ZEA em cerveja tipo Pilsen pela ação da amano lipas	se A 139
4 CONCLUSÃO	140
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

ARTIGO 3. DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZE	EARALENONA
EM MOSTO E CERVEJA PELA AÇÃO DE MIX ENZIMÁTICO	152
1 INTRODUÇÃO	156
2 MATERIAL E MÉTODOS	157
2.1 PADRÕES DE MICOTOXINAS, ENZIMAS E AMOSTRAS	157
2.2 PREPARO DE AMOSTRA	

2.3 MICOTOXINAS: PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E ESTIMA CONCENTRAÇÃO	ΓΙVA DA 158
2.4 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA POR CLAE-FL	
2.5 PREPARO DAS ENZIMAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁ	TICA 159
2.6 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AÇÃO ENZIMÁTICO	DO MIX
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AÇÃO DO MIX ENZIMÁTICO	
3.1.1 Efeito da temperatura	
3.1.2 Efeito da atividade enzimática	
4 CONCLUSÃO	
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ARTIGO 4. CARACTERIZAÇÃO DE MOSTO E CERVEJA APÓS BIODEGRAD	AÇÃO DE
OCRATOXINA A E ZEARALENONA POR AÇÃO DE MIX ENZIMATICO	
I INTRODUÇAO	172
2 MATERIAL E METODOS	1/3
2.1 AMOSTRA, PADROES DE MICOTOAINAS E ENZIMAS	1/4
2.2 PREPARO DE AMOSTRA	1/4
2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE MICOTOXINAS E ENZIMAS 2.4 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA	1/4
2.4 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA EM MOSTO E CEDVELA DELA AÇÃO	DO MIY
ENZIMÁTICO DE PO E AMANO LIPASE A	, DO MIX
2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	
2.7 CARACTERIZAÇÃO DE MOSTO E CERVEJA POR RMN	
2.8 ANÁLISE DOS DADOS	
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	177
3.1 DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA	
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO E CERVEJA DEGRADAÇÃO	APÓS A 178
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA E MOSTO ATRAVÉS DE RESSO MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	ONÂNCIA 180
4 CONCLUSÃO	
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPÍTULO IV	196

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	
CAPÍTULO V	
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada, consumida e apreciada mundialmente, obtida de cereais malteados, água, lúpulo e levedura. A ocorrência das micotoxinas ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) é reportada nos insumos utilizados no processo cervejeiro e produto final. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos à saúde humana produzidos por fungos sob condições de estresse e devido a sua toxicidade, métodos biológicos para mitigação destas substâncias são necessários. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação das enzimas peroxidase (PO) e amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja. Primeiramente, foi realizada a validação de método cromatográfico para a determinação das micotoxinas em solução modelo, mosto e cerveja. Em solução modelo foram realizadas a otimização das condições reacionais para ação das enzimas, determinação de parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{máx})) e avaliação cinética de degradação de OTA e ZEA sob tratamento enzimático. No mosto e na cerveja, foi avaliado a ação de mix enzimático, composto por PO e amano lipase A, em condições ótimas de temperatura e atividade enzimática, na degradação das micotoxinas. Além disso, as amostras foram caracterizadas físico-quimicamente e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. O método cromatográfico validado cumpriu os critérios analíticos descritos pelos órgãos internacionais de validação. As condições ótimas para ação da PO (0.6 U mL⁻¹) na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo foram tampão fosfato 25 mM pH 7 a 30 °C, adição de 26 mM de H₂O₂ e adição de 1 mM de K⁺. O K_M e V_{máx} determinados de OTA e ZEA após ação da PO foram de 50 e 10.710 nM e 0,168 e 72 nM min⁻¹, respectivamente. A degradação de OTA e ZEA após ação da PO em 6 h foi de 27,0 e 64,9% em solução modelo e de 4,8 e 10,9% em cerveja, respectivamente. A amano lipase A (0,3 U mL⁻¹) demonstrou atividade ótima para degradação de OTA e ZEA em tampão fosfato 50 mM pH 7 a 40 °C durante 22 h. O K_M e V_{máx} para OTA e ZEA após ação da amano lipase A foram de 0,03 e 3,14 µM e 6,56x10⁻⁰⁵ e 19,57x10⁻⁰³ µM min⁻¹, respectivamente. A degradação de OTA e ZEA após ação da amano lipase A por 22 h em solução modelo foi de 100% de OTA e 30,6% de ZEA e em cerveja foi de 89,5% de OTA e 6,5% de ZEA. O mix enzimático, no mosto (0,90 U mL⁻¹ de PO e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A, 30 °C, 22 h e 26 mM de H₂O₂) degradou 86,3% de OTA e 29,4% de ZEA e em cerveja (1,20 U mL⁻¹ de PO e 0,60 U mL⁻¹ de amano lipase A, 25°C, 22 h e 26 mM de H₂O₂) foi degradado 96,9 e 23,0% de OTA e ZEA, respectivamente. A caracterização das amostras permitiu verificar alterações de parâmetros físico-químicos e dos sinais característicos de álcoois, ácidos orgânicos, acúcares e compostos aromáticos após o tratamento enzimático. Em suma, foi proposto um método promissor para a mitigação de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja e com potencial para aplicação em diversas matrizes alimentares. E assim, reduzir os impactos que estes contaminantes ocasionam à saúde humana e economia.

Palavras-chave: Peroxidase. Amano Lipase A. Micotoxinas. Solução Modelo. Mosto. Cerveja.

ABSTRACT

Beer is a fermented alcoholic drink, consumed and appreciated worldwide, obtained from malted cereals, water, hops, and yeast. The occurrence of mycotoxins ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) is reported in the inputs used in the brewing process and final product. Mycotoxins are secondary metabolites toxic to human health produced by fungi under stress conditions and due to their toxicity, biological methods to mitigate these substances are necessary. Thus, the objective of this study was to evaluate the action of the enzymes peroxidase (PO) and amano lipase A in the simultaneous degradation of OTA and ZEA in model solution, wort, and beer. Firstly, the validation of the chromatographic method for the determination of mycotoxins in model solution, wort and beer was performed. In a model solution, the reaction conditions were optimized for enzyme action, determination of kinetic parameters (Michaelis-Menten constant - K_M and maximal velocity - V_{max}), and kinetic evaluation of degradation of OTA and ZEA under enzymatic treatment. In the wort and beer, the action of the enzymatic mix, composed of PO and amano lipase A, under optimal conditions of temperature and enzyme activity, in the degradation of mycotoxins was evaluated. Also, the samples were characterized physicochemically and by hydrogen nuclear magnetic resonance spectrometry. The validated chromatographic method met the analytical criteria described by international organizations for validation. The optimal conditions for the action of PO (0.6 U mL^{-1}) in the simultaneous degradation of OTA and ZEA in model solution were phosphate buffer 25 Mm pH 7 at 30 °C, the addition of 26 mM H₂O₂ and the addition of 1 mM K⁺. The K_M and V_{max} determined from OTA and ZEA after PO action were 50 and 10,710 nM and 0.168 and 72 nM min⁻¹, respectively. The degradation of OTA and ZEA after PO action in 6 h was 27.0 and 64.9% in model solution and 4.8 and 10.9% in beer, respectively. Amano lipase A (0.3 U mL⁻¹) demonstrated optimal activity for degradation of OTA and ZEA in 50 mM phosphate buffer pH 7 at 40 °C for 22 h. The K_M and V_{max} for OTA and ZEA after the action of amano lipase A were 0.03 and 3.14 μM and 6.56x10⁻⁰⁵ and 19.57x10⁻⁰³ µM min⁻¹, respectively. The degradation of OTA and ZEA after the action of amano lipase A for 22 h in a model solution was 100% OTA and 30.6% ZEA and in beer, it was 89.5% OTA and 6.5% ZEA. The enzymatic mix, in the wort (0.90 U mL⁻¹ of PO and 0.45 U mL⁻¹ of amano lipase A, 30 °C, 22 h, and 26 mM H₂O₂) degraded 86.3% of OTA and 29.4 % of ZEA and in beer (1.20 U mL⁻¹ of PO and 0.60 U mL⁻¹ of amano lipase A, 25°C, 22 h, and 26 mM H₂O₂) degraded 96.9 and 23.0% of OTA and ZEA, respectively. The characterization of the samples allowed to verify changes in physical-chemical parameters and the characteristic signs of alcohols, organic acids, sugars, and aromatic compounds after enzymatic treatment. In conclusion, a promising method has been proposed for the mitigation of OTA and ZEA in model solution, wort, and beer and with potential for application in several food matrices. And so, reduce the impacts that these contaminants have on human health and the economy.

Keywords: Peroxidase. Amano lipase A. Mycotoxins. Model solution. Wort. Beer.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada obtida de cereais maltados, água, lúpulo e levedura (HARRISON; ALBANESE, 2017), apreciada e comercializada mundialmente, o setor cervejeiro contribui com a economia de muitos países. O Brasil é um destes países, pois é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com produção de 14 bilhões de litros ao ano (CERVBRASIL, 2020), onde o consumo nacional médio anual desta bebida corresponde a 50,5 L, o que resulta um gasto médio de R\$ 1.100,00 (STATISTA, 2020). Além disso, a cerveja, se consumida moderadamente, pode oferecer benefícios à saúde humana, devido a sua composição ser constituída por proteínas, polissacarídeos e lipídeos (STEINER; BECKER; GASTL, 2010) e também por várias vitaminas e compostos fenólicos (KONDO, 2004). Entretanto, estudos demonstraram que os insumos cervejeiros são frequentemente contaminados por micotoxinas (BĚLÁKOVÁ et al., 2011b; BŁAJET-KOSICKA et al., 2014; MAKUN et al., 2011; TARAZONA et al., 2020; XU; HAN; LI, 2019).

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos toxigênicos em condições de estresse, que ocasionam efeito tóxico à saúde humana e animal (BENNETT; KLICH, 2003). As micotoxinas são descritas em diversas matrizes alimentares como cereais (SOLEIMANY; JINAP; ABAS, 2012), café (BENITES et al., 2017), oleaginosas (BHAT; REDDY, 2017), frutas (PIQUÉ et al., 2013) e derivados, vinhos (PIZZUTTI et al., 2014) e sucos (ZOUAOUI et al., 2015); leite (IQBAL; ASI, 2013), salame (MONACI et al., 2005), carne e ovos (IQBAL et al., 2014b). Adicionalmente, também é reportado a ocorrência de micotoxinas na cerveja, como a ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) (ARAGUÁS; GONZÁLEZ-PEÑAS; LÓPEZ DE CERAIN, 2005; BAUER et al., 2016; NKWE; TAYLOR; SIAME, 2005; ODHAV; NAICKER, 2002; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 2000).

A OTA é uma micotoxina, produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (RINGOT et al., 2006), caracterizada por causar efeitos nefrotóxicos e imunotóxicos (GAN et al., 2017), teratogênicos (MAYURA et al., 1984) e cancerígenos (QI et al., 2014), tendo como principais alvos de toxicidade os rins e o figado de humanos e animais (O'BRIEN; DIETRICH, 2005; RINGOT et al., 2006). A ZEA é produzida por algumas espécies toxigênicas do gênero *Fusarium* (ZINEDINE et al., 2007). Estudos realizados com ZEA demonstraram que esta ocasiona distúrbio do sistema endócrino (KOWALSKA; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016) que promove puberdade feminina precoce (MASSART; SAGGESE, 2010), ocasiona estresse oxidativo e apoptose de células embrionárias humanas (CAO et al., 2019). Esta toxina também é

considerada hepatotóxica, citotóxica, genotóxica (HASSEN et al., 2007) e imutóxica (MARIN et al., 2013).

Em decorrência, da frequente ocorrência destas micotoxinas em insumos cervejeiros e produto final e da toxicidade destes compostos, estas são motivo de preocupação de órgãos de controle sanitário. Portanto, há necessidade de estudos que tenham como escopo a degradação de OTA e ZEA. Uma alternativa que vem sendo estudada é a utilização de métodos biológicos empregando enzimas, como a peroxidase (PO) e a lipase. A PO é uma enzima oxidorredutora que possui capacidade de catalisar a oxidação de vários substratos tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora e outro composto como doador de átomos de hidrogênio (MEDINA et al., 2017). A lipase é uma enzima hidrolítica que exerce sua atividade nas ligações éster carboxílico de triacilgliceróis e outros substratos, como ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos e aromáticos, tioésteres, aminas ativadas, mantendo alta seletividade de regio, quimio e enantioseletividade (LOTTI; ALBERGHINA, 2007).

Neste contexto, estudos acerca da degradação de micotoxinas por ação da PO comercial em solução são cada vez mais frequentes, como na degradação de 59 e 69,9% de OTA e ZEA, conforme demonstrado por Nora et al., (2019) e Garcia, Feltrin e Garda-Buffon (2018), respectivamente. A PO comercial e a obtida de outras fontes tem sido relatada na mitigação de outras micotoxinas, como aflatoxinas (DAS; MISHRA, 2000; MARIMÓN SIBAJA et al., 2019; TRIPATHI; MISHRA, 2011) e deoxinivalenol (FELTRIN et al., 2017b; GAUTÉRIO et al., 2017). Em relação ao emprego da enzima amano lipase A na degradação de micotoxinas, há relato de somente um estudo que avaliou a degradação de OTA em Ocratoxina α (OT α), produto de detoxificação dessa micotoxina (STANDER et al., 2000). Porém, outros tipos de lipases, como a lipase pancreática suína e imobilizada, são descritas na degradação de patulina (PAT) em suco de pêra (XIAO et al., 2019), suco de maçã (TANG et al., 2018) e solução aquosa (LI et al., 2017b). A ação de enzimas na degradação de micotoxinas é resultante principalmente das reações de oxidação, acetilação, glicosilação, clivagem de anéis, hidrólise, desanimação e descarboxilação, que estas substâncias catalisam durante a reação enzimática (HAQUE et al., 2020).

Em virtude do exposto anteriormente, se faz necessário estudos que mencionem a ação da PO e/ou amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja, e consequentemente futura aplicação industrial. Desta forma, pretende-se com esta pesquisa contribuir para o avanço no conhecimento científico para a degradação simultânea destas micotoxinas em cerveja, definindo um método biológico que possa contribuir para a produção de uma bebida consumida mundialmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação das enzimas, PO e amano lipase A, na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar um método analítico para determinação de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja;
- Otimizar as condições reacionais para ação enzimática da PO na degradação de OTA e ZEA, definir os parâmetros cinéticos (K_M e V_{máx}) e determinar a cinética de degradação das micotoxinas em solução modelo;
- Otimizar as condições reacionais para ação enzimática da amano lipase A na degradação de OTA e ZEA, definir os parâmetros cinéticos (K_M e V_{máx}) e determinar a cinética de degradação das micotoxinas em solução modelo;
- Aplicar a PO e amano lipase A na degradação de OTA e ZEA em cerveja;
- Otimizar as condições reacionais para ação de mix enzimático, composto por PO e amano lipase A, na degradação de OTA e ZEA em mosto e cerveja;
- Caracterizar através de determinações físico-químicas e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio o mosto e cerveja após tratamento enzimático visando a degradação de OTA e ZEA.
CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA3.1 CERVEJA: DEFINIÇÃO, HISTÓRICO, PRODUÇÃO, CONSUMO E ECONOMIA

Desde o século XVI, a Lei de Pureza Alemã de 1516, oriunda da Baviera, define a cerveja como uma bebida alcoólica fermentada obtida de três ingredientes: malte de cevada, água e lúpulo. Posteriormente, com a descoberta da levedura em 1860, por Louis Pasteur, a lei foi alterada, sendo este adicionado como ingrediente para produção cervejeira (NARZISS, 1984). No entanto, alguns países, permitem a adição de outras substâncias na fabricação desta bebida (HARRISON; ALBANESE, 2017). Os principais aditivos permitidos à fabricação de cerveja são: adição de cereais não malteados (milho, arroz, trigo, aveia e sorgo), xarope de milho, especiarias entre outros (BUIATTI, 2009). Segundo Weeks (1949), a etimologia da palavra cerveja, indica que ela se originou do verbo latim *bibere*, que significa "para beber". Da mesma forma, a palavra em espanhol *cerveza* (cerveja), aparentemente deriva da expressão *cerevisia*, que combina as palavras do latim *ceres* e *vis* que significam "deusa do grão" e "vigor", respectivamente.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria, conforme Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019. Por definição, cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro (BRASIL, 2019).

A produção de cerveja, rica em tradição, é uma das atividades mais antigas da humanidade e acompanhou a evolução humana juntamente com o início da agricultura e da sedentarização (ZARNKOW, 2014). De acordo com registros históricos, é admitido que a cerveja se originou durante a Revolução Neolítica, datada entre 11000 e 6000 a.C. na Mesopotâmia e Egito (áreas do Oriente Médio), considerados berços da civilização (WESTERMANN; HUIGE, 1979; ZARNKOW, 2014). Segundo Hornsey (2015), a transição nómade dos humanos para uma vida sedentária, foi um avanço importante para a história do *Homo sapiens*, onde os primeiros agricultores utilizavam as plantas disponíveis para o preparo de poções e bebidas que alteravam seu comportamento. Para os caçadores-coletores, o antecessor da cerveja propriamente dito, era um mingau produzido pela simples imersão de grãos (cevada ou trigo) em água.

No Egito, com a evolução da civilização, a cerveja se tornou a bebida básica da dieta egípcia, além de desempenhar um papel fundamental em assuntos econômicos, como moeda e oferta religiosa. É descrito que o faraó Ramsés possuía uma cervejaria que produzia aproximadamente 10.000 hectolitros de cerveja por ano (BAMFORTH, 2003). Conforme Harrison e Albanese (2017), foram os egípcios que ensinaram a "arte" da produção de cerveja aos gregos e romanos, estas práticas se espalharam por Roma durante o reinado de César. Entretanto, quando o vinho adquiriu popularidade na região do Mediterrâneo, a cerveja migrou para o norte da Europa com os gauleses, tribos germânicas e celtas (BAMFORTH, 2003). Durante os tempos medievais, a cerveja era uma bebida caracterizada como agradável e quente e seu consumo dava-se por dois motivos principais: (I) esta era também considerada uma bebida segura em uma época onde a pureza da água era incerta; e (II) outras bebidas, como o café e chá, eram desconhecidas (BUIATTI, 2009).

Ao longo de 1000 anos, a ciência sobre a fabricação de cerveja cresceu devido a influência da igreja, atingindo o apogeu nos séculos XVI e XVII. Algumas das mais importantes cervejarias foram implementadas em ambientes eclesiásticos, como a produção de cervejas trapistas na Bélgica (WESTERMANN; HUIGE, 1979). Em 1086, foi registrado no livro Domesday Book que a cervejaria da Catedral de São Paulo produzia o equivalente a cerca de 3150 hectolitros da bebida ao ano (BAMFORTH, 2003).

A inserção da cerveja na Ásia, por meio da civilização ocidental, registrou boa aceitabilidade pela população local. Na América, os imigrantes foram responsáveis por difundir as técnicas de fabricação da cerveja (LI; WANG; LIU, 2017). No Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido por D. João VI, no ano de 1808 (século XIX), durante a permanência da família real portuguesa em território nacional. Neste período, a bebida consumida no país era importada da Europa. Em decorrência da elevada demanda pela bebida, em 1888, foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a primeira cervejaria no Brasil, denominada "Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia" e em 1891 na cidade de São Paulo foi inaugurada a "Companhia Antárctica Paulista" (VENTURINI FILHO, 2018).

A cerveja que era produzida como um *hobby* dos sumérios, tornou-se a bebida alcoólica mais popular (LI; WANG; LIU, 2017) e a terceira mais consumida em todo o mundo, ficando somente atrás do consumo de água e chá (STATISTA, 2020). De acordo com o portal on-line alemão para estatísticas, o Statista (2020), em 2018 foram produzidos mundialmente 1,94 bilhões de hectolitros de cerveja, o que representa um crescimento médio de 49% na produção nos últimos 20 anos. A Associação Brasileira da Indústria da Cerveja – CervBrasil,

reporta que o Brasil produz, em média, 14 bilhões de litros ao ano, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos (CERVBRASIL, 2020).

Em 2020, o consumo médio mundial de cerveja foi estimado em 22,6 L *per capita*. No Brasil, o consumo médio da bebida, por pessoa, é de 50,5 L. Este segmento gera mundialmente uma receita de US\$ 522,299 milhões, representando em média o valor de US\$ 70,18 por pessoa ao ano. Em nosso país, esse montante é de aproximadamente R\$ 233.688,00 milhões, resultante de um gasto médio, por pessoa, de R\$ 1.100,00 (STATISTA, 2020), representando assim 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB), gerando 2,7 milhões de empregos e R\$ 21 bilhões em impostos/ano. O setor cervejeiro, no Brasil, vem avançando de forma sustentada nos últimos 20 anos, visto a taxa média de 19,6% ao ano de novas cervejarias registradas (CERVBRASIL, 2020).

3.1.1 Matérias-primas cervejeiras

A obtenção de cerveja de alto padrão depende da matéria-prima empregada estando relacionada a dois fatores: identidade e qualidade. As principais matérias-primas empregadas no processamento da bebida são cereais malteados, água, lúpulo e levedura (HUGHES, 2003). O êxito das cervejarias, devido a boa aceitação da bebida, depende do conhecimento sobre as características e importância de cada ingrediente, bem como sua aplicação durante o processo (HOWE, 2020).

3.1.1.1 Água

A água é, em termos quantitativos, o principal ingrediente da cerveja, pois representa aproximadamente 90 a 94% do produto final (BUIATTI, 2009). Além de ser uma matéria-prima, a água apresenta diversas outras funcionalidades durante o processamento cervejeiro (STEWART, 2015a), como o emprego na limpeza, resfriamento e geração de vapor para aquecimento (PARKER, 2012). Estima-se que para cada 1 hectolitro de cerveja são empregados de 4 a 11 hectolitros de água, 2/3 são utilizados no processamento e o restante é destinado à limpeza e operações (FILLAUDEAU; BLANPAIN-AVET; DAUFIN, 2006). Por este motivo, as indústrias cervejeiras se fixam em regiões onde haja disponibilidade da mesma em quantidade suficiente e de boa qualidade. O abastecimento de água de uma cervejaria pode ser proveniente de: poços subterrâneos, rios, lagos ou córregos e rede pública, esta quando tratada de acordo com padrões internacionais (PARKER, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que a indústria de alimentos e bebidas devem utilizar água potável e de qualidade (WHO, 2011). A qualidade da água empregada na fabricação de cerveja é determinada pela legislação de cada país. De maneira geral, a água dever ser potável, pura e livre de patógenos, confirmadas por determinações químicas e microbiológicas (WUNDERLICH; BACK, 2009). No entanto, parâmetros adicionais de qualidade como a dureza, alcalinidade e o conteúdo de íons são estabelecidos individualmente pelas cervejarias, visto que estes influenciam em inúmeras características da bebida (STEWART, 2015a). O pH e conteúdo mineral são indicadores fundamentais para conferir bebidas únicas e de sabores característicos, o controle destes parâmetros foram determinantes para a consolidação de algumas cervejarias (WUNDERLICH; BACK, 2009). Venturi Filho (2018) descreve que alguns requisitos básicos de qualidade de água cervejeira são: seguir padrões de potabilidade; apresentar alcalinidade de 50 mg L⁻¹ ou menor (preferencialmente inferior a 25 mg L⁻¹) e possuir concentração de cálcio, em torno, de 50 mg L⁻¹.

3.1.1.2 Malte e adjuntos

As principais atribuições do malte no processamento da cerveja são fornecer os sacarídeos, proteínas, nitrogênio amino livre (FAN) e enzimas que facilitam as reações de fermentação da bebida (BETTENHAUSEN et al., 2018). O termo malte define a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal rico em amido, sob condições controladas (VENTURINI FILHO, 2018). O malte, depois da água, é o ingrediente mais empregado na fabricação da cerveja e suas características e qualidade possuem grande impacto no processamento da bebida e nos atributos do produto final (ULLRICH, 2010).

A cevada é o cereal mais empregado para a obtenção de malte (LINKO et al., 1998), visto que 96% do malte de cevada produzido no mundo é usado na fabricação de cerveja e o restante (3%) destinado à produção de uísque (GUIDO; MOREIRA, 2013). A elevada aplicação deste cereal é resultado de sua composição, principalmente por apresentar níveis adequados de proteína (de 8 a 12% da matéria-seca), baixos níveis de lipídeos e desenvolver altos níveis de enzimas amilolíticas durante a germinação. Outro fator determinante para a cevada ser o cereal mais empregado no processamento da cerveja, é por possuir em sua camada externa a casca que forma um leito de filtração e a auxilia na separação do material insolúvel do extrato (FERREIRA, 2009).

A cor da cerveja, um dos atributos mais importantes da bebida, é resultante da coloração do malte utilizado no processo cervejeiro. Esta etapa ocorre quando o malte é colocado em infusão com água a 60 °C, pois as enzimas presentes na matéria-prima (amilases e proteases) degradam o amido e proteínas, em açúcares, peptídeos e aminoácidos. A degradação do amido, temperatura e tempo são importantes à caramelização de açúcares e reações do tipo Maillard. Estas condições determinam a cor do malte, que variam de uma cor pálida, âmbar até escura (KEUKELEIRE, 2000).

Para muitas jurisdições mundiais, o malte pode ser obtido de outras fontes, como trigo, arroz, milho, aveia, sorgo, centeio e triticale, cereais classificados como adjuntos. Além disso, os xaropes de glicose, xaropes de açúcar de cana e xaropes de açúcar invertido também são considerados adjuntos cervejeiros. Embora esses xaropes sejam diferentes em características químicas, a similaridade é que eles são soluções concentradas de carboidratos facilmente fermentáveis (STEWART, 2015a). Mesmo que o uso das fontes adjuntas tradicionais na fabricação de cerveja já esteja bem estabelecido, existem outras fontes de carboidratos, tais como: beterraba sacarina, cana-de-açúcar, batata, milho, aveia, centeio, mandioca, grão de bico, feijão mungu, quinoa, trigo sarraceno, trigo mourisco, amaranto, soja, banana, mel e lactose. Alguns destes adjuntos já são utilizados na fabricação de cerveja comercial, enquanto outros parecem ter potencial, visto sua composição físico-química e características (GOODE; ARENDT, 2006).

No Brasil, qualquer cereal apto ao consumo humano como alimento, exceto a cevada, submetido ao processo de malteação, deve ser denominado como "malte de " (seguido do nome do cereal que lhe deu origem). Os adjuntos cervejeiros são descritos como, a cevada cervejeira não malteada, cereais malteados ou não-malteados, o mel e os ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares. A substituição do malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro é permitida por legislação em até 45% do peso em relação ao extrato primitivo (MAPA, 2019). No mundo, de 85 a 90% da cerveja é produzida com adjuntos, as variações de quantidade variam de acordo com os continentes e países. Em países europeus o malte pode ser substituição pode ser de 40 a 50% ou mais, enquanto na África os valores permitidos entre 50 e 75% (ANNEMÜLLER; MANGER, 2013; BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017).

Os adjuntos geralmente são empregados como fontes de extrato fermentável de menor custo, como alternativa ao malte de cevada e são importantes se houver considerações fiscais que tornem o uso reduzido de malte na fabricação de cerveja sendo financeiramente

vantajoso (STEWART, 2016). Bogdan e Kordialik-Bogacka (2017) descrevem que a produção de cerveja com adjuntos melhora a estabilidade coloidal, devido ao seu menor teor de proteínas, principalmente quando utilizado no processo, grãos como milho e arroz, que apresentam baixo teor proteico comparados a cevada. A estabilidade coloidal, afetada pelo conteúdo de polifenóis, é aprimorada quando o malte de cevada é substituído por adjuntos, que contêm níveis mais baixos de polifenóis extraíveis. Soma-se também que a substituição do malte por adjuntos torna a cerveja mais leve, o que na maioria dos casos é favorável. Uma diminuição benéfica dos precursores de aromatizantes na cerveja é outro resultado do uso de adjuntos, devido aos níveis mais baixos de nitrogênio. E por fim, alterando os espectros de açúcar e aminoácidos resultantes do uso de matérias-primas não malteadas, podem ser feitas alterações nos perfis de sabor das cervejas, o que fornece aos fabricantes a capacidade de desenvolver produtos finais com novas características sensoriais.

3.1.1.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*), pertencente a ordem das Rosales e família das *Cannabaceae*, é um ingrediente essencial para a fabricação da cerveja. Este é empregado na forma de cones ou *pellets* e conferem amargor e aroma marcante e intenso, além de atuar como conservante natural da bebida (MACHADO; FARIA; FERREIRA, 2019). Estima-se que mais de 97% da produção mundial de lúpulo é destinada à fabricação de cerveja (SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011), o restante é utilizado em aplicações terapêutica e nutracêutica, visto suas propriedades sedativas, antioxidantes e antimicrobianas (HOLUBKOVÁ et al., 2013).

O lúpulo é composto por resinas, óleos essenciais, proteínas, polifenóis, lipídios, ceras, celulose e aminoácidos (ALMAGUER et al., 2014). Para a fabricação de cerveja, os principais compostos de interesse são: o óleo essencial, os α e β -ácidos e os compostos polifenólicos (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015). A importância do lúpulo à indústria cervejeira é devida suas flores (plantas fêmeas não fertilizadas) conterem quantidades significativas das substâncias químicas de interesse, principalmente os α e β -ácidos. Estas flores apresentam as glândulas de lupulina que são responsáveis pela secreção de um pó amarelo, denominado lupulina (Figura 1) que contêm polifenóis e óleos essenciais (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). A composição do lúpulo contribui à cerveja aromas de notas verdes, cítricas, florais, picantes, amadeiradas e frutadas, de ervas entre outros (SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011).

As resinas amargas do lúpulo, majoritariamente α -ácidos (humulona) e β -ácidos (lupulona), representam de 2 a 15% do seu peso seco (BAMFORTH, 2000). Sabe-se que α -ácidos, fração mais expressiva e mais importante devido seu potencial de amargor (BAMFORTH, 2000), é composta por uma mistura de cinco humulonas análogas, sendo os seus principais constituintes a humulona (35 - 70% do total de α -ácidos), a cohumulona (20 - 55%), a adhumulona (10 - 15%), a prehumulona (1 - 10%) e a poshumulona (1 - 3%) (JASKULA et al., 2007).



Fonte: Adaptado de Durello; Silva e Bogusz (2019).

Durante a fervura do mosto, os α - ácidos se isomerizam termicamente em iso- α ácidos por meio de uma contração em anel do tipo acilo, resultando na geração de dois isômeros epiméricos: cis-iso- α -ácidos e trans-iso- α - ácidos (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012; HUGHES, 2000). Os iso- α -ácidos (isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona) são os responsáveis pelo sabor amargo típico da cerveja, bem como pela estabilidade das propriedades da espuma e da preservação da cerveja, devido às propriedades antibacterianas apresentadas pelas isohumulonas (MACHADO; FARIA; FERREIRA, 2019).

Os β -ácidos são análogos triprenilados dos α -ácidos, estes compõem aproximadamente 10% dos lúpulos comerciais (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015). A composição da fração dos β -ácidos corresponde a uma mistura de análogos de lupulona (30 - 55% do total de β -substâncias), colupulona (20 - 55%), adlupulona (5 - 10%), prelupulona (1 - 3%) e poslupulona (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). As lupulonas são estruturalmente similares as humulonas, sendo análogos triprenilados. Estas se caracterizam por serem menos ácidas quando comparadas às humulonas e também são potenciais precursoras de compostos de gosto amargo para cerveja (INTELMANN et al., 2011).

Os óleos essenciais, contêm basicamente hidrocarbonetos, compostos oxigenados e sulfurados, são uma fração relativamente pequena e volátil que representa 0,5 a 3,0% dos cones de lúpulo secos (SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011). A composição dos óleos essenciais é complexa, pois mais de 400 compostos químicos diferentes já foram identificados (HANKE; et al., 2008; HERRMANN et al., 2008; ROBERTS; DUFOUR; LEWIS, 2004). O monoterpeno, mirceno e os sesquiterpenos, α -humuleno e β -cariofileno, compõem a maior parte do óleo essencial, juntamente com um grande número de outros terpenos, como linalol, farneceno, limoneno, pineno e geraniol, entre outros álcoois, ácidos, cetonas e aldeídos (ERI et al., 2000; KATONO; YONEZAWA; INUI, 2018). A quantidade e composição química do óleo essencial do lúpulo depende da variedade, porém a composição também pode ser influenciada por fatores agronômicos, como local de crescimento ou aspectos sazonais (KOVAČEVIČ; KAČ, 2002).

Os polifenóis são metabólitos secundários do lúpulo e representam até 4% do peso total da planta. Estes são encontrados como monômeros, dímeros, trímeros e estruturas complexas, associadas a componentes nitrogenados. Semelhante à maioria dos constituintes do lúpulo, o nível de polifenóis depende de sua variedade (ALMAGUER et al., 2014). O lúpulo pode contribuir com cerca de um terço do total de polifenóis da cerveja, que contribuem para a preservação e estabilização das características organolépticas da bebida, devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e de estabilização da espuma (KEUKELEIRE, 2000; MACHADO; FARIA; FERREIRA, 2019). Os principais polifenóis presentes no lúpulo são: proantocianidinas, flavonóis glicosilados e flavonoides prenilados (xanotohumol e o desmetilxanthohumol) e prenilflavanonas, (isoxanthohuol, 6-prenilnaringenina e 8-prenilnaringenina) (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015). Com exceção das proantocianidinas, os demais polifenóis conferem à cerveja sabor e sensações no paladar e, são capazes de melhorar a palatabilidade da bebida, e, em combinação com essências de aroma de lúpulo, propriedades sensoriais, como amargor, corpulência e adstringência (SANZ et al., 2019).

3.1.1.4 Levedura

As leveduras, classificadas no reino dos fungos, são microrganismos eucarióticos de célula única (BENNETT, 1998; SHURSON, 2018). As células de levedura variam de 4 a

14 μ m de comprimento e de 3 a 10 μ m de largura (WESTERMANN; HUIGE, 1979). Há milhares de anos, as espécies de levedura do complexo *Saccharomyces sensu stricto* são utilizadas para fabricação de alimentos e bebidas, sendo responsáveis pela conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono (CO₂) por meio da fermentação (SICARD; LEGRAS, 2011).

A cerveja é o resultado da transformação do mosto e do lúpulo por leveduras em condições de fermentação. Embora o lúpulo adicionado contribua principalmente para as características de sabor e aroma à cerveja, a levedura também impacta significativamente a bebida (LIU, 2015), influenciada pela cepa da levedura e as condições de fermentação aplicadas no processamento cervejeiro (STEWART, 2014). As reações que a levedura realiza durante o processamento são: catabolismo de açúcares, nitrogênio assimilável, ácidos orgânicos e outras substâncias (ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, compostos fenólicos voláteis, terpenóides e compostos voláteis de enxofre) e autólise de leveduras (LIU, 2015). A tipificação da levedura utilizada durante a fermentação é importante pois serve para classificar as cervejas, como *ale* e *lager* (LI; WANG; LIU, 2017). As leveduras são distintas e a tipificação é realizada pela capacidade que estas possuem para fermentar a melibiose (dissacarídeo redutor formado por uma ligação α -1,6 entre galactose e glicose) e sua localização no tanque, como fermentação na parte superior ou na parte inferior (HELLBORG; PIŠKUR, 2009).

As cervejas do tipo *lager* são produzidas com leveduras de baixa fermentação denominadas *Saccharomyces pastorianus* (*Saccharomyces uvarum (carlsbergensis*)) (FERREIRA, 2009), que apresentam crescimento máximo a 34 °C. Os genes destas leveduras produzem enzimas (melibiase) que fermentam a melibiose (STEWART, 2015b). A fermentação com este tipo de levedura dura em média de 7 a 12 dias em temperaturas de 6 a 15 °C (HARRISON, 2009). Ao final da fermentação primária, estas floculam e se depositam na base do fermentador (VENTURINI FILHO, 2018). As cervejas do tipo *lager* são maturadas a frio (0 °C) durante várias semanas (3 a 5 semanas) podendo chegar até vários meses (HARRISON; ALBANESE, 2017). Este tipo de fermentação proporciona a menor produção de éster e mais enxofre (BOULTON, 2020). A cerveja obtida pela fermentação com *Saccharomyces pastorianus* é mais aceita pelos consumidores no mundo, pois o gosto das matérias-primas ficam mais pronunciadas, como o aroma doce do malte e o frescor do lúpulo (LI; WANG; LIU, 2017).

A levedura de alta fermentação, a *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na fermentação das cervejas do tipo *ale*, esta não é capaz de fermentar a melibiose. O crescimento ótimo deste tipo de levedura é em temperatura de aproximadamente 37 °C. As temperaturas

ótimas, para a fermentação do mosto (5 a 7 dias), ocorrem entre 18 a 27 °C (HARRISON, 2009; STEWART, 2015b). Diferentemente das leveduras do tipo *lager*, as leveduras *ale* realizam a fermentação em temperaturas mais altas e a maturação realiza-se em poucos dias (HARRISON; ALBANESE, 2017). Outra distinção deste tipo de levedura é que ao final da fermentação estas leveduras transformam-se em aglomerados de células que são adsorvidas pelas bolhas de CO₂, sendo carregadas para a superfície do mosto e, posteriormente retiradas para sua reutilização no processo (STEWART, 2014). De um modo geral, esse tipo de cerveja possui mais compostos ésteres e outros produtos secundários de sabor e aroma (BOULTON, 2020) que a tornam uma bebida com um sabor diferenciado e com características frutadas (LI; WANG; LIU, 2017).

3.1.2 Processamento cervejeiro

O processamento da bebida (Figura 2) abrange etapas complexas que exigem operações unitárias capazes de transformar: cereais, água, lúpulo e levedura em cerveja. No início, os cereais utilizados na produção de cerveja não contêm quantidades suficientes de açúcares fermentáveis. Desta maneira, é necessário o emprego de etapas como a maltagem e moagem dos grãos, para que durante a fermentação os carboidratos liberados sejam convertidos a etanol e CO₂. Além disso, a cerveja produzida pode ser maturada para o desenvolvimento de sabor e aroma antes das etapas de finalização do produto, como filtragem, pasteurização e envase (HARRISON, 2009). Desta maneira, o processamento da cerveja consiste em basicamente quatro estágios: produção do mosto, fermentação, condicionamento/maturação e envase (LIVENS, 2015). A obtenção da cerveja envolve processos relativamente de alto custo e cada etapa possui a devida importância às propriedades e qualidade da bebida (WUNDERLICH; BACK, 2009).

3.1.2.1 Cevada: limpeza, classificação e armazenamento

O processo inicia-se com o recebimento dos grãos de cevada na indústria, que passam pela primeira etapa de limpeza, a fim de remover contaminantes que acompanham o cereal desde a colheita. Os principais contaminantes são sementes, ervas daninhas, grãos quebrados, palha, areia, poeira e objetos estranhos, como ferro e metais. Para essa limpeza, são empregados eletroímãs que retiram partículas de ferro e metal, as peneiras que permitem a separação de partículas pequenas (areia e sementes) e os cilindros rotativos para selecionar e remover grãos quebrados e outros indesejados (WESTERMANN; HUIGE, 1979).



Figura 2 - Fluxograma do processamento cervejeiro

Fonte: Adaptado de HARRISON (2009).

A classificação da cevada para maltagem é realizada por meio do tamanho do grão (largura) em diferentes categorias, por exemplo, tamanho de grãos menor de 2,2 mm, 2,2 a 2,5 mm e maior de 2,5 mm. Os grãos quebrados e de largura inferior a 2,2 mm, são removidos por peneiras e podem ser coletados em um silo para serem destinados à alimentação animal. A cevada que está apta à maltagem, é armazenada em silos, podendo estes conter sistemas de pesagem que controlam a quantidade de grãos armazenados e que auxiliam nos registros de estoque (GUIDO; MOREIRA, 2013).

3.1.2.2 Germinação

A germinação é a etapa onde as enzimas (α-glucanase e pentosanases) hidrolisam as paredes das células e de algumas proteínas (proteinase) do endosperma amiláceo, reserva alimentar do grão, e como consequência este grão torna-se quebradiço (BAMFORTH, 2000). Para tanto, durante a germinação, o grão tem temperatura controlada, sob fluxo de ar, entre 15 e 20 °C por até 48 h (HARRISON, 2009). A umidificação é realizada por jatos de água de atomização, que podem ser resfriados por refrigeração. Também é comum e importante a rotação suave dos grãos para garantir a homogeneidade desta etapa (SWANSTON et al., 2014).

As enzimas hidrolíticas, que catalisam as modificações dos grãos, são derivadas principalmente da camada de escutelo e aleurona (Figura 3). Nos estágios iniciais da germinação, o escutelo libera inúmeras enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da parede celular, proteínas e grânulos de amido do endosperma. Além das enzimas, o escutelo libera o hormônio giberelina, que estimula a produção e liberação de inúmeras enzimas hidrolíticas pela camada de aleurona (GUIDO; MOREIRA, 2013). A α -amilase está ausente na aleurona hidratada, e sua síntese e liberação são novamente desencadeadas independentemente da presença de giberelina. Estima-se que no malte, aproximadamente 85% dessa enzima se origine da camada de aleurona e 15% da camada de escutelo. A β -amilase da cevada, presente em sua forma inativa no endosperma amiláceo da cevada, é liberada gerando a hidrólise dos componentes do grão (ZARNKOW, 2014).

As proteases e carboxipeptidases também se acumulam no endosperma amiláceo durante a germinação. A β -glucana solubilase é um tipo de carboxipeptidase que converte a matriz proteica da parede celular insolúvel em β -glucanas solúveis. As características químicas das β -glucanas, como a alta massa molar e viscosidade, geram problemas no processamento cervejeiro, pois dificultam a separação do mosto e a filtração da cerveja. Essas são hidrolisadas em glucanos e glicose de baixo massa molar pelas endo- β -glucanases e β -glucosidases. Tais

enzimas desenvolvem-se lentamente no processo de maltagem e são levemente sensíveis ao ácido giberélico. Logo, este ácido pode ser considerado um regulador da germinação, assim como o bromato de potássio pode atuar acelerando a taxa de modificação do grão (GUIDO; MOREIRA, 2013).



Fonte: Adaptado de Stewart (2015a).

No final da germinação, espera-se que as paredes celulares do endosperma estejam uniformes e totalmente degradadas, porém a integridade dos grânulos de amido deve ser mantida. Além disso, as enzimas amilolíticas (dextrinase, α -amilase e β -amilase), acumuladas durante a etapa de germinação devem estar ativas e 40% a 50% das proteínas do grão, solubilizadas. O produto resultante da germinação do grão é denominado "malte verde" (MACLEOD; EVANS, 2015).

3.1.2.3 Secagem e moagem do malte

A secagem possui várias funções, entre elas: secar o grão e interromper reações que contribuem para sua modificação, preparar o grão para armazenamento, preservar a atividade das enzimas necessárias para a trituração, remover componentes aromatizantes e agregar características desejadas de cor e sabor (SWANSTON et al., 2014). Uma quantidade de 100 kg de cevada resulta em cerca de 160 kg de malte verde e, cerca de 80 kg de malte após a secagem (WUNDERLICH; BACK, 2009). A secagem é realizada primeiramente pela remoção do excesso de umidade do "malte verde", onde ocorre a redução de 44 para 12% da umidade. Com um fluxo de ar ascendente, esse processo leva cerca de 12 h para passar pelo leito de um forno

de plataforma única e 24 h para um forno de plataforma dupla a temperatura média de 40 °C (HARTMEIER e REISS, 2002).

Essa fase de secagem é rápida e é chamada de "secagem livre". Nesta fase, a respiração e atividade biológica do grão são interrompidas, decorrente da ausência de água para as funções básicas do vegetal. A retirada da água também impede a deterioração bacteriana e auxilia na preservação das enzimas e substratos necessários na etapa de moagem. Além disso, durante a primeira fase de secagem, alguns dos componentes característicos do sabor e aroma são sintetizados em uma série de reações químicas e bioquímicas complexas. Entre essas reações, ocorre a hidrólise de proteínas e liberação de aminoácidos suscetíveis a interação com açúcares (Reação de Maillard), formando as melanoidinas, substâncias coloridas e com sabor característico (WESTERMANN; HUIGE, 1979).

Na segunda fase da secagem, ocorre a redução da umidade do malte de 12% para 4%, este processo é mais lento e, geralmente chamado de fase de "taxa de queda". No final do processo de secagem, as temperaturas do forno podem ser elevadas a 100 °C por 1 ou 2 h na "fase de cura", seguidas de um período de resfriamento para atingir uma temperatura adequada para o armazenamento (GUIDO; MOREIRA, 2013). O sabor do produto final (cerveja) pode ser influenciado pela quantidade de compostos aromáticos não enzimáticos gerados pelo calor durante o processo de secagem e torrefação. As cervejas escuras são produzidas a partir de maltes submetidos ao processo de torra, que confere um sabor agradável, enquanto que o malte menos torrado é usado para fazer cervejas mais claras (HARRISON, 2009).

As condições de secagem são um dos contribuintes mais significativos para o caráter final do malte, visto que o controle cuidadoso dessa etapa permite que vários tipos especiais de malte sejam produzidos (Tabela 1). Maltes com cores de 2 a 30 ° EBC - *European Brewing Convention*, podem ser produzidos em um forno normal sem a necessidade de torrefação. Os produtos torrados têm coloração mais alta, entre 35 e 1500 ° EBC e podem ser produzidos a partir de cevada, malte ou malte verde. Esses produtos são dispostos em torrefadores especiais a altas temperaturas, que são responsáveis por destruir toda atividade enzimática, porém produzem maltes com compostos de sabores e cores característicos e fortes (MACLEOD; EVANS, 2015).

A moagem do malte, operação puramente mecânica, tem influência direta sobre a rapidez das transformações físico-químicas, rendimento, clarificação e qualidade do produto final (cerveja) (EßLINGER; NARZIß, 2009; VENTURINI FILHO, 2018). A moagem do malte expõe o endosperma amiláceo do grão, o que torna os carboidratos disponíveis à fermentação (HARRISON, 2009) e separa a casca dos grãos que auxiliarão a filtração do mosto

(BAMFORTH, 2006). A moagem pode ser realizada em moinhos secos, úmidos ou de martelos. A redução das partículas é realizada com o uso de rolos de ferro fundido lisos ou com ranhuras que giram na mesma velocidade ou em velocidades diferentes entre si (HARTMEIER; REISS, 2002).

Malte especial	Cor EBC	Características de sabor
Ale	4 – 8	Malte, noz, doce e torrado
Vienna	7 - 10	Granulado, malte sutil
Munich	15 - 25	Granulado, malte marcante
Pale	4,5 - 4,8	Tipo biscoito
Caramalt	25 - 35	Doce, nozes, cereais e caramelo
Brown	20 - 120	Torrado e amargo
Crystal	100 - 300	Malte e caramelo
Amber	40 - 60	Noz, caramelo e frutado
Chocolate	900 - 1200	Mocha, melaço e chocolate
Black	1250 - 1500	Esfumaçado e café
Cevada torrada*	1000 - 1550	Queimado e enfumaçado

Tabela 1 - Atributos típicos para descrição de cores e sabores de maltes especiais.

* Não descrito estritamente como um malte, mas incluído para fins didáticos.

Fonte: Adaptado de Hughes (2003) e Macleod e Evans (2015).

3.1.2.4 Mosturação

A mosturação objetiva dissolver em água pequenas quantidades das substâncias solúveis no malte e adjuntos, visando transformar o amido insolúvel e algumas proteínas para formas solúveis usando as enzimas (INGLEDEW; HYSERT, 1994). Assim, parte do amido é hidrolisada originando os açúcares simples (maltose, glicose, maltotriose e maltotetraose) e as dextrinas (BOULTON, 2020). Existem várias classificações de compostos extraídos durante a etapa de mosturação. Em um sentido geral, esses compostos podem ser agrupados da seguinte forma: carboidratos, proteínas, lipídios, polifenóis, minerais e compostos que conferem cor (melanoidinas e/ou outros compostos de cor e sabor desenvolvidos durante as etapas anteriores) (HOLBROOK, 2020).

Durante o período inicial de mosturação, são utilizadas temperaturas entre 35 e 50 °C, condições adequadas à ação das proteases e fosfatases que hidrolisam proteínas e

aminoácidos, liberando compostos nitrogenados. Após um período de tempo, a temperatura da mistura aumenta para 50 a 65 °C, onde ocorre a atuação da β -amilase que converte o amido em maltose e dextrinas. Ao final, a temperatura é elevada entre 65 e 75 °C, de modo que a α -amilase a sacarificação (conversão do amido em açúcares fermentáveis) seja concluída (ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2003). Após a conclusão da etapa de mosturação, a temperatura é regulada para 75 °C objetivando inativar enzimas presentes no processo (HARRISON, 2009). A escolha do tipo de mosturação ou condições de tempo e temperatura a ser aplicados durante a atuação enzimática dependerá da composição e do tipo de cerveja desejada (VENTURINI FILHO, 2018).

3.1.2.5 Filtração e fervura do mosto

A filtração geralmente é realizada em tina de filtração ou filtro prensa (ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2003). As tinas de filtração possuem fundo plano e falso projetado com ranhuras que ocupam 8 a 12% da área da superfície. A tina é projetada para utilizar a casca do malte como um auxiliar de filtração (INGLEDEW; HYSERT, 1994). Estas cascas e outros sólidos do mosto sedimentam no fundo falso da tina, formando assim um "filtro natural". A separação de sólidos e líquido do mosto ocorre pela ação desses "filtros naturais" e, desta forma é obtido um mosto claro e de excelente qualidade, que possui concentrações de extrato de até 18%. Posteriormente, o "filtro natural" é lavado com água a 75 °C e é retirado um extrato residual com concentrações de 11 a 12% (ZARNKOW, 2014).

Após a filtração do mosto, o conteúdo filtrado é transferido para um tanque de aquecimento (tina de fervura) e adicionado lúpulo antes do início da fervura. A adição do lúpulo é realizada na forma de flores, extrato ou *pellets* (ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2003). A ebulição do mosto, que ocorre entre 1 e 2 h, tem várias funções, entre elas: eliminação da maioria dos microrganismos restantes após o esmagamento; inativação das enzimas remanescentes; extração dos constituintes do lúpulo (óleos essenciais e resinas); precipitação das substâncias que ocasionam a turbidez (complexos proteínas-polifenóis); estímulo do desenvolvimento da cor; remoção dos compostos voláteis indesejados e concentração do mosto após evaporação da água (HARRISON; ALBANESE, 2017). Durante a etapa de fervura, a adição do lúpulo permite que os α -ácidos sofram isomerização a iso- α -ácidos, que fornecem o amargor ao mosto (PARKER, 2012).

3.1.2.6 Clarificação do mosto e resfriamento

No final da fervura, o mosto apresenta coloração clara, mas contém sólidos em suspensão, como resíduos do lúpulo e os complexos de proteínas-polifenóis, resinas e taninos que precipitaram (denominado *trub*) (BRIGGS et al., 2004). O método usual para a remoção do *trub* é através da sedimentação em forma de redemoinho (forças centrípetas) via fluxo tangencial em tanques cilíndricos que comportam o mosto aquecido. O *trub* se acumula no cone, localizado no centro do tanque, podendo o mosto ser removido por decantação. Também é possível remover o *trub* por centrifugação ou filtração (INGLEDEW; HYSERT, 1994).

Posterior a retirada do *trub*, o mosto deve ser resfriado usando trocadores de calor para garantir condições ótimas de temperatura exigidas pela levedura no processo de fermentação (INGLEDEW; HYSERT, 1994). Tradicionalmente, as temperaturas de resfriamento são de 18 a 27 °C para o mosto de cervejas tipo *ale* e de 6 a 15 °C para os mostos de cervejas tipo *lager* (HARRISON, 2009). O resfriamento do mosto deve ser realizado rapidamente e sob condições assépticas para interromper as reações químicas e minimizar as chances de crescimento microrganismos contaminantes (BRIGGS et al., 2004).

3.1.2.7 Fermentação e recuperação da levedura

Durante a fermentação, as leveduras produzem álcool, CO₂ e alguns constituintes de sabor adicionais, após a conversão química de açúcares fermentáveis do mosto (ZARNKOW, 2014). A quantidade de etanol formado está diretamente relacionada à concentração de açúcar fermentável presente no mosto e isso é monitorado na cervejaria. No processo de inoculação da levedura as células são expostas a um suprimento de nutrientes. Nessa fase, a levedura, passa por um curto período de adaptação antes que o crescimento celular inicie. Após a fase inicial, o crescimento acelera gradualmente até atingir taxa máxima (fase exponencial ou logarítmica). Durante o seu crescimento (fase exponencial), há diminuição da densidade do mosto, aumento da concentração celular, formação de etanol e CO₂ (BOULTON, 2020).

A taxa de fermentação é proporcional à temperatura, que por sua vez é delimitada para diferentes tipos de levedura, quanto mais alta a temperatura, mais rápida será a fermentação. Normalmente, temperaturas brandas são utilizadas para cervejas tipo *lager* (6 a 15 °C), enquanto que temperaturas mais elevadas são para cervejas tipo *ale* (18 a 27 °C) (HARRISON, 2009). As diferenças de temperatura na fermentação impactam os compostos de

sabor da bebida, esta composição pode sofrer variações em função da natureza das leveduras utilizadas, que definem os diferentes tipos de cerveja. A concentração de etanol aumenta à medida que a fermentação prossegue, assim como a do CO₂. Este último é um gás e depois que o líquido atinge o ponto de saturação, o excesso é perdido na atmosfera. O gás dissolvido permanece na cerveja, onde produz a carbonatação. Em grandes cervejarias, o excesso de CO₂ é coletado e reaproveitado para ajustar os níveis de carbonatação da cerveja finalizada. Durante a fermentação, há um aumento de aproximadamente quatro a cinco vezes no número de células de levedura. Para a maioria das cervejas, a interrupção do crescimento de leveduras indica que todo o açúcar fermentável foi consumido, indicando o final da fermentação (BOULTON, 2020).

A sala de fermentação deve ser mantida de maneira limpa para reduzir possíveis problemas de contaminação e deve ser mantido a uma temperatura e umidade constantes para manter a taxa de crescimento desejada da levedura. As cubas de fermentação podem ser revestidas de vidro, aço inoxidável ou alumínio (HARRISON; ALBANESE, 2017). Durante a fermentação, as leveduras apresentam comportamentos distintos: algumas cepas tendem a flocular e, como resultado, retêm o CO₂, chegando ao topo do tanque de fermentação; outras, que não floculam, depositam-se no fundo do tanque (ROSENTRATER; EVERS, 2018). Ao final da etapa de fermentação as leveduras podem ser recuperadas para sua futura reutilização, podendo ser removidas por decantação, centrifugação ou a combinação de ambas operações. (WESTERMANN; HUIGE, 1979).

3.1.2.8 Maturação e resfriamento

No final da fermentação, a "cerveja verde", que foi separada da levedura é transferida para tanques de madeira (por exemplo, carvalho) ou aço revestido. Na fabricação de cerveja tradicional, a maturação da cerveja ocorre durante o armazenamento entre 0 e 2 °C por várias semanas. As cervejas do tipo *lager* normalmente são maturadas por períodos de tempo ligeiramente mais longos que as cervejas do tipo *ale* (cerca de 5 dias). Esta etapa permite que a cerveja desenvolva seu sabor final, cor e características corporais, como textura e viscosidade (HARRISON; ALBANESE, 2017).

Os tanques de armazenamento durante a maturação são fechados sob pressão fazendo com que o CO₂ seja dissolvido na bebida devido as temperaturas reduzidas (0 e 2 °C). Quando a concentração de CO₂ alcança 0,48% para *chopp*, 0,50% para cerveja em lata, 0,55% para cerveja em garrafa descreve-se que a bebida está pronta para consumo. Além disso, processos de degradação de compostos ocorrem durante a maturação, dentre estes a remoção

do diacetil e pentanodiona são os principais, uma vez possuem o gosto amargo e rançoso que geralmente não são aceitos pelos consumidores (KEUKELEIRE, 2000; VERHAGEN, 2010). O fim da etapa de maturação pode ser identificada quando o grau de atenuação atinge seu valor máximo, ou seja, quando todos os açúcares fermentáveis do mosto foram convertidos em etanol (HARTMEIER; REISS, 2002).

3.1.2.9 Finalização: clarificação, estabilização e carbonatação

Após a maturação, espera-se que a cerveja apresente sabor e nitidez adequados. No entanto, após a maturação, a cerveja ainda contém células de levedura, proteínas precipitadas, microrganismos, matéria coloidal (complexos proteínas-polifenóis) e outras substancias indesejáveis ao produto final (VENTURINI FILHO, 2018, WESTERMANN; HUIGE, 1979). As partículas presentes na cerveja (levedura, partículas de proteína - tanino e resinas de lúpulo) que ocasionam a turbidez são removidas por filtração. Existem quatro técnicas básicas para clarificação, que podem ser empregadas individualmente ou em combinação, sendo elas: a sedimentação por gravidade, clarificantes, centrifugação e filtração (VENTURINI FILHO, 2018; WESTERMANN; HUIGE, 1979).

A sedimentação por gravidade é o método mais simples para a obtenção de uma cerveja límpida. Todavia, este método não apresenta boa eficiência, pois a cerveja engarrafada ainda pode conter sólidos em suspensão, como massa de leveduras (autólise das células). Este processo de clarificação exige elevado investimento com a limpeza do fundo dos tanques e registra altas perdas do produto final. O princípio da centrifugação está fundamentado na lei de Stokes, que determina que a velocidade de sedimentação das partículas é influenciada pela viscosidade do líquido, diâmetro das partículas e diferença das densidades entre as partículas e o líquido (VENTURINI FILHO, 2018). Em relação aos agentes clarificantes e estabilizantes, os principais empregados no processamento cervejeiro são: cola de peixe (ictiocol ou *isinglass*), ácido tânico, silicatos, enzimas (proteases), hidrogel de sílica, xerogel de sílica, alginatos e polivinilpolipirrolidona (PVPP). Estes agentes apresentam estruturas químicas capazes de ligarse as células das leveduras e complexos proteínas-polifenóis, entre outros (WRAY, 2020).

A filtração auxilia na melhora da estabilidade biológica e físico-química da cerveja (EßLINGER; NARZIß, 2009). A filtração nas cervejarias é mais comumente realizada pela utilização de auxiliares filtrantes, como a terra diatomácea (também conhecida de *kieselguhr*) e perita (VENTURINI FILHO, 2018; WESTERMANN; HUIGE, 1979). Estas substâncias são usadas em pós e formam camadas de filtro altamente porosos, permitindo assim o fluxo

relativamente livre de cerveja. Os filtros *kieselguhr* são compostos por material fóssil ou esqueletos de espécies microscópica de água doce ou salgadas (BERNARDI et al., 2019). A perita é um mineral de origem vulcânica composta majoritariamente de silicato de alumínio (VENTURINI FILHO, 2018). Uma das desvantagens deste tipo de auxiliares de filtração é a geração de resíduos (material não biodegradável), pois estes tipos de filtros são rapidamente saturados e causam risco à saúde humana pela inalação da poeira (BAMFORTH, 2006). A filtração também pode ser realizada através de filtros de folhas e de celulose (WESTERMANN; HUIGE, 1979).

O conteúdo de CO₂ da cerveja contribui para muitas propriedades, como nas características sensoriais (efeito refrescante) e de estabilidade (físico-química, microbiológica e espuma) (LANGSTAFF; LEWIS, 1993). Desta maneira, o método mais comum de carbonatação é adicionar novamente o CO₂ ao produto (HARRISON, 2009). Por fim, este CO₂ adicionado, em algumas cervejarias, provém da fermentação e a coleta desse gás pode render de 2 a 2,5 kg por hectolitro de cerveja (EßLINGER; NARZIß, 2009; GIRARDON, 2019).

3.1.2.10 Envase e pasteurização

As embalagens para o envase da cerveja utilizadas pelas indústrias são: latas, garrafas e barris. Para aumentar o prazo de validade da cerveja enlatada ou engarrafada, esta geralmente é pasteurizada (HARRISON, 2009). O objetivo da pasteurização de cervejas é reduzir a atividade microbiana e enzimática encontrada no produto final, prolongando assim seu prazo de validade para mais de 6 meses. O método consiste na aplicação de temperaturas amenas durante alguns segundos ou minutos para manter a maior parte de seu valor nutricional e propriedades organolépticas. Posteriormente, a cerveja retorna gradualmente à temperatura ambiente através de um resfriamento adicional (BERNARDI et al., 2019). A pasteurização na cervejaria, na prática, pode ser dividida em duas categorias: a pasteurização *flash* e a pasteurização em túnel (VENTURINI FILHO, 2018).

Na pasteurização *flash* a cerveja circula por trocadores de calor de placas, sendo aquecida a 68 - 74 °C por 30 a 60 s a um fluxo contínuo. A cerveja pasteurizada é conduzida em contracorrente com a cerveja que entra no pasteurizador, enquanto a pressão é reduzida, para esfriá-la novamente (ZARNKOW, 2014). Este tipo de pasteurização tem como vantagens a velocidade com que o processo é conduzido e o tempo reduzido de exposição às temperaturas, o que pode manter a qualidade dos compostos da bebida (BERNARDI et al., 2019). Devido a técnica ser realizada antes do envase, é empregada principalmente em barris e vem sendo

empregada também para embalagens pequenas (garrafas PET e de vidro). As embalagens utilizadas para o envase de cerveja após esta técnica devem ser estéreis, bem como as tampas para garantir o sucesso deste tratamento térmico (VENTURINI FILHO, 2018).

A pasteurização em túnel é o processo mais comum nas cervejarias, pois as garrafas ou latas cheias e seladas são transportadas através de zonas de aquecimento e resfriamento em máquinas de um ou dois andares, enquanto a água, sob temperaturas específicas, é pulverizada. Embora os transportadores possam diferir, as embalagens são conduzidas em um fluxo constante, uniforme e controlado através do túnel (INGLEDEW; HYSERT, 1994). Durante a pasteurização em túnel as temperaturas são de 60 °C por no máximo 20 min (WESTERMANN; HUIGE, 1979).

3.1.3 Composição da cerveja e seu impacto na saúde humana

A cerveja, embora não possa ser classificada como uma importante fonte nutricional, possui em sua composição macro e micronutrientes com efeitos fisiológicos no corpo humano (GONZÁLEZ-SANJOSÉ; RODRÍGUEZ; VALLS-BELLÉS, 2017). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), do inglês *United States Department of Agriculture*, 100 g de cerveja contém em média 43 kcal, composta por 92 g de água, 0,5 g de proteínas, 3,6 g de carboidratos, 4 g de etanol, 4 mg de cálcio, 0,02 mg de ferro, 6 mg de magnésio, 14 mg de fósforo, 27 mg de potássio, 4 mg de sódio, 0,01 mg de zinco, 0,005 mg de cobre, 0,6 µg de selênio, 0,005 mg de tiamina (vitamina B1), 0,025 mg de riboflavina (vitamina B2), 0,513 mg de niacina (vitamina B3), 0,046 mg de piridoxina (vitamina B6), 10,1 mg de colina (vitamina B8), 0,02 µg de cobalamina (vitamina B12) e 6 µg de ácido fólico, entre outros constituintes como aminoácidos, compostos fenólicos e polifenóis (USDA, 2020). Comitês, formados por profissionais da área de todo o mundo, descreveram que o consumo moderado de cerveja (1 copo para mulheres e 2 copos para homens, cada copo equivale a 12 g de etanol) reduz o risco de doenças cardiovascular (DE GAETANO et al., 2016; POLI et al., 2013).

No entanto, a cerveja também é descrita por conter compostos antinutricionais e contaminantes que ocasionam diversos problemas a saúde humana, como nitrosaminas (FAN; LIN, 2018), carbamato de etila (LI et al., 2017a), amina biogênica (LORENCOVÁ et al., 2020), micotoxinas (BAUER et al., 2016), metais tóxicos (MENA et al., 1996; POHL, 2009) entre outros. A cerveja não é considerada uma matriz ideal para o crescimento de microrganismos por conter diversos inibidores, como os compostos do lúpulo (α e β -ácidos), álcool, dióxido de carbono e dióxido de enxofre, poucos nutrientes, oxigênio e o baixo pH. Porém, o

processamento da cerveja apresenta alguns riscos de segurança microbiológica devido a contaminação por bactérias e fungos toxigênicos. Além disso, é frequentemente relatada a contaminação das matérias-primas cervejeira pelos metabólitos fúngicos, denominadas micotoxinas (BAMFORTH, 2006; DAVIES, 2006).

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários, de baixa massa molecular, produzidos por fungos filamentosos toxigênicos que apresentam efeito tóxico à saúde humana e animal (BENNETT; KLICH, 2003). Os fungos se proliferam em diversos cereais e grãos, principalmente no amendoim, milho, trigo, cevada, sorgo, aveia e arroz, onde geralmente encontram substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento (KIRINČIČ et al., 2015; MILLER, 1995). A produção de micotoxinas ocorre quando os fungos são submetidos a condições de estresse. Nos grãos armazenados a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos (SHWAB; KELLER, 2008).

Os principais gêneros fúngicos produtores de micotoxinas durante o armazenamento são: *Aspergillus, Claviceps* e *Penicillium*. Nas condições de campo o estresse pode ocorrer por condições climáticas, pragas, entre outros, que também resultam em perda de vigor da planta, predispondo-a a colonização de fungos toxigênicos (MAGAN; ALDRED, 2007). Os fungos do gênero *Fusarium*, que geralmente infectam os grãos na lavoura, são fitopatógenos que necessitam de alta umidade, em torno de 20% e temperatura amena. Apesar da menor incidência, é possível o aparecimento de micotoxinas produzidas por *Fusarium* na fase da pós-colheita (HOLLINGER; EKPERIGIN, 1999).

Estas micotoxinas podem ingressar na cadeia alimentar humana de duas formas, diretamente, através do consumo de alimentos de origem vegetal, como cereais (SOLEIMANY; JINAP; ABAS, 2012), café (BENITES et al., 2017), especiarias (ZINEDINE et al., 2006), oleaginosas (BHAT; REDDY, 2017; RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002), frutas (PIQUÉ et al., 2013) e derivados, como cerveja (BAUER et al., 2016), vinhos (PIZZUTTI et al., 2014) e sucos (ZOUAOUI et al., 2015) e/ou indiretamente, por meio da ingestão de alimentos de origem animal, como leite (IQBAL; ASI, 2013), salame (MONACI et al., 2005), carne e ovos (IQBAL et al., 2014b), devido aos animais de criação serem alimentados com rações previamente contaminadas com micotoxinas.

As principais micotoxinas estudadas devido aos riscos que oferecem à saúde de humanos e animais são: aflatoxinas (AFLAs), OTA, tricotecenos (TCTs), fumonisinas (FBs), ZEA e patulina (PAT), pois causam efeitos crônicos como carcinogenicidade, genotoxicidade, hepatoxicidade, teratogenicidade, nefrotoxicidade e imunotoxicidade. Os efeitos agudos são rapidamente manifestados e perceptíveis, podendo ocasionar diarreia, hemorragias, vômito, distúrbios gastrointestinais e morte, devido a ingesta elevada destes contaminantes que causam alterações irreversíveis às células (BHAT; RAI; KARIM, 2010).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura – FAO (tradução do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e colaboradores é estimado que, por ano, 25% da produção mundial de grãos e cereais são contaminados por micotoxinas, gerando assim riscos à saúde humana e animal (BOUTRIF; CANET, 1998).

O comércio global, composto pela indústria alimentícia e de rações, contribui significativamente para a disseminação de micotoxinas (LOI et al., 2017). As perdas econômicas associadas à contaminação por micotoxinas em matérias-primas, correspondem a bilhões de dólares anuais. Estes prejuízos afetam o rendimento de culturas e desempenho zootécnico dos animais, além de acarretar em custos adicionais derivados de doenças em animais, uso de fungicidas, redução do valor comercial das matérias-primas e investimentos no desenvolvimento de estratégias e programas de pesquisa para redução da contaminação (WU, 2007). Ji et al. (2016) descreveram que a contaminação mundial de rações e alimentos com micotoxinas é um problema significativo devido aos danos à saúde de animais e humanos.

Desta maneira, para garantir a segurança de alimentos consumidos, órgãos mundiais determinam, através de regulamentos sanitários, os níveis aceitáveis (ausência de risco à saúde) destes contaminantes em diversos alimentos. A nível global a Comissão do *Codex Alimentarius*, formada pela FAO e a Organização Mundial da Saúde – OMS (tradução do inglês *World Health Organization*), é o principal órgão regulamentador para os níveis de contaminação de alimentos e ração animal (CODEX ALIMENTARIUS, 1995).

Contudo existem outros órgãos, em diferentes países, que também delimitam os níveis de contaminação destas substâncias. Por exemplo, na Europa, Estados Unidos, Canadá, Austrália/Nova Zelândia, Japão e China o controle dos níveis admissíveis de micotoxinas em alimentos e/ou ração animal são realizados pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2006a), pela Administração de Alimentos e Medicamentos (tradução do inglês *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2020), pela Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (tração do Inglês *Canadian Food Inspection Agency* (CFIA) (CFIA, 2017), pelo

Código de Padrões Alimentares da Austrália na Nova Zelândia (tradução do inglês *Australia New Zealand Food Standards Code*) (FSANZ, 2017), pelo Centro de Inspeção de Alimentos e Materiais Agrícolas (tradução do inglês *Food and Agricultural Materials Inspection Center*) (FAMIC, 2019) e Normas nacionais de segurança alimentar da China (tradução do inglês *China National Food Safety Standards*) (GB, 2017), respectivamente. Para os países que compõem o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), são aplicados os limites descritos na Resolução Nº 25 (MERCOSUL, 2002). No Brasil, os limites máximos tolerados (LMT) para os níveis de micotoxinas em matérias-primas, alimentos e bebidas são regulamentados a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC Nº 138 (BRASIL, 2017).

3.2.1 Micotoxinas na cerveja

A incidência natural de fungos toxigênicos e micotoxinas em cevada malteada, principal insumo do processo cervejeiro foi relatado na literatura (BĚLÁKOVÁ et al., 2014; BOLECHOVÁ et al., 2015), assim como em outros insumos comumente empregados como milho (TARAZONA et al., 2020), trigo (XU; HAN; LI, 2019), arroz (MAKUN et al., 2011), centeio (BŁAJET-KOSICKA et al., 2014), sorgo (NJUMBE EDIAGE; VAN POUCKE; DE SAEGER, 2015), aveia (VIDAL et al., 2013) e lúpulo (BĚLÁKOVÁ et al., 2011b). A contaminação de cerveja por micotoxinas é reportada em inúmeros países do mundo, inclusive no Brasil (BAUER et al., 2016; BERTUZZI et al., 2011; HAASNOOT et al., 2017; KUZDRALIŃSKI; SOLARSKA; MUSZYŃSKA, 2013; PIACENTINI et al., 2017).

Os primeiros relatos de ocorrência de micotoxinas em cerveja datam de 1977 na República da Zâmbia, onde foi verificada ocorrência de ZEA na concentração média de 920 µg L⁻¹ em cerveja comercial e artesanal (LOVELACE; NYATHI, 1977). Laitila (2015) descreve que as micotoxinas podem ser produzidas durante as seguintes etapas: cultivo dos grãos, armazenamento e/ou transporte e processo de maltagem. Na Tabela 2 estão reportadas a ocorrência de diferentes tipos de micotoxinas em cerveja de diversos países.

Na legislação brasileira, regulamentada pela Anvisa, não há descrição para os LMT de micotoxinas em cerveja. No entanto, são legisladas as principais matérias-primas empregadas na produção de cerveja, como cevada malteada, trigo, milho e arroz. De acordo com a resolução, em casos de produtos não legislados, estes devem considerar os limites estabelecidos para as matérias-primas utilizadas, considerando as proporções relativas, concentração, transformação e diluições destas durante o processamento (BRASIL, 2017).

				5	1		
Daío	Micotoxinas	Número	Percentual	Concentração			
		inumero	de amostras	de micotoxinas	Referência		
rais		amostro	positivas	na cerveja	bibliográfica		
		amostras	(%)	(µg L ⁻¹)*			
	DON		75	2,20 - 20,0			
A 1 1	ZEA	4.4	100	0,35 - 2,00	D (1(201()		
Alemanha	ERGOT	44	93	0,07 - 0,47	Bauer et al. (2016)		
	AOH		100	0,23 - 1,60			
República Tcheca	OTA	115	39	0,001 - 0,243	Běláková et al. (2011)		
Daígos da	OTA		68	< 0,002 - 0,189	Dortuzzi et el		
Faises da	FBs	106	97 - 58	0,100 - 30,3	$\frac{(2011)}{(2011)}$		
Europa	DON		66	0, 500 - 18,6	(2011)		
Polônia	DON ZEA	91	100 11	6 - 70,2 0 - 0,546	Kuzdraliński; Solarska;		
F 1		(0)	100	0.000 0.400	Muszyńska, (2013)		
Espanha		69	100	0,008 - 0,498	Medina et al. (2006)		
África do	AFLAS	25	3	200 - 400	Odhav; Naicker,		
Sul	OTA	35	35	1,5 - 2340	(2002)		
	ZEA		24	130 - 426			
Países da Europa Argentina México	ZEA	64	65	8,2 - 62,9	Pascari et al. (2018)		
Brasil	FBs	114	49	201,70 - 1568,6	Piacentini et al. (2017)		
Irlanda Espanha	FBs		41	71,2 - 127			
	OTA	49	12	2,7 - 6,9	Rubert et al. (2013)		
	TCT		12	4 - 20,0			
Itália	OTA	61	49	0,010 - 0,135	Visconti; Pascale; Centonze, (2000)		

Tabela 2 - Ocorrência de micotoxinas em cerveja de diversos países.

*Concentração mínima e máxima de micotoxinas na cerveja; DON – deoxinivalenol; Ergot – ergometrine; AOH - alternariol; ZEA – zearalenona; OTA – ocratoxina A; FBs – fumonisinas; AFLAs – aflatoxinas; TCT – tricotecenos.

3.2.2 Ocratoxina A

A OTA é uma micotoxina produzida pelos fungos dos gêneros *Aspergillus*, principalmente por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* que são característicos de regiões de clima temperado da Europa e da América do Norte; e *Penicillium*, como *Penicillium nordicum* e *Penicillium verrucosum* que são típicos de regiões de climas mais quentes, como a América do Sul e África (RINGOT et al., 2006; SCHMIDT-HEYDT et al., 2012). OTA é descrita como um ácido orgânico fraco derivado da dihidrometil-isocumarina unida por uma ligação peptídica a L-fenilalanina, um grupamento OH fenólico e além da presença de um átomo de cloro no C5, descrita quimicamente como C₂₀H₁₈CINO₆, massa molar 403,8 g mol⁻¹ (KIESSLING, 1986), conforme demonstrado na Figura 4. Esta micotoxina, apresenta estrutura cristalina, fluorescência esverdeada e solubilidade em solventes polares orgânicos quando em meio ácido, sendo estável a acidez e a altas temperaturas (KHOURY; ATOUI, 2010).

Figura 4 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA) e após hidrólise da ligação amida da OTA (1) para produzir ocratoxina α (OTα) (2) e fenilalanina (3) considerada a principal via de degradação/desintoxicação.



Fonte: HAQ et al. (2016).

A nível molecular, a OTA inibe a biossíntese proteica através da competição pela fenilalanina, ou seja, a absorção passiva é altamente favorecida pela alta afinidade de ligação

de OTA com as proteínas plasmáticas. Esta micotoxina tem sido relacionada com a nefropatia endêmica dos Bálcãs, e ao desenvolvimento de tumores no trato urinário de humanos (EL KHOURY; ATOUI, 2010). De acordo com Marin-Kuan e colaboradores (2008), a carcinogenicidade de OTA envolve uma rede de mecanismos epigenéticos, tendo como mecanismos de toxicidade a: inibição da síntese proteica, disfunção mitocondrial, alteração da homeostase do cálcio, formação de adutos com o DNA e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A OTA é caracterizada por causar efeitos nefrotóxicos e imunotóxicos (GAN et al., 2017), teratogênicos (MAYURA et al., 1984) e cancerígenos (QI et al., 2014), tendo como principais alvos de toxicidade os rins e o figado de humanos e animais (O'BRIEN; DIETRICH, 2005; RINGOT et al., 2006). O mecanismo mais importante de degradação da OTA é a fragmentação da molécula de OTA em ocratoxina α (OT α) formando a 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-di-hidro-3-R-metilisocumarina e L- β -fenilalanina que são formados pela hidrólise da ligação amida (Figura 4)(PITOUT, 1969).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (tradução do inglês *Agency for Research on Cancer* – IARC) (IARC,1993), classifica a OTA no grupo 2B, considerada como uma substância possivelmente cancerígena. O Comitê de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (traduzido do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* - JECFA) (JECFA, 2008) e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (tradução do inglês *European Food Safety Authority* - EFSA) (EFSA, 2006) reportaraam que a ingestão tolerável semanal provisória de OTA para humanos na dieta é de 100 e 120 ng kg⁻¹ de massa corporal, respectivamente.

A OTA tem sido reportada na literatura como contaminante de uma ampla variedade de alimentos, como cereais, trigo, milho, aveia, cevada, arroz e espelta (JUAN et al., 2008), produtos à base de cereais (IQBAL et al., 2014a), café (BENITES et al., 2017), cacau (COPETTI et al., 2013), especiarias e ervas (WASKIEWICZ et al., 2013), carne de frango e ovos (IQBAL et al., 2014b), leite (HUANG et al., 2014), salame e presunto (DALL'ASTA et al., 2010), frutas (DRUSCH; RAGAB, 2003), bebidas, como cerveja (ARAGUÁS; GONZÁLEZ-PEÑAS; LÓPEZ DE CERAIN, 2005; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 2000), sucos (HAJOK et al., 2019) e vinhos (QUINTELA et al., 2012). No Brasil, o LMT de OTA para alimentos, como cereais e produtos à base de cereais, feijão, especiarias, café, bebidas (suco de uva, vinho e derivados), frutas secas e desidratadas, produtos à cacau e chocolate, entre outros são demonstrados na Tabela 3 (BRASIL, 2017).

Alimento	LMT (µg kg ⁻¹)	
Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	20	
Feijão	10	
Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10	
Vinho e seus derivados	2	
Suco de uva e polpa de uva	2	
Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo		
pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp.		
(o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans	20	
(noz-moscada); Zingiber officinale (gengibre); Curcuma longa (cúrcuma);	30	
Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias		
acima indicadas		
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2	
(lactentes e crianças de primeira infância)	2	
Produtos à cacau e chocolate	5	
Amêndoa de cacau	10	
Frutas secas e desidratadas	10	

Tabela 3 - Limites máximos tolerados (LMT) de ocratoxina A para alimentos segundo a
legislação brasileira.

Fonte: BRASIL (2017).

3.2.3 Zearalenona

A micotoxina ZEA é produzida por fungos *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium equiseti* e *Fusarium semitectum* (BENNETT, KLICH, 2003; RICHARD, 2007). Esta micotoxina é uma lactona do ácido fenólico resorcílico, descrita quimicamente, como $C_{18}H_{22}O_5$ de massa molar 318,4g mol⁻¹. Sua molécula é constituída de radical "-eno" decorrente da dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o "-ona" pela cetona no C6, como mostra a Figura 5 (a) (KIESSLING, 1986).

A ZEA possui características estrogênicas e similaridade estrutural com o hormônio estrogênico 17- β -estradiol (ZINEDINE et al., 2007). A metabolização de ZEA em mamíferos, inclusive humanos, tem como característica a formação de dois metabólitos isômeros, o α -zearalenol (α -ZOL) e β -zearalenol (β -ZOL) (Figura 5 (b)), que também aumentam a produção de hormônios, como a progesterona, estradiol, testosterona e cortisol (FRIZZELL et al., 2011).

As rotas bioquímicas que levam a redução da ZEA em α -ZOL e β -ZOL em animais (ratos, suínos, bovinos, ovinos e galinhas) foram mais ativas no figado (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006). No entanto, os eritrócitos de ratos também possuem esta capacidade (CHANG; LIN, 1984), assim como a mucosa e a microbiota intestinal (OTHMEN et al., 2008). O metabólito α -ZOL possui maior potencial estrogênico que a ZEA e β -ZOL, pois apresenta maior afinidade de ligação com os receptores de estrogênio (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006).

Figura 5 - Estrutura química da zearalenona (a) e de seus metabólitos (b) α-zearalenol (R1=OH e R2=H) e β-zearalenol (R1=H e R2=OH).



Fonte: BENNETT; KLICH (2003).

O quadro clínico de intoxicações por ZEA depende da quantidade de toxina ingerida, tempo de ingestão, idade, sexo e espécie animal (HASSEN et al., 2007). Rogowska e colaboradores (2019) reportaram que a estrutura química da ZEA favorece sua ligação com as células e receptores de estrogênio, ocasionando sua bioacumulação e originando diferentes tipos de distúrbios. Estudos em humanos demonstrou que a ZEA ocasiona o desregulamento do sistema endócrino (KOWALSKA; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016) e resulta ao desenvolvimento precoce da puberdade feminina (MASSART; SAGGESE, 2010), por ocasionar estresse oxidativo e apoptose de células embrionárias humanas (CAO et al., 2019). Além de possuir a capacidade de promover a proliferação, também foi observado formação de colônias e migração de células de carcinoma de cólon (ABASSI et al., 2016).

Adicionalmente, pesquisas empregando animais e/ou células de animais, como modelo biológico, comprovaram que a ZEA provoca distúrbios reprodutivos (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999; GREEN et al., 1990), além de ser citotóxica (BAKOS et al., 2013; TATAY; FONT; RUIZ, 2016), nefrotóxica (VENKATARAMANA et al., 2014), genotóxica e imutóxica (ZINEDINE et al., 2007).

A IARC classifica a ZEA no grupo 3, pois não há evidências suficientes para afirmar o seu potencial carcinogênico em humanos (IARC, 1993). A ingestão diária tolerável de ZEA, dita como segura para humanos, é de 0,25 e 0,5 µg kg⁻¹ de massa corporal, conforme é descrito pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2011) e pelo Comitê de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA, 2000), respectivamente.

A ocorrência de ZEA é relatada em cevada (IBÁÑEZ-VEA et al., 2012), milho (PLEADIN et al., 2012), broa de milho (RIBEIRO et al., 2015), trigo (CALORI-DOMINGUES et al., 2016; GOLGE; KABAK, 2020), aveia (VIDAL et al., 2013), amendoim (SANGARE-TIGORI et al., 2006), arroz (SAVI et al., 2018), sorgo (GHALI et al., 2008) e soja (JACOBSEN et al., 1995). Além disso, foi detectada ZEA em produtos de origem animal como carne de frango e ovos (IQBAL et al., 2014), leite (HUANG et al., 2014) e cerveja (BAUER et al., 2016). Na Tabela 4 é apresentado o LMT para ZEA em diferentes alimentos conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2017).

legislação brasileira.	
Alimento	LMT (µg kg ⁻¹)
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	20
(lactentes e crianças de primeira infância)	20

Tabela 4 - Limites máximos tolerados (LMT) de zearalenona em alimentos segundo alegislação brasileira.

Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	20		
(lactentes e crianças de primeira infância)	20		
Milho em grão e trigo para posterior processamento	40		
Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e	100		
produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100		
Arroz beneficiado e derivados	100		
Arroz integral	400		
Farelo de arroz	600		
Milho em grão para posterior processamento, milho de pipoca,	150		
canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	150		
Trigo integral, farinha de trigo integral e farelo de trigo	200		

Fonte: BRASIL (2017).

3.2.4 Estratégias de degradação de ocratoxina A e zearalenona

Em vista da ocorrência de micotoxinas em alimentos e ração animal ocasionar perdas econômicas e problemas relacionados à saúde de humanos e animais, diversas pesquisas mundiais concentraram seus objetivos em explorar abordagens para descontaminação e/ou degradação destas substâncias. As estratégias incluem a utilização de métodos químicos, físicos e biológicos (LUO; LIU; LI, 2018).

Dentre os métodos químicos citados na literatura para degradação dos níveis de concentração de OTA, incluem-se o emprego do carbonato de potássio e bicarbonato de sódio (AMÉZQUETA et al., 2008), ozonização (MCKENZIE et al., 1997); peróxido de hidrogênio, solução com amônia a 2% e solução alcalina (GARDA; BADIALE-FURLONG, 2003). Além do tratamento com acetato de etila e diclorometano (HEILMANN; REHFELDT; ROTZOLL, 1999), ácido fórmico (FABIAN, 2002). Para a degradação de ZEA destaca-se a utilização do gás ozônio (LEMKE et al., 1999), peróxido de hidrogênio (ABD ALLA, 1997), hidróxido de amônio, formaldeído (BENNETT; SHOTWELL; HESSELTINE, 1980), hidróxido de cálcio (ABBAS et al., 1988) e carbonato de cálcio (TRENHOLM et al., 1992).

Os métodos físicos consistem na remoção da OTA e ZEA através da extrusão (CASTELLS et al., 2006; RYU; HANNA; BULLERMAN, 1999), adsorventes nutricionalmente inertes, como a colestiramina (AVANTAGGIATO; SOLFRIZZO; VISCONTI, 2005; MADHYASTHA; FROHLICH; MARQUARDT, 1992), carvão ativado (BUENO et al., 2005; GALVANO et al., 1998), zeolite (TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ et al., 2003), bentonita organofílica, argilas minerais, substâncias húmicas, produtos derivados da parede celular de levedura (SABATER-VILAR et al., 2007) e polímeros de quitosana (MINE KURTBAY et al., 2008; ZHAO et al., 2015b); irradiação com raios gama (AZIZ; MOUSSA; FAR, 2004; CALADO et al., 2018; HOOSHMAND; KLOPFENSTEIN, 1995), radiação ultravioleta (UV) (AMEER SUMBAL et al., 2016; MURATA; MITSUMATSU; SHIMADA, 2008) e limpeza ou descasque dos grãos (GRENIER et al., 2014; KARLOVSKY et al., 2016).

A mitigação de micotoxinas por meio dos métodos biológicos, como emprego de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) e enzimas, tem se tornado um estratégia promissora, resultado da especificidade, eficiência, por ser um tratamento irreversível e ambientalmente amigável (JI; FAN; ZHAO, 2016). Em termos de degradação da OTA por métodos biológicos é descrito na literatura a utilização de fungos, como isolados de *Rhizopus* (VARGA et al., 2005), *Alternaria, Botrytis, Cladosporium, e Penicillium* (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002), *Aspergillus* (VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000), leveduras como

Saccharomyces cerevisiae (MECA; BLAIOTTA; RITIENI, 2010; PETRUZZI et al., 2014) Phaffia rhodozyma e Xanthophyllomyces dendrorhous (PÉTERI et al., 2007) e bactérias, como Bifidobacterium e Lactobacillus (FUCHS et al., 2008), Bacillus megaterium (SHANG et al., 2019), Brevibacterium (RODRIGUEZ et al., 2011) e diferentes tipos de bactérias ácido lácteas (LUZ et al., 2018). Os principais microrganismos empregados na degradação de ZEA são: as bactérias, como Bacillus (CHO et al., 2010; FU et al., 2016; LEI et al., 2014; TINYIRO et al., 2011), diferentes cepas de Pseudomonas (MEGHARAJ; GARTHWAITE; THIELE, 1997; TAN et al., 2014), Streptomyces rimosus (HARKAI et al., 2016), Lactobacillus plantarum (ZHAO et al., 2015a), diferentes cepas de Gordonia e Rhodococcus (KRIFATON et al., 2013); leveduras, entre elas a Saccharomyces spp., Kluyveromyces spp. e Rhodotorula spp. (ŠTYRIAK et al., 2001), Trichosporon mycotoxinivorans (VEKIRU et al., 2010) e fungos, como Rhizopus (EL-SHARKAWY et al., 1991) e Aspergillus spp. (JARD et al., 2010).

A ação de enzimas na degradação de micotoxinas é resultante principalmente das reações de acetilação, glicosilação, clivagem de anéis, hidrólise, desanimação e descarboxilação, que estas substâncias catalisam (HAQUE et al., 2020). Diversas enzimas foram estudadas com a finalidade de degradar OTA e ZEA, conforme demonstrados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. É possível observar, que mesmo havendo estudos com percentuais elevados de degradação (acima de 80 %) para OTA e ZEA por enzimas (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2007; ALTALHI; EL-DEEB, 2009; BANU; LUPU; APRODU, 2013; DEBERGHES et al., 1995; KRISZT et al., 2012; PITOUT, 1969; STANDER et al., 2001, 2000; TAKAHASHI-ANDO et al., 2005; UTERMARK; KARLOVSKY, 2007; WANG et al., 2017; YU et al., 2012, 2011; ZHANG et al., 2016), sua aplicação em alimentos é dificultada ou impossibilitada devido a fatores como pH de atuação enzimática, tempo, temperatura entre outros.

3.3 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que desempenham um papel essencial à vida, pois participam de diferentes processos, como no metabolismo, expressão gênica, divisão celular e reações importantes do sistema imunológico entre outros (VANDENBERGHE et al., 2020). As enzimas funcionam como máquinas moleculares altamente especializadas, capazes de quebrar, agrupar ou transformar moléculas. Além de sua função básica de sustentar a vida, as enzimas tornaram-se ferramentas insubstituíveis em muitos setores e atividades da vida diária (TALENS-PERALES; MARÍN-NAVARRO; POLAINA, 2016).

	Concentração								
Enzima (Fonte de obtenção)	da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	Degradação (%)	Referência
Peroxidase comercial	0,6 U mL ⁻¹	Solução modelo	7	25	30	360	1 mM K ⁺ e 26 mM de H ₂ O ₂	27,0	Garcia et
(Armoracia rusticana)		Cerveja	4,05	-	30	360	26 mM de H ₂ O ₂	4,8	ai. (2020)
Peroxidase comercial (Armoracia rusticana)		Solução modelo	6,0	5		300		41,0	
Peroxidase	0,063 U mL ⁻¹	Solução modelo Suco de	5,5	5	25	1440	26 mM de H ₂ O ₂	59,0	Nora et al. (2019)
(farelo de arroz)		uva branca	3,3	-				17,0	
Ocratoxinase (Aspergillus niger)	0,7 μg mL ⁻¹ (15 μM)	Solução modelo	7,5	200	40	60	-	50,0	Dobritzsch et al. (2014)

		Concentração	Condições reacionais							
	Enzima (Fonte de obtenção)	da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	Degradação (%)	Referência
	Carboxipeptidase cp4 (<i>Lysobacter</i> sp. CW239)	$0,5 \text{ mg mL}^{-1*}$	Solução modelo	7,0	50	37	1440	-	36,8	Wei et al. (2020)
		0,1 U mL ⁻¹	Meio líquido	NI	NI	26	18**	-	100,0	Deberghes et al. (1995)
	Carboxipeptidase A (pâncreas bovino)	50 µg mL ^{-1*}	Solução	7,5	200	25	300	-	100,0	Pitout (1969)
		1 μg mL ⁻¹	modelo	8,0	50	NI	10	-	100,0	Stander et al. (2001)
	Carboxipeptidase (<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 7560) Pancreatina	39,5 mU mg ⁻¹ 240 mU mg ⁻¹	Solução modelo	7,5	25	25	60	500 mM de NaCl	19,4 12,9	Kupski et al. (2013)
59	Carboxipeptidase (Bacillus amyloliquefaciens ASAG1) Bruta Bruta	NI	Solução modelo	7,0	20	37	720	-	41,0 72,0	Chang et al. (2015)

Fabela 5 - Degradação enzimática da ocratoxina A (continuação).										
Enzima (Fonte de obtenção)		Concentração			C	Condições reacio	onais			
------------------------------------	----------------------------------	--------------------------	---------------------	-----	-------------------------	---------------------	----------------	---------	-------------------	---------------------------------
		da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	Degradação (%)	Referência
Carboxipep (Bacillus subti	otidase Tis CW14)	NI	NI	NI	NI	37	1440	-	38,4	Hu et al. (2019)
Amano lipa (<i>Aspergillus</i>	ase A 5 <i>niger</i>)	10,0 mg	Solução modelo	7,5	50	37	1080	-	≅ 90,0	Stander et al. (2000)
	pâncreas bovino	50,0 U mg ^{-1*}				25			78,5	
	farelo de soja	0,3 U mg ^{-1*}				30			17,8	
Carboxipeptidase	Rhizopus oryzae CCT 7560	0,4 U mg ^{-1*}	Farinha de trigo	7,5	-	50	60	-	71,0 61,0	Kupski, Queiroz; Badiale-
	Trichoderma reesei QM 9414	0,3 U mg ^{-1*}	de digo							Furlong (2018b)
Pancreat (pâncreas	ina suíno)	1,0 U mg ^{-1*}							16,8	

Tabela 5 - Degradação enzimática da ocratoxina A (continuação).

	Concentração			(Condições reacio	onais			
Enzima (Fonte de obtenção)	da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	(%)	Referência
Extrato enzimático bruto									Abrunhosa,
(Aspergillus niger	$0,112 \text{ mg}^*$							100,0	Santos e
MUM 03.58)									Venâncio
									(2006) e
	۰ ۲ *	a 1 ~					0,1% de	00.0	Abrunhosa e
Carboxipeptidase A	0,5 mg	Soluçao	7,5	100	37	1500	Azida de	≅ 90,0	Venâncio
		modelo					sódio		(2007)
Protease A	10,0 mg*							87,3	Abrunhosa,
									Santos e
Pancreatina	10,0 mg *							43,4	Venâncio
									(2006)

 Tabela 5 - Degradação enzimática da ocratoxina A (continuação).

Legenda: * - concentração da enzima em mg de proteína; ** - em dias; NI – não informado no estudo pelos autores.

Enzima (Fonte de obtenção)		Concentração		8	, Co	ondições reacior	nais				
		da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	Degradação (%)	Referência	
Peroxidase comercial (Armoracia rusticana)		0,6 U mL ⁻¹	Solução modelo	7	25	30	360	1 mM K ⁺ e 26 mM de H ₂ O ₂	64,9	Garcia et al. (2020)	
			Cerveja	4,05	-	30	360	26 mM de H ₂ O ₂	10,9		
	Armoracia rusticana	0,6 U mL ⁻¹	Solução	6,0	100				69,9	Garcia: Feltrin	
Peroxidase	farelo de soja	6,0 U mL ⁻¹	modelo	5,0	5	25	1440	26 mM de H ₂ O ₂	30,6	e Garda-	
farelo	farelo de arroz	6,0 U mL ⁻¹	Solução aquosa	5,0	-				47,4	Buffon (2018)	
L (Tramete	acase es versicolor)	0,4 mg mL ⁻¹	Solução modelo	5,2	200	30	240	0,16 mM de ABTS	81,7	Banu; Lupu e Aprodu (2013)	
Este Bacillus p	erase de <i>umilus</i> ES-21	1x10 ⁹ UFC mL ⁻¹	Solução modelo	7,6	-	40	1440	-	95,7	Wang et al. (2017)	

Enzima (Fonte de obtenção)		Concentração			Co	ondições reacior	nais			
		da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	Degradação (%)	Referência
Peroxirredoxina		1 12 mg mI ⁻¹	Solução modelo	9,0	20	70	60	26 mM de H ₂ O ₂	85,0	Yu et al.
(Acinetobacter sp. SM04)	1,12 mg mL	Milho	-	-	30	360	0,09% de H ₂ O ₂	90,0	(2012)	
Lactonase de G roseu	fliocladium m	1x10 ⁶ esporos 0,1 mL ⁻¹	Agar	5,6	-	20	7*	-	100,0	Utermark e Karlovsky (2007)
Enzima de Rho pyridinivo	odococcus orans	NI	Agar	-	-	28	5*	-	81,7	Kriszt et al. (2012)
Enzimas de Saccharomyces cerevisiae	extracelular intracelular	1×10 ⁸ células mL⁻¹	Agar	-	-	28	2*	-	100,0	Zhang et al. (2016)
Enzima secretada amylolique	a por Bacillus faciens	5x10 ⁸ UFC mL ⁻¹	Agar Trigo	6,0 7,0 -	-	30	2* 1440	-	95,2 62,1	Xu et al. (2016)

Tabela 6 -	Degradação	enzimática da	zearalenona	(continuação).
				· · · ·

Concentração			Co	ondições reacior	nais			
da enzima/ microbiana	Matriz	рН	Força iônica (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	Degradação (%)	Referência
1x10 ⁹	Agar	45	_	37	3*	_	79.0	Tan et al.
UFC mL ⁻¹	<i>i</i> igui	7,5		51	5		79,0	(2015b)
NI	Extrato	NI	10	30	2*	_	68 2	Sun et al.
111	filtrado	111	10	50	2	-	00,2	(2014)
1 0 mg mI ⁻¹	Solução	15	200	40	720	_	65.2	He et al.
1,0 mg mL	modelo	т,Ј	200		120		00,2	(2016)
NI	Solução	0.0	20	30	360	-	86,7	Yu et al.
INI	modelo	9,0	20					(2011)
	Meio	7.0						Altalhi e Fl
NI	de	8.0	10	30	720	-	100,0	Deeb (2000)
	cultura	8,0						Dee0 (2009)
	Meio							Takahashi-
NI	de	10,5	-	37	2*	-	100,0	Ando et al.
	cultura							(2005)
	Concentração da enzima/ microbiana 1x10 ⁹ UFC mL ⁻¹ NI 1,0 mg mL ⁻¹ NI NI	Concentração da enzima/ microbianaMatriz mariz1x109 UFC mL-1Agar1x109 UFC mL-1Extrato filtradoNIExtrato filtrado1,0 mg mL-1Solução modeloNISolução modeloNISolução modeloNIMeioNIde culturaNIde soluçãoNIde culturaNIde cultura	Concentração da enzima/Matriz pHda enzima/Matriz pHmicrobiana PH 1x109 UFC mL-1Agar1x109 UFC mL-1AgarNIExtrato filtradoNISolução modelo1,0 mg mL-1Solução modeloNISolução modeloNISolução modeloNISolução modeloNIMeio s,0 culturaMeio7,0 8,0 culturaMeio7,0 8,0NIde de s,0NIde de s,0	ConcentraçãoForça iônica iónica<	Concentração da enzima/ Matriz PH PH PH PH PH PH PH PH	ConcentraçãoMatrizForça têmeEneretionEneretionda enzima/ microbianaMatrizForça têmeAnneretionAnneretionAnneretionIx10° UFC mL1Agar4,5-373*MatrizAgar4,5-303*MatrizAgarAgarAgar10303*MatrizAgarAgarAgar-303*MatrizAgarAgarAgar-303*MatrizAgarAgar303*MatrizAgarAgarMatrizAgarMatrizAgarMatrizAgarMatrizAgarMatrizAgarMatrizMatrizMatrizMatrizMatrizMatrizMatrizMatrizMatriz <td>Concentração da enzimaMatriz MatrizForça 2 H 2 H<br< td=""><td>Anderse Anderse increduceExpectionExpectionForce and infinitionForce and infinitionForce and infinitionForce and infinitionForce and and andForce and<</td></br<></td>	Concentração da enzimaMatriz MatrizForça 2 H 2 H <br< td=""><td>Anderse Anderse increduceExpectionExpectionForce and infinitionForce and infinitionForce and infinitionForce and infinitionForce and and andForce and<</td></br<>	Anderse Anderse increduceExpectionExpectionForce and infinitionForce and infinitionForce and infinitionForce and infinitionForce and and andForce and<

Tabela 6 - Degradação enzimática da zearalenona (continuação).

Legenda: * - em dias.

O primeiro esquema de nomenclatura de enzimas foi apresentado no Congresso Internacional de Bioquímica (traduzido do inglês *International Congress of Biochemistry*), onde a Comissão de Enzimas (CE) foi definida. Então, em 1961, a primeira versão foi publicada. Em 1992, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (traduzido do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) descreveu aproximadamente 3196 enzimas diferentes. A classificação das enzimas é realizada pela CE de acordo com as reações que catalisam (MARTÍNEZ CUESTA et al., 2015). Na Tabela 7 é demonstrado a classificação das enzimas com base nas reações que catalisam.

Classe	Nome da enzima	Tipos de reações	Exemplos
EC 1	Oxidorredutase	Reações de oxidação/redução envolvendo adição e remoção de hidrogênio, elétrons ou oxigênio	Lipoxigenase, malato desidrogenase, álcool desidrogenase, peroxidases
EC 2	Transferase	Transferência do grupo funcional de uma molécula para outra, exceto hidrogênio	DOXP sintase Aminotransferase, amido sintase
EC 3	Hidrolase	Catalisar a hidrólise de várias ligações	Clorofilase, α-amilase, lipases, Esterases
EC 4	Liase	Cliva várias ligações por outros meios que não a hidrólise e oxidação	Pectato-liase, hidroperóxido liase
EC 5	Isomerase	Catalisar alterações de isomerização dentro de uma única molécula	Isomerização (isomerase carotenóide,) Epimerases (glicose para manose)
EC 6	Ligase	União de duas moléculas com ligações covalentes, geralmente às custas de uma fonte de energia (ATP)	Hidroxicinamoil-CoA ligase; acetilCoA carboxilase

Tabela 7 - Classificação das enzimas com base em suas reações.

Fonte: Adaptado KUMAR et al. (2018) e ROY CHOUDHURY (2020).

A atividade enzimática é uma medida da quantidade de enzima ativa presente na solução a ser testada. Independentemente do objetivo do estudo, em todos os casos, os dados de atividade enzimática precisam ser comparáveis entre amostras e entre pesquisadores (PONTIS, 2017). A catálise enzimática é influenciada por muitos fatores químicos e físicos. Entre os primeiros, estão substâncias de baixa massa molar (por exemplo, prótons, metais e outros íons inorgânicos, íons-tampão, várias moléculas orgânicas, além de ativadores, inibidores e estabilizadores de enzimas naturais e sintéticas) e componentes macromoleculares (por exemplo, proteínas, polissacarídeos e outros polieletrólitos). Os fatores físicos incluem temperatura, pressão, força iônica, polaridade do solvente, imobilização, sequestro de substrato e aglomeração molecular. A complexidade química e estrutural das enzimas, bem como as interações que realizam explicam o porquê a atividade de uma enzima pode ser afetada facilmente (PURICH, 2010).

Para a cinética enzimática, considera-se o mecanismo de reação simples o modelo de equilíbrio rápido conhecido de Michaelis-Menten, demonstrado na Equação 1.

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P \tag{1}$$

A ligação das substâncias chamadas substratos ao sítio ativo forma o complexo enzimasubstrato que permite que os substratos reajam e formem o produto. O substrato é indicado por S, a enzima por E, e o produto da reação por P (MURZIN; SALMI, 2016).

3.3.1 Peroxidase

As peroxidases (PO) são enzimas da classe das oxidoredutase que catalisam a reação na qual o peróxido de hidrogênio atua como receptor e outro composto atua como doador de átomos de hidrogênio (MEDINA et al., 2017). Basicamente, a reação catalisada pelas POs é demonstrada na Equação 2, onde AH₂ é um doador de hidrogênio e A é sua forma oxidada. (LÜCK, 1965).

$$AH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + A \tag{2}$$

A PO (CE 1.11.1.X) está largamente distribuída em 3 superfamílias, como as de origem animal, vegetal e microbiana (MATHÉ et al., 2010). As raízes de rábano silvestre (*Armoracia rusticana*) são comumente empregados como fonte comercial para a produção de

peroxidase (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009), por ser termotolerante e estável em pH de 5 a 9 (SIGMA-ALDRICH, 2019). Porém, estudos evidenciaram que vegetais (DEVAIAH; SHETTY, 2009; VETAL; RATHOD, 2015) e microrganismos como fungos (STAJIĆ et al., 2006) e bactérias (REKIK et al., 2015) também podem ser considerados fontes alternativas para obtenção de PO.

Segundo Medina e colaboradores (2017) as POs podem atuar principalmente nos seguintes grupamentos: CH-CH; C=O; HC=CH; CH-NH-; NADH e NADPH. A classificação das peroxidases é baseada com seu sítio ativo específico, podendo ser: heme peroxidases, vanádio peroxidases e peroxidases não metálicas (VELDE; RANTWIJK; SHELDON, 2001). Dentre as peroxidases, as heme peroxidases, são as mais comuns e amplamente distribuídas e estudas (KWON et al., 2020). A heme peroxidases contêm ferro (III) protoporfirina IX (ferriprotoporfirina IX), como grupo protético e apresentam massa molar entre 30000 e 15000 Da (REGALADO; GARCÍA-ALMENDÁREZ; DUARTE-VÁZQUEZ, 2004). Na Tabela 8 é demonstrado as principais heme peroxidases e suas funções biológicas (VELDE; RANTWIJK; SHELDON, 2001).

Peroxidase	Número EC	Fonte	Função biológica
Claranaravidasa	1 11 1 10	Fungo Caldariomyces	Biossíntese de
Cloroperoxidase	1.11.1.10	fumago	caldariomicina
Cita anoma a		Laura duna Cara di manuna an	Redução de H ₂ O ₂ e
peroxidase	1.11.1.5	Levedura Saccharomyces	oxidação de
		cerevisiae	citocromo c
Peroxidase de	1 11 1 7	Raízes de Armoracia	Biossíntese de
rábano silvestre	1.11.1./	rusticana	hormônios vegetais
Lactoperoxidase	1.11.1.7	Leite bovino	Antimicrobiana
Lignina	1 11 1 11	Fungo Phanerochaete	Desmodesão de lignino
peroxidase	1.11.1.14	chrysosporium	Degradação da lignina
Mieloperoxidase	1.11.1.7	Leucócitos humanos	Antimicrobiana
	Fonto: VEL DI	E. DANTWIIK. SHELDON (2	001)

Tabela 8 - Principais heme peroxidases, classificação, fontes e funções

Fonte: VELDE; RANTWIJK; SHELDON (2001).

No ciclo catalítico das heme peroxidases, pode ser observado na Figura 6, na etapa inicial, enzima férrica nativa é oxidada pelo H₂O₂ a uma forma intermediária chamada

composto I (CI), deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do íon Fe³⁺ e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente, Fe⁴⁺ e radical cátion porfirínico. Posteriormente, o CI aceita um composto aromático (ROH) no seu sítio ativo e realiza a sua oxidação, formando o composto II (CII), um intermediário deficiente em um elétron. Um radical livre (RO⁻) é produzido e lançado em solução. Logo, CII oxida, então, uma segunda molécula aromática, liberando um segundo radical livre, que conduz à formação de um produto polimérico, retornando a peroxidase ao seu estado nativo (estado reduzido Fe³⁺), completando assim o ciclo. Na presença de excesso de H₂O₂, pode acontecer a inibição da enzima, formando o composto III (CIII), forma reversivelmente inativa da enzima (ELY; KEMPKA; SKORONSKI, 2016; MEDINA et al., 2017).

Figura 6 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a possível forma de inativação da peroxidase de rábano silvestre.



Fonte: Adaptado de ELY; KEMPKA; SKORONSKI (2016).

As POs podem ser aplicadas para a oxidação de uma ampla variedade de compostos, como contaminantes fenólicos (AITKEN et al., 1994; DEVAIAH; SHETTY, 2009), na desodorização de dejetos de suínos (YE; ZHU; LI, 2009), na descoloração de corantes (ULSON DE SOUZA; FORGIARINI; ULSON DE SOUZA, 2007; VUJČIĆ et al., 2015), na degradação de diferentes micotoxinas (DAS; MISHRA, 2000; FELTRIN et al., 2017a; GARCIA et al., 2020; GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018; NORA et al., 2019; SIBAJA et al., 2019; TRIPATHI; MISHRA, 2011), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CHEN et al., 2014; LEE et al., 2015) e no tratamento de águas residuais de indústrias (NICELL et al., 1993).

3.3.2 Lipase

As lipases (E.C.3.1.1.3) são definidas como hidrolases e exercem sua atividade nas ligações éster carboxílico de triacilgliceróis e outros substratos (LOTTI; ALBERGHINA, 2007). Esta enzima contêm uma unidade de oligopeptídeo helicoidal que protege o sítio ativo. O sítio ativo é geralmente caracterizado pela tríade composta por serina, histidina e aspartato, sendo os complexos acil-enzimas os intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por lipase (REETZ, 2002).

As lipases são geralmente enzimas versáteis que aceitam uma ampla gama de substratos, como ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos e aromáticos, tioésteres, aminas ativadas, mantendo alta seletividade de regio, quimio e enantioseletividade (LOTTI; ALBERGHINA, 2007). Esse grupo de enzimas pode ser empregada em diversas reações, pois não catalisa somente as reações de hidrólise, mas também as reações de síntese, conforme demonstrado na Figura 7 (REIS et al., 2009).





Fonte: Adaptado de RAMOS-SÁNCHEZ et al. (2015).

As lipases catalisam naturalmente a hidrólise da ligação éster de tri, di e monoglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. No entanto, estas também são ativas em uma ampla gama de substratos. Contudo, em condições termodinâmicas favoráveis, as lipases também catalisam uma grande variedade de reações de síntese que podem ser classificadas em dois tipos principais de reações, a esterificação e transesterificação. A esterificação é a reação em que um ácido graxo está ligado, através da ação da enzima, a um álcool por uma ligação covalente, produzindo um éster e liberando uma molécula de água. A tioesterificação e aminação são reações semelhantes, mas com um tiol ou uma amina como substratos. A transesterificação agrupa reações de alcoólise, acidólise, aminólise e interesterificação. Geralmente, essas reações de síntese com a lipase ocorrem em um meio com baixa atividade termodinâmica da água, sendo a atividade termodinâmica uma medida da disponibilidade da molécula em um solvente (CASAS-GODOY; DUQUESNE; BORDES, 2012).

Dentre as enzimas utilizadas nas indústrias, as lipases são o terceiro maior grupo, ficando atrás somente das proteases e amilases. A alta versatilidade das lipases, reconhecida como o grupo mais importante de biocatalisadores em biotecnologia (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), permite suas aplicações em diferentes indústrias, como a de alimentos (produção de queijos, óleos e gorduras) (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007), detergentes (HASAN et al., 2010), farmacêutica, couro, têxtil, cosmético e papel (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004), tratamento de efluentes (AL-MALAH; AZZAM; ABU-LAIL, 2000) e degradação de micotoxinas, como OTA (STANDER et al., 2000) e PAT (LI et al., 2017b; TANG et al., 2018; XIAO et al., 2019). As principais características da aplicação de lipases em processos industriais é devido a sua atuação em ampla faixa de pH, como meios ácidos (pH entre 2 a 5) ou meios alcalinos (pH 9 a 11), por serem estáveis à altas temperaturas, a solventes orgânicos e possuírem elevada especificidade e enantiosseletividade (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SALIHU; ALAM, 2015).

As lipases podem ser obtidas de fonte animal, vegetal e microbiana (SCHMID; VERGER, 1998). Dentre os vários tipos de lipase, obtidas de fonte animal (lipase hepática, lipase pancreática), a mais amplamente estudada é a lipase pancreática (LAI et al., 2018). No entanto, as lipases de fonte microbiana possuem destaque na indústria, especialmente devido à sua estabilidade a diferentes temperaturas e pH, seletividade e ampla especificidade de substrato (MENONCIN et al., 2010). Muitos microrganismos são conhecidos como produtores de lipases, como bactérias (JAEGER; et al., 1994), leveduras (VAKHLU; KOUR, 2006) e fungos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cerveja é uma bebida amplamente comercializada e consumida. No Brasil, a produção e consumo de cerveja impacta diretamente na economia do país. No entanto, estudos têm demonstrado que diversos insumos cervejeiros e produto final (cerveja) são contaminados por micotoxinas, como OTA e ZEA. A ocorrência de OTA e ZEA em alimentos é preocupante devido aos problemas que estes contaminantes ocasionam à saúde humana. Desta maneira, a contaminação de alimentos e bebidas por micotoxinas é regulamentada por órgãos sanitários em muitos países. Como consequência, são estudados métodos químicos, físicos e biológicos para mitigação destas substâncias. Dentre as estratégias utilizadas, os métodos biológicos por meio da ação de enzimas, se destacam pela fácil aplicabilidade, estabilidade, utilização de condições brandas de reações e por serem ambientalmente amigáveis e seguras.

Neste contexto, são mencionados estudos que verificaram resultados promissores de degradação de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares e em soluções modelo utilizando enzimas. Logo, o emprego de PO e lipases, como a amano lipase A, na biotecnologia, indústria alimentícia, farmacêutica e no tratamento de efluentes, entre outros é relevante principalmente devido às características das reações enzimáticas que catalisam. Porém, um aspecto importante quando pretende-se empregar a enzima como um biocatalisador é que a atividade enzimática é influenciada por diversos fatores, como pH, temperatura, força iônica, concentração de substrato e enzima, concentração de cofator, tempo de reação e íons. Adicionalmente, há a falta de dados sobre a degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja pela ação enzimática da PO e lipase descritos na literatura. Portanto, para suprir essa lacuna é que este estudo justifica-se promovendo o avanço do conhecimento científico e propondo uma alternativa para o controle destes contaminantes. Sendo assim, é indispensável a otimização dos parâmetros reacionais para ação enzimática da PO e amano lipase A na degradação de OTA e ZEA e assim, verificar as melhores condições de aplicação destas enzimas.

CAPÍTULO III

ARTIGO 1. PEROXIDASE COMO AGENTE DE DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA APLICADA EM SOLUÇÃO MODELO E CERVEJA

GARCIA, S. DE O.; SIBAJA, K. V. M.; NOGUEIRA, W. V.; FELTRIN, A. C. P.; PINHEIRO, D. F. A.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039, 2020.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da enzima peroxidase (PO) comercial (*Amoracia rusticana*) na degradação simultânea de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em solução modelo e cerveja. Para tanto, os parâmetros reacionais para ação da PO foram otimizados, sua aplicação para degradação de micotoxinas em solução modelo e cerveja foi avaliada e os parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{máx})) foram definidos. Nas condições reacionais determinadas (pH 7, força iônica de 25 mM, incubação a 30 °C, adição de 26 mM de H₂O₂ e 1 mM de íon potássio), a PO (0,6 mL⁻¹) apresentou a máxima atividade para degradação simultânea de OTA e ZEA de 27,0 e 64,9%, respectivamente, em solução modelo após 360 min. A aplicação da PO na cerveja resultou na degradação simultânea de OTA e ZEA em 4,8 e 10,9%, respectivamente. Os parâmetros K_M e V_{máx} da PO para degradação de OTA e ZEA foram de 50 e 10.710 nM e 0,168 e 72 nM min⁻¹, respectivamente. Portanto, a PO pode ser uma alternativa promissora para mitigar a contaminação de OTA e ZEA em solução modelo e cerveja, minimizando seus efeitos em humanos.

Palavras-chave: *Amoracia rusticana*. Degradação biológica. Ação enzimática. Cinética enzimática. Otimização enzimática. Micotoxinas.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são substâncias tóxicas para humanos e animais, produzidas por fungos sob condições de estresse. Os principais gêneros fúngicos responsáveis pela produção de micotoxinas são *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium*; estes são extremamente comuns, e podem se desenvolver em diversos tipos de substratos e sob diferentes condições ambientais (BENNETT; KLICH, 2003). Estudos relatam a ocorrência de micotoxinas em produtos de origem vegetal e animal, como: cereais (SOLEIMANY; JINAP; ABAS, 2012), produtos de panificação (KIRINČIČ et al., 2015), oleaginosas (BHAT; REDDY, 2017), frutas (PIQUÉ et al., 2013) e bebidas como cerveja (BAUER et al., 2016; BERTUZZI et al., 2011; MEDINA et al., 2006; PASCARI et al., 2018a), vinho (PIZZUTTI et al., 2014; PUANGKHAM et al., 2017), sucos (ZOUAOUI et al., 2015); leite (IQBAL; ASI, 2013), carne e ovos (IQBAL et al., 2014b).

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que promove efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos e cancerígenos (RINGOT et al., 2006). A zearalenona (ZEA), micotoxina não esteroide, é produzida por fungos do gênero *Fusarium* (RICHARD, 2007). Estudos realizados com ZEA demonstraram que esta micotoxina induz efeitos estrogênicos (ZINEDINE et al., 2007), além de ser hepatotóxica, citotóxica (HASSEN et al., 2007), genotóxica, imunotóxica e hematotóxica (MARIN et al., 2013). Ambas micotoxinas, foram descritas quanto a sua toxicidade pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – (IARC, 1993), OTA foi classificada no grupo 2B considerada como possível cancerígena, enquanto ZEA pertence ao grupo 3, uma vez que não há evidências suficientes para afirmar o seu potencial carcinogênico em humanos.

Estratégias para minimizar a contaminação de OTA e ZEA em alimentos e rações estão sendo estudadas, devido a ocorrência destas micotoxinas e seus efeitos na saúde humana e animal. A enzima peroxidase (PO) tem sido avaliada por demonstrar potencial e versatilidade como método biológico no tratamento de efluentes (WAGNER; NICELL, 2001), descoloração de corantes (DUARTE BAUMER et al., 2018), decomposição de poluentes (CHENG; MING YU; ZUO, 2006) e utilização na degradação de micotoxinas (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018; NORA et al., 2019; SIBAJA et al., 2019). O potencial da PO no tratamento de contaminantes é devido sua capacidade de catalisar a oxidação de vários substratos orgânicos e inorgânicos empregando o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como molécula aceptora (MATHÉ et al., 2010). Além disso, as enzimas são seguras, fáceis de manipular e utilizar, além de serem ambientalmente amigáveis e eficazes em baixas concentrações e volumes (MANUBOLU et al.,

2018). As PO (EC 1.11.1.7) são amplamente distribuídas na natureza e são produzidas por uma ampla variedade de plantas, animais e microrganismos (HIRAGA et al., 2001). A principal fonte de PO disponível comercialmente é a de raiz-forte (*Amoracia rusticana*) (VALETTI; PICÓ, 2013).

Diante do exposto, visando a degradação de OTA e ZEA e a futura aplicação da PO na degradação destes contaminantes em um produto alimentício, este estudo teve como objetivo avaliar a ação da enzima PO comercial (*Armoracia rusticana*) na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo e cerveja. Para isto, foi realizada a otimização das condições reacionais, bem como a determinação os parâmetros cinéticos e a confirmação da ação da PO, a fim de realizar a aplicação da enzima na degradação de OTA e ZEA na cerveja Pilsen.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS E REAGENTES

As amostras de cerveja Pilsen foram obtidas em estabelecimento comercial na cidade de Rio Grande (Brasil). Os padrões de OTA e ZEA, com pureza \geq 99,0%, foram adquiridos na Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, EUA). A PO comercial foi adquirida da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, EUA) como padrão enzimático de PO tipo VI, obtida de raiz-forte (*Armoracia rusticana*) liofilizada em concentrações de 250 a 330 U mg⁻¹.

A acetonitrila (grau de CLAE) foi adquirida da empresa J.T Baker (Mallinckrodt, EUA). Os reagentes benzeno, ácido acético glacial, guaiacol, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, peróxido de hidrogênio, fosfato de potássio monobásico anidro, fosfato de potássio dibásico anidro, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de ferro e clorofórmio foram adquiridos em grau análitco. A água ultrapura (resistividade de 18,2 M Ω cm) foi purificada por um sistema de água Milli-Q (Direct-Q UV3) (Millipore, Bedford, MA, EUA) com filtro de membrana (poros com 0,45 µm de diâmetro).

2.2 PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE OTA E ZEA

As soluções estoque de OTA (concentração de 100 μ g mL⁻¹) e ZEA (concentração de 500 μ g mL⁻¹) foram preparadas em benzeno: ácido acético (99: 1, v v⁻¹) e benzeno: acetonitrila (98:2, v v⁻¹), respectivamente, e congelados. As soluções de trabalho resultaram de diluições de soluções de estoque até a concentração desejada às análises. A estimativa da concentração da solução de trabalho (Equação 1) de OTA e ZEA foi realizada por um

espectrofotômetro. O comprimento de onda de absorção máxima para OTA e ZEA foi de 333 e 317 nm, a absorvância molar foi de 5550 e 6060 L cm⁻¹ mol⁻¹ em benzeno: ácido acético (99: 1, v v⁻¹) e benzeno, respectivamente (AOAC, 2000).

micotoxina (µg mL⁻¹) =
$$\frac{abs X MM X 1000 X fc}{\epsilon X b}$$
 (1)

Onde: micotoxina (μ g mL⁻¹) é a concentração da micotoxina presente em 1 mL; abs é o valor da absorvância da solução padrão; MM é a massa molecular da micotoxina em estudo (g mol⁻¹); fc é o fator de correção do instrumento; ε é a absortividade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina (mol L⁻¹) e b é a largura da cubeta (cm).

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PO

A atividade da PO comercial foi determinada de acordo com as instruções do fabricante com modificações (SIGMA-ALDRICH, 2019). Para analisar a atividade enzimática, foram utilizados tampão fosfato 100 mM pH 6,0, água, 26 mM de H₂O₂, 9 mM de guaiacol e extrato enzimático. A incubação foi realizada em banho termostático por 15 min a 30 °C. A oxidação do composto foi verificada em espectrofotômetro a 470 nm e a atividade da enzima PO foi estimada pela Equação 2 descrita por Schüttmann et al. (2014), através da reação de oxidação do substrato ao tetraguaiacol. Uma unidade de atividade da PO representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de guaiacol em 1 min.

$$U \,{}^{\text{U}\,\text{mL}^{-1}} = \frac{\text{abs x V}_{\text{reação}} \text{ x DF x 10}^3}{\epsilon \,\text{x d x t x V}_{\text{amostra}}}$$
(2)

Onde U mL⁻¹ é a unidade de atividade de PO por mL de extrato; abs é a absorbância da reação; $V_{reação}$ é o volume total da reação (mL); $V_{amostra}$ é o volume de extrato enzimático (mL); DF é o fator de diluição (diluição do extrato enzimático); 10^3 é a conversão de mmol em µmol; ε é o coeficiente de atenuação molar do tetraguaiacol (26.600 L mol⁻¹ cm⁻¹); d é o tamanho horizontal da cubeta (cm) e t é o tempo de reação (min).

2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE OTA E ZEA POR CLAE-FL

A detecção e quantificação das micotoxinas OTA e ZEA foram realizadas por um cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE), fabricado por Shimadzu (Kyoto, Japão), acoplado a um detector de fluorescência (modelo FL - 10AXL). As condições de detecção foram: excitação a 333 nm e emissão a 460 nm (KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2015). A coluna cromatográfica utilizada foi a Supleco® - Kromasil C18 (5 μ m e 150 mm x 4,6 mm) (Bellefonte, EUA) a 25 °C. Os solventes que constituíram a fase móvel foram acetonitrila: água acidificada com ácido acético a 1% (60:40, v v⁻¹), em eluição isocrática. A vazão da fase móvel estabelecida foi de 0,8 mL min⁻¹, de modo a executar uma corrida cromatográfica de 7 min.

2.5 EXTRAÇÃO DE MICOTOXINAS DA SOLUÇÃO MODELO E CERVEJA

A extração de OTA e ZEA da solução modelo e cerveja foi realizada por partição líquido-líquido (LLP), de acordo com Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018) com modificações. Os padrões OTA e ZEA foram adicionados em recipientes de 10 mL de vidro e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Primeiramente, 1 mL de amostra (solução modelo - tampão fosfato, água, 26 mM de H₂O - ou cerveja) foi acidificada com ácido acético para pH 2, depois foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio (CH₃Cl) e agitados no vórtex por 30 s e em banho ultrassônico (25 kHz) por 3 min. A fração de clorofórmio foi coletada. O procedimento de partição com clorofórmio foi repetido três vezes. As frações de clorofórmio foram evaporadas em banho de areia a 60 °C e as amostras foram ressuspensas em acetonitrila: água acidificada com ácido acético a 1% (60:40, v v⁻¹) para detecção e quantificação por CLAE-FL.

2.6 MÉTODO DE VALIDAÇÃO ANALÍTICO

Os parâmetros validados para a determinação da OTA e ZEA foram linearidade, curva analítica, coeficiente de correlação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) (SANTE/EU, 2015), precisão e exatidão (EUROPEAN COMMISSION, 2006b).

2.7 DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA POR PO

2.7.1 Otimização das condições de reação na solução modelo

Para obter os maiores níveis de degradação de micotoxinas foi realizada a otimização das condições de reação (pH, força iônica, temperatura, concentração de H_2O_2 e adição de íons metálicos). As soluções padrão de OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 µg mL⁻¹) foram adicionadas ao reator tipo Erlenmeyer, de acordo com Nora et al. (2019) e Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018), respectivamente. O solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e as amostras foram solubilizadas na solução modelo usando vórtex por 30 s, seguido de um banho ultrassônico por 3 min. A solução modelo foi constituída de tampão fosfato de potássio, água, H_2O_2 e enzima PO a uma concentração de 0,6 U mL⁻¹, conforme descrito por Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018).

O estudo para otimização das condições de reação foi realizado pelo método de um fator de cada vez, em cinco etapas. Uma variável independente foi investigada em cada estágio e o tratamento com os resultados mais satisfatórios foi selecionado e utilizado no estágio seguinte. Assim, no primeiro estágio, a solução modelo foi homogeneizada e incubada com 100 mM de tampão fosfato de potássio em diferentes pH (3, 4, 5, 5, 5, 6, 6, 5, 7 e 8), água, 26 mM de H₂O₂ e PO (0,6 U mL⁻¹), por 24 h em agitação orbital (150 rpm) a 25 \pm 1 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata nas mesmas condições de reação e comparados ao controle (com micotoxinas e sem enzima). A concentração de OTA e ZEA residual na solução modelo foi extraída e quantificada como descrito na Equação 3.

Degradação de OTA ou ZEA (%):
$$\frac{CM_{inicial} - CM_{final}}{CM_{inicial}} X 100$$
 (3)

Onde $CM_{inicial}$ é a concentração de micotoxinas inicial (OTA em ng mL⁻¹ ou ZEA em µg mL⁻¹); e CM_{final} é a concentração de micotoxinas final (OTA em ng mL⁻¹ ou ZEA em µg mL⁻¹), calculada através uma curva analítica com os padrões das micotoxinas.

Então, no segundo estágio, a força iônica (5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 mM) do tampão fosfato de potássio foi avaliado. Na terceira etapa, foi avaliada a temperatura de incubação (20; 25; 30; 35 e 40 \pm 1 ° C) com agitação orbital. Posteriormente, foi avaliada a concentração de H₂O₂ (13, 26, 39 e 52 mM). E finalmente, na quinta etapa, foi avaliada a influência de íons metálicos (Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Fe²⁺ e Na⁺ a 1 e 5 mM) no aumento ou diminuição da atividade da PO relacionada à degradação das micotoxinas.

2.7.2 Determinação de parâmetros cinéticos

A constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{máx}$) foram determinadas para a PO comercial (0,6 U mL⁻¹) empregando as condições ótimas de reação da atividade enzimática por 90 min (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018). As concentrações de OTA e ZEA foram 1; 1,7; 3; 5; 8,3; 10; 15; 18; 20; 27,5 e 31,7 ng mL⁻¹ e 0,16; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6 µg mL⁻¹, respectivamente, conforme descrito por Nora et al. (2019) e Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018). Os ensaios foram realizados em triplicata e comparados ao controle (com micotoxina e sem PO). O K_M e V_{máx} foram determinados a partir do gráfico Lineweaver–Burk (LB). O gráfico entre 1 v₀⁻¹ e 1 S⁻¹ (gráfico LB) produz uma linha reta que é caracterizada por uma inclinação de K_M V_{máx}⁻¹ com intercepção em y em 1 V_{max}⁻¹ e intercepção em x em 1 K_M⁻¹. Onde V₀ é correspondente a taxa inicial da utilização de substrato; V_{máx}: é referente a taxa máxima de utilização de substrato; S é a concentração de substrato e K_M indica a constante de Michaelis-Menten.

2.7.3 Cinética de degradação de OTA e ZEA

A degradação simultânea de OTA e ZEA foi realizada em reator tipo Erlenmeyer com volume útil de 125 mL. Os padrões de OTA e ZEA foram adicionados ao reator em 10 ng mL⁻¹ e 1 μ g mL⁻¹, respectivamente, conforme Nora et al. (2019) e Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018). O solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. A solução modelo consistia em tampão fosfato de potássio, água, H₂O₂, íons metálicos e enzima PO, com incubação por 24 h em agitação orbital (150 rpm). As condições de reação de pH, força iônica, temperatura, concentração de H₂O₂ e adição de íon metal foram definidas pela otimização, de acordo com o item 2.7.1. A amostragem foi realizada nos intervalos de tempo de 0; 15; 30; 60; 90; 120; 240; 360; 480 e 1440 min (24 h) para extrair OTA e ZEA e determinar sua concentração, a fim de estimar a degradação pela ação da PO comercial. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e comparados ao controle.

2.7.4 Confirmação de degradação por PO

O mecanismo de degradação da OTA e ZEA foi verificado pela aplicação da enzima ativa e desnaturada (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018). Portanto, a PO $(0,6 \text{ U mL}^{-1})$ foi desnaturada termicamente a 100 °C. Os ensaios de degradação com a PO desnaturada foram realizados em recipientes de 10 mL de vidro, onde os padrões OTA e ZEA foram adicionados a 10 ng mL⁻¹ e 1 µg mL⁻¹, respectivamente, e o solvente foi evaporado sob

atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, os constituintes da solução modelo foram adicionados e homogeneizados por 30 s por agitação em vórtex e banho ultrassônico por 3 min. Em seguida, a enzima desnaturada foi adicionada. As misturas foram incubadas por 24 h sob agitação orbital a 150 rpm a 25 ± 1 °C. Após, as micotoxinas foram extraídas e quantificadas. Os ensaios foram realizados em triplicata e comparados ao controle.

2.7.5 Degradação de OTA e ZEA na cerveja

Primeiramente, a ocorrência de OTA e ZEA nas amostras de cerveja do tipo Pilsen a serem utilizadas nos ensaios de degradação de micotoxinas por PO foi verificada. Reatores do tipo Erlenmeyer com um volume útil de 50 mL foram utilizados nos ensaios. Os padrões de OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 μ g mL⁻¹) foram adicionados aos reatores e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, cerveja desgaseificada (banho ultrassônico de 25 kHz foi aplicado por 1 h), H₂O₂ e PO (0,6 U mL⁻¹) foram adicionados a um volume final de 10 mL, e as condições ideais obtidas neste estudo foram aplicadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e comparadas ao controle. Após o tratamento enzimático, o residual de micotoxinas foi extraído e quantificado por CLAE-FL.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da degradação de OTA e ZEA na solução modelo e cerveja foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (p < 0.05), com o uso do Software Statistica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE OTA E ZEA

A validação do método analítico é necessária para garantir resultados exatos e precisos (EUROPEAN COMMISSION, 2006b). Os parâmetros de validação do método para quantificação de OTA e ZEA em CLAE- FL empregados neste estudo, estão demonstrados na Tabela 1. O método proposto pode ser descrito como sensível, exato e preciso, devido às baixas concentrações do limite de detecção e limite de quantificação das micotoxinas, além de níveis de recuperações aceitáveis e linearidades das curvas com ampla faixa de aplicação. A curva de

calibração construída em solvente foi utilizada para quantificar a degradação das micotoxinas em solução modelo e cerveja, devido à ausência de efeito de matriz. Portanto, o método validado pode ser empregado com confiabilidade para monitorar a degradação de OTA e ZEA pela PO em solução modelo e cerveja e está de acordo com os parâmetros internacionais de validação descritos pela European Commission (2006) e SANTE/EU (2015).

Parâmetros analí	ticos	OTA (ng mL ⁻¹)	ZEA (μg mL ⁻¹)
Equação da curva		y = 3235x + 1580,2	y = 220395x + 1160,1
Linearidade		0,40 a 30	0,02 a 2
Coeficiente de corre	elação	0,999	0,997
Coeficiente de detern	ninação	0,998	0,995
LD_m		0,25	0,01
LQm		0,40	0,02
	Nível 1	$95{,}3\pm3{,}7$	$94,\!4\pm9,\!9$
Recuperação (%)* em	Nível 2	$90,\!4\pm7,\!7$	$80{,}5\pm9{,}8$
solução modelo	Nível 3	$83,2 \pm 5,4$	$87,7\pm4,0$
\mathbf{D}	Nível 1	$106,5 \pm 6,1$	$85,6 \pm 4,5$
Recuperação (%)* na	Nível 2	$100,8 \pm 6,4$	$88,5 \pm 1,3$
cerveja	Nível 3	$97,4 \pm 4,2$	$84,\!4 \pm 0,\!4$

Tabela 1 - Parâmetros de validação do método analítico avaliado em CLAE-FL para quantificação de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA).

LDm – limite de detecção do método; LQm – limite de quantificação do método. *Resultados expressos em média ± DP. DP – Desvio padrão das médias (n = 3). Nível 1 – fortificação com 1,0 ng mL⁻¹ de OTA e 0,1 μg mL⁻¹ de ZEA; Nível 2 – fortificação com 5,0 ng mL⁻¹ de OTA e 0,5 μg mL⁻¹ de ZEA; Nível 3 – fortificação com 10,0 ng mL⁻¹ de OTA e 1,0 μg mL⁻¹ de ZEA.

3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AÇÃO DA PO NA DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA EM SOLUÇÃO MODELO

A aplicação da PO como um biocatalizador industrial é determinada por sua estabilidade e atividade enzimática (LOPES; PINTO; SILVA, 2014), sendo estas influenciadas por parâmetros como: pH, temperatura (CHATTOPADHYAY; MAZUMDAR, 2000), força iônica (BURSAL, 2013), substratos (ROJAS-REYES et al., 2014), concentração de H₂O₂ (BHUNIA; DURANI; WANGIKAR, 2001), adição de compostos químicos (MÁRQUEZ et al., 2008) e íons metálicos (LAI et al., 2006). Desta maneira, a otimização das condições de reação da PO para degradação de OTA e ZEA é primordial para obter resultados promissores.

3.2.1 Efeito do pH

O pH é um fator determinante na atividade enzimática, pois pode ocasionar alterações no estado de ionização da cadeia de aminoácidos presente no sítio catalítico da enzima ou na ionização do substrato (AJILA; PRASADA RAO, 2009). A Figura 1 mostra os resultados obtidos para a degradação de OTA e ZEA em diferentes valores de pH durante 24 h. Os resultados demonstram que a degradação de OTA e ZEA pela atividade da PO é estatisticamente afetada pelo pH da solução modelo, sendo que as maiores degradações simultânea para as micotoxinas foram obtidas quando empregado pH 7,0 e 8,0.

Figura 1 - Efeito do pH da solução modelo* na degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (PO).



*Solução-modelo - tampão fosfato de potássio, água, 26 mM de peróxido de hidrogênio e incubação a 25 °C ± 1 °C por 24 h. Resultados expressos em média ± DP. DP - desvio padrão das médias (n = 3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis avaliados para a mesma micotoxina (p < 0,05).

Adicionalmente, a constante de dissociação (pKa) da ZEA é de 7,6 (GAJÊCKA et al., 2011), enquanto a OTA possui dois grupos ionizáveis, onde o grupo carboxila da fenilalanina apresenta pKa de 4,4 e o grupo fenólico um valor entre 7,05 a 7,3 (DOHNAL; PAVLÍKOVÁ; KUCA, 2010). Desta maneira, foi possível observar que a ionização das micotoxinas permitiu maior interação entre os compostos e a enzima, e consequente aumento

da degradação de OTA e ZEA. Portanto, visando os maiores percentuais de degradação simultânea de OTA e ZEA, o pH da solução modelo foi definido como 7,0.

Segundo a Sigma-Aldrich (2019), fabricante da enzima, a PO obtida de raiz-forte (*Armoracia rusticana*) atua na faixa de pH de 5,0 a 9,0, com pH ótimo de 6,0 a 6,5, apresentando 84% do máximo da atividade a 25 °C quando em pH 7,5, empregando pirogalol como substrato específico da enzima. A PO de *Armoracia rusticana* em solução modelo com pH 6 a 25 °C foi empregada na redução de 40, 59 e 69,9% de deoxinivalenol (DON) (FELTRIN et al., 2017b), OTA (NORA et al., 2019) e ZEA (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018), respectivamente. Contudo, deve-se salientar que a otimização do pH para ação da PO nas micotoxinas não foi realizada nesses estudos, mas sim o pH ótimo para oxidação do guaiacol (substrato) foi usado. Além disso, a PO de *Armoracia rusticana* foi utilizada na oxidação de outros substratos, como ABTS e 4-aminoantipirina-fenol (BAYRAMOĞLU; ARICA, 2008) e apresentou maior atividade enzimática em pH 6 a 25 °C (AL-BAGMI et al., 2019; SARIKA et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos descritos na literatura. As maiores porcentagens de biotransformação da aflatoxina B1 (AFB1) por PO de Armoracia rusticana foram obtidas nos valores de pH de 7; 7,5 e 8 e temperaturas de 30 e 40 °C (SIBAJA et al., 2019). Em pH 7 e temperatura ambiente, as degradações máximas de 56 e 86% *p*-clorofenol e fenol respectivamente, foram obtidas usando a mesma enzima (BAYRAMOĞLU; ARICA, 2008).

3.2.2 Efeito da força iônica

A força iônica afeta as reações catalisadas por enzimas se o substrato estiver ionizado ou se aminoácidos cataliticamente importantes dentro da molécula da enzima estiverem ionizados (DALE; WHITE, 1983). Isso ocorre porque os resíduos de aminoácidos podem sofrer reações de protonação ou desprotonação e estão envolvidos na ligação de substratos e conversão em produtos, e os efeitos da força iônica devem ser considerados ao trabalhar com enzimas que utilizam substratos ionizados ou que catalisam a separação de carga (ELLIS; MORRISON, 1982). Assim, tanto a ligação de substratos ionizados a enzimas quanto o movimento de grupos ionizados dentro do sítio catalítico serão influenciados pela composição iônica do meio (CHAPLIN; BUCKE, 1990). A Figura 2 mostra os resultados obtidos para a degradação de OTA e ZEA em diferentes forças iônicas em pH 7 durante 24 h. A maior degradação de OTA e ZEA foi observada quando empregado tampão fosfato na concentração de 25 mM. Os resultados do estudo da força iônica revelaram que esta é uma variável que interfere significativamente na atividade do PO para degradação das micotoxinas.





* Solução-modelo - tampão fosfato de potássio pH 7, água, 26 mM de peróxido de hidrogênio e incubação a 25 °C ± 1 ° C por 24 h. Resultados expressos em média ± DP. DP - desvio padrão das médias (n = 3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis avaliados para a mesma micotoxina (p < 0,05).</p>

Comportamento similar foi observado por Malomo et al. (2011) e Bursal (2013) que verificaram que em solução tamponante com força iônica de 25 mM e 25 °C a PO de *Armoracia rusticana* e PO purificada de folhas de acelga (*Beta Vulgaris* subespécies *cicla*) apresentavam maior atividade na oxidação de ABTS e guaiacol, respectivamente. Em relação à degradação de micotoxinas, a ação do PO de *Armoracia rusticana* degradou 69% de ZEA (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018) e 97% de AFB1 (SIBAJA et al., 2019) uma solução modelo com tampão de fosfato 100 mM. Cabe ressaltar que a força iônica empregada nesses estudos foi a concentração que o fabricante da enzima recomenda para oxidação de substrato específico, como guaiacol e/ou pirogalol, enquanto que neste estudo a otimização desta variável foi realizada. Além disso, uma menor concentração de força iônica (25 mM) para o uso na degradação de micotoxinas permite a redução dos custos no processo.

3.2.3 Efeito da temperatura

A temperatura ocasiona um grande impacto nas reações catalisadas por enzimas, pois o aumento da temperatura tem o efeito de reduzir a energia de ativação ao aumentar o nível de energia inicial (GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015). Além disso, a temperatura de um ensaio enzimático é extremamente importante, pois o aumento gradual da temperatura pode aumentar a atividade enzimática até um certo valor no qual a desnaturação pode ocorrer e, também, o sítio catalítico é modificado e pode alterar as interações na formação do complexo enzima-substrato (DANIEL; DANSON, 2013). A Figura 3 apresenta os percentuais de degradação de OTA e ZEA em temperaturas entre 20 e 40 °C. Os resultados evidenciaram que os maiores percentuais de degradação simultânea das micotoxinas são alcançadas em 30 °C; não diferindo estatisticamente da temperatura de 25 °C.





* Solução modelo - tampão de fosfato de potássio 25 mM pH 7, água, 26 mM de peróxido de hidrogênio e incubação por 24 h. Resultados expressos em média ± DP. DP - desvio padrão das médias (n = 3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis avaliados para a mesma micotoxina (p < 0,05).</p>

3.2.4 Efeito do peróxido de hidrogênio

Como o H_2O_2 é o co-substrato do PO, ele participa do ciclo catalítico através da oxidação da enzima nativa para formar uma molécula intermediária (composto I) que

subsequentemente oxida um substrato fenólico e o converte em um radical livre (composto II) e, com isso a enzima retorna ao seu estado nativo ou pode ser convertida em formas inativas através da reação do composto II com H₂O₂ para formar o composto III (HOSHINO; NAKAJIMA; YAMAZAKI, 1987).Também é relatado que, na ausência ou excesso de H₂O₂, a PO demonstra um comportamento cinético de inativação por suicídio, sendo o co-substrato o composto suicida. A partir do complexo (composto I - H₂O₂), é estabelecida uma competição entre duas vias catalíticas (a via da catalase e a via de formação do composto III) e a inativação pela via suicida (formação da enzima inativa) (ARNAO et al., 1990). Assim, em um reator com baixas concentrações de H₂O₂, a taxa de reação é limitada e, ao considerar os fatores de produção e recursos econômicos, a adição da concentração mínima admissível deste cosubstrato deve ser determinada com o objetivo de obter a maior taxa de reação (WU et al., 1994). Considerando as implicações que a ausência ou excesso de H₂O₂ pode causar à reação enzimática catalisada por PO, foi verificado o efeito da concentração de co-substrato na solução modelo para degradação de OTA e ZEA, como demonstra a Tabela 2.

Concentração de H2O2 (mM)	Degradação** (%)					
na solução modelo	ΟΤΑ	ZEA				
13	$10,6^{b} \pm 2,6$	$54,8^{c} \pm 4,4$				
26	$27,6^{a} \pm 1,5$	$65,9^{a} \pm 0,5$				
39	$15,2^{b} \pm 5,1$	$61,5^{ab} \pm 1,4$				
52	$9,3^{b} \pm 0,3$	$58,1^{bc} \pm 2,1$				

Tabela 2 - Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (0,6 U mL⁻¹) na solução

* Solução-modelo - tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7, água, peróxido de hidrogênio e incubação a 30 °C ± 1 °C por 24 h. ** Resultados expressos em média ± DP. DP - desvio padrão das médias (n = 3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significante (p > 0,05).

Os resultados indicam que a concentração do H_2O_2 na solução modelo é um parâmetro significativo à otimização da degradação de OTA e ZEA simultaneamente, e os maiores porcentuais de degradação das micotoxinas foram obtidos quando empregados a concentração de 26 mM de H_2O_2 . Além disso, observou-se que nas concentrações mais baixas (13 mM) e superiores (52 mM) de H_2O_2 houve a diminuição na degradação da OTA (51 e 57%, respectivamente) e da ZEA (17 e 12%, respectivamente), quando comparados com a degradação obtida ao empregar 26 mM.

A utilização da PO na presença de 0,08% de H_2O_2 (v v⁻¹, equivalente a 26 mM) é descrita na degradação de micotoxinas, como nos estudos de Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018), Nora et al. (2019) e Sibaja et al. (2019) que empregaram a PO de *Armoracia rusticana* para degradação de ZEA, OTA e AFLA B₁, respectivamente, e Gautério et al. (2017) que utilizaram a PO purificada de farelo de arroz para redução dos níveis de DON. Entretanto, a concentração de H_2O_2 não foi avaliada nestes estudos, pois foram utilizadas as condições ótimas de ação enzimática para a oxidação de guaiacol ou pirogalol, descritas pelo fabricante da enzima.

A PO juntamente com o H₂O₂ em diferentes concentrações também é empregada na oxidação de outros substratos, como a oxidação de *o*-dianisidina pela ação da PO purificada de feijão preto (*Vigna mungo*) (AJILA; PRASADA RAO, 2009), oxidação de 4- aminoantipirina através atividade da PO de *Armoracia rusticana* e soja (NICELL; WRIGHT, 1997) e oxidação de guaiacol, fenol e 2-clorofenol após a ação de PO de *Armoracia rusticana* (LAVERY et al., 2010).

3.2.5 Efeito da adição de íons metálicos

A adição de íons metálicos nas reações enzimáticas pode alterar a conformação do sítio catalítico da enzima e, assim, bloquear sua interação com o substrato (inibição enzimática) ou podem ser utilizados como um cofator pela enzima ocasionando o aumento da atividade enzimática (MAHMOUDI et al., 2003). Na Tabela 3 é demonstrado os resultados obtidos para degradação de OTA e ZEA por PO após a adição de íons metálicos na solução modelo. Os íons metálicos K⁺ e Na⁺ (1 mM) e Mg²⁺ (1 e 5 mM) demonstraram aumentar significativamente a atividade da PO na degradação de OTA em 66; 38; 58 e 39%, respectivamente, enquanto o Ca²⁺ (1 e 5 mM) inibiu a degradação em 100% quando comparado ao controle (sem adição do íon metálico). Por outro lado, observou-se que a adição de Ca²⁺ (1 e 5 mM), Fe²⁺ (1 e 5 mM), e Na⁺ e Mg²⁺ em 5 mM resultou na redução da atividade da PO na degradação de 2EA. Assim, visando a degradação simultânea de OTA e ZEA o íon metálico K⁺ na concentração de 1 mM foi escolhido para dar continuidade no estudo.

É possível sugerir que algumas propriedades químicas dos íons possam auxiliar ou prejudicar a ligação enzima-substrato, como por exemplo, o íon ser monovalente ou divalente, tamanho do raio atômico, densidade e potencial de ionização. Portanto, os resultados obtidos corroboram com a importância de estimar o efeito de íons metálicos na otimização da degradação de micotoxinas por PO, uma vez que não há estudos relacionados a isto na literatura.

		Degradação** (%)		Degradação relativa***(%)		
Composto	Concentração (mM)	ОТА	ZEA	ΟΤΑ	ZEA	
Controle	0	$20,4^{b} \pm 1,5$	$63,\!5^{ab}\!\pm2,\!1$	100,0	100,0	
Ca ²⁺	1	$0,0^{e} \pm 0,1$	$55,2^{cd}\pm2,2$	0,0	86,9	
Fe ²⁺	1	$14,0^{bc} \pm 2,5$	$47,2^{de} \pm 5,1$	68,6	74,3	
\mathbf{K}^+	1	$33,8^{a} \pm 4,1$	$64,8^{a}\pm4,8$	165,7	102,0	
Na^+	1	$28{,}2^a\pm0{,}5$	$61,0^{abc}\pm0,2$	138,2	96,1	
Mg^{2+}	1	$32,3^a\pm1,5$	$60,\!4^{abc}\pm2,\!1$	158,3	95,1	
Ca^{2+}	5	$0,0^{e} \pm 0,3$	$55,7^{bc}\pm1,0$	0,0	87,7	
Fe ²⁺	5	$5,1^{d} \pm 0,2$	$25,2^{f} \pm 1,7$	25,0	39,7	
\mathbf{K}^+	5	$16,7^{bc} \pm 2,9$	$59,6^{abc}\pm3,0$	81,9	93,9	
Na^+	5	$10,6^{cd} \pm 1,1$	$45,3^{e}\pm 2,5$	52,0	71,3	
Mg^{2+}	5	$28,3^{a}\pm 3,4$	$45,5^{e} \pm 4,1$	138,7	71,7	

Tabela 3 - Efeito da adição de íons metálicos na degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela peroxidase comercial (0,6 U mL⁻¹) na solução modelo*.

* Solução-modelo - tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7, água, peróxido de hidrogênio e incubação a 30 °C ± 1 °C por 24 h. Controle - a atividade enzimática sem a adição de íons metálicos durante a degradação das micotoxinas foi estabelecida em 100%. ** Resultados expressos em média ± DP. DP - desvio padrão das médias (n = 3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significante (p > 0,05). *** Degradação relativa calculada em relação à porcentagem de degradação da amostra controle sem adição de íons metálicos.

Na literatura, existem vários estudos que descrevem a adição de íons metálicos para o aumento da atividade ou inibição de PO obtida de diferentes fontes para oxidação de diversos substratos. O Ca²⁺ nas concentrações de 1 e 5 mM é reportado por inibir a atividade da PO de *Armoracia rusticana* na oxidação do guaiacol, em 60 e 64%, respectivamente (MOHAMED et al., 2011). O Fe²⁺ em 1 e 5 mM reduz a atividade da PO purificada de folhas de *Jatropha curcas* na oxidação do guaiacol, em 22 e 32%, respectivamente (CAI et al., 2012). Os íons K⁺, Na⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ em 5 mM aumentaram a atividade enzimática da PO purificada de grama de trigo (*Triticum aestivum* L.) na oxidação de *o*-fenilenodiamina em 46; 44; 64 e 50%, respectivamente (LAI et al., 2006). Verificou-se também que a adição de Mg²⁺ e Ca²⁺ em uma concentração de 5 mM induziu o aumento da atividade do PO purificado do feijão preto (*Vigna mungo*) na oxidação de *o*-dianisidina em 4 e 10%, respectivamente, enquanto que Na⁺ e K⁺ (5 mM) inibiu a atividade em 19 e 2%, respectivamente (AJILA; PRASADA RAO, 2009). Em outro estudo, observou-se que os íons Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺ e Fe²⁺ (1 mM) inibiram aproximadamente 3; 20; 24 e 54% da atividade da PO purificada a partir da orquídea (*Vanilla planifolia*) na oxidação do guaiacol, respectivamente (MÁRQUEZ et al., 2008).

3.2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos KM e Vmáx

Os resultados de K_M e $V_{máx}$ apresentados na Tabela 4 foram determinados pelas equações apresentadas nos gráficos de duplo-recíproco de LB para degradação de OTA e ZEA pela ação da PO comercial (0,6 U mL⁻¹). Os resultados de K_M e $V_{máx}$ da PO comercial para degradação e OTA e ZEA foram de 50 e 10.710 nM e 0,168 e 72 nM min⁻¹, respectivamente.

Micotoxina	Equação de LR**	R ²	K	ΣM	Vmáx		
	LD	-	nM	ng mL ⁻¹	nM min ⁻¹	ng mL ⁻¹ min ⁻¹	
ОТА	a = 326,33x	0.983	50	20	0,168	0,068	
	b = 14,577	0,905	50	20			
7 F A	a = 144x	0.08/	10 710	3 /10	72	23	
LĽA	b = 42,189	0,704	10./10	5.410	12		

Tabela 4 - Parâmetros K_M e V_{máx} na degradação de de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) por peroxidase comercial (0,6 U mL⁻¹) em solução modelo*.

* Solução-modelo - tampão fosfato 25 mM pH 7, 26 mM de peróxido de hidrogênio, 1 mM de íon metálico K⁺ e incubação a 30 °C ± 1 °C por 90 min. **Equação do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (y = ax + b).

A otimização das condições reacionais contribui com o aumento da afinidade da enzima por OTA e ZEA em até 5 e 3,7 vezes, respectivamente, quando comparado aos resultados descritos por Nora et al. (2019) e Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018) que empregaram a PO comercial para degradação de OTA e ZEA e obtiveram valores de K_M de 270 e 39.600 nM, respectivamente. É relevante salientar que nos estudos citados, a ação da enzima foi empregada sobre as micotoxinas individualmente, diferentemente do presente estudo que avaliou os parâmetros de K_M e V_{máx} da PO após otimização de condições reacionais ótimas para degradação simultânea das micotoxinas.

3.2.7 Cinética de degradação de OTA e ZEA e confirmação da degradação pela ação da PO desnaturada

Na Figura 4 são apresentados os percentuais de degradação de OTA e ZEA pela PO comercial (0,6 U mL⁻¹) ao longo de 1440 min (24 h). Os percentuais de degradação simultânea de OTA e ZEA pela ação enzimática aumentaram gradualmente ao longo de 360 min, onde foram obtidos os valores máximos de 27,0 e 64,9%, respectivamente. Os resultados de degradação obtidos em 480 e 1440 min foram de 29,8 e 30,5% para OTA e 65,7 e 65,0% para ZEA, respectivamente, e não houve diferença estatística nas porcentagens de degradação obtidos em 360; 480 e 1440 min. Desta maneira, o tempo de incubação ótimo para degradação simultânea de OTA e ZEA por PO comercial em solução modelo é de 360 min (6 h), indicando seu potencial para futura aplicação desta enzima na indústria de alimentos, pois com atividade enzimática de 0,6 U mL⁻¹ foi possível alcançar percentuais de degradação satisfatórios para ambas micotoxinas. Assim, após a otimização das condições reacionais da enzima PO na degradação simultânea de OTA e ZEA, foi verificado um aumento de 40% na degradação de ambas micotoxinas quando comparada às condições de reação descritas pelo fabricante da enzima (tampão fosfato de 100 mM, pH 6,0, 26 mM de H₂O₂ e temperatura de 30 °C em 24 h).

A ação da PO comercial com atividade enzimática de 0,6 U mL⁻¹ foi descrita por degradar ZEA em 69,9% em 24 h na solução modelo (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018) e, com atividade de 0,063 U mL⁻¹ degradou 59% de OTA em solução modelo em 300 min (NORA et al., 2019). Além disso, o potencial da PO comercial ou obtida de fontes alternativas na redução dos níveis ou biotransformação de outras micotoxinas foram relados na literatura (DAS; MISHRA, 2000; FELTRIN et al., 2017b; GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011; GAUTÉRIO et al., 2017; SIBAJA et al., 2019; TRIPATHI; MISHRA, 2011).

Outras enzimas também são mencionadas na literatura devido ao seu potencial na degradação de OTA e ZEA. OTA é degradado por: carboxipeptidase A, obtida de pâncreas bovino (STANDER et al., 2001), *Rhizopus oryzae* (KUPSKI et al., 2013) e *Trichoderma reesei* (KUPSKI; QUEIROZ; BADIALE-FURLONG, 2018a); carboxipeptidase obtida de *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1 (CHANG et al., 2015) e *Bacillus subtilis* CW14 (HU et al., 2019); proteases comerciais e obtidas de *Aspergillus niger* (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006); lipase obtida de *Aspergillus niger* (amano lipase A) (STANDER et al., 2000); metaloenzima hidrolítica obtida *Aspergillus niger* (ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2007). Na degradação de ZEA são reportadas enzimas, como a peroxirredoxina (tio-redoxina peroxidases)

obtida de *Acinetobacter* sp. SM04 (YU et al., 2012); a enzima lactona hidrolase ZEA (ZHD101) obtida a partir de *Clonostachys rosea* (KOSAWANG et al., 2014); enzimas extracelulares obtidas de *Aspergillus niger* FS10 (HE et al., 2016), de *Pseudomonas putida* (ALTALHI; EL-DEEB, 2009) e de *Acinetobacter sp.* SM04 (YU et al., 2011), além de enzimas extracelular e intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANG et al., 2016).





* Solução-modelo - tampão fosfato 25 mM pH 7, 26 mM de peróxido de hidrogênio e 1 mM de íon metálico K⁺ e incubação a 30 °C ± 1 °C. Resultados expressos em média ± DP. DP - desvio padrão das médias (n = 3).

A confirmação da ação da PO na degradação simultânea de micotoxinas foi verificada, onde as porcentagens de degradação de OTA e ZEA utilizando a enzima desnaturada foram de 0,4 e 0,6%, com desvio padrão de 0,1 e 0,2, respectivamente. Desta maneira, ficou comprovado que a degradação se deve à capacidade de oxidação do PO e não à interações químicas ou físicas com a estrutura proteica da enzima, corroborando com o estudo de Garcia; Feltrin; Garda-Buffon (2018).

Os resultados deste estudo contribuem com informações sobre a degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo e para futuras aplicações alimentares. A aplicação de enzimas na indústria de alimentos, como a PO, é apoiada por muitos pesquisadores
(MANUBOLU et al., 2018; RAVEENDRAN et al., 2018). O uso de aditivos, como enzimas, é promissor para degradar micotoxinas na indústria de alimentos e rações, principalmente porque cada enzima tem uma função específica (JI; FAN; ZHAO, 2016).

3.2.8 Degradação de OTA e ZEA em cerveja tipo Pilsen

Com base nos resultados obtidos da otimização das condições de reação da PO em solução modelo (26 mM de peróxido de hidrogênio e incubação a 30 °C por 6 h) foi proposto a aplicação da PO comercial na degradação de OTA e ZEA em cerveja tipo Pilsen. A cerveja é uma bebida consumida mundialmente e é frequentemente reportada por ser contaminada por OTA e ZEA (BAUER et al., 2016; BERTUZZI et al., 2011; MEDINA et al., 2006; PASCARI et al., 2018a).

A degradação simultânea de OTA e ZEA na cerveja tipo Pilsen foi de 4,8 e 10,9%, com desvio padrão de 0,7 e 0,9, respectivamente. Os baixos percentuais de degradação podem estar relacionados ao pH ácido da cerveja (4,05), pois pode ocasionar modificações do sítio ativo da enzima e/ou alterações no estado de ionização das micotoxinas. Estes resultados também se assemelham aos obtidos na degradação de OTA e ZEA em solução modelo com pH 4. Outro aspecto a ser observado é que a maior concentração adicionada de ZEA aumenta a possibilidade da interação enzima-substrato.

Além disso, foi verificado a ocorrência natural de OTA (6,4 μ g L⁻¹) nas amostras não fortificadas e que a ação da PO degradou a micotoxina em 40,9%, com desvio padrão de 2,0. A maior degradação de OTA na cerveja pela ação da PO, quando comparada aos ensaios de degradação simultânea de micotoxinas, ocorreu devido à ação da enzima em apenas um substrato. Para perspectivas futuras, a PO pode ser usado para degradação simultânea de OTA e ZEA em outras matrizes alimentares, como produtos de panificação e alimentos para bebês, entre outros, observando principalmente o pH da matriz alimentar, a fim de alcançar a maior ação enzimática.

Na literatura, não existem estudos avaliando a degradação de OTA e ZEA na cerveja pela aplicação de PO. No entanto, a PO comercial foi descrita para degradar 24% do AFB1 em cerveja e os pesquisadores reportaram que a taxa de redução da micotoxina pode ser influenciada negativamente quando comparada aos resultados de degradação (97%) obtidos na solução modelo, devido a bebida ser constituída por água, minerais, lipídios, carboidratos, proteínas, fibras solúveis e vitaminas do complexo B (SIBAJA et al., 2019).

A cerveja é descrita como fonte de minerais, como cálcio (0,9 mM), magnésio (4,3 mM), sódio (1,3 mM) e potássio (14 mM) e em menor proporção, por ferro, cobre, zinco e manganês. Além disso, é relatado que o conteúdo desses minerais influencia na qualidade e o sabor (doce, salgado, amargo e azedo) da bebida (MONTANARI et al., 2009). Portanto, é possível inferir que nos ensaios de degradação de OTA e ZEA na cerveja, a presença de K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, também podem ter influenciado na atuação da PO na degradação das micotoxinas, visto que, K⁺, Na⁺ e Mg²⁺ contribuem com o aumento da degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo. Enquanto que a presença de Ca²⁺ ocasiona o efeito inibidor da atividade da PO na degradação, o que resulta de uma matriz complexa e justificaria a redução dos percentuais de degradação simultânea de OTA e ZEA quando comparados aos resultados obtidos em solução modelo.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo relatou pela primeira vez que a PO comercial degradou simultaneamente OTA e ZEA, em 27,0 e 64,9%, respectivamente, em solução modelo durante 360 min após otimização das condições reacionais, como pH (pH 7), concentração da força iônica da solução (25 mM), temperatura de incubação (30 °C), adição de H₂O₂ como co-subtrato da enzima (26 mM) e adição de íon metálico de potássio (K⁺) (1 mM). Além disso, a degradação simultânea de OTA e ZEA em amostra de cerveja tipo Pilsen foi de 4,8 e 10,9%, respectivamente. Em conclusão, a utilização da PO comercial na degradação destas micotoxinas em solução modelo e cerveja demonstrou que a enzima pode ser uma alternativa para a indústria de alimentos e/ou rações, além de servir de base para outros estudos que visem a degradação de micotoxinas em matrizes alimentares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. Food Biotechnology, v. 20, n. 3, p. 231–242, 2006.

ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1909–1914, 2007.

AJILA, C. M.; PRASADA RAO, U. J. S. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1–2, p. 36–44, 2009.

AL-BAGMI, M. S.; KHAN, M. S.; ISMAEL, M. A.; AL-SENAIDY, A. M.; BACHA, A. BEN; HUSAIN, F. M.; ALAMERY, S. F. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 301–307, 2019.

ALTALHI, A. D.; EL-DEEB, B. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. Journal of Hazardous Materials, v. 161, n. 2–3, p. 1166–1172, 2009.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. In: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM. ARNAO, M. B.; ACOSTA, M.; DEL RIO, J. A.; VARÓN, R.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1041, n. 1, p. 43–47, 1990.

AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; ADAMS, C. D.; TYAGI, R. D. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: Temperature and pH effects. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2847–2856, 2006.

AZEVEDO, A. M.; MARTINS, V. C.; PRAZERES, D. M. F.; VOJINOVIĆ, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. **Biotechnology annual review**, v. 9, n. 3, p. 1387-2656, 2003.

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.

BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, n. 1–3, p. 148–155, 2008.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. Clinical microbiology reviews, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

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

BHAT, R.; REDDY, K. R. N. Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade. Food Chemistry, v. 215, p. 425–437, 2017.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 5, p. 562–7, 2001.

BURSAL, E. Kinetic Properties of Peroxidase Enzyme from Chard (*Beta vulgaris* Subspecies *cicla*) Leaves. International Journal of Food Properties, v. 16, n. 6, p. 1293–1303, 2013.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012.

CHANG, X.; WU, Z.; WU, S.; DAI, Y.; SUN, C. Degradation of ochratoxin A by Bacillus amyloliquefaciens ASAG1. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 32, n. 4, p. 564–571, 2015.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. Fundamentals of enzyme kinetics. In: CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. (Eds.). **Enzyme technology**. New York: Cambridge University Press., 1990. p. 12–17.

CHATTOPADHYAY, K.; MAZUMDAR, S. Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. **Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 263–270, 2000.

CHENG, J.; MING YU, S.; ZUO, P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminumpillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. **Water Research**, v. 40, n. 2, p. 283–290, 2006.

DALE, B. E.; WHITE, D. H. Ionic strength: A neglected variable in enzyme technology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 3, p. 227–229, 1983.

DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. **FEBS Letters**, v. 587, n. 17, p. 2738–2743, 2013.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 309–313, 2000.

DOHNAL, V.; PAVLÍKOVÁ, L.; KUCA, K. The pH and Mobile Phase Composition Effects Ochratoxin A Fluorescence at Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 9, p. 766–770, 2010.

DUARTE BAUMER, J.; VALÉRIO, A.; DE SOUZA, S. M. A. G. U.; ERZINGER, G. S.; FURIGO, A.; DE SOUZA, A. A. U. Toxicity of enzymatically decolored textile dyes solution by horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, n. May, p. 82–88, 2018.

ELLIS, Keith J.; MORRISON, John F. Buffers of constant ionic strength for studying pHdependent processes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1982. p. 405-426.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12–34, 2006.

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.

GAJÊCKA, M.; ZIELONKA, U.; DABROWSKI, M.; GAJÊCKI, M. Threats resulting from the presence of zearalenone in water. **Medycyna Wet.**, v. 67, n. 10, p. 643–646, 2011.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

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.

GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 8, p. 1998–2008, 2017.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. In: Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality. Woodhead Publishing, 2015. p. 11-55.

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

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

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001.

HOSHINO, N.; NAKAJIMA, R.; YAMAZAKI, I. The Effect of Polymerization of Horseradish Peroxidase on the Peroxidase Activity in the Presence of Excess H₂O₂: A Background for a Homogeneous Enzyme Immunoassay. **The Journal of Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 785–791, 1987.

HU, H.; JIA, X.; WANG, Y.; XIONG, L.; PENG, M.; LIANG, Z. Detoxification of ochratoxin a by an expressed carboxypeptidase and some isolated peptides from *Bacillus subtilis* CW14. **Toxicon**, v. 158, p. S67, 2019.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France, 1993: [s.n.]. v. 56.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. Food Control, v. 30, n. 1, p. 235–239, 2013.

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

JI, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 127–133, 2016.

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

KOSAWANG, C.; KARLSSON, M.; VÉLËZ, H.; RASMUSSEN, P. H.; COLLINGE, D. B.; JENSEN, B.; JENSEN, D. F. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic Fusarium graminearum. **Fungal Biology**, v. 118, n. 4, p. 364–373, 2014.

KUPSKI, L.; ALVES, C. L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Aplicação de carboxipeptidase obtida de *Rhizopus* na degradação de ocratoxina A. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 30, 2013.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food Chemistry**, v. 177, p. 354–360, 2015.

KUPSKI, L.; QUEIROZ, M. I.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase A to a baking process to mitigate contamination of wheat flour by ochratoxin A. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 248–254, 2018.

LAI, L. S.; WANG, D. J.; CHANG, C. T.; WANG, C. H. Catalytic characteristics of peroxidase from wheat grass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8611–8616, 2006.

LAVERY, C. B.; MACINNIS, M. C.; MACDONALD, M. J.; WILLIAMS, J. B.; SPENCER, C. A.; BURKE, A. A.; IRWIN, D. J. G.; D'CUNHA, G. B. Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 15, p. 8471–8476, 2010.

LOPES, G. R.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. **Rsc Advances**, v. 4, n. 70, p. 37244–37265, 2014.

MAHMOUDI, A.; NAZARI, K.; MOHAMMADIAN, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Effect of Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cu^{2+} on Horseradish Peroxidase: Activation, Inhibition, and Denaturation Studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 81–94, 2003.

MALOMO, S. O.; ADEOYE, R. I.; BABATUNDE, L.; SAHEED, I. A.; INIAGHE, M. O.; OLORUNNIJI, F. J. Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide: The effects of reaction pH, buffer ion concentration, and redox mediation. **Biokemistri**, v. 23, n. 3, 2011.

MANUBOLU, M.; GOODLA, L.; PATHAKOTI, K.; MALMLÖF, K. Enzymes as direct decontaminating agents—mycotoxins. In: **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Academic Press, 2018. p. 313-330.

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

MÁRQUEZ, O.; WALISZEWSKI, K. N.; OLIART, R. M.; PARDIO, V. T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1372–1379, 2008.

MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 500, n. 1, p. 58–65, 2010.

MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, R.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, n. 2, p. 178–83, 2006.

MOHAMED, S. A.; ABULNAJA, K. O.; ADS, A. S.; KHAN, J. A.; KUMOSANI, T. A. Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 725–730, 2011.

MONTANARI, L.; MAYER, H.; MARCONI, O.; FANTOZZI, P. Minerals in Beer. In: Beer in health and disease prevention. Academic Press, 2009. p. 359-365.

NICELL, J. A.; WRIGHT, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, p. 302–310, 1997.

NORA, N. S.; FELTRIN, A. C. P.; SIBAJA, K. V. M.; FURLONG, E. B.; GARDA-BUFFON, J. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1075–1082, 2019.

PASCARI, X.; ORTIZ-SOLÁ, J.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. **LWT**, v. 92, p. 87–91, 2018.

PIQUÉ, E.; VARGAS-MURGA, L.; GÓMEZ-CATALÁN, J.; LAPUENTE, J. DE; LLOBET, J. M. Occurrence of patulin in organic and conventional apple-based food marketed in Catalonia and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 199–204, 2013.

PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A.; SCHOLTEN, J.; RIGHI, L. W.; CARDOSO, C. D.; NECCHI ROHERS, G.; DA SILVA, R. C. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 352–363, 2014.

PUANGKHAM, S.; POAPOLATHEP, A.; JERMNAK, U.; IMSILP, K.; TANHAN, P.; CHOKEJAROENRAT, C.; POAPOLATHEP, S. Monitoring and health risk of mycotoxins in RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16– 30, 2018.

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

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 18–46, 2006.

ROJAS-REYES, J. O.; ROBLES-OLVERA, V.; CARVAJAL-ZARRABAL, O.; CASTRO MATINEZ, C.; WALISZEWSKI, K. N.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 94, n. 9, p. 1844–1853, 2014.

SANTE/EU. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, v. 11945, p. 1–42, 2015.

SARIKA, D.; KUMAR, P. S. S. A.; ARSHAD, S.; SUKUMARAN, M. K. Purification and evaluation of horseradish peroxidase activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 7, p. 367–375, 2015.

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

SIBAJA, K. V. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; FELTRIN, A. C. P.; DIAZ REMEDI, R.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

SIGMA-ALDRICH. **Product information - Peroxidase from horseradish**, (pp. 1–3). Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 25 de junho de 2019.

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1055–1060, 2012.

STANDER, M. A.; STEYN, P. S.; VAN DER WESTHUIZEN, F. H.; PAYNE, B. E. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 302–304, 2001.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 11, p. 5736–5739, 2000.

TRIPATHI, S.; MISHRA, H. N. Modeling and optimization of enzymatic degradation of aflatoxin B 1 (AFB 1) in red chili powder using response surface methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 770–780, 2011.

VALETTI, N. W.; PICÓ, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 119, p. 1–6, 2013.

WAGNER, M.; NICELL, J. A. Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 485–495, 2001.

WU, J.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; TAYLOR, K. E. Effect of H_2O_2 addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. The **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 72, n. 5, p. 881–886, 1994.

YU, Y.; WU, H.; TANG, Y.; QIU, L. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 121–126, 2012.

YU, Y.; QIU, L.; WU, H.; TANG, Y.; LAI, F.; YU, Y. Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter* sp. SM04 into smaller estrogenic products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2675–2681, 2011.

ZHANG, H.; DONG, M.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; LI, J.; ZHANG, X. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 416–423, 2016.

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

ZOUAOUI, N.; SBAII, N.; BACHA, H.; ABID-ESSEFI, S. Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. **Food Control**, v. 51, p. 356–360, 2015.

ARTIGO 2. DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA PELA AÇÃO DA AMANO LIPASE A: CONDIÇÕES E APLICAÇÃO

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a ação da enzima amano lipase A na degradação simultânea de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em solução modelo e cerveja tipo Pilsen. Para tanto, os parâmetros reacionais e cinéticos ($K_M e V_{máx}$) foram otimizados. A aplicação da enzima (0,3 U mL⁻¹) na degradação de OTA e ZEA em cerveja foi avaliada. Nas condições ótimas de reação a amano lipase A em solução modelo, constituída de tampão fosfato 50 mM pH 7, 40 °C e 22 h de incubação, degradou simultaneamente OTA e ZEA em até 100,0 e 30,6%, respectivamente. Os parâmetros cinéticos $K_M e V_{máx}$ da amano lipase A na degradação de OTA e ZEA foram de 0,03 e 3,14 μ M e 6,56x10⁻⁰⁵ e 19,57x10⁻⁰³ μ M min⁻¹, respectivamente. Na cerveja, a enzima degradou simultaneamente 89,5% de OTA e 6,5% de ZEA. A enzima amano lipase A se apresenta como uma alternativa para o controle destes contaminantes em cerveja ou alimentos.

Palavras-chave: Micotoxina. Mitigação. Aspergillus niger. Otimização enzimática. Cinética enzimática. Método biológico.

1 INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que realizam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas, ligações glicosídicas em carboidratos e ligações éster em lipídios. No entanto, sob em certas condições, estas enzimas também catalisam reações de hidrólise e síntese, como acidólise, alcoólise, aminólise, esterificação e interesterificação (CASAS-GODOY; DUQUESNE; BORDES, 2012; WOOLLEY; PETERSEN, 1994). As lipases podem ser obtidas de fonte animal (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; VERGER et al., 1969), vegetal (PRABHU et al., 1999; RIGO et al., 2010) ou microbiana (MOHAMMADI et al., 2016; TOIDA et al., 1995). Especificamente as lipases microbianas, como as obtidas a partir dos fungos do gênero *Aspergillus* spp., apresentam um grande potencial frente as demais enzimas por possuírem maior estabilidade, especificidade com o substrato e menor custo de produção, pois podem ser produzidas em larga escala (CONTESINI et al., 2010; UTSUGI; KANDA; HARA, 2009).

Dentre as enzimas, obtidas de fungos do gênero *Aspergillus* spp., a enzima comercial Amano lipase A extraída de *Aspergillus niger* é descrita por catalisar principalmente reações quimosseletivas de *O*-desacetilação, reações de epoxidação com suporte de líquido iônico hidrofílico e reações de hidrólise regiosseletiva (SIGMA-ALDRICH, 2020). A Amano lipase A é empregada como biocatalisador em reações aldólicas assimétricas de compostos aromáticos, heteroaromático, aldeídos, cetonas cíclicas e acíclicas (YILDIZ et al., 2017), hidrólise de ésteres (AKITA; MATSUKURA; OISHI, 1986), modificação de flavor em alimentos (JOLLY, 2015), produção e maturação de queijos (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SCHMID; VERGER, 1998) e degradação da micotoxina ocratoxina A (OTA) (STANDER et al., 2000). As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus, Claviceps, Penicillium* e *Fusarium*, que crescem em uma ampla variedade de substratos e de condições ambientais. Dentre estas, se destacam a OTA e zearalenona (ZEA) devido toxicidade e ocorrência em diversas matrizes alimentares (BENNETT; KLICH, 2003).

A OTA é uma micotoxina produzida pelos fungos dos gêneros *Aspergillus e Penicillium*. Esta é caracterizada por ser nefrotóxica e imunotóxica (GAN et al., 2017), teratogênica (MAYURA et al., 1984) e principais alvos de toxicidade os rins e o fígado de humanos e animais (O'BRIEN; DIETRICH, 2005; RINGOT et al., 2006). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – IARC, classifica a OTA no grupo 2B, pois é considerada como uma substância possivelmente carcinogênica (IARC, 1993). Na literatura, a

ocorrência de OTA é descrita em grãos e cereais (JUAN et al., 2008), produtos à base de cereais (IQBAL et al., 2014a), café (BENITES et al., 2017), carne de frango e ovos (IQBAL et al., 2014b), salame e presunto (DALL'ASTA et al., 2010), frutas (DRUSCH; RAGAB, 2003), bebidas, como cerveja (ARAGUÁS; GONZÁLEZ-PEÑAS; LÓPEZ DE CERAIN, 2005; ODHAV; NAICKER, 2002; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 2000), sucos (HAJOK et al., 2019) e vinhos (QUINTELA et al., 2012).

A ZEA é uma micotoxina produzida pelos fungos do gênero Fusarium, através da via policetídeo (BENNETT; KLICH, 2003). A toxicidade deste composto está relacionada a sua estrutura química ser naturalmente semelhante a de hormônios estrógenos, tal característica favorece a ligação da ZEA as células aos receptores de estrogênio e a consequente bioacumulação (ROGOWSKA et al., 2019). Portanto, a ZEA em animais, provoca distúrbios reprodutivos (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999; GREEN et al., 1990), além de ser hepatotóxica, citotóxica, genotóxica e imutóxica (ZINEDINE et al., 2007). Em humanos, a ZEA é descrita por ser um desregulador endócrino (KOWALSKA; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA: PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016). estando relacionada ao desenvolvimento precoce da puberdade feminina (MASSART; SAGGESE, 2010), por ocasionar estresse oxidativo e apoptose de células embrionárias humanas (CAO et al., 2019), e por possuir a capacidade de promover a proliferação, formação de colônias e migração de células de carcinoma de cólon (ABASSI et al., 2016). A ZEA foi classificada pela IARC no grupo 3, pois não há evidências suficientes para ser considerada como carcinogênica a humanos (IARC, 1993). Vários estudos determinaram ZEA em alimentos e bebidas, como grãos e cereais (ABD ALLA, 1997; ALKADRI et al., 2014; BRIONES-REYES; GÓMEZ-MARTINEZ; CUEVA-ROLÓN, 2007), produtos a base de cereais (IQBAL et al., 2014a, 2014c), carne de frango e ovos (IQBAL et al., 2014b), leite (HUANG et al., 2014), especiarias e frutas secas (GHALI et al., 2008) e cerveja (BAUER et al., 2016; NKWE; TAYLOR; SIAME, 2005).

Mesmo existindo esforços na prevenção da formação de micotoxinas, sejam eles durante o plantio, colheita, transporte e armazenamento dos alimentos, ainda assim ocorre a produção desses metabólitos. Portanto, estratégias de redução de micotoxinas como a adição de produtos desativadores, com base em diferentes estratégias, seja pela adsorção, biotransformação, biodegradação e bioproteção devem ser consideradas (STREIT et al., 2012). Para tanto, estratégias com base em métodos químicos e físicos, visando a degradação e redução dos níveis de micotoxinas estão sendo desenvolvidas. No entanto, esses métodos apresentam limitações relacionadas principalmente a altos custos e possível perda de nutrientes essenciais e atributos sensoriais dos alimentos (ZHANG et al., 2016). Em contrapartida, os métodos biológicos estão ganhando destaque por serem mais seguros, economicamente viáveis e ecológicos (ROGOWSKA et al., 2019).

Desta maneira, a frequente ocorrência de OTA e ZEA em alimentos juntamente com os danos que estes contaminantes ocasionam à saúde humana, a necessidade da busca por novas estratégias de degradação para o controle destas substâncias e, também, a falta de relatos na literatura sobre o efeito da lipase na degradação de ZEA incentivaram essa pesquisa. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a ação da enzima amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo, visando a otimização das condições de reação, determinação dos parâmetros cinéticos e aplicação da enzima em amostras de cerveja tipo Pilsen.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ENZIMA, PADRÕES DE MICOTOXINAS, AMOSTRAS E REAGENTES

A enzima amano lipase A obtida de *Aspergillus niger* (concentrações de enzima acima de 120.000 U g⁻¹) e os padrões de OTA e ZEA com pureza de \geq 99,0% e foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, EUA). As amostras de cerveja tipo Pilsen (embalagem de 473 mL) foram adquiridas em estabelecimento comercial na cidade de Rio Grande (Brasil).

Os produtos químicos e reagentes, como ácido acético glacial, etanol, 4-nitrofenil butirato, 4-nitrofenol, etanol, fosfato de potássio monobásico anidro, fosfato de potássio dibásico anidro, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de ferro, clorofórmio e benzeno, foram adquiridos em grau analítico. A acetonitrila foi adquirida a J.T Baker. A água ultrapurificada (resistividade de 18,2 M Ω cm) foi purificada em sistema de água Milli-Q (Direct-Q UV3) (Millipore, Bedford, EUA) com filtro de membrana (diâmetro de poro de 0,45 µm).

2.2 PREPARO DE AMOSTRA

As amostras de cerveja (473 mL) destinadas a aplicação da enzima foram adquiridas do mesmo fabricante e lote. Estas foram homogeneizadas por inversão total do líquido presente na embalagem e desgaseificadas em banho ultrassônico de 25 kHz durante 60 min, conforme descrito por Garcia et al. (2020).

2.3 PREPARO DA ENZIMA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A solução enzimática de lipase foi preparada com a diluição da enzima em água ultrapurificada, de acordo com as especificações do fabricante e foi armazenado de 2 a 8 ° C, conforme recomendado pela Sigma Aldrich Co. (2020).

A atividade da lipase foi verificada conforme condições descritas por Lee et al. (1999). Primeiramente, o p-nitrofenil butirato (p-NPB) foi diluído em acetonitrila para obtenção da concentração de 10 mM do substrato. A solução de substrato foi constituída por 10 mM de p-NPB, etanol absoluto e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 nas proporções de 1:4:95, respectivamente. A reação enzimática foi realizada empregando 0,3 mL da solução enzimática e 0,9 mL de substrato p-NPB mantidos a 60 °C por 15 min. A hidrólise do substrato em p-nitrofenol (p-NP) foi medida em um espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade da lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-NP em 1 minuto, nas condições do ensaio.

2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE MICOTOXINAS E ESTIMATIVA CONCENTRAÇÃO

As soluções estoque de OTA (concentração de 100 μ g mL⁻¹) e ZEA (concentração de 500 μ g mL⁻¹) foram preparadas em benzeno:ácido acético (99:1, v v⁻¹) e benzeno:acetonitrila (98:2, v v⁻¹), respectivamente e congeladas. As soluções de trabalho resultaram das diluições de soluções de estoque até a concentração desejada para os ensaios de degradação. A estimativa da concentração da solução de trabalho (Equação 1) de OTA e ZEA foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis. O comprimento de onda de absorção máxima para OTA e ZEA é de 333 e 317 nm, e a absortividade molar de 5550 e 6060 L cm⁻¹ mol⁻¹ em benzeno:ácido acético (99:1, v v⁻¹) e benzeno, respectivamente (AOAC, 2000).

micotoxina (µg mL⁻¹) =
$$\frac{abs X MM X 1000 X fc}{\epsilon X b}$$
 (1)

Onde micotoxina (μ g mL⁻¹) é a concentração da micotoxina presente em 1 mL; abs é o valor da absorvância da solução padrão; MM é a massa molecular da micotoxina em estudo (g mol⁻¹); fc é o fator de correção do instrumento; ε é absortividade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina (mol L⁻¹) e b é a largura da cubeta (cm).

2.5 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA POR CLAE-FL

A extração de OTA e ZEA da solução modelo e das amostras de cerveja foi realizada pela técnica de partição líquido-líquido (LLP), de acordo com Garcia et al. (2020). Os padrões OTA e ZEA foram adicionados em recipientes de vidro com volume útil de 10 mL e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. A amostra, 1 mL (solução modelo ou cerveja), foi acidificada com ácido acético a pH 2, seguida da adição de 1,5 mL de clorofórmio (CH₃Cl) e agitados em vórtex por 30 s e banho ultrassônico de 25 kHz por 3 min. A fase orgânica (clorofórmio) foi coletada e o procedimento foi repetido três vezes. O volume final obtido foi evaporado em banho de areia a 60 °C, ressuspenso em 1 mL de fase móvel (60% de acetonitrila, 40% de água Milli-Q acidificada com 1% de ácido acético) e injetado em sistema cromatográfico.

A determinação das micotoxinas OTA e ZEA foi realizada em cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE), fabricado pela Shimadzu, acoplado a um detector de fluorescência (modelo FL - 10AXL) com comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 333 e 460 nm, respectivamente. A coluna cromatográfica utilizada foi a Supleco® - Kromasil C18 (5 μm e 150 mm x 4,6 mm) a 25 °C. A vazão da fase móvel foi estabelecida em 0,8 mL min⁻¹, de modo a realizar uma corrida cromatográfica de 7 min, de acordo com Garcia et al. (2020). Nestas condições, a eluição de OTA e ZEA levou 4,7 min e 5,3 min, respectivamente.

O método foi validado através dos parâmetros de linearidade, curva analítica, coeficiente de correlação e determinação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, conforme descrito por (SANTE/EC, 2017). Para tanto, foi construída uma curva analítica através das soluções padrão de OTA e ZEA diluídas na fase móvel em triplicata, nas concentrações de OTA de 0,4 a 30,0 ng mL⁻¹ e de ZEA de 0,02 a 2,00 μ g mL⁻¹.

2.6 DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA PELA AMANO LIPASE A

2.6.1 Otimização das condições de reação para ação da amano lipase A na degradação de OTA e ZEA

Com a finalidade de atingir a máxima degradação das micotoxinas, foi realizada a otimização das condições de reação. Para tanto, as soluções padrão de OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 μ g mL⁻¹) foram adicionadas ao reator, o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio, de acordo com Garcia et al. (2020). A solubilização do reator (1 mL), com micotoxinas e tampão fosfato foi realizada em vórtex e banho ultrassônico por 30 s e 3 min, respectivamente. Posteriormente, foi adicionada na solução modelo (tampão fosfato de

potássio) e a amano lipase A de acordo com Stander et al. (2000) com modificações na concentração da enzima, pois foram utilizados nos ensaios 0,3 U mL⁻¹.

A otimização das condições de reação foi realizada em quatro etapas, onde uma variável independente (pH, força iônica, temperatura e adição de íons metálicos) foi investigada em cada etapa e o tratamento com os resultados mais satisfatórios foi selecionado para a etapa seguinte. Assim, na primeira etapa a variável avaliada foi o pH da solução modelo com tampão fosfato de potássio 50 mM em diferentes valores de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), lipase (0,3 U mL⁻¹) e incubação durante 24 h sob agitação orbital (150 rpm) a 25 ± 1 °C. A concentração residual de OTA e ZEA na solução modelo foi determinada por meio Equação 2.

Degradação de OTA e ZEA (%) =
$$\frac{(CM_{inicial} - CM_{final})}{CM_{incial}} \times 100$$
 (2)

Onde $CM_{inicial}$ é concentração inicial de OTA (ng mL⁻¹) ou ZEA (µg mL⁻¹) e CM_{final} é concentração final de OTA (ng mL⁻¹) ou ZEA (µg mL⁻¹).

A segunda etapa da otimização consistiu na avaliação da força iônica (5; 10; 25; 50; 75 e 100 mM) do tampão fosfato de potássio. Na terceira etapa, foi verificada a temperatura de incubação (25; 30; 35; 40; 45; 50; 55 e 60 ± 1 °C) da solução modelo. Finalmente, no último estágio, foi avaliada a influência de íons metálicos (Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Fe²⁺ e Na⁺ a 1 e 5 mM) no aumento ou diminuição da atividade de lipase relacionada à degradação das micotoxinas.

2.6.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de OTA e ZEA sobre a ação enzimática $(0,3 \text{ U mL}^{-1})$ empregando as condições ótimas de reação em 90 min foi descrito pela constante de Michaelis-Menten (K_M) (Equação 3), determinado a partir do gráfico da velocidade *versus* a concentração de substrato. A linearização da equação de Michaelis-Menten (Equação 4) foi realizada para a obtenção do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (LB) empregado para determinar os valores K_M e velocidade máxima (V_{máx}) a partir dos coeficientes angular e linear, respectivamente.

As concentrações de OTA e ZEA empregadas nos ensaios foram de 1,0; 6,5; 8,5; 10,4; 12,4; 15,6; 18,3 e 31,7 ng mL⁻¹ e 0,1; 0,2; 0,5; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 μ g mL⁻¹, respectivamente, conforme descrito por Garcia et al. (2020).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_{\text{M}} + [S]} \tag{3}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{máx}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$
(4)

Onde V_0 é a taxa inicial da utilização de substrato; $V_{máx}$ é a taxa máxima de utilização de substrato; S é a concentração de substrato e K_M é a constante de Michaelis-Menten.

2.6.3 Cinética de degradação de OTA e ZEA por lipase

A degradação simultânea de OTA e ZEA foi realizada em um reator tipo Erlenmeyer com volume útil de 125 mL. Os padrões OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 μ g mL⁻¹) foram adicionados ao reator e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. A solução modelo consistiu em tampão fosfato de potássio e micotoxinas. A incubação foi efetuada por 24 h em agitação orbital (150 rpm) após a adição da enzima. As condições de reação de pH, força iônica, temperatura e adição de íons metálicos foram definidas através das variáveis estabelecidas de acordo com o item 2.6.1. Nos intervalos de tempo de 0; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 240; 480; 720; 960; 1080; 1200; 1320; 1440; 2160 e 2440 min foram realizadas amostragens de 1 mL para determinação da concentração de OTA e ZEA residual.

2.6.4 Degradação do OTA e ZEA na cerveja

Os ensaios de degradação de OTA e ZEA na cerveja foram realizados em um reator do tipo Erlenmeyer com um volume útil de 50 mL. Os padrões OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 μ g mL⁻¹) foram adicionados ao reator e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, a cerveja previamente desgaseificada e enzima (0,3 U mL⁻¹) foram adicionados ao reator a um volume final de 10 mL e homogeneizada sob agitador orbital (150 rpm) a 40 °C durante 22 h, parâmetros estes obtidos através da otimização das condições de reação da enzima em solução modelo.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da otimização das condições de reação, como pH, força iônica, temperatura, influência de íons metálicos, para ação da lipase para degradação de OTA e ZEA

e cinética de degradação foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a nível de significância de 5% (p < 0,05), com o uso do programa Statistica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e comparados ao controle (com micotoxinas e sem enzima).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA

Os métodos analíticos devem ser submetidos a procedimentos de validação, a fim de comprovar a produção de resultados confiáveis. Esses métodos precisam fornecer resultados precisos e reproduzíveis. Isso é especialmente importante em vista de ações legais, especificações comerciais, bem como estudos de monitoramento, avaliação de risco ou publicação do método proposto (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002). Para Gilbert e Anklam (2002) o monitoramento de micotoxinas depende da disponibilidade de métodos analíticos precisos e confiáveis. Desta maneira, a confiabilidade dos resultados para determinação de OTA e ZEA em solução modelo e cerveja foi demonstrada através dos resultados descritos na Tabela 1. O método validado pode ser empregado com confiabilidade para monitorar a degradação de OTA e ZEA pela amano lipase A em solução modelo e cerveja e está de acordo com os parâmetros internacionais de validação descritos pela European Commission (2006) e SANTE/EU (2015).

3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO PARA AÇÃO DA AMANO LIPASE A PARA DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA

A catálise enzimática é influenciada por substâncias químicas (por exemplo, prótons, íons metálicos, tampão, ativadores enzimáticos naturais e sintéticos, inibidores e estabilizadores) e fatores físicos (temperatura, pressão, pressão iônica, resistência, polaridade do solvente, imobilização, sequestro de substrato e aglomeração molecular). A complexidade química e estrutural das enzimas juntamente com as interações realizadas pelas mesmas, explica o fato da atividade ser facilmente afetada (PURICH, 2010). Em virtude do exposto, foram avaliadas as variáveis pH, força iônica, temperatura e íons metálicos com a finalidade da obtenção dos maiores percentuais de degradação de OTA e ZEA por amano lipase A.

	() ()
Parâmetros analíticos		OTA (ng mL ⁻¹)	ZEA (μg mL ⁻¹)
Equação da curva		y = 3235x + 1580,2	y = 220395x + 1160,1
Linearidade		0,40 a 30	0,02 a 2
Coeficiente de corre	elação	0,999	0,997
Coeficiente de detern	ninação	0,998	0,995
LD_m		0,25	0,01
LQm		0,40	0,02
Recuperação (%)* em	Nível 1	$74,3 \pm 7,6$	$88,6 \pm 3,1$
solução modelo	Nível 2	$77,0\pm5,8$	$89,9\pm5,8$
	Nível 3	$77,2 \pm 5,9$	$75{,}9\pm8{,}5$
Recuperação (%)* em	Nível 1	$106,5 \pm 6,1$	$85,6 \pm 4,5$
cerveja	Nível 2	$100,8 \pm 6,4$	$88,5 \pm 1,3$
	Nível 3	$97,\!4 \pm 4,\!2$	$84{,}4\pm0{,}4$

Tabela 1 - Parâmetros de validação do método analítico avaliados em CLAE-FL para
ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA).

LDm - limite de detecção do método; LQm - limite de quantificação do método.

*Resultados expressos como média ± coeficiente de variação das médias (n=3).

Nível 1 - fortificação com 1,0 ng mL⁻¹ de OTA e 0,1 µg mL⁻¹; Nível 2 - fortificação com 5,0 ng mL⁻¹ de OTA e 0,5 µg mL⁻¹ de ZEA; Nível 3 - fortificação com 10,0 ng mL⁻¹ de OTA e 1,0 µg mL⁻¹ de ZEA.

3.2.1 Efeito do pH

As enzimas proteicas são polieletrólitos constituídos por α -aminoácidos, contendo frequentemente cargas adicionais positivas (+) e negativas (-) nas cadeias laterais. A carga dessas enzimas e de seus grupo funcionais catalíticos depende do pH da solução (PURICH, 2010). De acordo com Ajila e Rao (2009), o pH é um fator determinante na atividade de uma enzima, pois pode ocasionar alterações no estado de ionização da cadeia de aminoácidos presente no sítio catalítico da enzima ou na ionização do substrato.

Na Figura 1 são demonstrados os resultados obtidos para degradação de OTA e ZEA pela lipase em solução modelo com tampão fosfato de potássio 50 mM em diferentes valores de pH. Na faixa de pH entre 6,5 e 7,5 são observados os maiores percentuais de degradação de OTA e ZEA simultaneamente, cerca de 97 e 30% com desvio padrão de 1,8 e 1,0 respectivamente. Também foi verificado que tal variável é importante na atividade da enzima, visto que em pH mais ácido (4,5), houve a diminuição da degradação de OTA e ZEA em 1,3 e 14,7 vezes, respectivamente, quando comparado ao pH 7,0. Desta maneira, visando a

otimização das condições de reação, a solução modelo com pH 7,0 foi selecionada para dar seguimento nas próximas etapas do estudo da degradação destas micotoxinas.



Figura 1 - Efeito do pH na solução modelo* para degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela amano lipase A (0,3 U mL⁻¹).

*Solução modelo = tampão fosfato de potássio 50 mM e incubação a 25 ± 1 °C durante 24 h. Resultados de degradação (%) expressos como média \pm desvio padrão das médias (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis avaliados para a mesma micotoxina (p < 0,05).

De acordo com a Sigma-Aldrich Co (2020), fabricante da enzima, o pH ótimo da amano lipase A obtida de *Aspergillus niger* é de 6,5. No entanto, na literatura é descrito que a lipase obtida de *Aspergillus niger* apresenta atividade em uma ampla faixa de pH para hidrólise de diversos substratos, como em pH 1,5 e 2,5 usando como substrato o p-nitrofenol (MHETRAS; BASTAWDE; GOKHALE, 2009); em pH 3 e 5 com azeite de oliva (HEERDEN; LITTHAUER; VERGER, 2002); em pH de 3 a 6,5 com p-nitrofenol palmitato (p-NPP) (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007); em pH 5 e 6 com azeite de oliva (NAMBOODIRI; CHATTOPADHYAYA, 2000) e em pH 6 com óleo de cártamo (UTSUGI; KANDA; HARA, 2009).

Quanto ao emprego da lipase para a degradação de micotoxinas, a mesma é descrita por degradar patulina (PAT) em suco de pêra pelo emprego da lipase pancreática suína nas condições de pH entre 4,3 e 4,5 (XIAO et al., 2019), em suco de maçã (TANG et al., 2018) e em solução aquosa com pH 6,0 (LI et al., 2017b). Stander e colaboradores (2000) utilizaram a lipase A obtida de *Aspergillus niger* para degradar mais de 90% de OTA em solução modelo com tampão fosfato 50 mM com pH 7,5. Adicionalmente, Garcia et al. (2020) avaliaram o emprego da enzima PO na degradação de OTA e ZEA em solução modelo com pH 7,0 e verificaram que a ionização das micotoxinas permitiu uma maior interação dos substratos com a enzima e um consequente aumento na degradação de OTA e ZEA.

3.2.2 Efeito da força iônica

A atividade das enzimas é influenciada pela concentração de sal do meio reacional e, consequentemente, pela força iônica; de fato, em baixa concentração de eletrólitos, os sais podem modificar a natureza da carga superficial iônica. Em altas concentrações, as forças eletrostáticas podem ser neutralizadas a superfície da enzima e as estruturas tridimensionais da enzima também podem ser afetadas (KHEIROLOMOOM et al., 1998). Complementarmente, Salis e colaboradores (2007) mencionam que a força iônica é um parâmetro variável que pode influenciar diretamente a atividade catalítica, pois em altas concentrações de força iônica pode ocorrer a redução da constante de ionização (pKa) pKa, mas em pH neutro pouco efeito sobre a carga da molécula da enzima é observado, a menos que haja variação de carga dentro do seu sítio ativo. No entanto, na literatura há poucos estudos que descrevem o efeito da força iônica na atividade catalítica de enzimas, sendo está variável frequentemente negligenciada em estudos que visam a otimização das condições de reação (DALE; WHITE, 1983).

Os resultados obtidos para degradação simultânea de OTA e ZEA pela lipase em solução modelo com tampão fosfato pH 7 em diferentes concentrações iônicas são demonstrados na Figura 2. As soluções modelo constituídas por tampão fosfato nas concentrações entre 25 e 100 mM foram as que propiciaram significativamente a obtenção dos maiores percentuais de degradação de ZEA. Para OTA, o maior percentual de degradação de foi verificado em solução modelo constituída de tampão fosfato com 50 mM. Uma possível explicação para esse fato seria que a força iônica além de influenciar a ação da enzima também ocasiona modificações na molécula dos substratos que estão envolvidos na reação. Além disso, a ZEA apresenta pKa de 7,6 (GAJÊCKA et al., 2011) enquanto a OTA possui dois grupos ionizáveis, onde o grupo carboxila da fenilalanina apresenta pKa de 4,4 e o grupo fenólico o pKa é de 7,3 (DOHNAL; PAVLÍKOVÁ; KUCA, 2010). A OTA é empregada nos ensaios em baixa concentração (ng mL⁻¹) quando comparada com a concentração de ZEA (µg mL⁻¹), ficando assim mais susceptível as alterações de concentração salina e consequentemente a

ionização. Desta maneira, a solução modelo constituída de tampão fosfato com 50 mM foi a determinada como ideal devido resultar nos maiores percentuais de degradação simultânea de OTA e ZEA em cerca de 96 e 29% com desvio padrão de 4,8 e 1,5, respectivamente.





*Solução modelo = tampão fosfato de potássio pH 7 e incubação a 25 ± 1 °C durante 24 h. Resultados de degradação (%) expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis avaliados para a mesma micotoxina (p < 0,05).

Os resultados obtidos corroboram com os descritos por Stander e colaboradores (2000) que empregaram a amano lipase A solução modelo com tampão fosfato 50 mM na degradação de OTA. Assim, como no estudo de Bhardwaj; Raju e Rajasekharan (2001) que extraíram, purificaram e caracterizaram uma lipase termoestável obtida de farelo de arroz, onde a enzima demonstrou redução da atividade na hidrólise do substrato trioleína para tampão fosfato de potássio em concentrações acima de 50 mM.

3.2.3 Efeito da temperatura

A atividade enzimática é dependente da temperatura, pois esta pode ocasionar dois processos: propiciar a energia de ativação catalítica (energia cinética) ou a energia de ativação para reação de desnaturação (inativação irreversível) (EISENTHAL et al., 2006). De todos os

fatores que afetam a catálise enzimática, a temperatura é sem dúvida a mais importante, pois esta influencia praticamente todos os aspectos de uma reação bioquímica, incluindo a ionização dependente do pH da enzima e substrato, interações de ligação metal-ligante, alterações conformacionais na enzima, oligomerização de proteínas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e estado de transição (PURICH, 2010).

Na Figura 3 são apresentados os resultados obtidos para degradação simultânea de OTA e ZEA pela lipase em solução modelo com tampão fosfato 50 mM pH 7 em diferentes temperaturas de incubação (25 a 60 °C). Os resultados demonstraram que nas temperaturas de 35 e 40 °C são alcançados os maiores percentuais de degradação das micotoxinas, sendo obtido em 40 °C a degradação de OTA e ZEA de 100 e 29%, com desvio padrão de 2,4 e 1,8, respectivamente. Estes resultados de degradação de OTA alcançados por meio da otimização da temperatura corroboram com os demonstrados por Stander e colaboradores (2000), onde a OTA é degradada acima de 90% a 37 °C. Desta maneira, a temperatura de 40 °C foi selecionada para a otimização das condições reacionais.





*Solução modelo = tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7 e incubação durante 24 h. Resultados de degradação (%) expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis avaliados para a mesma micotoxina (p < 0.05).

40

45

Temperatura (°C)

10

0

d

25

30

35

c_

50

cd

60

55

As lipases microbianas, especialmente as obtidas dos fungos do gênero *Aspergillus*, são descritas como enzimas termoestáveis, como demonstrado por Falony e colaboradores (2006) e Mhetras e colaboradores (2009) que obtiveram a enzima a partir de diferentes cepas de *Aspergillus niger*; e Saxena e colaboradores (2003) que extraíram a lipase do fungo *Aspergillus carneus*, sendo que estas enzimas demonstraram atividade ótima em 40 °C e pH 6 para a hidrólise p-nitrofenol propianato, em 50 °C e pH 2,5 para hidrólise de p-NPP e de 37 °C e pH 9 para a hidrólise de azeite de oliva, respectivamente. No entanto, as lipases obtidas de outras fontes fúngicas, também apresentam esse comportamento, como as enzimas extraídas de *Antrodia cinnamomea* BCRC 35396 e *Candida rugosa* que demonstraram a atividade ótima a 45 °C em pH 8 (SHU; XU; LIN, 2006) e 50 °C em pH 7,5 (SOARES et al., 1999), respectivamente, quando na hidrólise dos substratos p-NPP e azeite de oliva, respectivamente.

Semelhantemente ao comportamento das lipases fúngicas, as obtidas a partir de bactérias são resistentes as temperaturas mais elevadas, como a enzimas extraídas de *Pseudomonas* sp. KWI-56 e de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 que mostraram atividade ótima na hidrólise de azeite de oliva a 60 °C em pH 7 (IIZUMI; NAKAMURA; FUKASE, 1990) e na hidrólise do substrato p-NPB em temperaturas entre 70 e 75 °C em pH 7,5 (LEE et al., 1999), respectivamente.

3.2.4 Efeito da adição de íons metálicos na solução modelo

Os íons metálicos são essenciais para a estrutura e/ou função de enzimas (WAGNER, 1988). O efeito dos íons na estabilidade das proteínas está relacionado as interações químicas que ocorrem no complexo enzima-substrato, pois podem ser utilizados na reação como um co-substrato, como um cofator da enzima ou até mesmo atuar inibição competitiva ou não competitiva de enzimas (ZHAO, 2005). Desta maneira, na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos dos ensaios de degradação de OTA e ZEA pela lipase com a adição dos íons metálicos Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Fe²⁺ e Na⁺ a 1 e 5 mM na solução modelo com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7 a 40 °C e incubação por 24 h. Os resultados obtidos demonstraram que, de forma geral, os íons metálicos, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Fe²⁺ e Na⁺ nas concentrações 1 ou 5 mM, inibiram significativamente a atividade enzimática da lipase na degradação das micotoxinas em solução modelo e em cerveja foi realizada sem a adição de íons metálicos. Na literatura consultada, não há estudos que verifiquem a influência de íons na ação enzimática da lipase para degradação de micotoxinas. No entanto, os resultados

obtidos neste estudo, corroboram com os descritos por Garcia e colaboradores (2020), quanto ao efeito inibitório dos íons Ca^{2+} (1 e 5 mM), Fe²⁺ (1 e 5 mM), Na⁺ e Mg²⁺ em 5 mM, na atividade da PO empregada na degradação de OTA e ZEA em solução modelo.

Composto	Concentração	Degradação** (%)		Degradação relativa***(%)	
(mM)		ΟΤΑ	ZEA	ΟΤΑ	ZEA
Controle	0	$97,0^{a} \pm 1,7$	$30,5^{a} \pm 1,6$	100,0	100,0
Ca^{2+}	1	$50,2^{cd} \pm 3,0$	$0,\!8^{\mathrm{fg}}\pm0,\!8$	51,8	2,6
Fe ²⁺	1	$76,\!3^{\mathrm{b}}\pm0,\!8$	$10,1^{b} \pm 1,3$	78,7	33,1
\mathbf{K}^+	1	$78,7^{b} \pm 3,1$	$1,\!0^{\mathrm{fg}}\pm0,\!1$	81,1	3,3
Na^+	1	$57,1^{c} \pm 1,3$	$6{,}2^{cd}\pm0{,}9$	58,9	20,3
Mg^{2+}	1	$51,9^{cd} \pm 2,7$	$3,7^{def} \pm 0,6$	53,5	12,1
Ca^{2+}	5	$45{,}2^{de}\pm3{,}9$	$7,3^{bc} \pm 1,5$	46,6	23,9
Fe ²⁺	5	$55,2^{c} \pm 4,4$	$4,7^{cde} \pm 1,3$	56,9	15,4
\mathbf{K}^+	5	$40,5^{e} \pm 1,9$	$3{,}0^{\text{efg}}\pm0{,}9$	41,8	9,8
Na^+	5	$72,7^{b}\pm3,9$	$4,7^{\mathrm{cde}}\pm0,8$	74,9	15,4
Mg^{2+}	5	$79,\!4^{\mathrm{b}}\pm3,\!7$	$0,\!4^{ ext{g}} \pm 0,\!4$	81,9	1,3

Tabela 2 - Efeito da adição de íons metálicos na atividade enzimática de amano lipase A (0,3 U mL⁻¹) para degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em solução modelo*.

*Solução modelo = tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7 e incubação a 40 °C durante 24 h. Controle – A atividade da enzima sem adição de íons metálicos durante a degradação das micotoxinas foi estabelecida em 100%. **Resultados expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (p > 0,05). ***Degradação relativa calculada em relação a porcentagem de degradação da amostra controle, sem adição de íons metálicos.

Além disso, são descritos estudos que avaliaram o efeito dos íons metálicos no aumento ou diminuição da atividade enzimática da lipase obtida de diferentes espécies dos fungos *Aspergillus* e hidrólise de diferentes substratos. Pokorny; Cimerman; Steiner (1997) relataram que a adição dos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} e $Na^+(1 \text{ mM})$ aumenta em até 10 % a atividade da lipase obtida de *Aspergillus niger* cepa MZKI A116 na hidrólise de tributirina. Posteriormente, Yadav e colaboradores (1998) também descreveram que a adição de 20 mM de Mg^{2+} ou Ca^{2+} tendo como substrato p-NPP aumenta a atividade da lipase extraída a partir de *Aspergillus terréus*. Shu, Yang e Yan (2007) também verificaram que os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na concentração de 2 mM aumentaram em aproximadamente 125 e 257%, enquanto o íon de Fe²⁺ (2 mM) diminuiu em aproximadamente 40%, a atividade da lipase obtida de *Aspergillus niger* F044 na hidrólise de azeite de oliva.

A influência de íons metálicos na atividade de lipases obtidas de outras fontes fúngicas, como *Yarrowia lipolytica* (YlLip2) é descrito por Yu; Qin e Tan (2007) que verificaram o aumento de 8,5; 22,5 e 4,0 % na atividade enzimática da lipase extracelular na hidrólise de azeite de oliva, após adição de 1 e 5 mM de Ca²⁺ e 1 mM de Mg²⁺, respectivamente. Em contrapartida, Sathish Yadav e colaboradores (2011) reportaram que a adição de 5 e 10 mM de Ca²⁺ e 5 mM de Mg²⁺ acarretava na diminuição de 4, 11 e 13%, respectivamente, a atividade da lipase extraída da *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 quando empregada na hidrólise p-NPP.

Na literatura também é reportado o efeito da adição de íons na atividade de lipases obtidas de fontes bacterianas, como descrito por Kumar e parceiros (2005) que verificaram que a adição de 1 mM dos íons K⁺, Fe³⁺ e Mg²⁺ na reação aumentou significativamente a atividade enzimática da lipase obtida de *Bacillus coagulans* BTS-3 em 386; 251 e 357%, respectivamente, na hidrólise de p-NPP. Enquanto, a adição do íon metálico Na⁺ não demonstrou nenhum efeito sobre a enzima, quando comparado ao ensaio controle, sem adição de íons. No estudo de Kojima; Yokoe e Mase (1994) a atividade enzimática da lipase obtida de *Pseudomonas fluorescens* AK102 aumentou 9% comparado ao controle quando houve a adição de Fe²⁺ e 12% quando foi adicionado Na⁺, na hidrólise de uma solução emulsionada de azeite de oliva. Enquanto, a adição de Mg²⁺ acarretou na diminuição da atividade da enzima e a adição K⁺ e Ca²⁺ não ocasionou nenhum efeito. Dong e colaboradores (1999) reportaram que o íon Ca²⁺ (10 mM) ocasiona o aumento de até 250% na atividade enzimática da lipase obtida de *Pseudomonas* sp., na hidrólise de p-nitrofenol acetato.

3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos KM e Vmáx

O parâmetro cinético K_M corresponde à concentração de substrato necessária para atingir metade da $V_{máx}$ e que a obtenção de menores valores de K_M demonstram a maior a afinidade da enzima pelo substrato (TALENS-PERALES; MARÍN-NAVARRO; POLAINA, 2016). Os resultados de K_M e $V_{máx}$ obtidos neste estudo são apresentados na Tabela 3 e foram determinados através das equações apresentadas nos gráficos de duplo-recíproco de LB para degradação de OTA e ZEA pela ação da amano lipase A. Os resultados de K_M e $V_{máx}$ obtidos da degradação de OTA e ZEA pela lipase foram de 0,03 e 3,14 μ M e 6,56x10⁻⁰⁵ e 19,57x10⁻⁰³ μ M min⁻¹, respectivamente.

Micotoxina	Equação de	R ²	Км		Vmáx	
	LB**		μM	μg mL ⁻¹	μM min ⁻¹	μg mL ⁻¹ min ⁻¹
ОТА	a = 410,99x	0,98	0,03	0,01	6,56x10 ⁻⁰⁵	2,65x10 ⁻⁰⁵
	b= 37,69					
ZEA	a = 160,52x	0,98	3,14	1,00	19,57x10 ⁻⁰³	6,23x10 ⁻⁰³
	b = 160,44					

Tabela 3 - Parâmetros K_M e $V_{máx}$ na degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela amano lipase A (0,3 U mL⁻¹) em solução modelo*.

*Solução modelo = tampão fosfato 50 mM pH 7, incubação a 40 °C durante 90 min. **Equação do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (y = ax + b).

A determinação dos parâmetros K_M e $V_{máx}$ para a enzima lipase na hidrólise simultânea de OTA e ZEA, até o momento, ainda não foram descritos na literatura. Porém, Carrea e colaboradores (1996) empregaram a amano lipase A na hidrólise de cefalosporina C e foi verificado um valor de K_M de 65 µM do substrato. Desta maneira, é possível verificarmos que a lipase obtida de *Aspergillus niger* apresenta maior afinidade pelos substratos OTA e ZEA, do que pela cefalosporina C.

Quando compararmos aos mesmos substratos (OTA e ZEA), Garcia e colaboradores (2020) determinaram os parâmetros cinéticos da enzima PO utilizando como substratos OTA e ZEA simultaneamente, onde foram obtidos os valores de K_M e $V_{máx}$ de 0,05 e 10,71 μ M e 1,68x10⁻⁰⁴ e 0,072 μ M min⁻¹, respectivamente. A afinidade da lipase obtida de *Aspergillus niger* em relação aos substratos OTA e ZEA é maior que a determinada para a enzima PO.

Além disso, estudos anteriores determinaram valores de K_M para hidrólise de diferentes substratos utilizando lipases obtidas de outras fontes microbianas, como 7,37 μ M de p-NPP para a lipase obtida de *Aspergillus niger* F044 (SHU; YANG; YAN, 2007), 360 e 630 μ M de p-nitrofenil laurato para as lipase de *Serratia marcescens* (selvagem e mutantes) (MOHAMMADI et al., 2016), 2500 μ M de p-nitrofenil laurato para as lipase e setraída de *Bacillus* sp. J33 (NAWANI; KAUR, 2000), 420 e 150 μ M de azeite de oliva para uma lipase livre e imobilizada de *Candida rugosa* (PEREIRA et al., 2001) e 1327 μ M de p-NPP para a lipase obtida a partir de *Mucor hiemalis f. cortícola* (ÜLKER; KARAOĞLU, 2012). Portanto, a amano lipase A apresenta potencial para ser aplicada para degradação simultânea de OTA e ZEA, visto que os valores determinados de K_M de 0,03 e 3,14 μ M, respectivamente, são menores quando comparados aos outros estudos.

3.2.6 Cinética de degradação de OTA e ZEA por lipase

A cinética da degradação de OTA e ZEA pela ação amano lipase A (0,3 mL⁻¹) ao longo de 2400 min (40 h) nas condições otimizadas é apresentada na Tabela 4. A degradação de 100% de OTA foi observada em 30 min de reação. No entanto, os percentuais de degradação de ZEA pela ação enzimática aumentaram gradualmente ao longo de 1320 min (22 h), não havendo diferença estatística no aumento da degradação desta micotoxina até 40 h. Desta maneira, o tempo de incubação ótimo para degradação simultânea de OTA (100,0%) e ZEA (28,5%) pela ação da amano lipase A foi considerado de 1320 min (22 h), em solução modelo com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7 a 40 °C.

Tompo (min)	Degradação de micotoxinas** (%)			
rempo (mm)	ΟΤΑ	ZEA		
0	$0,0^{c} \pm 0,3$	$0,0^{\mathrm{f}}\pm0,1$		
15	$83,8^{b} \pm 2,1$	$4,4^{ef} \pm 1,7$		
30	$100,0^{a} \pm 0,1$	$5,2^{e} \pm 0,3$		
45	$100,0^{a} \pm 0,0$	$5,5^{e} \pm 0,8$		
60	$100,0^{a} \pm 0,1$	$6,0^{de} \pm 1,0$		
90	$100,0^{a} \pm 0,2$	$6,8^{de} \pm 0,2$		
120	$100,0^{a} \pm 0,0$	$7,3^{de} \pm 1,1$		
240	$100,0^{a} \pm 0,5$	$11,0^{d} \pm 3,5$		
480	$100,0^{a} \pm 0,0$	$21,2^{c} \pm 3,3$		
720	$100,0^{a} \pm 0,1$	$21,2^{c} \pm 2,7$		
960	$100,0^{a} \pm 1,0$	$21,3^{c} \pm 1,7$		
1080	$100,0^{a} \pm 0,3$	$25,3^{bc} \pm 2,5$		
1200	$100,0^{a} \pm 0,7$	$25,2^{bc} \pm 1,6$		
1320	$100,0^{a} \pm 0,2$	$28,5^{ab} \pm 1,4$		
1440	$100,0^{a} \pm 0,3$	$30,6^{a} \pm 1,1$		
2160	$100,0^{a} \pm 0,1$	$30,4^{a} \pm 1,2$		
2400	$100,0^{a} \pm 0,4$	$29,8^{a} \pm 1,2$		

Tabela 4 - Cinética de degradação da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) pela a ação da amano lipase A (0,3 U mL⁻¹) em solução modelo*.

*Solução modelo = tampão fosfato 50 mM pH 7 e incubação a 40 °C ao longo de 24 h. **Resultados expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (p > 0.05).

O emprego da amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA pode ser considerada promissora. Uma vez que, os percentuais de degradação 100% de OTA e 30,6% de ZEA atingidos foram satisfatórios quando comparados a outros estudos que aplicaram a lipase para degradação de uma micotoxina por vez. Como no estudo reportado por Stander e colaboradores (2000) que realizaram o *screening* de diferentes hidrolases comerciais para a degradação de OTA em solução modelo com tampão fosfato 50 mM com pH 7,5 a 37 °C e verificaram que a amano lipase A degrada mais de 90% da micotoxina em 120 min. No nosso estudo, em 30 minutos 100% da micotoxinas foi degradada. A lipase obtida de pâncreas suíno é descrita para degradação de PAT em suco de pêra, como demonstrado por Xiao e colaboradores (2019), onde 93% de micotoxina foi degradada a 40 °C após 24 h. No estudo de Tang e colaboradores (2018) a enzima imobilizada degradou até 70% de PAT em suco de maçã a 40 °C após 18 h. Li e colaboradores (2017) verificaram que a ação da lipase imobilizada degradou 98% de PAT em solução aquosa com pH 6 a 40 °C em 42 h de reação.

Além disso, até esse momento, nenhum estudo prévio foi descrito na literatura utilizando a ação da lipase na degradação de ZEA. Segundo Urry e colaboradores (1966) a molécula de ZEA é constituída de uma porção resorcinol fundida a uma lactona que inclui dupla ligação trans, uma cetona, um éster e um grupamento metil. Portanto, a ZEA pode ser considerada um potencial substrato da amano lipase A por sua molécula ser constituída por grupamentos químicos, como uma cetona cíclica e um éster.

O conhecimento científico sobre a utilização de outras enzimas na degradação de OTA e ZEA têm avançado, devido aos riscos que estas micotoxinas ocasionam a saúde humana e/ou animal. Estudos descrevem que a OTA é degradada por diversas enzimas, como a PO comercial (GARCIA et al., 2020), a PO comercial e PO extraída de farelo de arroz (NORA et al., 2019), a ocratoxinase obtida de *Aspergillus niger* (DOBRITZSCH et al., 2014), a carboxipeptidase cp4 obtida a partir de *Lysobacter* sp. CW239 (WEI et al., 2020), a carboxipeptidase A obtida de pâncreas bovino (DEBERGHES et al., 1995; PITOUT, 1969; STANDER et al., 2001); a carboxipeptidase obtida de *Rhizopus oryzae* (KUPSKI et al., 2013) e *Trichoderma reesei* (KUPSKI; QUEIROZ; BADIALE-FURLONG, 2018b), a carboxipeptidase obtida de *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1 (CHANG et al., 2015) e *Bacillus subtilis* CW14 (HU et al., 2019), proteases comerciais e obtidas de *Aspergillus niger* (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006) e metaloenzima hidrolítica obtida *Aspergillus niger* (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006).

Em relação a degradação de ZEA pela ação de enzimas, são descritas: a PO comercial e obtida de farelo de arroz e farelo de soja (GARCIA; FELTRIN; GARDA-

BUFFON, 2018), lacase obtida de *Trametes versicolor* (BANU; LUPU; APRODU, 2013), a peroxirredoxina obtida de *Acinetobacter* sp. SM04 (YU et al., 2012); enzimas extracelular e intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANG et al., 2016), enzima extracelular obtida de *Bacillus amyloliquefaciens* ZDS-1 (XU et al., 2016), enzima intracelular de *Pseudomonas otitidis* TH-N1 (TAN et al., 2015a), enzima obtidas de *Aspergillus niger* FS10 (HE et al., 2016; SUN et al., 2014), de *Acinetobacter sp.* SM04 (YU et al., 2011), *Pseudomonas putida* (ALTALHI; EL-DEEB, 2009) e a enzima lactona hidrolase ZEA (ZHD101) obtida a partir de *Clonostachys rosea* (TAKAHASHI-ANDO et al., 2005; KOSAWANG et al., 2014).

A ação de enzimas na degradação de micotoxinas é resultante principalmente das reações de acetilação, glicosilação, clivagem de anéis, hidrólise, desanimação e descarboxilação, que estas moléculas catalisam (HAQUE et al., 2020). Adicionalmente, a utilização de enzimas microbianas, como a amano lipase A, é preferida quando comparada a outras fontes, principalmente devido a estabilidade, facilidade de produção e modificação, altos rendimentos e viabilidade econômica das mesmas. Pesquisas têm objetivado a investigação de enzimas para degradar micotoxinas de grande relevância econômica, como AFs, OTA, ZEA, FBs, PAT e deoxinivalenol (ZHU et al., 2016). Além disso, muitos processos enzimáticos foram implementados nas indústrias nas últimas décadas, impulsionados principalmente pelas características de especificidade e ação rápida das enzimas, e economia no uso de matérias-primas, energia, produtos químicos e/ou água em comparação com os processos convencionais (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013). Portanto, os resultados obtidos do estudo da otimização das condições de reação para ação da Amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA contribuem para futuras aplicações desta enzima na indústria de alimentos, bebidas e ração.

3.2.7 Degradação de OTA e ZEA em cerveja tipo Pilsen pela ação da amano lipase A

A degradação simultânea de OTA e ZEA pela lipase na cerveja tipo Pilsen foi de 89,5 e 6,5%, com desvio padrão de 1,3 e 0,8, respectivamente. Através dos resultados foi possível observar a diminuição da degradação destas micotoxinas na cerveja quando comparado aos percentuais de degradação de OTA e ZEA alcançados em solução modelo, de 100,0 e 30,6%, respectivamente. A ação da amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA em cerveja pode ter sido inibida devido a composição físico-química complexa da matriz, quando comparada a da solução modelo.

A cerveja é constituída de mais de 800 compostos e muitos deles contribuem para suas características nutricionais e sensoriais, como amargor, doçura, acidez, características de lúpulo, carbonatação, sabor alcoólico, éster ou frutado (CORTACERO-RAM REZ et al., 2003). Adicionalmente, Montanari e parceiros (2009) reportaram que a cerveja é considerada uma fonte de minerais, em maior proporção como cálcio, magnésio, sódio e potássio e em menor proporção por ferro, cobre, zinco e manganês.

Chilaka e colaboradores (2018), descreveram que a cerveja é um produto à base de cereais consumido em todo o mundo. Este produto é frequentemente contaminado por micotoxinas, independentemente da localização geográfica da fabricação de cerveja ou do tipo de cerveja, e sim devido as matérias-primas empregadas durante o processamento ser altamente susceptível a contaminação por fungos. Na literatura a ocorrência de OTA e ZEA em cerveja é reportada por Bauer et al. (2016), Běláková et al. (2011), Kuzdraliński, Solarska e Muszyńska (2013), Medina et al. (2005, 2006), Odhav e Naicker (2002), Pascari et al. (2018) e Rubert et al. (2013).

Apesar disso, os relatos na literatura empregando métodos para degradação de micotoxinas em cerveja, especialmente pela ação de enzimas, são escassos. No entanto, estudos recentes descrevem a utilização da PO comercial para degradar 24% de AFLA B₁ (SIBAJA et al., 2019), 4,8% de OTA e 10,9% de ZEA (GARCIA et al., 2020), em cerveja tipo Pilsen. Estes autores também reportam que a ação da enzima PO na degradação da cerveja é influenciada negativamente quando comparada a ação da enzima em soluções modelo, devido a bebida ser constituída de água, minerais (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺), lipídeos, carboidratos, proteínas, fibras solúveis e vitaminas do complexo B. Até o momento, nenhuma pesquisa científica empregando a lipase para degradação de micotoxinas em cerveja é descrita.

4 CONCLUSÃO

A ação da amano lipase A na degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo foi satisfatória resultando em degradações de 100,0 e 30,6%, respectivamente. As condições ótimas para a ação da enzima para a degradação destas micotoxinas em solução modelo foram o emprego de tampão fosfato 50 mM pH 7, incubação a 40 °C por 22 h, sem a adição de íons metálicos. Com base nas condições otimizadas de reação, a enzima foi empregada em cerveja tipo Pilsen para a degradação de OTA (89,5%) e ZEA (6,5%) simultaneamente. Além disso, os resultados das condições de reação, como pH, temperatura e tempo, indicam que a amano lipase A pode ser empregada para degradação de OTA e ZEA em

outras matrizes alimentares, sendo uma alternativa para a indústria de alimentos e/ou rações para mitigação destas micotoxinas, diminuindo os impactos econômicos e também os relativos a à saúde humana e animal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASSI, H.; AYED-BOUSSEMA, I.; SHIRLEY, S.; ABID, S.; BACHA, H.; MICHEAU, O. The mycotoxin zearalenone enhances cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. **Toxicology Letters**, v. 254, p. 1–7, 2016.

ABD ALLA, E.-SAM. Zearalenone: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. **Food/Nahrung**, v. 41, n. 6, p. 362-365, 1997.

ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. Food Biotechnology, v. 20, n. 3, p. 231–242, 2006.

AKITA, H.; MATSUKURA, H.; OISHI, T. Lipase catalyzed enantioselective hydrolysis of 2methyl 3-acetoxy esters. **Tetrahedron letters**, v. 27, n. 43, p. 5241-5244, 1986.

ALKADRI, D.; RUBERT, J.; PRODI, A.; PISI, A.; MAÑES, J.; SOLER, C. Natural cooccurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. **Food Chemistry**, v. 157, p. 111–118, 2014.

ALTALHI, A. D.; EL-DEEB, B. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. Journal of Hazardous Materials, v. 161, n. 2–3, p. 1166–1172, 2009.

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, n. 3, p. 173–183, 2002.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. In: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.

ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 459–464, 2005.

BANU, I.; LUPU, A.; APRODU, I. Degradation of zearalenone by laccase enzyme. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, v. 14, n. 2, p. 79–84, 2013.

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.
BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKUL OVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. Food Chemistry, v. 126, n. 1, p. 321–325, 2011.

BENITES, A. J.; FERNANDES, M.; BOLETO, A. R.; AZEVEDO, S.; SILVA, S.; LEITÃO, A. L. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 73, p. 1223–1228, 2017.

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

BHARDWAJ, Kanchan; RAJU, Aruna; RAJASEKHARAN, Ram. Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1728-1738, 2001.

BRIONES-REYES, D.; GÓMEZ-MARTINEZ, L.; CUEVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. Food Chemistry, v. 100, n. 2, p. 693–698, 2007.

CAO, H.; ZHI, Y.; XU, H.; FANG, H.; JIA, X. Zearalenone causes embryotoxicity and induces oxidative stress and apoptosis in differentiated human embryonic stem cells. **Toxicology in Vitro**, v. 54, p. 243-250, 2019.

CARREA, G.; CORCELLI, A.; PALMISANO, G.; RIVA, S. Preparation of 3-deacetyl cephalosporins by *Aspergillus niger* lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 6, p. 648–652, 1996.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F. Lipases: an overview. In: Lipases and phospholipases. Humana Press, 2012. p. 3-30.

CHANG, X.; WU, Z.; WU, S.; DAI, Y.; SUN, C. Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 32, n. 4, p. 564–571, 2015.

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.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; ALVES, M. G.; NASCIMENTO, M. DA G.; CARVALHO, P. DE O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163–171, 2010.

CORTACERO-RAM REZ, S.; HERNÁINZ-BERMÚDEZ DE CASTRO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 440-455, 2003.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3–4, p. 183–205, 1999.

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BERTUZZI, T.; MOSERITI, A.; PIETRI, A.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 978–983, 2010.

DEBERGHES, P.; BETBEDER, A. M.; BOISARD, F.; BLANC, R.; DELABY, J. F.; KRIVOBOK, S.; STELMAN, R.; SELGLE-MURANDI, F.; CREPPY, E. E. Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: Prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. **Mycotoxin Research**, v. 11, p. 37–47, 1995.

DOBRITZSCH, D.; WANG, H.; SCHNEIDER, G.; YU, S. Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme. **Biochemical Journal**, v. 462, n. 3, p. 441–452, 2014.

DOHNAL, V.; PAVLÍKOVÁ, L.; KUCA, K. The pH and Mobile Phase Composition Effects Ochratoxin A Fluorescence at Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 9, p. 766–770, 2010.

DONG, H.; GAO, S.; HAN, S. P; CAO, S. G. Purification and characterization of a Pseudomonas sp. lipase and its properties in non-aqueous media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 251-256, 1999.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. Journal of food protection, v. 66, n. 8, p. 1514-1527, 2003.

EISENTHAL, R.; PETERSON, M. E.; DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 289–292, 2006.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology** & Biotechnology, v. 44, n. 2, p. 235–240, 2006.

GAJÊCKA, M.; ZIELONKA, U.; DABROWSKI, M.; GAJÊCKI, M. Threats resulting from the presence of zearalenone in water. **Medycyna Wet**, v. 67, n. 10, p. 643–646, 2011.

GAN, F.; ZHOU, Y.; HOU, L.; QIAN, G.; CHEN, X.; HUANG, K. Ochratoxin A induces nephrotoxicity and immunotoxicity through different MAPK signaling pathways in PK15 cells and porcine primary splenocytes. **Chemosphere**, v. 182, p. 630–637, 2017.

GARCIA, S. DE O.; SIBAJA, K. V. M.; NOGUEIRA, W. V.; FELTRIN, A. C. P.; PINHEIRO, D. F. A.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039, 2020. GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 921–924, 2008.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6–7, p. 468–486, 2002.

GREEN, M. L.; DIEKMAN, M. A.; MALAYER, J. R.; SCHEIDT, A. B.; LONG, G. G. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 1, p. 171, 1990.

HAJOK, I.; KOWALSKA, A.; PIEKUT, A.; ĆWIELĄG-DRABEK, M. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. **Food Chemistry**, v. 284, p. 264-269, 2019.

HAQUE, M. A.; WANG, Y.; SHEN, Z.; LI, X.; SALEEMI, M. K.; HE, C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 104095, 2020.

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

HEERDEN, E. VAN; LITTHAUER, D.; VERGER, R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, n. 7, p. 902-909, 2002.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HU, H.; JIA, X.; WANG, Y.; XIONG, L.; PENG, M.; LIANG, Z. Detoxification of ochratoxin a by an expressed carboxypeptidase and some isolated peptides from *Bacillus subtilis* CW14. **Toxicon**, v. 158, p. S67, 2019.

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

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France, 1993: [s.n.]. v. 56.

IIZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agricultural and **Biological Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1253-1258, 1990.

IQBAL, S. Z.; RABBANI, T.; ASI, M. R.; JINAP, S. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. Food Chemistry, v. 157, p. 257–262, 2014a.

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

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

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.

JOLLY, James F. **Enzymatic methods of flavor modification.** U.S. Patent n. 9,144,249, 29 set. 2015.

JUAN, C.; MOLTÓ, J. C.; LINO, C. M.; MAÑES, J. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 525–530, 2008.

KHEIROLOMOOM, A.; ARDJMAND, M.; VOSSOUGHI, M.; KAZEMEINI, M. The stability analysis and modeling of pH- and ionic strength inactivation of penicillin G acylase obtained from various species of *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 2, n. 2, p. 81–88, 1998.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564-1568, 1994.

KOWALSKA, K.; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA, D. E.; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A. W. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 141–149, 2016.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 38–44, 2005.

KUPSKI, L.; ALVES, C. L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Aplicação de carboxipeptidase obtida de *Rhizopus* na degradação de ocratoxina A. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 30, 2013.

KUPSKI, L.; QUEIROZ, M. I.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase A to a baking process to mitigate contamination of wheat flour by ochratoxin A. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 248-254, 2018.

KUZDRALIŃSKI, A.; SOLARSKA, E.; MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 22–24, 2013.

LEE, D.; KOH, Y.; KIM, K.; KIM, B.; CHOI, H.; KIM, D.; SUHARTONO, M. T.; PYUN, Y. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 393-400, 1999.

LI, X.; PENG, X.; WANG, Q.; ZUO, H.; MENG, X.; LIU, B. Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 78, p. 48-56, 2017.

MASSART, F.; SAGGESE, G. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. International Journal of Andrology, v. 33, n. 2, p. 369–376, 2010.

MAYURA, K.; STEIN, A. F.; BERNDT, W. O.; PHILLIPS, T. D. Teratogenic effects of Ochratoxin A in rats with impaired renal function. **Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 277–285, 1984.

MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, R.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, n. 2, p. 178-183, 2006.

MEDINA, Á.; JIMÉNEZ, M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, n. 1–2, p. 7–13, 2005.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 78, p. 119–134, 2012.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486–1490, 2009.

MOHAMMADI, M.; SEPEHRIZADEH, Z.; EBRAHIM-HABIBI, A.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMARZI, M. A.; SETAYESH, N. Enhancing activity and thermostability of lipase A from *Serratia marcescens* by site-directed mutagenesis. **Enzyme and microbial technology**, v. 93, p. 18-28, 2016.

MONTANARI, L.; MAYER, H.; MARCONI, O.; FANTOZZI, P. Minerals in beer. In: Beer in health and disease prevention. Academic Press, 2009. p. 359-365.

NAMBOODIRI, V. M. H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Aspergillus niger*. Lipids, v. 35, p. 495–502, 2000.

NAWANI, N.; KAUR, J. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 206, p. 91–96, 2000.

NKWE, D. O.; TAYLOR, J. E.; SIAME, B. A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B_1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 177-186, 2005.

NORA, N. S.; FELTRIN, A. C. P.; SIBAJA, K. V. M.; FURLONG, E. B.; GARDA-BUFFON, J. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1075–1082, 2019.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33–60, 2005.

ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Additives and Contaminants, v. 19, n. 1, p. 55–61, 2002.

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.

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. In: **Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.** Humana Press, Totowa, NJ, 2001. p. 739-752.

PITOUT, M. J. The hydrolysis of ochratoxin a by some proteolytic enzymes. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 485–491, 1969.

POKORNY, D.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A116 strain. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 2, n. 4–5, p. 215–222, 1997.

PRABHU, A. V.; TAMBE, S. P.; GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Rice Bran Lipase: Extraction, Activity, and Stability. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 6, p. 1083–1089, 1999.

PURICH, D. L. Factors influencing enzyme activity. In: Enzyme Kinetics: Catalysis & Control, Elsevier, 2010, p. 379-484.

QUINTELA, S.; VILLARÁN, M. C.; LÓPEZ DE ARMENTIA, I.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 501–504, 2012.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132–1137, 2010.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico - Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 18–46, 2006.

ROGOWSKA, A.; POMASTOWSKI, P.; SAGANDYKOVA, G.; BUSZEWSKI, B. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. **Toxicon**, v. 162, p. 46-56, 2019.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861-866, 2007.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MARÍN, R.; JAMES, K. J.; MAÑES, J. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 122–128, 2013.

SALIS, A.; BILANIČOVÁ, D.; NINHAM, B. W.; MONDUZZI, M. Hofmeister effects in enzymatic activity: weak and strong electrolyte influences on the activity of *Candida rugosa* lipase. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 5, p. 1149-1156, 2007.

SANTE/EC. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, v. 11813, p. 1–42, 2017.

SATHISH YADAV, K. N.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10663–10670, 2011.

SAXENA, R.; DAVIDSON, W.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239–247, 2003.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

SHU, C.-H.; XU, C.-J.; LIN, G.-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 734–738, 2006.

SHU, Z.; YANG, J.; YAN, Y. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. Chinese Journal of Biotechnology, v. 23, n. 1, p. 96–101, 2007.

SIBAJA, K. V. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; FELTRIN, A. C. P.; DIAZ REMEDI, R.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

SIGMA-ALDRICH. **Amano Lipase A from** *Aspergillus niger*. Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 18 de fevereiro de 2020.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. In: **Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.** Humana Press, Totowa, NJ, 1999. p. 745-757.

STANDER, M. A.; STEYN, P. S.; VAN DER WESTHUIZEN, F. H.; PAYNE, B. E. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 302–304, 2001.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. Journal of agricultural and food chemistry, v. 48, n. 11, p. 5736-5739, 2000.

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I. P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 788-809, 2012.

SUN, X.; HE, X.; XUE, K. SIYU; LI, Y.; XU, D.; QIAN, H. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10. **Food and chemical toxicology**, v. 72, p. 76-82, 2014.

TALENS-PERALES, D.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: Functions and Characteristics. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 532–538.

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

TANG, H.; PENG, X.; LI, X.; MENG, X.; LIU, B. Biodegradation of mycotoxin patulin in apple juice by calcium carbonate immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 88, p. 69-74, 2018.

TOIDA, J.; KONDOH, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience**, **biotechnology**, **and biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1199-1203, 1995.

ÜLKER, S.; KARAOĞLU, Ş. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 385-390, 2012.

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

UTSUGI, A.; KANDA, A.; HARA, S. Lipase specificity in the transacylation of triacylglycerin. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 3, p. 123-132, 2009.

VERGER, R.; DE HAAS, G. H.; SARDA, L.; DESNUELLE, P. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. **Biochimica et Biophysica Acta** (**BBA)-Protein Structure**, v. 188, n. 2, p. 272-282, 1969.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, n. 1–2, p. 321–326, 2000.

WAGNER, F. W. Preparation of metal-free enzymes. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1988. p. 21-32.

WEI, W.; QIAN, Y.; WU, Y.; CHEN, Y.; PENG, C.; LUO, M.; XU, J.; ZHOU, Y. Detoxification of ochratoxin A by *Lysobacter* sp. CW239 and characteristics of a novel degrading gene carboxypeptidase cp4. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113677, 2020.

WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. Lipases: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, 1994.

XIAO, Y.; LIU, B.; WANG, Z.; HAN, C.; MENG, X.; ZHANG, F. Effective degradation of the mycotoxin patulin in pear juice by porcine pancreatic lipase. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110769, 2019.

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

YADAV, R. P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 28, n. 3, p. 243-249, 1998.

YILDIZ, T.; YAŞA, H.; HASDEMIR, B.; YUSUFOĞLU, A. S. Different bio/Lewis acidcatalyzed stereoselective aldol reactions in various mediums. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 148, n. 8, p. 1445-1452, 2017.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 384–391, 2007.

YU, Y.; WU, H.; TANG, Y.; QIU, L. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 121–126, 2012.

YU, Y.; QIU, L.; WU, H.; TANG, Y.; LAI, F.; YU, Y. Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter* sp. SM04 into smaller estrogenic products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2675–2681, 2011.

ZHANG, H.; DONG, M.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; LI, J.; ZHANG, X. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 416–423, 2016.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 16–25, 2005.

ZHU, Y.; HASSAN, Y. I.; WATTS, C.; ZHOU, T. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. Animal Feed Science and Technology, v. 216, p. 19–29, 2016.

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

ARTIGO 3. DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM MOSTO E CERVEJA PELA AÇÃO DE MIX ENZIMÁTICO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do mix enzimático, composto por peroxidase comercial (PO) e amano lipase A, na degradação simultânea de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em mosto e cerveja. A temperatura e atividade enzimática ótimas para degradação foram determinadas. As condições de reação para ação do mix no mosto foram de 30 °C e adição de 0,90 e 0,45 U mL⁻¹ de PO e amano lipase A e na cerveja foram de 25 °C e adição de 1,20 e 0,60 U mL⁻¹ de PO e amano lipase A, respectivamente, a 150 rpm durante 22 h com 26 mM de peróxido de hidrogênio. No mosto, OTA e ZEA foram degradadas em 86,3 e 29,4%, respectivamente. Na cerveja, 96,9% de OTA e 23,0% de ZEA foram degradadas após a ação das enzimas. O mix enzimático pode ser recomendado como uma alternativa para o controle de OTA e ZEA nesta bebida amplamente produzida e consumida mundialmente.

Palavras-chave: Peroxidase. Amano lipase A. Condições reacionais. Processo cervejeiro. Micotoxina.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais populares e consumidas do mundo, alcançando no ano de 2018 a produção global aproximada de 1,94 bilhões de hectolitros (STATISTA, 2020). Os ingredientes essenciais na fabricação da cerveja são malte de cevada, fermento, lúpulo e água (LI; WANG; LIU, 2017), podendo ser adicionados outros cereais adjuntos, como arroz, trigo, milho, aveia, sorgo (PARKER, 2012). Entretanto, essas matériasprimas são frequentemente contaminadas por micotoxinas, como ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) (BĚLÁKOVÁ et al., 2011; GHALI et al., 2008; IBÁÑEZ-VEA et al., 2012; LAITILA, 2015; MAKUN et al., 2011).

As micotoxinas afetam a economia e podem resultar em riscos à saúde dos consumidores (ADEBIYI et al., 2019) além de causarem prejuízos à fermentação alcoólica, reduzindo a concentração de etanol, produtividade e rendimento (KŁOSOWSKI et al., 2010). Deste modo, para a produção de alimento seguro e de qualidade é imprescindível a utilização de matérias-primas com características físico-químicas (PAHL; MEYER; BIURRUN, 2016) e microbiológicas adequadas (WESTERMANN; HUIGE, 1979).

A OTA e ZEA provocam efeitos tóxicos à saúde de humanos e animais (STROKA; GONÇALVES, 2019). A OTA é reconhecida por ser nefrotóxica, hepatotóxica, teratogênica e imunotóxico (O'BRIEN; DIETRICH, 2005). A ZEA não ocasiona efeito tóxico em um órgão especificamente, pois sua ação é sistêmica por ser um desregulador endócrino (EFSA, 2016). A OTA e ZEA são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – IARC no grupo 2B (possivelmente carcinogênica) e 3 (as evidências científicas são insuficientes para a classificação como carcinógeno), respectivamente (IARC, 1993).

Os efeitos tóxicos da contaminação de alimentos por micotoxinas podem ser minimizados pela prevenção da contaminação, remoção de material contaminado, mitigação do conteúdo de micotoxinas nos alimentos (métodos biológicos, físicos e químicos) e tratamento de indivíduos expostos a estas substâncias (KARLOVSKY et al., 2016). Na fabricação da cerveja, a redução dos níveis de micotoxinas estão associadas à algumas etapas, como maltagem, moagem, fermentação e/ou clarificação (PASCARI et al., 2018). No entanto, a ocorrência de OTA e ZEA é verificada no produto final mesmo após o processamento (ARAGUÁS; GONZÁLEZ-PEÑAS; LÓPEZ DE CERAIN, 2005; BAUER et al., 2016; NKWE; TAYLOR; SIAME, 2005; ODHAV; NAICKER, 2002; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 2000). Desta maneira, a utilização de enzimas é estudada como um método biológico alternativo para reduzir os níveis de micotoxinas em alimentos. Dentre as vantagens da ação de enzimas, destaca-se a especificidade com diferentes substratos, condições brandas de reação, ser ambientalmente sustentáveis e seguras, além de causar mínimas alterações na qualidade sensorial e nutricional de produtos, quando comparada a outros métodos de descontaminação (LOI et al., 2017). Adicionalmente, a peroxidase comercial (PO) demonstrou potencial oxidativo em solução modelo e cerveja para degradação simultânea de OTA e ZEA (GARCIA et al., 2020). Assim como, a amano lipase A mostrou-se efetiva na hidrólise de OTA em solução tampão (STANDER et al., 2000).

A elevada produção e consumo de cerveja e a ocorrência de OTA e ZEA nesta matriz estimulam a busca por alternativas para o controle destas substâncias, visando reduzir os danos que estas micotoxinas acarretam à saúde humana e economia. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a ação do mix enzimático, composto pelas enzimas peroxidase comercial e amano lipase A, na degradação simultânea de OTA e ZEA em mosto e cerveja, tornando a biodegradação destas micotoxinas um processo alternativo para a indústria cervejeira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PADRÕES DE MICOTOXINAS, ENZIMAS E AMOSTRAS

Os padrões das micotoxinas OTA e ZEA, com pureza de \geq 99,0%, a PO comercial - padrão enzimático de PO tipo VI obtida de raiz-forte (*Armoracia rusticana*) liofilizada com concentração de 250 a 330 U mg⁻¹ e a enzima amano lipase A obtida *Aspergillus niger* em concentrações acima de 120.000 U g⁻¹ foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, EUA). As amostras de cerveja tipo Pilsen, constituídas de latas de 473 mL do mesmo fabricante e lote, foram adquiridas em estabelecimento comercial na cidade de Rio Grande, RS - Brasil. O mosto tipo *American Pale Ale* foi fornecido por uma microcervejaria localizada na mesma cidade, sendo este produto da mosturação de 88 kg de malte Pilsen, 2 kg de malte *Carared*, 90 kg de malte de *Munique* tipo II e 750 L de água potável.

2.2 PREPARO DE AMOSTRA

As amostras foram desgaseificadas em banho ultrassônico de 25 kHz durante 60 min, conforme Garcia et al. (2020). O mosto foi filtrado em filtro de papel de 40 μ m.

Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em frascos âmbar de 1 L e mantidas congeladas até a utilização.

2.3 MICOTOXINAS: PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO

As soluções estoque de OTA (100 μ g mL⁻¹) e ZEA (500 μ g mL⁻¹) foram preparadas em benzeno:ácido acético (99:1, v v⁻¹) e benzeno:acetonitrila (98:2, v v⁻¹), respectivamente, e posteriormente congelados. As soluções de trabalho resultaram das diluições de soluções estoque até a concentração desejada para os ensaios de degradação. A confirmação da concentração da solução de trabalho de OTA e ZEA foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis. O comprimento de onda de absorção máxima para OTA e ZEA foi de 333 e 317 nm, e a absortividade molar foi de 5550 e 6060 L cm⁻¹ mol⁻¹ em benzeno:ácido acético (99:1, v v⁻¹) e benzeno, respectivamente (AOAC, 2000).

micotoxina (
$$\mu g \ mL^{-1}$$
) = $\frac{abs \ X \ MM \ X \ 1000 \ X \ fc}{\epsilon \ X \ b}$ (1)

Onde micotoxina (μ g mL⁻¹) é a concentração da micotoxina presente em 1 mL; abs é o valor da absorvância da solução padrão; MM é a massa molecular da micotoxina em estudo (g mol⁻¹); fc é o fator de correção do instrumento; ε é absortividade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina (mol L⁻¹) e b é a largura da cubeta (cm).

2.4 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA POR CLAE-FL

A determinação de OTA e ZEA das amostras de mosto e cerveja foram realizadas de acordo com Garcia et al. (2020), empregando a técnica de extração partição líquido-líquido com clorofórmio. Para a extração os padrões OTA e ZEA foram adicionados em recipientes de 10 mL de vidro e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Primeiramente, a amostra de 1 mL (mosto ou cerveja) foi acidificada com ácido acético para pH 2, depois foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio e agitados em vórtex por 30 s e em banho ultrassônico de 25 kHz por 3 min. A fase orgânica foi coletada e o procedimento foi repetido três vezes. O volume final obtido durante a extração foi evaporado em banho de areia a 60 °C. A determinação das micotoxinas OTA e ZEA foi realizada em cromatógrafo a líquido (CL)

acoplado a um detector de fluorescência, e prévia ressuspensão e homogeneização das amostras em fase móvel. Para a análise foi utilizada uma coluna Supleco® - Kromasil C18 (5 μ m e 150 mm x 4,6 mm) mantida a temperatura de 25 °C, detecção nos comprimentos de onda de 333 nm para excitação e 460 nm para emissão, fase móvel composta por acetonitrila:água acidificada 1% com ácido acético (60:40, v v⁻¹) e vazão 0,8 mL min⁻¹ em eluição isocrática totalizando 7 min a corrida cromatográfica.

Para a aplicabilidade do método analítico, as curvas analíticas corresponderam a faixa de concentração das micotoxinas de 0,4 a 30,0 ng mL⁻¹ para OTA e 0,02 a 2,00 μ g mL⁻¹ para ZEA, limites de detecção e quantificação foram de 0,25 e 0,40 ng mL⁻¹ para OTA e 0,01 e 0,02 μ g mL⁻¹ de ZEA, respectivamente. Os coeficientes de correlação e determinação foram superiores a 0,99 e as médias dos níveis de recuperação, em três níveis de fortificação de OTA e ZEA, em mosto foram 92 e 99% e em cerveja foram 101 e 86%, respectivamente, com coeficiente de variação inferior ou igual a 7%.

2.5 PREPARO DAS ENZIMAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As soluções trabalho de PO e lipase foram preparadas a partir da diluição dos padrões em água ultrapurificada, de acordo com as especificações do fabricante.

A medida da atividade enzimática da PO foi determinada em tampão fosfato (100 mM pH 6,0), água, peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (26 mM), guaiacol (9 mM) e extrato enzimático, incubação a 30 °C durante 15 min, conforme Garcia et al. (2020). A atividade enzimática foi verificada em espectrofotômetro a 470 nm através da oxidação do substrato guaiacol à tetraguaiacol. Uma unidade de atividade da peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de guaiacol em 1 min.

A atividade da lipase foi verificada sob condições descritas por Lee et al. (1999). Para análise, o substrato p-nitrofenil butirato (p-NPB) foi diluído em acetonitrila a uma concentração de 10 mM. Posteriormente, 10 mM de p-NPB em acetonitrila foi solubilizado em etanol absoluto e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 nas proporções de 1:4:95, respectivamente. A incubação foi realizada com 0,3 mL da solução enzimática e 0,9 mL de substrato p-NPB a 60 °C por 15 min. A atividade da enzima foi medida em um espectrofotômetro a 405 nm através da hidrólise do substrato em p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade de atividade da lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-NP em 1 min.

2.6 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AÇÃO DO MIX ENZIMÁTICO

As condições reacionais de temperatura e concentração de enzimas foram avaliadas para ação da PO e amano lipase A na degradação simultânea das micotoxinas em amostras de mosto e cerveja. A otimização das condições de reação foi realizada usando o método de um fator por vez, em duas etapas. Na primeira etapa, a variável independente temperatura, foi investigada e os tratamentos com os melhores resultados de degradação foram selecionados e utilizados na próxima fase, onde foi avaliado a atividade enzimática do mix.

Para tanto, cada reator foi previamente contaminado com OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 μ g mL⁻¹), conforme descrito por Garcia et al. (2020). Posteriormente, o solvente da solução padrão foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e a adicionada mosto (1 mL) ou cerveja (1 mL). Após, foi realizada homogeneização em vórtex e banho ultrassônico por 30 s e 3 min, respectivamente. Em seguida, foi adicionado H₂O₂ (26 mM), PO (0,6 U mL⁻¹) de acordo com Garcia et al. (2020) e amano lipase A (0,3 U mL⁻¹) de acordo com Stander et al. (2000) com modificações na concentração da enzima. A temperatura foi avaliada incubando os reatores em agitador orbital a 150 rpm a 25; 30; 40 e 45 ± 1 °C durante 22 h. A concentração de enzima PO (0,15; 0,30; 0,6; 1,2 U mL⁻¹) e amano lipase A (0,07; 0,15; 0,30; 0,9 U mL⁻¹) foi avaliada nas condições de temperaturas padronizadas. As amostras foram extraídas e quantificadas para a verificação do percentual de degradação (%) de OTA e ZEA, sendo este determinado pela diferença da concentração inicial e final das micotoxinas.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da degradação simultânea de OTA e ZEA pela ação do mix enzimático após otimização das condições reacionais (temperatura e atividade enzimática) foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a nível de significância de 5% (p<0,05) no programa Statistica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e comparados ao controle (com micotoxinas e sem adição do mix enzimático).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AÇÃO DO MIX ENZIMÁTICO

3.1.1 Efeito da temperatura

A temperatura tem grande impacto em reações enzimática (GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015). Em temperatura mais altas, ocorre o aumento da taxa das reações catalisadas por enzimas, denominado temperatura ótima. Na temperatura ótima as moléculas ganham mais energia cinética (energia de ativação catalítica), o que aumenta a atividade da enzima e a probabilidade da ligação enzima-substrato (LIU, 2020). No entanto, acima da temperatura ótima, ocorre a desnaturação enzimática, devido ao rompimento das ligações intra e intermoleculares e, consequentemente modificação estrutural da enzima (EISENTHAL et al., 2006; GOMES; ROCHA-SANTOS, 2019)

Os resultados demonstraram que nas temperaturas de 30 e 25 °C são alcançados os maiores percentuais de degradação das micotoxinas em mosto e cerveja, respectivamente (Tabela 1). A PO é amplamente conhecida por sua ação na degradação de diferentes micotoxinas (DAS; MISHRA, 2000; FELTRIN et al., 2017; GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011; GAUTÉRIO et al., 2017; MARIMÓN SIBAJA et al., 2019), inclusive de OTA (NORA et al., 2019) e de ZEA (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018; YU et al., 2012). Adicionalmente, Garcia e colaboradores (2020) descreveram, pela primeira vez, a ação da PO (0,6 U mL⁻¹) na degradação simultânea de OTA e ZEA em amostras de cerveja tipo Pilsen e solução modelo, sendo verificado a degradação de 4,8 e 27,0% de OTA e 10,9 e 64,9% de ZEA, respectivamente, após incubação por 6 h a 30 °C. Quando comparado ao estudo de Garcia e colaboradores (2020) as degradações de OTA e ZEA na cerveja, observadas neste estudo, foram maiores em 5,57 e 1,85 vezes, respectivamente, ficando demonstrada a necessidade da padronização das condições de aplicação no produto desejado.

	Degradação** (%)					
Temperatura (°C)	Mosto		Cerveja			
	ΟΤΑ	ZEA	ΟΤΑ	ZEA		
25	$37,2^{c} \pm 0,2$	$27,3^{a} \pm 0,8$	$67,4^{a} \pm 3,3$	$20,2^{a} \pm 2,2$		
30	$42,5^{ab}\pm3,1$	$29{,}3^{\mathrm{a}}\pm2{,}5$	$64,7^{a}\pm4,9$	$12,6^{b} \pm 2,0$		
35	$44,0^{a}\pm3,2$	$14,7^{b}\pm0,5$	$67,2^{a} \pm 0,3$	$14,1^b \pm 0,8$		
40	$28,2^{d} \pm 1,2$	$15,2^{b} \pm 1,3$	$21,\!2^{\mathrm{b}}\pm0,\!9$	$11,3^{b} \pm 1,1$		

 Tabela 1 - Efeito da temperatura na degradação de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA)

 pela ação do mix enzimático* em mosto e cerveja.

* Mix enzimático (peroxidase comercial, 0,6 U mL⁻¹ e amano lipase A, 0,3 U mL⁻¹) sob agitação orbital a 150 rpm durante 22 h. **Resultados expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (p > 0,05).

A lipase também apresenta potencial para hidrolisar micotoxinas, principalmente por sua ação na degradação de 90% de OTA em solução tamponante (STANDER et al., 2000), 93% de patulina (PAT) em suco de pera (XIAO et al., 2019), 70% PAT em suco de maçã (TANG et al., 2018) e 98% de PAT em solução aquosa (LI et al., 2017). Além disso, até esse momento, nenhum estudo prévio foi descrito utilizando a ação da lipase na degradação de ZEA. Assim, para dar continuidade na degradação de OTA e ZEA em mosto foi selecionada a temperatura de 30 °C e para a cerveja foi empregado 25°C.

A cerveja é obtida através das operações de maltagem, moagem do malte, mosturação, filtração do mosto, fervura, tratamento do mosto, fermentação, maturação, clarificação, estabilização e envase (HARRISON; ALBANESE, 2017; WUNDERLICH; BACK, 2009). A aplicação do mix enzimático, nas condições reacionais de 30 e 25 °C em mosto e cerveja, respectivamente, pode ser considerada uma alternativa à indústria cervejeira para o controle de OTA e ZEA. Desta maneira, sugerimos a aplicação do mix no mosto, após a etapa de mosturação, e na cerveja após a fermentação, o que propiciariam evitar referentes a manutenção da temperatura ótima à reação enzimática. Além disso, as etapas seguintes do processamento da bebida, como fervura do mosto e pasteurização da cerveja, auxiliariam na inativação das enzimas. E assim, evitariam reações enzimáticas indesejáveis e a necessidade de adicionar outra etapa com a finalidade de desnaturar essas moléculas. Portanto, o mix enzimático podendo ser aplicada em uma etapa do processamento ou de maneira sequencial, caso haja necessidade, como em situações onde os níveis de contaminação por estas micotoxinas no mosto estejam altos mesmo após a ação enzimática.

3.1.2 Efeito da atividade enzimática

A concentração da enzima é importante, pois esta é necessária para reagir com as moléculas do substrato. Se houver uma maior concentração de enzimas, a reação será mais rápida até que haja a extinção de todo substrato disponível. Portanto, aumentar a concentração da enzima sempre aumentará a taxa da reação catalisada pela enzima até certo ponto, após isto, qualquer acréscimo não afetará a taxa da reação e resultará em desperdícios (KUDDUS, 2019).

Nas concentrações de 0,90 U mL⁻¹ de PO e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A foram observados os maiores percentuais de degradação simultânea de OTA e ZEA em mosto. Quanto a cerveja, as maiores degradações foram observadas quando empregado o mix enzimático nas concentrações de PO e amano lipase A de 1,20 e 0,60 U mL⁻¹, respectivamente. Além disso, é

possível observar que os percentuais de degradação no mosto e cerveja aumentaram conforme adição da atividade enzimática (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito da atividade enzimática de peroxidase comercial (PO) e amano lipase A	A na
degradação de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) em mosto* e cerveja**.	

Atividade enzimática (U mL ⁻¹)		Degradação***(%)				
РО	Amano lipase A	Mosto		Cerveja		
		ОТА	ZEA	ΟΤΑ	ZEA	
0,15	0,08	$28,9^{d} \pm 1,4$	$16,2^{b} \pm 0,6$	$5,5^{e} \pm 1,1$	$20,8^{b} \pm 0,7$	
0,30	0,15	$38,2^{\circ} \pm 2,7$	$16,1^{b} \pm 2,2$	$11,7^{\rm d} \pm 0,6$	$22,\!3^{ab}\pm0,\!7$	
0,60	0,30	$47,0^{b} \pm 2,6$	$30,3^{a} \pm 1,8$	$69,2^{c} \pm 1,2$	$21,2^{b} \pm 1,3$	
0,90	0,45	$86,3^{a} \pm 3,6$	$29{,}4^a \pm 1{,}4$	$78,\!4^{\mathrm{b}}\pm1,\!6$	$24,7^{a}\pm1,3$	
1,20	0,60	$87,3^{a} \pm 2,1$	$28,4^{a} \pm 1,2$	$96,9^{a} \pm 1,9$	$23,\!0^{ab}\pm1,\!2$	

*Mosto sob agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 30 ± 1 °C. **Cerveja sob agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 25 ± 1 °C. ***Resultados expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (p > 0,05).

Os resultados observados corroboram com o descrito no estudo de Das; Mishra (2000), que verificaram que a velocidade de reação da PO e a degradação de aflatoxina B1 (AFB1) é diretamente proporcional a atividade enzimática, mas que após a concentração ótima não ocorre diferença na conversão de substrato, ocasionada pela saturação de substrato ou atuação de inibidores enzimáticos. Outra consideração a ser realizada, é que a atividade enzimática determina o uso destas moléculas em processos comerciais devido ao seu alto custo, viabilizando o estudo desta variável para ser empregado quantidades mínimas de enzima e obtenção de altos percentuais de degradação a um custo razoável (SIBAJA et al., 2019).

Adicionalmente, nenhum estudo, na literatura consultada, foi realizado avaliando a enzimática ótima de PO comercial e amano lipase A para degradação simultânea de OTA e ZEA. No entanto, a PO comercial foi empregada em diferentes concentrações, para a degradação de OTA e ZEA em solução modelo e cerveja (GARCIA et al., 2020), de OTA em solução modelo e suco de uva (NORA et al., 2019) e ZEA em solução modelo (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018).

4 CONCLUSÃO

O mix enzimático, composto pela PO e pela amano lipase A, foi eficiente na degradação simultânea de OTA e ZEA em mosto e cerveja. No mosto a 30 °C, a adição de 0,90 U mL⁻¹ de PO e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A a 30 °C propiciou a degradação de OTA e ZEA de 86,3 e 29,4%, respectivamente. Na cerveja, a ação do mix com 1,20 U mL⁻¹ de PO e 0,60 U mL⁻¹ de amano lipase A, a 25 °C, resultou na degradação de OTA e ZEA em 96,9 e 23,0%, respectivamente. Em suma, foi proposto a utilização de um método biológico promissor para o controle de OTA e ZEA na indústria cervejeira. Este estudo colabora para a redução dos impactos que estes contaminantes ocasionam na produção de alimentos seguros e contribui com a economia, por evitar o descarte de insumos e produtos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBIYI, J. A.; KAYITESI, E.; ADEBO, O. A.; CHANGWA, R.; NJOBEH, P. B. Food fermentation and mycotoxin detoxification: An African perspective. **Food Control**, v. 106, p. 106731, 2019.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 166**. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412>. Acesso em: 16 de janeiro de 2020.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. In: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.

ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 459–464, 2005.

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.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 321–325, 2011.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 309–313, 2000.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. **EFSA Journal**, v. 14, n. 4, p. 1–46, 2016.

EISENTHAL, R.; PETERSON, M. E.; DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 289–292, 2006.

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.

GARCIA, S. DE O.; SIBAJA, K. V. M.; NOGUEIRA, W. V.; FELTRIN, A. C. P.; PINHEIRO, D. F. A.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039, 2020.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

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.

GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 8, p. 1998–2008, 2017.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 921–924, 2008.

GOMES, A. R.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Enzyme Assays. In: Encyclopedia of Analytical Science. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 271–278.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. In: **Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality.** Woodhead Publishing, 2015. p. 11-55

HARRISON, M. A.; ALBANESE, J. B. Beer/Brewing. In: Reference Module in Life Sciences. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 467–477.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France, 1993: [s.n.]. v. 56

IBÁÑEZ-VEA, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 35–42, 2012.

KARLOVSKY, P.; SUMAN, M.; BERTHILLER, F.; DE MEESTER, J.; EISENBRAND, G.; PERRIN, I.; OSWALD, I. P.; SPEIJERS, G.; CHIODINI, A.; RECKER, T.; DUSSORT, P. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin Research**, v. 32, n. 4, p. 179–205, 2016. KŁOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D.; GRAJEWSKI, J.; BŁAJET-KOSICKA, A. The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3147–3152, 2010.

KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 1-18.

LAITILA, A. Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. In: **Brewing microbiology**. Woodhead Publishing, 2015. p. 107-139.

LEE, D.; KOH, Y.; KIM, K.; KIM, B.; CHOI, H.; KIM, D.; SUHARTONO, M. T.; PYUN, Y. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 393-400, 1999.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 305–351.

LI, X.; PENG, X.; WANG, Q.; ZUO, H.; MENG, X.; LIU, B. Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 78, p. 48-56, 2017.

LIU, S. Enzymes. In: Bioprocess Engineering. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 229–290.

LOI, M.; FANELLI, F.; LIUZZI, V. C.; LOGRIECO, A. F.; MULÈ, G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. **Toxins**, v. 9, n. 4, 2017.

MAKUN, H. A.; DUTTON, M. F.; NJOBEH, P. B.; MWANZA, M.; KABIRU, A. Y. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. **Mycotoxin research**, v. 27, n. 2, p. 97-104, 2011.

NKWE, D. O.; TAYLOR, J. E.; SIAME, B. A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B l and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 177-186, 2005.

NORA, N. S.; FELTRIN, A. C. P.; SIBAJA, K. V. M.; FURLONG, E. B.; GARDA-BUFFON, J. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1075–1082, 2019.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33–60, 2005. ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 1, p. 55–61, 2002.

PAHL, R.; MEYER, B.; BIURRUN, R. Wort and Wort Quality Parameters. In: **Brewing** Materials and Processes. Academic Press, 2016. p. 113-121.

PARKER, D. K. Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. In: Alcoholic beverages. Woodhead Publishing, 2012. p. 133-158.

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.

SIBAJA, K. V. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; FELTRIN, A. C. P.; DIAZ REMEDI, R.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of chratoxin A. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 11, p. 5736–5739, 2000.

STATISTA. **Global beer production 1998-2018**. Disponível em: https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/. Acesso em: 10 de jan. 2020.

STROKA, J.; GONÇALVES, C. Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 401–419.

TANG, H.; PENG, X.; LI, X.; MENG, X.; LIU, B. Biodegradation of mycotoxin patulin in apple juice by calcium carbonate immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 88, p. 69-74, 2018.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, n. 1–2, p. 321–326, 2000.

WESTERMANN, D. H.; HUIGE, N. J. Beer Brewing. In: Microbial Technology. Academic Press, 1979. p. 1-37

WUNDERLICH, S.; BACK, W. Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria. In: **Beer in health and disease prevention**. Academic Press, 2009. p. 3-16.

XIAO, Y.; LIU, B.; WANG, Z.; HAN, C.; MENG, X.; ZHANG, F. Effective degradation of the mycotoxin patulin in pear juice by porcine pancreatic lipase. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110769, 2019.

YU, Y.; WU, H.; TANG, Y.; QIU, L. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 121–126, 2012.

ARTIGO 4. CARACTERIZAÇÃO DE MOSTO E CERVEJA APÓS BIODEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A E ZEARALENONA POR AÇÃO DE MIX ENZIMÁTICO

170

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização, físico-química e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H), de mosto e cerveja após ação de mix enzimático para degradação simultânea de ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA). O mix enzimático foi composto por peroxidase (PO) e amano lipase A. As condições reacionais para degradação de OTA e ZEA no mosto foram de 30 °C com adição de 0,90 e 0,45 U mL⁻¹ de PO e amano lipase A. Para a degradação na cerveja as condições reacionais foram de 25 °C e adição de 1,20 e 0,60 U mL⁻¹ de POD e amano lipase A na cerveja. No mosto e na cerveja foi realizado o acréscimo de 26 mM de peróxido de hidrogênio antes dos ensaios de degradação das micotoxinas. A incubação foi realizada sob sob agitação orbital a 150 rpm por 22 h. No mosto, OTA e ZEA foram degradadas em 86,3 e 29,4%, respectivamente. Na cerveja, 96,9% de OTA e 23,0% de ZEA foram degradadas após ação do mix enzimático. A caracterização físicoquímica demonstrou que a ação das enzimas afetou parâmetros, como cor, pH, amargor e turbidez das amostras e, a caracterização por espectrometria de RMN ¹H possibilitou verificar modificações nos sinais característicos de álcoois, ácidos orgânicos, açúcares e compostos aromáticos. Além disso, foi demonstrado a eficiência da ação enzimática na degradação de micotoxinas, podendo ser uma alternativa ao processo cervejeiro para o controle destes contaminantes.

Palavras-chave: Micotoxina. Método biológico. Peroxidase. Amano lipase A. RMN ¹H. Caracterização físico-química.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é amplamente consumida e apreciada. Em 2018, sua produção global foi estimada em aproximadamente 1,94 bilhões de hectolitros (STATISTA, 2020). A Lei de Pureza Alemã, oriunda da Baviera, descreve que a cerveja é uma bebida alcoólica fermentada obtida de cereais maltados, água, lúpulo e fermento (NARZISS, 1984). Para a obtenção da cerveja, são efetuadas várias operações durante o processo cervejeiro, como maltagem, moagem do malte, mosturação, filtração do mosto, fervura, tratamento do mosto, fermentação, maturação, clarificação, estabilização e envase (HARRISON; ALBANESE, 2017; WUNDERLICH; BACK, 2009). Na fabricação da bebida os principais cereais empregados são cevada, arroz, trigo, milho, aveia e sorgo (PARKER, 2012). Cerca de 450 constituintes compõem a cerveja, dentre eles macromoléculas, como proteínas, ácido nucleicos, polissacarídeos e lipídeos (STEINER; BECKER; GASTL, 2010). Além disso, esta bebida é considerada fonte de aminoácidos, peptídeos, vitaminas B e compostos fenólicos derivados do lúpulo e do malte e, portanto, podem oferecer benefícios à saúde humana (KONDO, 2004).

No entanto, nesta bebida é reportado a ocorrência de micotoxinas, como a ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) (ARAGUÁS; GONZÁLEZ-PEÑAS; LÓPEZ DE CERAIN, 2005; BAUER et al., 2016; NKWE; TAYLOR; SIAME, 2005; ODHAV; NAICKER, 2002; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 2000), resultantes do emprego de insumos contaminados na fabricação da cerveja (BĚLÁKOVÁ et al., 2011; GHALI et al., 2008; IBÁÑEZ-VEA et al., 2012; LAITILA, 2015; MAKUN et al., 2011). As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos quando estes são submetidos a condições favoráveis a produção e/ou estresse (BENNETT; KLICH, 2003). A significativa ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações apresenta riscos à saúde humana e animal que variam de simples reações alérgicas até a morte (HAQUE et al., 2020).

A OTA é descrita como uma substância nefrotóxica e imunotóxica (GAN et al., 2017), teratogênica (MAYURA et al., 1984), mencionada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – IARC como uma substância possivelmente carcinogênica (IARC, 1993). A ZEA é reconhecida por ser um desregulador endócrino (EFSA, 2016), porém as evidências científicas são insuficientes para sua classificação como um agente carcinógeno (IARC, 1993). Os efeitos tóxicos que estas substâncias acarretam à saúde humana estimulam estudos de métodos físicos, químicos e biológicos que visam a mitigação de micotoxinas em alimentos (MAGAN; OLSEN, 2004).

O emprego de enzimas como método biológico para reduzir os níveis de micotoxinas em alimentos e/ou rações é considerado vantajoso e promissor (KARLOVSKY et al., 2016). As enzimas destacam-se frente a outros métodos de mitigação de micotoxinas por serem específicas, ambientalmente seguras e sustentáveis e por causarem alterações leves na qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (LOI et al., 2017; MANUBOLU et al., 2018). Adicionalmente, a utilização da enzima peroxidase comercial (PO), pertencente a classe das enzimas oxidorredutases (LOPES; PINTO; SILVA, 2014), é descrita por degradar OTA e ZEA em cerveja e solução modelo (GARCIA et al., 2020). A amano lipase A faz parte da família de enzimas hidrolíticas (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004) e foi eficiente na degradação de OTA em solução modelo (STANDER et al., 2000).

As características inerentes a composição da cerveja são importantes, pois fornecem informações sobre a natureza e histórico da amostra e apresentam implicações significativas para o controle de qualidade apropriado da bebida (GIL; RODRIGUES, 2009). Além disso, esta matriz é uma mistura complexa dependente de muitos fatores, como as matérias-primas empregadas e o processamento cervejeiro (HARRISON; ALBANESE, 2017). Neste contexto, a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica não destrutiva, rápida, simples e capaz de detectar seletivamente um grande número de compostos simultaneamente e mesmo que em baixas concentrações, e até em matrizes complexas, como leite e produtos lácteos (BELLOQUE; RAMOS, 1999; SCANO et al., 2019), carne (LAURENT; BONNY; RENOU, 2000), frutas e vegetais (HILLS; CLARK, 2003), cereais e farinhas (KALETUNC; BRESLAUER, 2003; SANGPRING et al., 2017), óleos (HIDALGO; ZAMORA, 2003), mel (OHMENHAEUSER et al., 2013), especiarias (SCOGNAMIGLIO et al., 2015) e cerveja (JEONG; CHO; KIM, 2017).

Portanto, a elevada produção e consumo de cerveja somado a frequente ocorrência de OTA e ZEA e aos problemas que estas substâncias ocasionam à saúde dos consumidores, bem como os avanços dos métodos biológicos para degradação das mesmas, incentivam estudos voltados a caracterização do mosto cervejeiro por diferentes técnicas como RMN, principalmente pela ausência de pesquisas com este foco na literatura. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização, físico-química e por espectrometria por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), de mosto e cerveja antes e após ação de mix enzimático, composto por PO e amano lipase A, para degradação simultânea de OTA e ZEA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRA, PADRÕES DE MICOTOXINAS E ENZIMAS

O mosto base para a produção de cerveja tipo *American Pale Ale* foi fornecido por uma microcervejaria situada em Rio Grande, RS – Brasil, resultante da mosturação de 88 kg de malte *Pilsen*, 2 kg de malte *Carared*, 90 kg de malte de *Munique* tipo II e 750 L de água potável. A cerveja tipo Pilsen (latas de 473 mL) foi adquirida em um estabelecimento comercial na cidade de Rio Grande, RS – Brasil, sendo estas do mesmo fabricante e lote. Os padrões das micotoxinas OTA e ZEA, com pureza de \geq 99,0%, a PO comercial - padrão enzimático de PO tipo VI obtida de raiz-forte (*Armoracia rusticana*) liofilizada com concentração de 250 a 330 U mg⁻¹ e a enzima amano lipase A obtida *Aspergillus niger* em concentrações acima de 120.000 U g⁻¹ foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, EUA).

2.2 PREPARO DE AMOSTRA

As amostras foram desgaseificadas em banho ultrassônico de 25 kHz durante 60 min, conforme Garcia et al. (2020). O mosto foi filtrado em filtro de papel de 40 μ m. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em frascos âmbar de 1 L e mantidas congeladas até a utilização.

2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE MICOTOXINAS E ENZIMAS

As soluções estoque de OTA (100 μ g mL⁻¹) e ZEA (500 μ g mL⁻¹) foram preparadas em benzeno:ácido acético (99:1, v v⁻¹) e benzeno:acetonitrila (98:2, v v⁻¹), respectivamente, e posteriormente congelados. As soluções de trabalho resultaram das diluições de soluções estoque até a concentração utilizadas para os ensaios de degradação. A confirmação da concentração da solução de trabalho de OTA e ZEA foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis. O comprimento de onda de absorção máxima para OTA e ZEA foi de 333 e 317 nm, e a absortividade molar foi de 5550 e 6060 L cm⁻¹ mol⁻¹ em benzeno:ácido acético (99:1, v v⁻¹) e benzeno, respectivamente (AOAC, 2000).

As soluções trabalho de PO e lipase foram preparadas a partir da diluição dos padrões em água ultrapurificada, de acordo com as especificações do fabricante. A medida da atividade enzimática da PO foi determinada de acordo com Garcia et al. (2020) utilizando tampão fosfato (100 mM pH 6,0), água, peróxido de hidrogênio - H₂O₂ (26 mM), guaiacol (9 mM) e extrato enzimático, incubação a 30 °C durante 15 min. A atividade enzimática foi

verificada em espectrofotômetro a 470 nm através da oxidação do substrato guaiacol à tetraguaiacol. Uma unidade de atividade da peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μ mol de guaiacol a tetraguaiacol (26.600 L mol⁻¹ cm⁻¹) em 1 min.

A atividade da lipase foi verificada sob condições descritas por Lee et al. (1999). O substrato p-nitrofenilbutirato (p-NPB) foi diluído em acetonitrila a uma concentração de 10 mM. Posteriormente, o substrato p-NPB (10 mM) foi diluído em etanol absoluto e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 nas proporções de volumes de 1:4:95, respectivamente. A incubação foi realizada com 0,3 mL da solução enzimática e 0,9 mL de substrato p-NPB a 60 °C por 15 min. O produto da hidrólise do substrato em p-nitrofenol (p-NP) foi medido em um espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade da lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-NP em 1 min.

2.4 DETERMINAÇÃO DE OTA E ZEA

A determinação de OTA e ZEA das amostras de mosto e cerveja foram realizadas de acordo com Garcia et al. (2020), empregando a técnica de extração partição líquido-líquido com clorofórmio. Primeiramente, a amostra de 1 mL (mosto ou cerveja) foi acidificada com ácido acético até atingir pH 2, depois foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio e agitados em vórtex por 30 s e em banho ultrassônico de 25 kHz por 3 min. A fase orgânica foi coletada e o procedimento foi repetido três vezes. O volume final obtido durante a extração foi evaporado em banho de areia a 60 °C. A determinação das micotoxinas OTA e ZEA foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de fluorescência, e prévia ressuspensão e homogeneização das amostras em fase móvel. Para a análise foi utilizada uma coluna Supleco® - Kromasil C18 (5 μ m e 150 mm x 4,6 mm) mantida a temperatura de 25 °C, detecção nos comprimentos de onda de 333 nm para excitação e 460 nm para emissão, fase móvel composta por acetonitrila:água acidificada 1% com ácido acético (60:40, v v⁻¹) e vazão 0,8 mL min⁻¹ em eluição isocrática totalizando 7 min de corrida cromatográfica.

2.5 DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA EM MOSTO E CERVEJA PELA AÇÃO DO MIX ENZIMÁTICO DE PO E AMANO LIPASE A

A degradação de OTA e ZEA nas amostras foi realizada em reatores tipo Erlenmeyer com volume de 250 mL. Os reatores foram previamente contaminados com OTA (10 ng mL⁻¹) e ZEA (1 μg mL⁻¹) e o solvente da solução padrão foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e adicionado de 200 mL das amostras (mosto ou cerveja). Posteriormente, foi realizada homogeneização banho ultrassônico por 3 min, respectivamente. Nos reatores, constituídos por mosto foram adicionados H₂O₂ (26 mM), PO (0,90 U mL⁻¹) e amano lipase A (0,45 U mL⁻¹), e nos reatores de cerveja foram realizadas o acréscimo de H₂O₂ (26 mM), PO (1,20 U mL⁻¹) e amano lipase A (0,60 U mL⁻¹). Os reatores de mosto e cerveja foram mantidos em agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 30 e 25 ± 1 °C, respectivamente. As amostras foram extraídas e quantificadas para a avaliação do percentual de degradação (%) de OTA e ZEA, sendo este determinado pela diferença da concentração inicial e final das micotoxinas.

A confiabilidade dos resultados foi verificada de acordo com as diretrizes descritas como aceitáveis pela Comissão Europeia (2006) e Sante/Eu (2017). As curvas analíticas apresentaram faixa de concentração das micotoxinas e linearidade (0,4 a 30,0 ng mL⁻¹ de OTA e 0,02 a 2,00 μg mL⁻¹ de ZEA) e limites de detecção e quantificação foram de 0,25 e 0,40 ng mL⁻¹ para OTA e 0,01 e 0,02 μg mL⁻¹ de ZEA, respectivamente. Os coeficientes de correlação e determinação foram superiores a 0,99 e as médias dos níveis de recuperação, em três níveis de fortificação de OTA e ZEA, em mosto foram 92 e 99% e em cerveja foram 101 e 86%, respectivamente, com coeficiente de variação inferior ou igual a 7%. Os ensaios foram denominados como cerveja controle sem adição de micotoxina e mix enzimático (C), cerveja contaminada com OTA e ZEA (CM), cerveja contaminada com OTA e ZEA e tratada com mix enzimático (MME).

2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química das amostras de mosto (cor - método nº 8.5, pH - método nº 8.17, amargor - método nº 8.8, densidade específica - método nº 8.2.1, extrato do mosto - método nº 8.3 e açúcar total – método 8.14) e de cerveja (cor - método nº 9.6, pH - método nº 9.35, amargor - método nº 9.8, densidade específica - método nº 9.43, grau alcoólico – método nº 9.2.3, açúcar total – método 9.26, extrato real, extrato aparente e extrato original - método nº 9.4) foi realizada conforme os métodos propostos pela *European Brewery Convention* (EBC, 2007). A turbidez foi determinada em turbidímetro digital portátil (modelo 2100-P, Hach) de acordo com o método nº 970.14 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000).

Para a análise espectrométrica, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 s e em banho ultrassônico de 25 kHz por 3 min. Posteriormente, 100 μ L de dióxido de deutério (D₂O) foram adicionados a 500 μ L de amostra (mosto ou cerveja) em tubos de RMN. Os espectros do núcleo de ¹H em 400,13 MHz a 26 °C foram registrados em espectrômetro Bruker Avance III HD Ascend 400, operando a 9,4 T com sonda BBI de detecção inversa. A supressão de H₂O foi realizada em 4,77 ppm, janela espetral de 20 ppm, correção da linha de base de 0,3 Hz, resolução digital de 65536, 16 varreduras e tempo de aquisição de 4,09 s. O processamento dos dados foi realizado no software Topspin 3.6.2 Bruker. O trimetilsililpropionato de sódio (TMSP) foi utilizado como padrão interno para referência do 0 ppm.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) foram exportados e organizados em 3 matrizes, separadas pelas regiões: de 0-3 ppm (9520 x 18), 3-6 ppm (9100 x 18) e 6-10 ppm (13090 x 18). As linhas correspondem aos deslocamentos químicos em RMN ¹H, e as colunas, às amostras. Os sinais para o etanol (1,21-1,13 e 3,69 - 3,60 ppm) e água residual (4,74 - 4,86 ppm) foram retirados, conforme Almeida et al (2006).

2.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados da caracterização físico-química foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a nível de significância de 5% no programa Statistica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e comparados ao controle (com micotoxinas e sem adição do mix enzimático).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada utilizando o software MetaboAnalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca – McGillUniversity) e aplicados ao conjunto de dados relativos as 3 regiões dos espectros de RMN ¹H. A normalização dos dados foi realizada em relação a uma amostra de referência. A separação das amostras em grupos foi realizada por meio dos scores obtidos do PC1 e PC2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 3.1 DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE OTA E ZEA
Ao final de 22 h de atividade do mix enzimático foram observadas as degradações de 86,3 e 29,4% de OTA e ZEA em mosto, com desvio padrão de 3,6 e 1,4, respectivamente. Na cerveja, 96,9% de OTA e 23,0% de ZEA, com desvio padrão de 1,9 e 1,2, respectivamente, foram degradadas após a ação das enzimas. Por meio destes resultados, foi proposto um método eficiente de biodegradação de OTA e ZEA para a indústria cervejeira. Até o momento, não há nenhum estudo na literatura consultada que descreva a ação de mix enzimático composto por PO comercial e amano lipase A para degradação simultânea de OTA e ZEA em mosto e cerveja. Também não há estudo prévio que descreva a ação da amano lipase A na degradação de ZEA. No entanto, a PO de diferentes fontes demonstrou bons resultados na degradação de diferentes micotoxinas, como aflatoxinas (AFLA) (DAS; MISHRA, 2000; SIBAJA et al., 2019; TRIPATHI; MISHRA, 2011), OTA (NORA et al., 2019), deoxinivalenol (FELTRIN et al., 2017; GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011; GAUTÉRIO et al., 2017) e ZEA (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018).

Na literatura, somente dois estudos relatam a degradação de micotoxinas por PO em cerveja. Sibaja e colaboradores (2019) demonstraram que a PO (0,015 U mL⁻¹) reduziu a concentração da micotoxina AFLA B1 em 97 e 24%, em leite e cerveja, respectivamente. Além disso, é reportado por Garcia e colaboradores (2020) que a PO comercial (0,6 U mL⁻¹) é capaz de degradar simultaneamente OTA e ZEA em solução modelo e cerveja após incubação a 30 °C por 6 h. Os percentuais de degradação de OTA e ZEA em solução modelo foram de 64,9 e 27%, respectivamente. Na cerveja, somente 4,8% de OTA e 10,9% de ZEA foram degradados, menores índices observados na cerveja foram justificados pelos autores devido à complexidade da matriz quando comparado a solução modelo.

Adicionalmente, a lipase foi relatada por apresentar potencial na degradação de OTA e patulina (PAT). Stander et al. (2000) avaliaram a degradação de OTA pela ação de 23 enzimas hidrolíticas em solução tamponante com pH 7,5, e verificaram que a amano lipase A degradou até 90% de OTA em ocratoxina α (OT α), produto de detoxificação dessa micotoxina. Na degradação de PAT, a lipase obtida de diferentes fontes foi eficaz na degradação de desta micotoxinas em 93% em suco de pera (XIAO et al., 2019), 70% em suco de maçã (TANG et al., 2018) e 98% em solução aquosa (LI et al., 2017).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO E CERVEJA APÓS A DEGRADAÇÃO

Na Tabela 1 são demonstrados os resultados da caracterização físico-química das amostras (mosto e cerveja), observados após a degradação simultânea de OTA e ZEA. Esta caracterização foi realizada com a finalidade de avaliar as possíveis alterações que as enzimas poderiam acarretar às amostras. No mosto, com exceção da densidade e amargor, os parâmetros analisados foram influenciados significativamente pela ação das enzimas, e para cerveja somente o teor alcoólico não foi alterado. Além disso, os demais parâmetros como extrato de mosto, densidade da cerveja, extrato real, extrato aparente, extrato original e açúcar foram estatisticamente diferentes ao controle, o que pode ser decorrente da interferência das enzimas e/ou proteínas presentes no mix adicionado.

A cor e a turbidez em ambas amostras (mosto ou cerveja) tratadas com o mix enzimático foram os parâmetros mais afetados quando comparados ao controle. O efeito observado relacionado a alteração da cor pode ser resultante da ação da PO. A PO é uma enzima oxidativa, altamente reativa, termotolerante e reconhecida por ocasionar o escurecimento enzimático (JIANG et al., 2016; LI; WANG; LIU, 2017). Outra característica a ser observada é que a cerveja é uma mistura complexa, onde interações entre polifenóis e proteínas, por exemplo, pode resultar na precipitação destes compostos e, consequentemente, aumento da turbidez (STEINER; BECKER; GASTL, 2010). A cor e turbidez são importantes atributos sensoriais e que poderiam ser melhoradas no produto final, nesta situação, através das etapas de filtração e/ou clarificação atualmente empregadas durante o processamento cervejeiro.

O amargor no mosto não foi influenciado pela ação do mix enzimático, porém na cerveja foi observado uma diminuição de 18,3% deste parâmetro quando comparado ao controle. O amargor da cerveja é um atributo de sabor que os consumidores esperam e desfrutam em grau variável durante o consumo (HOUGH et al., 1982). A baixa influência do mix no mosto e/ou cerveja ocasionada no amargor torna seu emprego favorável visando a degradação de OTA e ZEA.

Após a ação do mix enzimático, o pH do mosto foi reduzido em 5,7% e na cerveja houve o aumento de 18,1 %, quando comparados ao controle. Adicionalmente, as alterações observadas no pH podem ser resultantes das reações de ionização dos aminoácidos das proteínas que compõem o mix enzimático. Segundo Kaneda, Takasiiio e Tamaki (1997) o pH no processo cervejeiro apresenta influência acentuada referentes ao desenvolvimento microbiano e turbidez, pois em baixos níveis este inibe o crescimento dos microrganismos, porém aumenta a turbidez.

Amostra	Indicadores	Controle	Tratamento
			enzimático***
Mosto	Cor (EBC)	$13,59^{b} \pm 0,07$	$36,31^{a} \pm 0,27$
	рН	$5,12^{\rm a} \pm 0,05$	$4,83^{b} \pm 0,03$
	Amargor (IBU)	$8,\!44^{\rm a}\pm0,\!06$	$8,59^{a}\pm0,20$
	Densidade específica (g cm ³)	$1,0565^{\mathrm{a}} \pm 0,0007$	$1,\!0535^{\rm a}\pm0,\!0026$
	Extrato do mosto (°P)	$13{,}8^{\mathrm{a}}\pm0{,}04$	$13,\!1^b\pm0,\!12$
	Açúcar total (mg mL ⁻¹)	126,7 ^a ± 2,27	$116,8^{b}\pm 3,29$
	Turbidez (NTU)	$49,21^{b}\pm 0,80$	$897,01^{a} \pm 1,50$
Cerveja	Cor (EBC)	$5,10^{b} \pm 0,09$	$40,53^{a}\pm0,50$
	рН	$4{,}25^{\text{b}}\pm0{,}04$	$5,02^{a} \pm 0,01$
	Amargor (IBU)	$13,81^{a} \pm 0,17$	$11,\!28^{b}\pm0,\!14$
	Densidade específica (g cm ³)	$1,0075^{b} \pm 0,0001$	$1,0139^{a} \pm 0,0019$
	Teor alcoólico (% v v ⁻¹)	5,01 ^a ± 0,02	$5,04^{a} \pm 0,02$
	Extrato real (°P)	$4,06^{b}\pm 0,05$	$5,82^{a} \pm 0,30$
	Extrato aparente (°P)	$1,95^{b}\pm 0,00$	$3,55^{a} \pm 0,00$
	Extrato original (°P)	$13,68^{b} \pm 0,21$	$15,40^{a}\pm0,31$
	Açúcar total (mg mL ⁻¹)	$1,2^{b}\pm 1,61$	$7,4^{a}\pm 1,08$
	Turbidez (NTU)	$8,76^{b}\pm 0,80$	564,32 ^a ± 3,69

Tabela 1– Caracterização físico-química do mosto* e cerveja** após degradação de ocratoxina A e zearalenona pela ação de mix enzimático.

°P – graus Plato; EBC – unidade da European Brewery Convention; IBU- unidade Internacional de Amargor; NTU - unidade nefelométrica de turbidez. Controle – amostra com micotoxinas e sem adição do mix enzimático.
*Mosto - adição de 0,9 U mL⁻¹ de PO e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 30 ± 1 °C. **Cerveja - adição de 1,2 U mL⁻¹ de PO e 0,6 U mL⁻¹ de amano lipase A e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 25 ± 1 °C. **Resultados expressos como média ± desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa estatisticamente (p > 0,05).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA E MOSTO ATRAVÉS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As três principais regiões para análise de cervejas por meio da técnica de espectrometria de RMN ^{1H}, conforme descrito por Almeida e colaboradores (2006), Jeong; Cho e Kim, (2017) e Rodrigues et al e colaboradores (2010), são: de 0 a 3 ppm, 3 a 6 ppm e 6 a 10 ppm, relativos aos compostos alifáticos, a açúcares e compostos aromáticos, respectivamente. Para a análise multivariada das amostras de cerveja e mosto, foi utilizada a técnica de PCA separadamente para cada região do espectro de RMN ¹H, de modo a observar os efeitos dos

tratamentos sobre os compostos alifáticos (região de 0 a 3 ppm), açúcares (região de 3 a 6 ppm) e compostos aromáticos (região de 6 a 10 ppm). Os gráficos de escores são apresentados na Figura 1.

Para as três regiões do espectro (Figuras 1 a, 1 b e 1 c), os agrupamentos correspondentes as amostras de cerveja localizam-se na região negativa da Principal Componente 1 (PC1), enquanto aqueles correspondentes ao mosto foram agrupados na região positiva dos gráficos de escore. A principal diferença observada foi a separação das amostras de mosto (M, MM e MME) e cerveja (C, CM e CME) resultante composição das amostras. Na região característica dos sinais dos compostos alifáticos, o PC1, explicou 96,5% da variância total (Figura 1 a) e a região dos açúcares (Figura 1 b) e dos compostos aromáticos (Figura 1 c) foi explicada em 50,9 e 86,4%, respectivamente. Na Tabela 1 é possível observar alguns indicadores que diferenciam a composição do mosto e da cerveja e corroboram com a análise de PCA.

Figura 1- Análise de Componentes Principais das amostras de cerveja e mosto dos espectros de RMN ¹H nas regiões de 0 a 3 ppm (a), de 3 a 6 ppm (b) e de 6 a 10 ppm (c).



Legenda: CM - cerveja contaminada com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 μg mL⁻¹); CME - cerveja contaminada com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 μg mL⁻¹) e tratada com mix enzimático (1,2 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,6 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 25 ± 1 °C; C – cerveja controle (sem adição de micotoxinas e enzimas); MM - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 μg mL⁻¹); MME - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e tratadas com mix enzimático (0,9 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 30 ± 1 °C; M – mosto controle (sem adição de micotoxinas e enzimas)



(c)

Legenda: CM - cerveja contaminada com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹); CME - cerveja contaminada com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹) e tratada com mix enzimático (1,2 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,6 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 25 ± 1 °C; C – cerveja controle (sem adição de micotoxinas e enzimas); MM - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹); MME - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e tratadas com mix enzimático (0,9 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 25 ± 1 °C; C – cerveja controle (sem adição de micotoxinas e enzimas); MM - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹); MME - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e tratadas com mix enzimático (0,9 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 30 ± 1 °C; M – mosto controle (sem adição de micotoxinas e enzimas).

Na região entre 0 e 3 ppm, correspondente a Figura 1 (a), a análise de componentes principais foi capaz de explicar 96,5% da variância entre as amostras verificadas no PC1. No PC2 (1,7%), há a separação do grupamento das amostras de C na região negativa, enquanto CM e CME encontram-se na região positiva. Deste modo, considerando esta região do espectro, os tratamentos empregados à cerveja ocasionaram a formação de agrupamentos distintos no PC2, enquanto as amostras de mosto formaram um único agrupamento tanto no PC1 quanto no PC2. A diferenciação entre mosto e cerveja não ocorreu em decorrência do tratamento enzimático ou contaminação das amostras por OTA e ZEA.

Para a região entre 3 e 6 ppm do espectro, demonstrado na Figura 1 (b), observa-se a separação das amostras CME e MME na região positiva do PC2, que explica 36,8% da variância entre as amostras. A contaminação das amostras com micotoxinas não produziu diferenças em relação aos C e M, pois é possível observar que C e CM formaram um agrupamento, do mesmo modo que o M e MM, ambos na região negativa do PC2.

A região entre 6 e 10 ppm, conforme observado na Figura 1 (c), no PC2 (8,7%) também é possível observar a separação do MME na região positiva, enquanto MM e M encontram-se na região negativa, do mesmo modo que observado anteriormente para a análise da região entre 3 e 6 ppm. O grupamento formado pela amostra de CME está localizado sobre a origem do eixo que separa as regiões positiva e negativa do PC2, próximo ao grupamento formado por CM e C, que está na região negativa. Portanto, foi possível observar que as amostras tratadas com mix enzimático (MME e CME) possuem características comuns e que ocasionaram a diferenciação das demais amostras nesta região do espectro de RMN ¹H.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentados os espectros de RMN ¹H das amostras de cerveja comercial tipo Pilsen (C, CM e CME) e das amostras mosto tipo American Pale Ale (M, MM e MME), respectivamente. Na literatura, as aplicações da espectrometria por RMN em amostras de cerveja envolvem basicamente: a tipificação (JEONG; CHO; KIM, 2017) e/ou diferenciação (DUARTE et al., 2004; KHATIB et al., 2006), a caracterização química (DUARTE et al., 2003, 2002; GIL et al., 2003; NORD; VAAG; DUUS, 2004; RODRIGUES et al., 2011, 2010), o controle de qualidade (LACHENMEIER et al., 2005) e o processamento cervejeiro (ALMEIDA et al., 2006).

Figura 2- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, 26 °C em água deuterada) das amostras de cervejas (CME, CM e C).



Legenda: CME - cerveja contaminada com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹) e tratada com mix enzimático (1,2 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,6 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 25 ± 1 °C; CM - cerveja contaminada com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹); C – cerveja controle (sem adição de micotoxinas e enzimas).



Figura 3 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, 26 °C em água deuterada) das amostras de mostos (MME, MM e M).

Legenda: MME - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹) e tratadas com mix enzimático (0,9 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,45 U mL⁻¹ de amano lipase A) e agitação orbital a 150 rpm durante 22 h a 30 ± 1 °C; MM - mosto contaminado com ocratoxina (10 ng mL⁻¹) e zearalenona (1 µg mL⁻¹); M – mosto controle (sem adição de micotoxinas e enzimas).

As amostras CME apresentaram as seguintes modificações: (I) a região dos alifáticos (0 a 3 ppm) apresentou maior intensidade de sinais, referentes aos álcoois e ácidos orgânicos; (II) a região de açúcares foram observadas modificações como a diminuição no sinal característico em 5,37 ppm (dextrina/maltose), aumento de sinais em 5,22 ppm, um dupleto em 4,62 e 4,64 ppm e também outros sinais de 3 a 4 ppm; (III) a região dos compostos aromáticos (6 a 10 ppm) demonstrou a redução de sinais indicando sobretudo a alteração no sinais característicos de compostos fenólicos e aminoácidos aromáticos. No mosto foi possível verificar que as amostras MME apresentaram diminuição de sinais na região correspondente aos sinais característicos de açúcares (3 a 6 ppm) e na região dos compostos aromáticos (6 a 10 ppm).

As alterações no aumento dos sinais correspondentes a álcoois e ácidos orgânicos e redução dos sinais dos compostos aromáticos (compostos fenólicos) das amostras de mosto e cerveja possivelmente são decorrentes da ação catalítica da PO. A PO é uma oxidoredutase capaz de catalisar reações de oxidação de uma ampla gama de substratos usando peróxido de hidrogênio como receptor (ZAKHAROVA; UPOROV; TISHKOV, 2011). Esta enzima é capaz de atuar sobre os grupamentos químicos: CH-CH, C=O, HC=CH, CH-NH-, NADH e NADPH (MEDINA et al., 2017), por este motivo foi empregada na degradação de contaminantes fenólicos (DEVAIAH; SHETTY, 2009) e micotoxinas (DAS; MISHRA, 2000; FELTRIN et al., 2017; GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018; NORA et al., 2019; SIBAJA et al., 2019; TRIPATHI; MISHRA, 2011), na desodorização de dejetos de suínos (YE; ZHU; LI, 2009), na descoloração de corantes (VUJČIĆ et al., 2015) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CHEN et al., 2014; LEE et al., 2015).

As modificações de sinais correspondente aos açúcares podem estar relacionados a ação da lipase concomitantemente a atuação da peroxidase. A lipase é uma hidrolase que atua em ligações éster carboxílico de triacilgliceróis e outros substratos, como ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos e aromáticos, tio ésteres e aminas (LOTTI; ALBERGHINA, 2007). De maneira geral, as enzimas hidrolíticas como a lipase realizam clivagem de ligações C-O, C-C, C-N e P-O (SHARMA; UPADHYAY, 2020) e C-S (BLANCO; BLANCO, 2017). Além disso, Fernandez-Mayoralas (1997) reportou que as reações enzimáticas que a lipase realiza incluem acilação e desacilação de monossacarídeos, dissacarídeos e glicosídeos. Também é relatado que a lipase possui capacidade de atuar na síntese sobre diferentes carboidratos, que se ligam a diversos aminoácidos, formando os amino ésteres (LOHITH; DIVAKAR, 2007; SOMASHEKAR; DIVAKAR, 2007).

Outra característica importante a ser ressaltada que pode ter ocasionado as alterações do sinais correspondentes a açúcares é que a PO é uma glicoproteína que contém 18% de carboidratos, sendo estes: a galactose, arabinose, xilose, fucose, manose, manosamina e galactosamina (KLAPPER; HACKETT, 1965; SIGMA-ALDRICH, 2019). Estudos empregando a análise de RMN demonstraram que os carboidratos que constituem a fração glicoproteica da peroxidase são detectados nas regiões de 3,2 a 5,2 ppm e também nas regiões entre 1,2 a 2,2 ppm (KUROSAKA et al., 1991; VEITCH; WILLIAMS, 1990). Também é possível descrever que os resultados observados pela espectrometria de RMN corroboram com os obtidos através da caracterização físico-química (Tabela 1). As amostras de mosto tratadas enzimaticamente apresentaram conteúdo de açúcar total estatisticamente menor do que as amostras controle (sem adição de mix enzimático) de mosto. Nas amostras de cerveja efeito contrário foi observado, pois após o tratamento enzimático houve o aumento significativo do conteúdo de açúcares totais quando comparado as amostras controle (sem adição do mix enzimático).

Os sinais característicos de OTA e ZEA nos espectros de RMN ¹H, descritos por Bittner, Cramer e Humpf (2013), Cordier et al. (1990), Dais et al. (2005) e Wang et al. (2019) não foram observados nas amostras de mosto e cerveja analisadas. A explicação para esse comportamento é devida as baixas concentrações de ZEA e OTA empregadas na fortificação das amostras (10 ng mL⁻¹ de OTA e 1 µg mL⁻¹ de ZEA) quando comparadas com as descritas por estes autores que variaram entre 1 e 15 mg mL⁻¹.

4 CONCLUSÃO

O mix enzimático composto por PO e amano lipase A, ocasionou a degradação de OTA e ZEA nas amostras de mosto e cerveja. As degradações de OTA e ZEA no mosto foram de 86,3 e 29,4%, respectivamente. Nas amostras de cerveja tratadas enzimaticamente foram atingidas degradações de 96,9% de OTA e 23,0% de ZEA. A caracterização físico-química do mosto e da cerveja demonstrou que a ação das enzimas acarretou alterações de parâmetros importantes, como pH, amargor, cor e turbidez das amostras, porém sugere-se que algumas etapas do processamento possam minimizar estes efeitos. Adicionalmente, a espectrometria de RMN ¹H permitiu determinar que a ação enzimática não é restrita somente aos substratos OTA e ZEA, pois foi observado alterações nos sinais característicos de álcoois, ácidos orgânicos, açúcares e compostos aromáticos. Em suma, mesmo havendo reações indesejadas catalisadas pelas enzimas foi proposto um método de degradação promissor para o controle de OTA e ZEA,

resultando na produção de uma bebida segura amplamente consumida e minimizando os problemas que estes contaminantes ocasionam a saúde humana e economia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, M. D.; MASSEY, I. J.; CHEN, T.; HECK, P. E. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. **Water Research**, v. 28, n. 9, p. 1879–1889, 1994.

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. 3, p. 700–706, 2006.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. In: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.

ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 459–464, 2005.

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.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKUL OVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 321–325, 2011.

BELLOQUE, J.; RAMOS, M. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 10, p. 313–320, 1999.

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

BITTNER, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U. Matrix binding of ochratoxin a during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12737–12743, 2013.

BLANCO, A.; BLANCO, G. Enzymes. In: **Medical Biochemistry.** [s.l.] Elsevier, 2017. p. 153–175.

CHEN, Z.; LI, H.; PENG, A.; GAO, Y. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase in water containing an organic cosolvent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 10696–10705, 2014.

CORDIER, C.; GRUSELLE, M.; JAOUEN, G.; HUGHES, D. W.; MCGLINCHEY, M. J. Structures of zearalenone and zearalanone in solution: A high-field NMR and molecular modelling study. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 835–845, 1990.

DAIS, P.; STEFANAKI, I.; FRAGAKI, G.; MIKROS, E. Conformational analysis of ochratoxin A by NMR spectroscopy and computational molecular modeling. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 35, p. 16926–16936, 2005.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 309–313, 2000.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 2–3, p. 119–126, 2009.

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. 17, p. 4847–4852, 2003.

DUARTE, I. F.; BARROS, A.; ALMEIDA, C.; SPRAUL, M.; GIL, A. M. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1031-1038, 2004.

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 of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 9, p. 2475–2481, 2002.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. **EFSA Journal**, v. 14, n. 4, p. 1–46, 2016.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analytica-EBC. In **European Brewery Convention.** (5 th Ed.), Analytica EBC, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12–34, 2006.

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.

FERNANDEZ-MAYORALAS, A. Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases. In: **Glycoscience Synthesis of Oligosaccharides and Glycoconjugates**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997. p. 1-20.

GAN, F.; ZHOU, Y.; HOU, L.; QIAN, G.; CHEN, X.; HUANG, K. Ochratoxin A induces nephrotoxicity and immunotoxicity through different MAPK signaling pathways in PK15 cells and porcine primary splenocytes. **Chemosphere**, v. 182, p. 630–637, 2017.

GARCIA, S. DE O.; SIBAJA, K. V. M.; NOGUEIRA, W. V.; FELTRIN, A. C. P.; PINHEIRO, D. F. A.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE FURLONG, E.; GARDA- BUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039, 2020.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

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.

GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 8, p. 1998–2008, 2017.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 921–924, 2008.

GIL, A. M.; RODRIGUES, J. Methods for the Characterization of Beer by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: Beer in Health and Disease Prevention. Academic Press, 2009. p. 935-942.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M.; SPRAUL, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 488, n. 1, p. 35–51, 2003.

HAQUE, M. A.; WANG, Y.; SHEN, Z.; LI, X.; SALEEMI, M. K.; HE, C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 104095, 2020.

HARRISON, M. A.; ALBANESE, J. B. Beer/Brewing. In: Reference Module in Life Sciences. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 467–477.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: Recent advances and future perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 12, p. 499–506, 2003.

HILLS, B. .; CLARK, C. Quality assessment of horticultural products by NMR. Annual Reports on NMR spectroscopy, v. 50, p. 76-121, 2003.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. Beer flavour and beer quality. In: **Malting and brewing science.** Springer, Boston, MA, 1982. p. 839-883.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France, 1993: [s.n.]. v. 56

IBÁÑEZ-VEA, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 35–42, 2012.

JEONG, J.-H.; CHO, S.-J.; KIM, Y. High-Resolution NMR Spectroscopy for the Classification of Beer. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 38, n. 4, p. 466–470, 2017.

JIANG, Y.; DUAN, X.; QU, H.; ZHENG, S. Browning: Enzymatic Browning. In: **Encyclopedia of Food and Health.** [s.l.] Elsevier, 2016. p. 508–514.

KALETUNC, Gonul; BRESLAUER, Kenneth J. (Ed.). Characterization of cereals and flours: properties, analysis and applications. CRC Press, 2003.

KARLOVSKY, P.; SUMAN, M.; BERTHILLER, F.; DE MEESTER, J.; EISENBRAND, G.; PERRIN, I.; OSWALD, I. P.; SPEIJERS, G.; CHIODINI, A.; RECKER, T.; DUSSORT, P. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin Research**, v. 32, n. 4, p. 179–205, 2016.

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. 2, p. 264–270, 2006.

KLAPPER, M. H.; HACKETT, D. P. Investigations on the multiple components of commercial horseradish peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation**, v. 96, n. 2, p. 272-282, 1965.

KONDO, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. **Biofactors**, v. 22, n. 1-4, p. 303-310, 2004.

KUROSAKA, A.; YANO, A.; ITOH, N.; KURODA, Y.; NAKAGAWA, T.; KAWASAKI, T. The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4168–4172, 1991.

LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; HUMPFER, E.; SCHÄFER, H.; KELLER, S.; MÖRTTER, M.; SPRAUL, M. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 2, p. 215–221, 2005.

LAITILA, A. Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. In: Brewing microbiology. Woodhead Publishing, 2015. p. 107-139.

LAURENT, W.; BONNY, J. M.; RENOU, J. P. Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. Food Chemistry, v. 69, n. 4, p. 419–426, 2000.

LEE, D.; KOH, Y.; KIM, K.; KIM, B.; CHOI, H.; KIM, D.; SUHARTONO, M. T.; PYUN, Y. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 393-400, 1999.

LEE, H.; YUN, S. Y.; JANG, S.; KIM, G.-H.; KIM, J.-J. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Creosote-Contaminated Soil by **Peniophora incarnata** KUC8836. **Bioremediation Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2015.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 305–351.

LI, X.; PENG, X.; WANG, Q.; ZUO, H.; MENG, X.; LIU, B. Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 78, p. 48-56, 2017.

LOHITH, K.; DIVAKAR, S. Candida rugosa lipase catalysed preparation of l-prolyl, l-phenylalanyl, l-tryptophanyl and l-histidyl esters of carbohydrates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 1, p. 28–43, 2007.

LOI, M.; FANELLI, F.; LIUZZI, V. C.; LOGRIECO, A. F.; MULÈ, G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. **Toxins**, v. 9, n. 4, 2017.

LOPES, G. R.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. **Rsc Advances**, v. 4, n. 70, p. 37244-37265, 2014.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: Industrial enzymes. Springer, Dordrecht, 2007. p. 263-281.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food : detection and control.** Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2004.

MAKUN, H. A.; DUTTON, M. F.; NJOBEH, P. B.; MWANZA, M.; KABIRU, A. Y. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. **Mycotoxin Research**, v. 27, n. 2, p. 97–104, 2011.

MANUBOLU, M.; GOODLA, L.; PATHAKOTI, K.; MALMLÖF, K. Enzymes as direct decontaminating agents—mycotoxins. In: **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Academic Press, 2018. p. 313-330.

MAYURA, K.; STEIN, A. F.; BERNDT, W. O.; PHILLIPS, T. D. Teratogenic effects of Ochratoxin A in rats with impaired renal function. **Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 277–285, 1984.

MEDINA, J. D. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; GUIMARÃES, L. R. C.; KARP, S. G.; SOCCOL, C. R. Peroxidases. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.** [s.l.] Elsevier, 2017. p. 217–232.

NARZISS, L. The German Beer Law. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 90, n. 6, p. 351–358, 1984.

NKWE, D. O.; TAYLOR, J. E.; SIAME, B. A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B_1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 177–186, 2005.

NORA, N. S.; FELTRIN, A. C. P.; SIBAJA, K. V. M.; FURLONG, E. B.; GARDA-BUFFON, J. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1075–1082, 2019.

NORD, L. I.; VAAG, P.; DUUS, J. Ø. Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by ¹ H NMR Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4790–4798, 2004.

ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Additives and Contaminants, v. 19, n. 1, p. 55–61, 2002.

OHMENHAEUSER, M.; MONAKHOVA, Y. B.; KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D. W. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. **ISRN Analytical Chemistry**, p. 1–9, 2013.

PARKER, D. K. Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. In: Alcoholic beverages. Woodhead Publishing, 2012. p. 133-158.

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. 2, p. 178–187, 2011.

RODRIGUES, J. E. A.; ERNY, G. L.; BARROS, A. S.; ESTEVES, V. I.; BRANDÃO, T.; FERREIRA, A. A.; CABRITA, E.; GIL, A. M. Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 166–175, 2010.

SANGPRING, Y.; FUKUOKA, M.; BAN, N.; OISHI, H.; SAKAI, N. Evaluation of relationship between state of wheat flour-water system and mechanical energy during mixing by color monitoring and low-field 1H NMR technique. **Journal of Food Engineering**, v. 211, p. 7–14, 2017.

SANTE/EC. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, v. 11813, p. 1–42, 2017.

SCANO, P.; CUSANO, E.; CABONI, P.; CONSONNI, R. NMR metabolite profiles of dairy: A review. **International Dairy Journal**, v. 90, p. 56–67, 2019.

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Chemical Composition and Seasonality of Aromatic Mediterranean Plant Species by NMR-Based Metabolomics. Journal of Analytical Methods in Chemistry, v. 2015, p. 1–9, 2015.

SHARMA, H.; UPADHYAY, S. K. Enzymes and their production strategies. In: **Biomass**, **Biofuels**, **Biochemicals**. Elsevier, 2020. p. 31-48.

SIBAJA, K. V. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; FELTRIN, A. C. P.; DIAZ REMEDI, R.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

SIGMA-ALDRICH. **Product information - Peroxidase from horseradish** (pp. 1–3). Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 10 de maio de 2020.

SOMASHEKAR, B. R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of l-alanyl esters of carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 299–309, 2007.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of Commercial Hydrolases for the Degradation of Ochratoxin A. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 11, p. 5736–5739, 2000.

STATISTA. **Global beer production 1998-2018.** Disponível em: https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/. Acesso em: 10 de jan. 2020.

STEINER, E.; BECKER, T.; GASTL, M. Turbidity and haze formation in beer—Insights and overview. Journal of the Institute of Brewing, v. 116, n. 4, p. 360–368, 2010.

TANG, H.; PENG, X.; LI, X.; MENG, X.; LIU, B. Biodegradation of mycotoxin patulin in apple juice by calcium carbonate immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 88, p. 69-74, 2018.

TRIPATHI, S.; MISHRA, H. N. Modeling and optimization of enzymatic degradation of aflatoxin B1 (AFB1) in red chili powder using response surface **methodology. Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 770–780, 2011.

ULSON DE SOUZA, S. M. A. G.; FORGIARINI, E.; ULSON DE SOUZA, A. A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 1073–1078, 2007.

VEITCH, N. C.; WILLIAMS, R. J. P. Two-dimensional ¹H-NMR studies of horseradish peroxidase C and its interaction with indole-3-propionic acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 189, n. 2, p. 351–362, 1990.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, n. 1–2, p. 321–326, 2000.

VUJČIĆ, Z.; JANOVIĆ, B.; LONČAR, N.; MARGETIĆ, A.; BOŽIĆ, N.; DOJNOV, B.; VUJČIĆ, M. Exploitation of neglected horseradish peroxidase izoenzymes for dye decolorization. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 97, p. 124–127, 2015.

WANG, G.; CHEN, W.; HU, J.; FAN, B.; SHI, J.; XU, J. Preparative isolation and purification of zearalenone from rice culture by combined use of macroporous resin column and high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1110–1111, p. 43–50, 2019.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria. In: **Beer in health and disease prevention**. Academic Press, 2009. p. 3-16.

XIAO, Y.; LIU, B.; WANG, Z.; HAN, C.; MENG, X.; ZHANG, F. Effective degradation of the mycotoxin patulin in pear juice by porcine pancreatic lipase. Food and Chemical Toxicology, v. 133, p. 110769, 2019.

YE, F. X.; ZHU, R. F.; LI, Y. Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 148–153, 2009.

ZAKHAROVA, G. S.; UPOROV, I. V; TISHKOV, V. I. Horseradish peroxidase: modulation of properties by chemical modification of protein and heme. **Biochemistry**, v. 76, n. 13, p. 1391-1401, 2011.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo demonstrou a aplicação de PO e amano lipase A para degradação simultânea de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja. Para tanto, um método analítico confiável para determinação de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja foi validado e os parâmetros empregados cumpriram os critérios analíticos preconizados por órgãos internacionais de validação.

A PO comercial (0,6 mL⁻¹), isoladamente, degradou simultaneamente OTA (27,0%) e ZEA (64,9%) em solução modelo após 6 h em condições ótimas de reação (25 mM de tampão fosfato, pH 7, incubação a 30 °C, adição de 26 mM de H₂O₂ e 1 mM de íon metálico K⁺). Os parâmetros cinéticos K_M e V_{máx} obtidos da degradação de OTA e ZEA por PO em solução modelo foram de 50 e 10.710 nM e 0,168 e 72 nM min⁻¹, respectivamente. Na cerveja, após adição de 26 mM de H₂O₂ e incubação a 30 °C por 6 h, a PO degradou simultaneamente OTA e ZEA em até 4,8 e 10,9%, respectivamente.

A ação da amano lipase A $(0,3 \text{ U mL}^{-1})$, isoladamente, após a otimização das condições de reação (tampão fosfato 50 mM, pH 7, incubação a 40 °C durante 22 h) possibilitou a degradação simultânea de 100% de OTA e 30,6% de ZEA em solução modelo. Os parâmetros cinéticos K_M e V_{máx} verificados após a ação da amano lipase A na degradação de OTA e ZEA foram de 0,03 e 3,14 μ M e 6,56x10⁻⁰⁵ e 19,57x10⁻⁰³ μ M min⁻¹, respectivamente. A amano lipase A degradou simultaneamente 89,5% de OTA e 6,5% de ZEA em cerveja, após incubação a 40 °C durante 22 h.

As condições reacionais (temperatura e atividade enzimática) obtidas da otimização para ação do mix enzimático (composto por PO e amano lipase A) no mosto foram de 30 °C e adição de 0,90 e 0,45 U mL⁻¹ de PO e amano lipase A e na cerveja foram de 25 °C e adição de 1,20 e 0,60 U mL⁻¹ de PO e amano lipase A, respectivamente, durante 22 h com 26 mM de H₂O₂. A ação do mix enzimático, em condições ótimas, degradou simultaneamente OTA e ZEA no mosto em 86,3 e 29,4%, respectivamente e, na cerveja foram atingidas degradações de 96,9% de OTA e 23,0% de ZEA.

Após a ação de mix enzimático para degradação simultânea de OTA e ZEA, a caracterização físico-química e por espectrometria de RMN ¹H permitiu verificar no mosto e cerveja alterações de parâmetros como cor, pH, amargor e turbidez das amostras e, modificações nos sinais característicos de álcoois, ácidos orgânicos, açúcares e compostos aromáticos.

A PO pode ser aplicada em cerveja com maior concentração de ZEA; enquanto a amano lipase A tem potencial na degradação de amostras com maior ocorrência de OTA. O emprego do mix enzimático, é uma alternativa quando o mosto e a cerveja apresentam elevada incidência das duas micotoxinas. A otimização das condições de aplicação do mix enzimático permitiu um aumento da degradação de 20,2 e 1,1 vezes de OTA e 2,1 e 3,5 vezes de ZEA, respectivamente, em cerveja comparado o emprego isolado da PO ou amano lipase A. No processamento cervejeiro a aplicação destas enzimas é dependente de fatores como o pH, tempo, temperatura, concentração de OTA e ZEA nos insumos utilizados e características inerentes a composição da cerveja. Além disso, é necessário a avaliação da viabilidade econômica e dos efeitos nas características da cerveja, para tornar essa alternativa de mitigação de micotoxina aplicável durante o processo.

Em suma, este estudo promoveu o avanço no conhecimento científico acerca da aplicação de PO e lipase para mitigação de OTA e ZEA em solução modelo, mosto e cerveja. Portanto, foi proposto um método biológico que pode auxiliar na adequação aos níveis aceitáveis de OTA e ZEA em alimentos, descritos como seguros, conforme a legislação nacional e internacional e, assim minimizar os efeitos tóxicos que estas substâncias ocasionam para saúde humana. Adicionalmente, o emprego do mix enzimático permite evitar desperdícios durante o processamento industrial quando relacionando ao descarte de matéria-prima ou produto final contaminado.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as condições de tempo para ação do mix enzimático em mosto e cerveja;
- Avaliar os compostos de degradação e sua toxicidade do mosto e cerveja após a mitigação de OTA e ZEA pela ação das enzimas;
- Avaliar a aplicação das enzimas durante o processo cervejeiro;
- Avaliar a viabilidade econômica para aplicação das enzimas no processo cervejeiro visando a mitigação de OTA e ZEA;
- Avaliar a ação enzimática sobre as características sensoriais e nutricionais do mosto e cerveja;
- Avaliar o emprego de enzimas obtidas de fontes alternativas, bem como a imobilização e o reuso destas na mitigação de OTA e ZEA.

CAPÍTULO V

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASSI, H.; AYED-BOUSSEMA, I.; SHIRLEY, S.; ABID, S.; BACHA, H.; MICHEAU, O. The mycotoxin zearalenone enhances cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. **Toxicology Letters**, v. 254, p. 1–7, 2016.

ABBAS, H. K.; MIROCHA, C. J.; ROSILES, R.; CARVAJAL, M. Decomposition of zearalenone and deoxynivalenol in the process of making tortillas from corn. **Cereal Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 15-19, 1988.

ABD ALLA, E.-SAM. Zearalenone: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. **Food/Nahrung**, v. 41, n. 6, p. 362-365, 1997.

ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. Food Biotechnology, v. 20, n. 3, p. 231–242, 2006.

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A by Fungi Isolated from Grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 25, p. 7493–7496, 2002.

ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1909–1914, 2007.

ADEBIYI, J. A.; KAYITESI, E.; ADEBO, O. A.; CHANGWA, R.; NJOBEH, P. B. Food fermentation and mycotoxin detoxification: An African perspective. **Food Control**, v. 106, p. 106731, 2019.

AITKEN, M. D.; MASSEY, I. J.; CHEN, T.; HECK, P. E. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. **Water Research**, v. 28, n. 9, p. 1879–1889, 1994.

AJILA, C. M.; PRASADA RAO, U. J. S. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1–2, p. 36–44, 2009.

AKITA, H.; MATSUKURA, H.; OISHI, T. Lipase catalyzed enantioselective hydrolysis of 2methyl 3-acetoxy esters. **Tetrahedron letters**, v. 27, n. 43, p. 5241-5244, 1986.

AL-BAGMI, M. S.; KHAN, M. S.; ISMAEL, M. A.; AL-SENAIDY, A. M.; BACHA, A. BEN; HUSAIN, F. M.; ALAMERY, S. F. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 301–307, 2019.

ALKADRI, D.; RUBERT, J.; PRODI, A.; PISI, A.; MAÑES, J.; SOLER, C. Natural cooccurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. **Food Chemistry**, v. 157, p. 111–118, 2014. ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.

AL-MALAH, K.; AZZAM, M. O. J.; ABU-LAIL, N. I. Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. **Separation and Purification Technology**, v. 20, n. 2–3, p. 225–234, 2000.

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. 3, p. 700–706, 2006.

ALTALHI, A. D.; EL-DEEB, B. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. Journal of Hazardous Materials, v. 161, n. 2–3, p. 1166–1172, 2009.

AMEER SUMBAL, G.; HUSSAIN SHAR, Z.; HUSSAIN SHERAZI, S. T.; SIRAJUDDIN; NIZAMANI, S. M.; MAHESAR, S. A. Decontamination of poultry feed from ochratoxin A by UV and sunlight radiations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 8, p. 2668–2673, 2016.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, T.; MURILLO-ARBIZU, M.; DE CERAIN, A. L. A Simple Chemical Method Reduces Ochratoxin A in Contaminated Cocoa Shells. Journal of Food Protection, v. 71, n. 7, p. 1422–1426, 2008.

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, n. 3, p. 173–183, 2002.

ANNEMÜLLER, G.; MANGER, H-J. Processing of Various Adjuncts in Beer Production. Raw Grain Adjuncts-Sugars and Sugar Syrups-Malt Substitutes. VLB Berlin, 2013.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 166**. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412>. Acesso em: 16 de janeiro de 2020.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. In: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.

ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 459–464, 2005.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141–158, 2007.

ARNAO, M. B.; ACOSTA, M.; DEL RIO, J. A.; VARÓN, R.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1041, n. 1, p. 43–47, 1990.

AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; ADAMS, C. D.; TYAGI, R. D. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: Temperature and pH effects. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2847–2856, 2006.

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379–388, 2005.

AZEVEDO, A. M.; MARTINS, V. C.; PRAZERES, D. M. F.; VOJINOVIĆ, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. **Biotechnology annual review**, v. 9, n. 3, p. 1387-2656, 2003.

AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A.; FAR, F. M. E. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. **Journal of Food Safety**, v. 24, n. 2, p. 109–127, 2004.

BAKOS, K.; KOVÁCS, R.; STASZNY, Á.; SIPOS, D. K.; URBÁNYI, B.; MÜLLER, F.; CSENKI, Z.; KOVÁCS, B. Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, v. 136–137, p. 13–21, 2013.

BAMFORTH, C. W. Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. **The Chemical Educator**, v. 5, n. 3, p. 102–112, 2000.

BAMFORTH, C. W. Beer - History and Types. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 418–422.

BAMFORTH, C. W. Brewing: New technologies. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2006.

BANU, I.; LUPU, A.; APRODU, I. Degradation of zearalenone by laccase enzyme. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, v. 14, n. 2, p. 79–84, 2013.

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.

BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, n. 1–3, p. 148–155, 2008.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; ČÁSLAVSKÝ, J.; SVOBODA, Z.; MIKUL KOVÁ, R. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in Czech malting barley. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 93–98, 2014.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKUL OVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 321–325, 2011.

BELLOQUE, J.; RAMOS, M. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 10, p. 313–320, 1999.

BENITES, A. J.; FERNANDES, M.; BOLETO, A. R.; AZEVEDO, S.; SILVA, S.; LEITÃO, A. L. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 73, p. 1223–1228, 2017.

BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W. Destruction of zearalenone in contaminated corn. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 57, n. 8, p. 245-247, 1980.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. Journal of Biotechnology, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, 1998.

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

BERNARDI, G. DOS S.; MAGRO, J. D.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V. Microfiltration for Filtration and Pasteurization of Beers. In: **Engineering Tools in the Beverage Industry.** Woodhead Publishing, 2019. p. 405-434.

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

BETTENHAUSEN, H. M.; BARR, L.; BROECKLING, C. D.; CHAPARRO, J. M.; HOLBROOK, C.; SEDIN, D.; HEUBERGER, A. L. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, p. 487-504, 2018

BHARDWAJ, Kanchan; RAJU, Aruna; RAJASEKHARAN, Ram. Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1728-1738, 2001.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–81, 2010.

BHAT, R.; REDDY, K. R. N. Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade. Food Chemistry, v. 215, p. 425–437, 2017.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 5, p. 562–7, 2001.

BITTNER, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U. Matrix binding of ochratoxin a during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12737–12743, 2013.

BŁAJET-KOSICKA, A.; TWARUZEK, M.; KOSICKI, R.; SIBIOROWSKA, E.; GRAJEWSKI, J. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. **Food Control**, v. 38, n. 1, p. 61–66, 2014. BLANCO, A.; BLANCO, G. Enzymes. In: **Medical Biochemistry.** [s.l.] Elsevier, 2017. p. 153–175.

BOGDAN, P.; KORDIALIK-BOGACKA, E. Alternatives to malt in brewing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 1–9, 2017.

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

BOULTON, C. Fermentation. In: The Craft Brewing Handbook. Woodhead Publishing, 2020. p. 111-152.

BOUTRIF, E.; CANET, C. Mycotoxin prevention and control: FAO programmes. Revue de Medecine Veterinaire, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 138, de 09 de fevereiro de 2017. **Dispõe** sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 de fevereiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019. **Padrões de Identidade e Qualidade para os produtos de cervejaria.** Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 de dezembro de 2019.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Wort boiling clarification, cooling and aeration. In: Brewing. [s.l.] Elsevier, 2004. p. 326–362.

BRIONES-REYES, D.; GÓMEZ-MARTINEZ, L.; CUEVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. Food Chemistry, v. 100, n. 2, p. 693–698, 2007.

BUENO, D. J.; DI MARCO, L.; OLIVER, G.; BARDÓN, A. In vitro binding of zearalenone to different adsorbents. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 613–615, 2005.

BUIATTI, S. Beer composition: an overview. In: Beer in health and disease prevention. Academic Press, 2009. p. 213-225.

BURSAL, E. Kinetic Properties of Peroxidase Enzyme from Chard (*Beta vulgaris* Subspecies *cicla*) Leaves. International Journal of Food Properties, v. 16, n. 6, p. 1293–1303, 2013.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso-α-acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 21–30, 2012.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012.

CALADO, T.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; CABO VERDE, S.; VENÂNCIO, A.; ABRUNHOSA, L. Gamma irradiation effects on ochratoxin A: Degradation, cytotoxicity and application in food. **Food Chemistry**, v. 240, p. 463–471, 2018.

CALORI-DOMINGUES, M. A.; BERNARDI, C. M. G.; NARDIN, M. S.; DE SOUZA, G. V.; DOS SANTOS, F. G. R.; STEIN, M. DE A.; GLORIA, E. M. DA; DIAS, C. T. DOS S.; DE CAMARGO, A. C. Co-occurrence and distribution of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in wheat from Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 9, n. 2, p. 142–151, 2016.

CAO, H.; ZHI, Y.; XU, H.; FANG, H.; JIA, X. Zearalenone causes embryotoxicity and induces oxidative stress and apoptosis in differentiated human embryonic stem cells. **Toxicology in Vitro**, v. 54, p. 243-250, 2019.

CARREA, G.; CORCELLI, A.; PALMISANO, G.; RIVA, S. Preparation of 3-deacetyl cephalosporins by *Aspergillus niger* lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 6, p. 648–652, 1996.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F. Lipases: an overview. In: Lipases and phospholipases. Humana Press, 2012. p. 3-30.

CASTELLS, M.; PARDO, E.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Reduction of ochratoxin A in extruded barley meal. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1139–1143, 2006.

CERVBRASIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. Anuário 2019 e Dados do setor cervejeiro nacional. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br. Acesso em: 01 de junho de 2020.

CFIA - Canadian Food Inspection Agency. **RG-8 Regulatory Guidance: Contaminants in Feed (formerly RG-1, Chapter 7), Section 1: Mycotoxins in livestock feed.** Date modified: october, 2017. Disponível em: https://www.inspection.gc.ca/animal-health/livestockfeeds/regulatory-guidance/rg-8/eng/1347383943203/1347384015909?chap=0#c1. Acesso em: 17 de junho de 2020.

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

CHANG, X.; WU, Z.; WU, S.; DAI, Y.; SUN, C. Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 32, n. 4, p. 564–571, 2015.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. Fundamentals of enzyme kinetics. In: CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. (Eds.). **Enzyme technology**. New York: Cambridge University Press., 1990. p. 12–17.

CHATTOPADHYAY, K.; MAZUMDAR, S. Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. **Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 263–270, 2000.

CHEN, Z.; LI, H.; PENG, A.; GAO, Y. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase in water containing an organic cosolvent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 10696–10705, 2014.

CHENG, J.; MING YU, S.; ZUO, P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminumpillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. **Water Research**, v. 40, n. 2, p. 283–290, 2006.

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.

CHO, K. J.; KANG, J. S.; CHO, W. T.; LEE, C. H.; HA, J. K.; SONG, K. BIN. In vitro degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 12, p. 1921–1924, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Standard, v. 193, 1995.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; ALVES, M. G.; NASCIMENTO, M. DA G.; CARVALHO, P. DE O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163–171, 2010.

COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T.; NESTER, M.A.; EFRAIM, P.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 100-104, 2013.

CORDIER, C.; GRUSELLE, M.; JAOUEN, G.; HUGHES, D. W.; MCGLINCHEY, M. J. Structures of zearalenone and zearalanone in solution: A high-field NMR and molecular modelling study. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 835–845, 1990.

CORTACERO-RAM REZ, S.; HERNÁINZ-BERMÚDEZ DE CASTRO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 440-455, 2003.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3–4, p. 183–205, 1999.

DAIS, P.; STEFANAKI, I.; FRAGAKI, G.; MIKROS, E. Conformational analysis of ochratoxin A by NMR spectroscopy and computational molecular modeling. Journal of **Physical Chemistry B**, v. 109, n. 35, p. 16926–16936, 2005.

DALE, B. E.; WHITE, D. H. Ionic strength: A neglected variable in enzyme technology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 3, p. 227–229, 1983.

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BERTUZZI, T.; MOSERITI, A.; PIETRI, A.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami

and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. Food Chemistry, v. 120, n. 4, p. 978–983, 2010.

DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. **FEBS Letters**, v. 587, n. 17, p. 2738–2743, 2013. DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 309–313, 2000.

DAVIES, N. (2006). Malt and malt products. In: **Brewing: New technologies.** Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, p. 68–101.

DE GAETANO, G.; COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; BADIMON, L.; BEJKO, D.; ALKERWI, A.; CHIVA-BLANCH, G.; ESTRUCH, R.; LA VECCHIA, C.; PANICO, S.; POUNIS, G.; SOFI, F.; STRANGES, S.; TREVISAN, M.; URSINI, F.; CERLETTI, C.; DONATI, M. B.; IACOVIELLO, L. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 6, p. 443–467, 2016.

DEBERGHES, P.; BETBEDER, A. M.; BOISARD, F.; BLANC, R.; DELABY, J. F.; KRIVOBOK, S.; STELMAN, R.; SELGLE-MURANDI, F.; CREPPY, E. E. Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: Prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. **Mycotoxin Research**, v. 11, p. 37–47, 1995.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 2–3, p. 119–126, 2009.

DOBRITZSCH, D.; WANG, H.; SCHNEIDER, G.; YU, S. Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme. **Biochemical Journal**, v. 462, n. 3, p. 441–452, 2014.

DOHNAL, V.; PAVLÍKOVÁ, L.; KUCA, K. The pH and Mobile Phase Composition Effects Ochratoxin A Fluorescence at Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 9, p. 766–770, 2010.

DONG, H.; GAO, S.; HAN, S. P; CAO, S. G. Purification and characterization of a Pseudomonas sp. lipase and its properties in non-aqueous media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 251-256, 1999.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. Journal of Food Protection, v. 66, n. 8, p. 1514-1527, 2003.

DUARTE BAUMER, J.; VALÉRIO, A.; DE SOUZA, S. M. A. G. U.; ERZINGER, G. S.; FURIGO, A.; DE SOUZA, A. A. U. Toxicity of enzymatically decolored textile dyes solution by horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, n. May, p. 82–88, 2018.

DUARTE, I. F.; BARROS, A.; ALMEIDA, C.; SPRAUL, M.; GIL, A. M. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1031-1038, 2004.

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. 17, p. 4847–4852, 2003.

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 of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 9, p. 2475–2481, 2002.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Hop Chemistry. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. **EFSA Journal**, v. 14, n. 4, p. 1–46, 2016.

EISENTHAL, R.; PETERSON, M. E.; DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 289–292, 2006.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461–493, 2010.

ELLIS, Keith J.; MORRISON, John F. Buffers of constant ionic strength for studying pHdependent processes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1982. p. 405-426.

EL-SHARKAWY, S. H.; SELIM, M. I.; AFIFI, M. S.; HALAWEISH, F. T. Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 549–552, 1991.

ELY, C.; P. KEMPKA, A.; SKORONSKI, E. Peroxidases Application in the Wastewater Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1537–1549, 2016.

ERI, S.; KHOO, B. K.; LECH, J.; HARTMAN, T. G. Direct Thermal Desorption–Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Profiling of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oils in Support of Varietal Characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 4, p. 1140–1149, 2000.

EβLINGER, H. M.; NARZIβ, L. Beer. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH 2009, p. 41–93.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analytica-EBC. In **European Brewery Convention.** (5 th Ed.), Analytica EBC, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006, Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12–34, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) 1881/2006 of 19 December 2006, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, p. 5–24, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to ochratoxin A in food. **EFSA Journal**, v. 1, n. 365, p. 1–56, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**, v. 9, n. 6, p. 2197, 2011.

FABIAN, M. **Process for removing micotoxins from a load of green coffee.** U.S. Patent n. 6,376,001, 23 abr. 2002.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology** & **Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235–240, 2006.

FAMIC - Food and Agricultural Materials Inspection Centre. **Regulation value of pesticides, heavy metals and mycotoxins (administrative guideline)** (Revised in Nov. 17, 2019). Food and Agricultural Materials Inspection Centre. Disponível em: http://www.famic.go.jp/ffis/feed/r_safety/r_feeds_ safety22.html. Acesso em: 16 de junho de 2020.

FAN, C.-C.; LIN, T.-F. N-nitrosamines in drinking water and beer: Detection and risk assessment. **Chemosphere**, v. 200, p. 48–56, 2018.

FDA - Food and Drug Administration. **Natural Toxins.** U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: https://www.fda.gov/food/guidance-documents-regulatory-information-topic-food-and-dietary-supplements/chemical-metals-natural-toxins-pesticides-guidance-documents-regulations. Acesso em: 18 de junho de 2020.

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.

FELTRIN, A. C. P.; RAMOS VAZ FONTES, M.; DELGADO KIKUMOTO GRACIA, H.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase from soybean meal: obtention, purification and application in reduction of deoxynivalenol levels. **Química Nova**, v. 40, n. 8, p. 908–915, 2017.

FERNANDEZ-MAYORALAS, A. Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases. In: **Glycoscience Synthesis of Oligosaccharides and Glycoconjugates**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997. p. 1-20.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Beer Carbohydrates. In: **Beer in Health and Disease Prevention**. Academic Press, 2009. p. 291-298.
FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 5, p. 463–471, 2006.

FSANZ - Australia New Zealand Food Standards Code, 2017. Schedule 19, **Maximum levels of contaminants and natural toxicants.** Prepared by Food Standards Australia New Zealand on 13 April 2017. Australian Government, Federal Register of Legislation. Disponivel em: https://www.legislation.gov.au/Details/ F2017C00333. Acesso em 15 de junho de 2020.

FRIZZELL, C.; NDOSSI, D.; VERHAEGEN, S.; DAHL, E.; ERIKSEN, G.; SØRLIE, M.; ROPSTAD, E.; MULLER, M.; ELLIOTT, C. T.; CONNOLLY, L. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. Toxicology Letters, v. 206, n. 2, p. 210–217, 2011.

FU, G.; MA, J.; WANG, L.; YANG, X.; LIU, J.; ZHAO, X. Effect of degradation of zearalenone-contaminated feed by *Bacillus licheniformis* CK1 on postweaning female piglets. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2016.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1398–1407, 2008.

GAJÊCKA, M.; ZIELONKA, U.; DABROWSKI, M.; GAJÊCKI, M. Threats resulting from the presence of zearalenone in water. **Medycyna Wet**, v. 67, n. 10, p. 643–646, 2011.

GALVANO, F.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; PIVA, A.; CHIES, L.; GALVANO, M. Activated carbons: In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 4, p. 469–475, 1998.

GAN, F.; ZHOU, Y.; HOU, L.; QIAN, G.; CHEN, X.; HUANG, K. Ochratoxin A induces nephrotoxicity and immunotoxicity through different MAPK signaling pathways in PK15 cells and porcine primary splenocytes. **Chemosphere**, v. 182, p. 630–637, 2017.

GARCIA, S. DE O.; SIBAJA, K. V. M.; NOGUEIRA, W. V.; FELTRIN, A. C. P.; PINHEIRO, D. F. A.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039, 2020.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 35, n. 9, p. 1819–1831, 2018.

GARDA, J.; FURLONG, E. B.. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. **VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2003.

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.

GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 8, p. 1998–2008, 2017.

GB - China Food Safety National Standard GB. **National food safety standards -Limited edition of mycotoxins in food,** China Food Safety National Standard GB 2761-2017. Released March 17, 2017, implemented September 17, 2017. Disponível em: https://www.chinesestandard.net/PDF/English.aspx/GB2761-2017. Acesso em: junho de 2020.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 921–924, 2008.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M.; SPRAUL, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 488, n. 1, p. 35–51, 2003.

GIL, A. M.; RODRIGUES, J. Methods for the Characterization of Beer by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: **Beer in Health and Disease Prevention**. Academic Press, 2009. p. 935-942.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6–7, p. 468–486, 2002.

GIRARDON, P. Gases in Breweries. In: Gases in Agro-Food Processes. Academic Press, 2019. p. 451-453.

GOLGE, O.; KABAK, B. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from Turkey. **Food Control**, v. 110, p. 106982, 2020.

GOMES, A. R.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Enzyme Assays. In: Encyclopedia of Analytical Science. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 271–278.

GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; RODRÍGUEZ, P. M.; VALLS-BELLÉS, V. Beer and its role in human health. In: **Fermented foods in health and disease prevention.** Academic Press, 2017. p. 365-384.

GOODE, D. L.; ARENDT, E. K. Developments in the supply of adjunct materials for brewing. In: **Brewing**. Woodhead Publishing, 2006. p. 30-67.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. In: Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality. Woodhead Publishing, 2015. p. 11-55.

GREEN, M. L.; DIEKMAN, M. A.; MALAYER, J. R.; SCHEIDT, A. B.; LONG, G. G. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 1, p. 171, 1990.

GRENIER, B.; LOUREIRO-BRACARENSE, A.-P.; LESLIE, J. F.; OSWALD, I. P. Physical and chemical methods for mycotoxin decontamination in maize. **Mycotoxin Reduct. Grain Chains**, p. 116-129, 2014.

GUIDO, L.; MOREIRA, M. Malting. In: GUINE, R. DE P. F.; CORREIA, P. M. DOS R. (Eds.). Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products. [s.l.] CRC Press, 2013. p. 52–70.

HAASNOOT, W.; VAN DOORN, R.; BERTHILLER, F.; KATERERE, D.; PETERS, J.; VAN DAM, R.; NIELEN, M. W. F. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. **Plos One**, v. 12, n. 10, p. e0185887, 2017. 2017.

HAJOK, I.; KOWALSKA, A.; PIEKUT, A.; ĆWIELĄG-DRABEK, M. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. **Food Chemistry**, v. 284, p. 264-269, 2019.

HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177–1186, 2009.

HANKE;, S.; HERRMANN;, M.; RÜCKERL;, J.; SCHÖNBERGER, C.; BACK, W. Hop Volatile Compounds (Part II): Transfer Rates of Hop Compounds from Hop Pellets to Wort and Beer. **Brewing Science**, v. 61, n. 7–8, p. 140–147, 2008.

HAQ, M.; GONZALEZ, N.; MINTZ, K.; JAJA-CHIMEDZA, A.; DE JESUS, C.; LYDON, C.; WELCH, A.; BERRY, J. Teratogenicity of Ochratoxin A and the Degradation Product, Ochratoxin α, in the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model of Vertebrate Development. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 40, 2016.

HAQUE, M. A.; WANG, Y.; SHEN, Z.; LI, X.; SALEEMI, M. K.; HE, C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 104095, 2020.

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

HARRISON, M. A. Beer/Brewing. In: Encyclopedia of Microbiology. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 23–33.

HARRISON, M. A.; ALBANESE, J. B. Beer/Brewing. In: Reference Module in Life Sciences. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 467–477.

HARTMEIER, W.; REISS, M. Production of beer and wine. In: **Industrial Applications**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2002. p. 49-65.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: Lipases. African Journal of Biotechnology, v. 9, n. 31, p. 4836–4844, 2010.

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

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

HEERDEN, E. VAN; LITTHAUER, D.; VERGER, R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, n. 7, p. 902-909, 2002.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**, v. 209, n. 3–4, p. 297–300, 1999.

HELLBORG, L.; PIŠKUR, J. Yeast diversity in the brewing industry. In: Beer in health and disease prevention. Academic Press, 2009. p. 77-88.

HERRMANN, M.; HANKE, S.; KALTNER, D.; BACK, W Hop volatile compounds (Part I): Analysis of hop pellets and seasonal variations. **Brewing Science**, v. 61, p. 135-139, 2008.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: Recent advances and future perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 12, p. 499–506, 2003.

HILLS, B.; CLARK, C. Quality assessment of horticultural products by NMR. Annual Reports on NMR spectroscopy, v. 50, p. 76-121, 2003.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001.

HOLBROOK, C. J. Brewhouse operations. In: **The Craft Brewing Handbook.** Woodhead Publishing, 2020. p. 65-109.

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

HOLUBKOVÁ, A.; MOŠOVSKÁ, S.; BALOGHOVÁ, B.; ŠTUR K, E. Hop pellets as an interesting source of antioxidant active compounds. **Potravinarstvo**, v. 7, n. 1, p. 53–57, 2013.

HOOSHMAND, H.; KLOPFENSTEIN, C. F. Effects of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybeans with different moisture contents. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 227–238, 1995.

HORNSEY, I. S. Beer: History and Types. 1. ed. [s.1.] Elsevier, 2015.

HOSHINO, N.; NAKAJIMA, R.; YAMAZAKI, I. The effect of polymerization of horseradish peroxidase on the peroxidase activity in the presence of excess H₂O₂: a background for a homogeneous enzyme immunoassay. **The Journal of Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 785-791, 1987.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. Beer flavour and beer quality. In: Malting and brewing science. Springer, Boston, MA, 1982. p. 839-883.

HOWE, S. Raw materials. In: **The Craft Brewing Handbook.** Woodhead Publishing, 2020. p. 1-46.

HU, H.; JIA, X.; WANG, Y.; XIONG, L.; PENG, M.; LIANG, Z. Detoxification of ochratoxin a by an expressed carboxypeptidase and some isolated peptides from *Bacillus subtilis* CW14. **Toxicon**, v. 158, p. S67, 2019.

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

HUGHES, P. BEERS | Raw Materials. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 422–429.

HUGHES, P. The significance of iso- α -acids for beer quality cambridge prize paper. Journal of the Institute of Brewing, v. 106, n. 5, p. 271–276, 2000.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France, 1993: [s.n.]. v. 56.

IBÁÑEZ-VEA, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 35–42, 2012.

IIZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agricultural and **Biological Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1253-1258, 1990.

INGLEDEW, W. M.; HYSERT, D. W. Brewing Technology. Reference Module in Food Science, p. 1-11, 1994.

INTELMANN, D.; HASELEU, G.; DUNKEL, A.; LAGEMANN, A.; STEPHAN, A.; HOFMANN, T. Comprehensive Sensomics Analysis of Hop-Derived Bitter Compounds during Storage of Beer. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 5, p. 1939–1953, 2011.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 235–239, 2013.

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

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

IQBAL, S. Z.; RABBANI, T.; ASI, M. R.; JINAP, S. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 157, p. 257–262, 2014a.

JACOBSEN, B. J.; HARLIN, K. S.; SWANSON, S. P.; LAMBERT, R. J.; BEASLEY, V. R.; SINCLAIR, J. B.; WEI, L. S. Occurrence of fungi and mycotoxins associated with field mold damaged soybeans in the midwest. **Plant Disease**, v. 79, n. 1, p. 86–88, 1995.

JAEGER, K.-E.; RANSAC;, S.; DIJKSTRA;, B. W.; COLSON;, C.; HEUVEL;, M. VAN; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.

JARD, G.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F.; GUYONVARC'H, A.; ANDRÉ, F.; DELAFORGE, M.; LEBRIHI, A. Transformation of zearalenone to zearalenone-sulfate by *Aspergillus* spp. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 2, p. 183–191, 2010.

JASKULA, B.; GOIRIS, K.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. Enhanced Quantitative Extraction and HPLC Determination of Hop and Beer Bitter Acids. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 4, p. 381–390, 2007.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.

JEONG, J.-H.; CHO, S.-J.; KIM, Y. High-Resolution NMR Spectroscopy for the Classification of Beer. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 38, n. 4, p. 466–470, 2017.

JI, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 127–133, 2016.

JIANG, Y.; DUAN, X.; QU, H.; ZHENG, S. Browning: Enzymatic Browning. In: **Encyclopedia of Food and Health.** [s.l.] Elsevier, 2016. p. 508–514.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, J. **Evaluation of** certain food additives and contaminants. Zearalenone. Geneva: WHO Technical Report Series, 2000.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, J. **Safety evaluation** of certain food additives and contaminants. Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). v. 59, p. 3–54, 2008.

JOLLY, James F. **Enzymatic methods of flavor modification.** U.S. Patent n. 9,144,249, 29 set. 2015.

JUAN, C.; MOLTÓ, J. C.; LINO, C. M.; MAÑES, J. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 525–530, 2008.

KALETUNC, Gonul; BRESLAUER, Kenneth J. (Ed.). Characterization of cereals and flours: properties, analysis and applications. CRC Press, 2003.

KARLOVSKY, P.; SUMAN, M.; BERTHILLER, F.; DE MEESTER, J.; EISENBRAND, G.; PERRIN, I.; OSWALD, I. P.; SPEIJERS, G.; CHIODINI, A.; RECKER, T.; DUSSORT, P. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin Research**, v. 32, n. 4, p. 179–205, 2016.

KATONO, F.; YONEZAWA, D.; INUI, T. **Hop extract and method for producing same.** U.S. Patent Application n. 15/572,859, 3 maio 2018.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108–112, 2000.

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. 2, p. 264–270, 2006.

KHEIROLOMOOM, A.; ARDJMAND, M.; VOSSOUGHI, M.; KAZEMEINI, M. The stability analysis and modeling of pH- and ionic strength inactivation of penicillin G acylase obtained from various species of *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 2, n. 2, p. 81–88, 1998.

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. **Toxins.** v. 2, p. 461-493, 2010.

KIESSLING, K.-H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986.

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

KLAPPER, M. H.; HACKETT, D. P. Investigations on the multiple components of commercial horseradish peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology** and **Biological Oxidation**, v. 96, n. 2, p. 272-282, 1965.

KŁOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D.; GRAJEWSKI, J.; BŁAJET-KOSICKA, A. The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3147–3152, 2010.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564-1568, 1994.

KONDO, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. **Biofactors**, v. 22, n. 1-4, p. 303-310, 2004.

KOSAWANG, C.; KARLSSON, M.; VÉLËZ, H.; RASMUSSEN, P. H.; COLLINGE, D. B.; JENSEN, B.; JENSEN, D. F. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic Fusarium graminearum. **Fungal Biology**, v. 118, n. 4, p. 364–373, 2014.

KOVAČEVIČ, M.; KAČ, M. Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 489–494, 2002.

KOWALSKA, K.; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA, D. E.; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A. W. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 141–149, 2016.

KRIFATON, C.; KRISZT, B.; RISA, A.; SZOBOSZLAY, S.; CSERHÁTI, M.; HARKAI, P.; ELDRIDGE, M.; WANG, J.; KUKOLYA, J. Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 429–435, 2013.

KRISZT, R.; KRIFATON, C.; SZOBOSZLAY, S.; CSERHÁTI, M.; KRISZT, B.; KUKOLYA, J.; CZÉH, Á.; FEHÉR-TÓTH, S.; TÖRÖK, L.; SZŐKE, Z.; KOVÁCS, K. J.; BARNA, T.; FERENCZI, S. A New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic Rhodococcus pyridinivorans K408 Strain. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. e43608, 2012.

KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 1-18.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 38–44, 2005.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; PAL, A.; SINGHCHOPRA, D. Enzymes. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**, p 335-358, 2018.

KUPSKI, L.; ALVES, C. L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Aplicação de carboxipeptidase obtida de *Rhizopus* na degradação de ocratoxina A. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 30, 2013.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food Chemistry**, v. 177, p. 354–360, 2015.

KUPSKI, L.; QUEIROZ, M. I.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase A to a baking process to mitigate contamination of wheat flour by ochratoxin A. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 248-254, 2018.

KUROSAKA, A.; YANO, A.; ITOH, N.; KURODA, Y.; NAKAGAWA, T.; KAWASAKI, T. The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4168–4172, 1991.

KUZDRALIŃSKI, A.; SOLARSKA, E.; MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 22–24, 2013.

LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; HUMPFER, E.; SCHÄFER, H.; KELLER, S.; MÖRTTER, M.; SPRAUL, M. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 2, p. 215–221, 2005.

LAI, L. S.; WANG, D. J.; CHANG, C. T.; WANG, C. H. Catalytic characteristics of peroxidase from wheat grass. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 22, p. 8611–8616, 2006.

LAI, O. M.; LEE, Y. Y.; PHUAH, E. T.; AKOH, C. C. Lipase/Esterase: Properties and industrial applications. In: **Encyclopedia of Food Chemistry.** Elsevier, 2018.

LAITILA, A. Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. In: **Brewing microbiology**. Woodhead Publishing, 2015. p. 107-139.

LANGSTAFF, S. A.; LEWIS, M. J. The mouthfeel of beer—a review. Journal of the Institute of Brewing, v. 99, n. 1, p. 31–37, 1993.

LAURENT, W.; BONNY, J. M.; RENOU, J. P. Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. Food Chemistry, v. 69, n. 4, p. 419–426, 2000.

LAVERY, C. B.; MACINNIS, M. C.; MACDONALD, M. J.; WILLIAMS, J. B.; SPENCER, C. A.; BURKE, A. A.; IRWIN, D. J. G.; D'CUNHA, G. B. Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 15, p. 8471–8476, 2010.

LEE, D.; KOH, Y.; KIM, K.; KIM, B.; CHOI, H.; KIM, D.; SUHARTONO, M. T.; PYUN, Y. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 393-400, 1999.

LEE, H.; YUN, S. Y.; JANG, S.; KIM, G.-H.; KIM, J.-J. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Creosote-Contaminated Soil by *Peniophora incarnata* KUC8836. **Bioremediation Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2015.

LEI, Y. P.; ZHAO, L. H.; MA, Q. G.; ZHANG, J. Y.; ZHOU, T.; GAO, C. Q.; JI, C. Degradation of zearalenone in swine feed and feed ingredients by *Bacillus subtilis* ANSB01G. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 2, p. 143–151, 2014.

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

LI, G.; ZHONG, Q.; WANG, D.; GAO, H. A survey of ethyl carbamate in beer from Chinese market. **Food Control**, v. 79, p. 254–257, 2017a.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 305–351.

LI, X.; PENG, X.; WANG, Q.; ZUO, H.; MENG, X.; LIU, B. Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 78, p. 48-56, 2017.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industry 1. Journal of Biotechnology, v. 65, p. 85–98, 1998.

LIU, S. Enzymes. In: Bioprocess Engineering. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 229–290.

LIU, S.-Q. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. In: **Brewing Microbiology.** Woodhead Publishing, 2015. p. 357-374.

LIVENS, S. Beer: Fermentation. In: Encyclopedia of Food and Health. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015. p. 339–344.

LOHITH, K.; DIVAKAR, S. Candida rugosa lipase catalysed preparation of l-prolyl, lphenylalanyl, l-tryptophanyl and l-histidyl esters of carbohydrates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 1, p. 28–43, 2007.

LOI, M.; FANELLI, F.; LIUZZI, V. C.; LOGRIECO, A. F.; MULÈ, G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. **Toxins**, v. 9, n. 4, 2017.

LOPES, G. R.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. **Rsc Advances**, v. 4, n. 70, p. 37244–37265, 2014.

LORENCOVÁ, E.; SALEK, R. N.; Č KOVÁ, M.; BUŇKOVÁ, L.; HÝLKOVÁ, A.; BUŇKA, F. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. **Food Control**, p. 107335, 2020.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: Industrial enzymes. Springer, Dordrecht, 2007. p. 263-281.

LOVELACE, C. E. A.; NYATHI, C. B. Estimation of the fungal toxins, zearalenone and aflatoxin, contaminating opaque maize beer in Zambia. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 28, n. 3, p. 288–292, 1977.

LÜCK, H. Peroxidase. In: Methods of Enzymatic Analysis. [s.l.] Elsevier, 1965. v. 32, p. 895–897.

LUO, Y.; LIU, X.; LI, J. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. Food Control, v. 89, p. 123–132, 2018.

LUZ, C.; FERRER, J.; MAÑES, J.; MECA, G. Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 60-66, 2018.

MACHADO, J. C.; FARIA, M. A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Hops: New Perspectives for an Old Beer Ingredient. In: **Natural Beverages.** Academic Press, 2019. p. 267-301.

MACLEOD, L.; EVANS, E. Barley: Malting. In: Encyclopedia of Food Grains: Second Edition. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 3–4p. 423–433.

MADHYASTHA, M. S.; FROHLICH, A. A.; MARQUARDT, R. R. Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. Food and Chemical Toxicology, v. 30, n. 8, p. 709–714, 1992.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1–2, p. 131–139, 2007.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food : detection and control.** Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2004.

MAHMOUDI, A.; NAZARI, K.; MOHAMMADIAN, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Effect of Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, and Cu²⁺ on Horseradish Peroxidase: Activation, Inhibition, and Denaturation Studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 81–94, 2003.

MAKUN, H. A.; DUTTON, M. F.; NJOBEH, P. B.; MWANZA, M.; KABIRU, A. Y. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. **Mycotoxin Research**, v. 27, n. 2, p. 97–104, 2011.

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

MALOMO, S. O.; ADEOYE, R. I.; BABATUNDE, L.; SAHEED, I. A.; INIAGHE, M. O.; OLORUNNIJI, F. J. Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide: The effects of reaction pH, buffer ion concentration, and redox mediation. **Biokemistri**, v. 23, n. 3, 2011.

MANUBOLU, M.; GOODLA, L.; PATHAKOTI, K.; MALMLÖF, K. Enzymes as direct decontaminating agents—mycotoxins. In: **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Academic Press, 2018. p. 313-330.

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

MARIN-KUAN, M.; CAVIN, C.; DELATOUR, T.; SCHILTER, B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 195–202, 2008.

MÁRQUEZ, O.; WALISZEWSKI, K. N.; OLIART, R. M.; PARDIO, V. T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1372–1379, 2008.

MARTÍNEZ CUESTA, S.; RAHMAN, S. A.; FURNHAM, N.; THORNTON, J. M. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 6, p. 1082–1086, 2015.

MASSART, F.; SAGGESE, G. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 2, p. 369–376, 2010.

MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 500, n. 1, p. 58–65, 2010.

MAYURA, K.; STEIN, A. F.; BERNDT, W. O.; PHILLIPS, T. D. Teratogenic effects of Ochratoxin A in rats with impaired renal function. **Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 277–285, 1984.

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

MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 579–583, 2010.

MEDINA, Á.; JIMÉNEZ, M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, n. 1–2, p. 7–13, 2005.

MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, R.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, n. 2, p. 178-183, 2006.

MEDINA, J. D. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; GUIMARÃES, L. R. C.; KARP, S. G.; SOCCOL, C. R. Peroxidases. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.** [s.l.] Elsevier, 2017. p. 217–232.

MEGHARAJ, M.; GARTHWAITE, I.; THIELE, J. H. Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. Letters in Applied Microbiology, v. 24, n. 5, p. 329–333, 1997.

MENA, C.; CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; LÓPEZ, M. C. Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. **Science of The Total Environment**, v. 181, n. 3, p. 201–208, 1996.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 78, p. 119–134, 2012.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V., DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from Penicillium verrucosum using solid-state fermentation of soybean bran. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 537-544, 2010.

MERCOSUL - MERCADO COMUM DO SUL (2002). Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. GMC/RES. N° 25/02. Disponível

em: http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_025_002_R TM_Aflatoxinas%20en%20Lech-Man%C3%AD-Ma%C3%ADz_Acta%202_02.PDF.Acesso em 30 de março de 2020.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486–1490, 2009.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: Implication for stored product research. Journal of Stored Product Research, v. 31, n. 1, p. 1–16, 1995.

MINE KURTBAY, H.; BEKÇI, Z.; MERDIVAN, M.; YURDAKOÇ, K. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 7, p. 2541-2545, 2008.

MOHAMED, S. A.; ABULNAJA, K. O.; ADS, A. S.; KHAN, J. A.; KUMOSANI, T. A. Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 725–730, 2011.

MOHAMMADI, M.; SEPEHRIZADEH, Z.; EBRAHIM-HABIBI, A.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMARZI, M. A.; SETAYESH, N. Enhancing activity and thermostability of lipase A from *Serratia marcescens* by site-directed mutagenesis. **Enzyme and microbial technology**, v. 93, p. 18-28, 2016.

MONACI, L.; PALMISANO, F.; MATRELLA, R.; TANTILLO, G. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A, v. 1090, n. 1–2, p. 184–187, 2005.

MONTANARI, L.; MAYER, H.; MARCONI, O.; FANTOZZI, P. Minerals in beer. In: Beer in health and disease prevention. Academic Press, 2009. p. 359-365.

MURATA, H.; MITSUMATSU, M.; SHIMADA, N. Reduction of feed-contaminating mycotoxins by ultraviolet irradiation: An in vitro study. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 25, n. 9, p. 1107–1110, 2008.

MURZIN, D. Y.; SALMI, T. Enzymatic Kinetics. In: Catalytic Kinetics. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 281–343.

NAMBOODIRI, V. M. H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Aspergillus niger*. Lipids, v. 35, p. 495–502, 2000.

NARZISS, L. The German Beer Law. Journal of the Institute of Brewing, v. 90, n. 6, p. 351–358, 1984.

NAWANI, N.; KAUR, J. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 206, p. 91–96, 2000.

NICELL, J. A.; AL-KASSIM, L.; BEWTRA, J. K.; TAYLOR, K. E. Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation. **Biodeterioration Abstracts**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 1993.

NICELL, J. A.; WRIGHT, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, p. 302–310, 1997.

NJUMBE EDIAGE, E.; VAN POUCKE, C.; DE SAEGER, S. A multi-analyte LC–MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. **Food Chemistry**, v. 177, p. 397–404, 2015.

NKWE, D. O.; TAYLOR, J. E.; SIAME, B. A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B_1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 177–186, 2005.

NORA, N. S.; FELTRIN, A. C. P.; SIBAJA, K. V. M.; FURLONG, E. B.; GARDA-BUFFON, J. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1075–1082, 2019.

NORD, L. I.; VAAG, P.; DUUS, J. Ø. Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by ¹ H NMR Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4790–4798, 2004.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33–60, 2005.

ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Additives and Contaminants, v. 19, n. 1, p. 55–61, 2002.

OHMENHAEUSER, M.; MONAKHOVA, Y. B.; KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D. W. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. **ISRN Analytical Chemistry**, p. 1–9, 2013.

ORTEGA-HERAS, M.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Beers/Wort Production. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 429–434.

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

PAHL, R.; MEYER, B.; BIURRUN, R. Wort and Wort Quality Parameters. In: **Brewing** Materials and Processes. Academic Press, 2016. p. 113-121.

PARKER, D. K. Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. In: Alcoholic beverages. Woodhead Publishing, 2012. p. 133-158.

PASCARI, X.; ORTIZ-SOLÁ, J.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. **LWT**, v. 92, p. 87–91, 2018.

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.

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. In: **Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.** Humana Press, Totowa, NJ, 2001. p. 739-752.

PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C.; VARGA, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 205–210, 2007.

PETRUZZI, L.; BEVILACQUA, A.; BAIANO, A.; BENEDUCE, L.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Study of *Saccharomyces cerevisiae* W13 as a functional starter for the removal of ochratoxin A. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 373–377, 2014.

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.

PIQUÉ, E.; VARGAS-MURGA, L.; GÓMEZ-CATALÁN, J.; LAPUENTE, J. DE; LLOBET, J. M. Occurrence of patulin in organic and conventional apple-based food marketed in Catalonia and exposure assessment. Food and Chemical Toxicology, v. 60, p. 199–204, 2013.

PITOUT, M. J. The hydrolysis of ochratoxin a by some proteolytic enzymes. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 485–491, 1969.

PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A.; SCHOLTEN, J.; RIGHI, L. W.; CARDOSO, C. D.; NECCHI ROHERS, G.; DA SILVA, R. C. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 352–363, 2014.

PLEADIN, J.; SOKOLOVIĆ, M.; PERŠI, N.; ZADRAVEC, M.; JAKI, V.; VULIĆ, A. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 94–98, 2012.

POHL, P. Metals in beer. In: Beer in Health and Disease Prevention. Academic Press, 2009. p. 349-358.

POKORNY, D.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A116 strain. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 2, n. 4–5, p. 215–222, 1997.

POLI, A.; MARANGONI, F.; AVOGARO, A.; BARBA, G.; BELLENTANI, S.; BUCCI, M.; CAMBIERI, R.; CATAPANO, A.L.; COSTANZO, S.; CRICELLI, C.; DE GAETANO, G.; DI CASTELNUOVO, A.; FAGGIANO, P.; FATTIROLLI, F.; FONTANA, L.; FORLANI, G.; FRATTINI, S.; GIACCO, R.; LA VECCHIA, C.; LAZZARETTO, L.; LOFFREDO, L.; LUCCHIN, L.; MARELLI, G.; MARROCCO, W.; MINISOLA, S.; MUSICCO, M.; NOVO, S.; NOZZOLI, C.; PELUCCHI, C.; PERRI L.; PIERALLI, F.; RIZZONI, D.; STERZI, R.; VETTOR, R.; VIOLI, F.; VISIOLI, F. Moderate alcohol use and health: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 6, p. 487–504, 2013.

PONTIS, H. G. Measurement of Enzyme Activity. In: Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms. Academic Press, 2017. v. 49, p. 65–70.

PRABHU, A. V.; TAMBE, S. P.; GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Rice Bran Lipase: Extraction, Activity, and Stability. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 6, p. 1083–1089, 1999.

PUANGKHAM, S.; POAPOLATHEP, A.; JERMNAK, U.; IMSILP, K.; TANHAN, P.; CHOKEJAROENRAT, C.; POAPOLATHEP, S. Monitoring and health risk of mycotoxins in imported wines and beers consumed in Thailand. **World Mycotoxin Journal**, v. 10, n. 4, p. 401–409, 2017.

PURICH, D. L. Factors influencing enzyme activity. In: Enzyme Kinetics: Catalysis & Control, Elsevier, 2010, p. 379-484.

QI, X.; YU, T.; ZHU, L.; GAO, J.; HE, X.; HUANG, K.; LUO, Y.; XU, W. Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, n. 3, p. 543–549, 2014.

QUINTELA, S.; VILLARÁN, M. C.; LÓPEZ DE ARMENTIA, I.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 501–504, 2012.

QUINTELA, S.; VILLARÁN, M. C.; LÓPEZ DE ARMENTIA, I.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 501–504, 2012.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, v. 5, n. 203, p. 3–9, 2015.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16– 30, 2018.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 145–150, 2002.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. Advances in Colloid and Interface Science, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

REKIK, H.; NADIA, Z. J.; BEJAR, W.; KOURDALI, S.; BELHOUL, M.; HMIDI, M.; BENKIAR, A.; BADIS, A.; SALLEM, N.; BEJAR, S.; JAOUADI, B. Characterization of a purified decolorizing detergent-stable peroxidase from *Streptomyces griseosporeus* SN9. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, n. 1, p. 253–263, 2015.

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

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

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132–1137, 2010.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico - Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 18–46, 2006.

ROBERTS, M. T.; DUFOUR, J. P.; LEWIS, A. C. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 5–6, p. 473–478, 2004.

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. 2, p. 178–187, 2011.

RODRIGUES, J. E. A.; ERNY, G. L.; BARROS, A. S.; ESTEVES, V. I.; BRANDÃO, T.; FERREIRA, A. A.; CABRITA, E.; GIL, A. M. Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 166–175, 2010.

RODRIGUEZ, H.; REVERON, I.; DORIA, F.; COSTANTINI, A.; DE LAS RIVAS, B.; MUŇOZ, R.; GARCIA-MORUNO, E. Degradation of Ochratoxin A by Brevibacterium Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 19, p. 10755–10760, 2011.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1–11, 2002. ROGOWSKA, A.; POMASTOWSKI, P.; SAGANDYKOVA, G.; BUSZEWSKI, B. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. **Toxicon**, v. 162, p. 46-56, 2019.

ROJAS-REYES, J. O.; ROBLES-OLVERA, V.; CARVAJAL-ZARRABAL, O.; CASTRO MATINEZ, C.; WALISZEWSKI, K. N.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 94, n. 9, p. 1844–1853, 2014.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861-866, 2007.

ROSENTRATER, K. A.; EVERS, A. D. Malting, brewing, fermentation, and distilling. **Kent's Technology of Cereals**, p. 729-784, 2018.

ROY CHOUDHURY, A. K. Introduction to enzymes. In: Sustainable Technologies for Fashion and Textiles. Woodhead Publishing, 2020. p. 75-90.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MARÍN, R.; JAMES, K. J.; MAÑES, J. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 122–128, 2013.

RYU, D.; HANNA, M. A.; BULLERMAN, L. B. Stability of Zearalenone during Extrusion of Corn Grits. Journal of Food Protection, v. 62, n. 12, p. 1482–1484, 1999.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86–96, 2015.

SALIS, A.; BILANIČOVÁ, D.; NINHAM, B. W.; MONDUZZI, M. Hofmeister effects in enzymatic activity: weak and strong electrolyte influences on the activity of *Candida rugosa* lipase. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 5, p. 1149-1156, 2007.

SANGARE-TIGORI, B.; MOUKHA, S.; KOUADIO, H. J.; BETBEDER, A.-M.; DANO, D. S.; CREPPY, E. E. Co-occurrence of aflatoxin B 1, fumonisin B 1, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. Food Additives and Contaminants, v. 23, n. 10, p. 1000–1007, 2006.

SANGPRING, Y.; FUKUOKA, M.; BAN, N.; OISHI, H.; SAKAI, N. Evaluation of relationship between state of wheat flour-water system and mechanical energy during mixing by color monitoring and low-field 1H NMR technique. **Journal of Food Engineering**, v. 211, p. 7–14, 2017.

SANTE/EC. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, v. 11813, p. 1–42, 2017.

SANTE/EU. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, v. 11945, p. 1–42, 2015. SANZ, V.; TORRES, M. D.; LÓPEZ VILARIÑO, J. M.; DOMÍNGUEZ, H. What is new on the hop extraction? Trends in Food Science & Technology, v. 93, p. 12-22, 2019.

SARIKA, D.; KUMAR, P. S. S. A.; ARSHAD, S.; SUKUMARAN, M. K. Purification and evaluation of horseradish peroxidase activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 7, p. 367–375, 2015.

SATHISH YADAV, K. N.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10663–10670, 2011.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; ROCHA, L. O.; CARNIELLI-QUEIROZ, L.; FURTADO, B. G.; SCUSSEL, R.; ZANONI, E. T.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; CORRÊA, B.; ANGIOLETTO, E. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 270, p. 5–13, 2018.

SAXENA, R.; DAVIDSON, W.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239–247, 2003.

SCANO, P.; CUSANO, E.; CABONI, P.; CONSONNI, R. NMR metabolite profiles of dairy: A review. **International Dairy Journal**, v. 90, p. 56–67, 2019.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

SCHMIDT-HEYDT, M.; GRAF, E.; STOLL, D.; GEISEN, R. The biosynthesis of ochratoxin A by Penicillium as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 233–241, 2012.

SCHÖNBERGER, C.; KOSTELECKY, T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. Journal of the Institute of Brewing, v. 117, n. 3, p. 259–267, 2011.

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

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Chemical Composition and Seasonality of Aromatic Mediterranean Plant Species by NMR-Based Metabolomics. Journal of Analytical Methods in Chemistry, v. 2015, p. 1–9, 2015.

SHANG, L.; BAI, X.; CHEN, C.; LIU, L.; LI, M.; XIA, X.; WANG, Y. Isolation and identification of a *Bacillus megaterium* strain with ochratoxin A removal ability and antifungal activity. **Food Control**, v. 106, n. June, p. 106743, 2019.

SHARMA, H.; UPADHYAY, S. K. Enzymes and their production strategies. In: **Biomass**, **Biofuels**, **Biochemicals**. Elsevier, 2020. p. 31-48.

SHU, C.-H.; XU, C.-J.; LIN, G.-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 734–738, 2006.

SHU, Z.; YANG, J.; YAN, Y. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. Chinese Journal of Biotechnology, v. 23, n. 1, p. 96–101, 2007.

SHURSON, G. C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. Animal Feed Science and Technology, v. 235, p. 60-76, 2018.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 225–230, 2008.

SIBAJA, K. V. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; FELTRIN, A. C. P.; DIAZ REMEDI, R.; CERQUEIRA, M. B. R.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187–1194, 2019.

SICARD, D.; LEGRAS, J.-L. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the Saccharomyces sensu stricto complex. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229–236, 2011.

SIGMA-ALDRICH. **Amano Lipase A from** *Aspergillus niger*. Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 18 de fevereiro de 2020.

SIGMA-ALDRICH. **Product information - Peroxidase from horseradish** (pp. 1–3). Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 25 de junho de 2019 e 10 de maio de 2020.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. In: **Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.** Humana Press, Totowa, NJ, 1999. p. 745-757.

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1055–1060, 2012.

SOMASHEKAR, B. R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of l-alanyl esters of carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 299–309, 2007.

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

production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 65–73, 2006.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of Commercial Hydrolases for the Degradation of Ochratoxin A. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 11, p. 5736–5739, 2000.

STANDER, M. A.; STEYN, P. S.; VAN DER WESTHUIZEN, F. H.; PAYNE, B. E. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 302–304, 2001.

STATISTA. **Global beer production 1998-2018**. Disponível em: https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/. Acesso em: 10 de jan. 2020.

STEENACKERS, B.; DE COOMAN, L.; DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742–756, 2015.

STEINER, E.; BECKER, T.; GASTL, M. Turbidity and haze formation in beer—Insights and overview. Journal of the Institute of Brewing, v. 116, n. 4, p. 360–368, 2010.

STEWART, G. Adjuncts. In: Brewing Materials and Processes. Academic Press, 2016. p. 27-46.

STEWART, G. G. Beer: Raw Materials and Wort Production. In: Encyclopedia of Food and Health. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2015a. p. 355–363.

STEWART, G. G. Saccharomyces/Brewer's Yeast. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 3p. 302–308.

STEWART, G. G. Yeast quality assessment, management and culture maintenance. In: **Brewing Microbiology**. Woodhead Publishing, 2015b. p. 11-29.

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I. P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 788-809, 2012.

STROKA, J.; GONÇALVES, C. Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 401–419.

ŠTYRIAK, I.; CONKOVÁ, E.; KMEC, V.; BÖHM, J.; RAZZAZI, E. The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins. **Mycotoxin Research**, v. 17, n. 1, p. 24–27, 2001.

SUN, X.; HE, X.; XUE, K. SIYU; LI, Y.; XU, D.; QIAN, H. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10. Food and chemical toxicology, v. 72, p. 76-82, 2014.

SWANSTON, J. S.; WILHELMSON, A.; RITALA, A.; GIBSON, B. R. Malting, Brewing, and Distilling. In: **Barley: Chemistry and Technology: Second Edition.** Elsevier, 2016. p. 193-222.

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

TALENS-PERALES, D.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: Functions and Characteristics. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 532–538.

TAN, H.; HU, Y.; HE, J.; WU, L.; LIAO, F.; LUO, B.; HE, Y.; ZUO, Z.; REN, Z.; ZHONG, Z.; PENG, G.; DENG, J. Zearalenone degradation by two *Pseudomonas* strains from soil. **Mycotoxin Research**, v. 30, n. 4, p. 191–196, 2014.

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

TANG, H.; PENG, X.; LI, X.; MENG, X.; LIU, B. Biodegradation of mycotoxin patulin in apple juice by calcium carbonate immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 88, p. 69-74, 2018.

TARAZONA, A.; GÓMEZ, J. V.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M.; ROMERA, D.; MATEO, E. M. Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. **Food Control**, v. 118, p. 107370, 2020.

TATAY, E.; FONT, G.; RUIZ, M. J. Cytotoxic effects of zearalenone and its metabolites and antioxidant cell defense in CHO-K1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p. 43–49, 2016.

TINYIRO, S. E.; YAO, W.; SUN, X.; WOKADALA, C.; WANG, S. Scavenging of Zearalenone by *Bacillus* strains-in vitro. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 304–309, 2011.

TOIDA, J.; KONDOH, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1199-1203, 1995.

TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M.; DAKOVIĆ, A.; ROTTINGHAUS, G.; MATIJAŠEVIĆ, S.; DURIČIĆ, M. Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 61, n. 1–3, p. 173–180, 2003.

TRENHOLM, H. L.; CHARMLEY, L. L.; PRELUSKY, D. B.; WARNER, R. M. Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 40, n. 11, p. 2147-2151, 1992.

TRIPATHI, S.; MISHRA, H. N. Modeling and optimization of enzymatic degradation of aflatoxin B1 (AFB1) in red chili powder using response surface **methodology. Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 770–780, 2011.

ÜLKER, S.; KARAOĞLU, Ş. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 385-390, 2012.

ULLRICH, S. Barley: Production, improvement, and uses. John Wiley & Sons, v. 12 2010.

ULSON DE SOUZA, S. M. A. G.; FORGIARINI, E.; ULSON DE SOUZA, A. A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 1073–1078, 2007.

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

USDA - United States Department of Agriculture. Beer. National Nutrient Database for Standard Reference. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Disponível em https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/789593/nutrients. Acesso em: 26 de maio de 2020.

UTERMARK, J.; KARLOVSKY, P. Role of Zearalenone Lactonase in Protection of Gliocladium roseum from Fungitoxic Effects of the Mycotoxin Zearalenone. Applied and Environmental Microbiology, v. 73, n. 2, p. 637–642, 2007.

UTSUGI, A.; KANDA, A.; HARA, S. Lipase specificity in the transacylation of triacylglycerin. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 3, p. 123-132, 2009.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69–85, 2006.

VALETTI, N. W.; PICÓ, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 119, p. 1–6, 2013.

VANDENBERGHE, L.; KARP, S. G.; BINDER PAGNONCELLI, M. G.; VON LINSINGEN TAVARES, M.; LIBARDI JUNIOR, N.; VALLADARES DIESTRA, K.; VIESSER, J. A.; SOCCOL, C. R. Classification of enzymes and catalytic properties. **Biomass, Biofuels, Biochemicals**, p. 11–30, 2020.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 321–328, 2005.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, n. 1–2, p. 1–7, 2000.

VEITCH, N. C.; WILLIAMS, R. J. P. Two-dimensional ¹H-NMR studies of horseradish peroxidase C and its interaction with indole-3-propionic acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 189, n. 2, p. 351–362, 1990.

VEKIRU, E.; HAMETNER, C.; MITTERBAUER, R.; RECHTHALER, J.; ADAM, G.; SCHATZMAYR, G.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a Novel Nonestrogenic Metabolite. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2353–2359, 2010.

VELDE, F. VAN DE; RANTWIJK, F. VAN; SHELDON, R. A. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 73–80, 2001.

VENKATARAMANA, M.; CHANDRA NAYAKA, S.; ANAND, T.; RAJESH, R.; AIYAZ, M.; DIVAKARA, S. T.; MURALI, H. S.; PRAKASH, H. S.; LAKSHMANA RAO, P. V. Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 335–342, 2014.

VENTURINI FILHO, W. Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia. Editora Blucher, 2018.

VERGER, R.; DE HAAS, G. H.; SARDA, L.; DESNUELLE, P. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 188, n. 2, p. 272-282, 1969.

VERHAGEN, L. C. Beer Flavor. In: Comprehensive Natural Products II. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 3, p. 967–997.

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

VIDAL, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 133–138, 2013.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, n. 1–2, p. 321–326, 2000.

VUJČIĆ, Z.; JANOVIĆ, B.; LONČAR, N.; MARGETIĆ, A.; BOŽIĆ, N.; DOJNOV, B.; VUJČIĆ, M. Exploitation of neglected horseradish peroxidase izoenzymes for dye decolorization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p. 124–127, 2015.

WAGNER, F. W. Preparation of metal-free enzymes. In: Methods in Enzymology. Academic Press, 1988. p. 21-32.

WAGNER, M.; NICELL, J. A. Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 485–495, 2001.

WANG, G.; CHEN, W.; HU, J.; FAN, B.; SHI, J.; XU, J. Preparative isolation and purification of zearalenone from rice culture by combined use of macroporous resin column and high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1110–1111, p. 43–50, 2019.

WANG, G.; YU, M.; DONG, F.; SHI, J.; XU, J. Esterase activity inspired selection and characterization of zearalenone degrading bacteria *Bacillus pumilus* ES-21. Food Control, v. 77, p. 57–64, 2017.

WASKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; BOCIANOWSKI, J.; GOLINSKI, P. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC – MS/MS method. **Food Microbiology.** v. 36, p. 426-431, 2013.

WEEKS, M. Beer and Brewing in America. New York: United States Brewers Foundation, 1949.

WEI, W.; QIAN, Y.; WU, Y.; CHEN, Y.; PENG, C.; LUO, M.; XU, J.; ZHOU, Y. Detoxification of ochratoxin A by *Lysobacter* sp. CW239 and characteristics of a novel degrading gene carboxypeptidase cp4. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113677, 2020.

WESTERMANN, D. H.; HUIGE, N. J. Beer Brewing. In: Microbial Technology. Academic Press, 1979. p. 1-37

WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality.** Geneva, v. 216, p. 303-304, 2011.

WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. Lipases: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, 1994.

WRAY, E. Common faults in beer. In: **The Craft Brewing Handbook**. Woodhead Publishing, 2020. p. 217-246.

WU, F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. Animal Feed Science and Technology, v. 137, n. 3–4, p. 363–374, 2007.

WU, J.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; TAYLOR, K. E. Effect of H₂O₂ addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 72, n. 5, p. 881–886, 1994.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria. In: **Beer in health and disease prevention**. Academic Press, 2009. p. 3-16.

XIAO, Y.; LIU, B.; WANG, Z.; HAN, C.; MENG, X.; ZHANG, F. Effective degradation of the mycotoxin patulin in pear juice by porcine pancreatic lipase. Food and Chemical **Toxicology**, v. 133, p. 110769, 2019.

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

XU, W.; HAN, X.; LI, F. Co-occurrence of multi-mycotoxins in wheat grains harvested in Anhui province, China. **Food Control**, v. 96, p. 180-185, 2019

YADAV, R. P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 28, n. 3, p. 243-249, 1998.

YE, F. X.; ZHU, R. F.; LI, Y. Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 148–153, 2009.

YILDIZ, T.; YAŞA, H.; HASDEMIR, B.; YUSUFOĞLU, A. S. Different bio/Lewis acidcatalyzed stereoselective aldol reactions in various mediums. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 148, n. 8, p. 1445-1452, 2017.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 384–391, 2007.

YU, Y.; QIU, L.; WU, H.; TANG, Y.; LAI, F.; YU, Y. Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter* sp. SM04 into smaller estrogenic products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2675–2681, 2011.

YU, Y.; WU, H.; TANG, Y.; QIU, L. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 121–126, 2012.

ZAKHAROVA, G. S.; UPOROV, I. V; TISHKOV, V. I. Horseradish peroxidase: modulation of properties by chemical modification of protein and heme. **Biochemistry**, v. 76, n. 13, p. 1391-1401, 2011.

ZARNKOW, M. Beer. In: Encyclopedia of Food Microbiology. [s.l.] Academic Press, 2014. v. 1, p. 209–215.

ZHANG, H.; DONG, M.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; LI, J.; ZHANG, X. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 416–423, 2016.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 16–25, 2005.

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

ZHAO, Z.; LIU, N.; YANG, L.; WANG, J.; SONG, S.; NIE, D.; YANG, X.; HOU, J.; WU, A. Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. **Food Control**, v. 57, p. 362–369, 2015b.

ZHU, Y.; HASSAN, Y. I.; WATTS, C.; ZHOU, T. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. Animal Feed Science and Technology, v. 216, p. 19–29, 2016.

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F.; ANGELINI, S.; DE SANTIS, B.; FAID, M.; BENLEMLIH, M.; MINARDI, V.; MIRAGLIA, M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, v. 17, n. 11, p. 868–874, 2006.

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

ZOUAOUI, N.; SBAII, N.; BACHA, H.; ABID-ESSEFI, S. Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. **Food Control**, v. 51, p. 356–360, 2015.