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

REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE OCRATOXINA A POR AÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE

NÁTHALI SAIÃO NORA

PROFª. DRA. JAQUELINE GARDA BUFFON
ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS
2015

Náthali Saião Nora

REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE OCRATOXINA A POR AÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE

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

RIO GRANDE, RS
2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, David e Sandra, por todo o amor e educação que me deram, por sempre acreditarem em mim, aceitarem minhas decisões e quererem o meu bem. Serei grata eternamente! Á todos os meus familiares, por entenderem a minha ausência algumas vezes e por acreditarem que eu seria capaz de concluir mais essa etapa.

Ao meu namorado Rafael, que além de namorado é meu amigo, companheiro e que mesmo nos momentos em que eu estava triste e nervosa, ele estava do meu lado, me apoiando, aguentando meu mau humor e me dizendo palavras de ânimo. Obrigada por estar sempre do meu lado e não desistir de mim.

À minha best Annie. Uma pessoa que eu admiro muito! Obrigada por ser meu braço direito e esquerdo, por me botar pra cima, por me ouvir e por sempre estar do meu lado. Obrigada pelos conselhos, pela ajuda nos cálculos e por me carregar pra FURG todos os dias. És muito importante pra mim e espero que nossa amizade dure eternamente. Passamos por momentos complicados, mas sobrevivemos! Torço muito por ti e espero que tenhas muito sucesso na tua vida. E nunca te esquece... O QUE É NOSSO TÁ GUARDADO!

Á Anelise, por me ouvir, por sempre me dirigir palavras de conforto, por rezar por mim e por acreditar que eu era capaz de vencer as dificuldades. A tua presença e a tua risada, sempre faziam eu me sentir melhor. És uma pessoa iluminada!

Á Larine, que mesmo estando longe estava sempre disposta a ajudar. Como já falei várias vezes, sou fã dela! Uma pessoa inteligentíssima que, com certeza, esta no lugar certo. É apaixonada pelo que faz e muito dedicada. Quando crescer, quero ser que nem tu, Lalá!! Obrigada por todas as “olhadinhas”, pelas dicas sempre pertinentes, POR TUDO. Volta logo!!!

Á Priscila, por sempre me ajudar, por me incentivar a não desistir e sempre confiar em mim! Obrigada por também aguentar os meus lamentos e por ser minha companheira de ataques aos sacos das bolachas e das balas. Com as tuas histórias extremamente detalhadas sempre me distraias e me mostravas como é bom curtir a vida ao extremo.

Gurias, torço muito por todas vocês e quero vocês sempre comigo!

Á minha orientadora Jaqueline, pela oportunidade, pelo apoio, pela confiança e, principalmente, pela paciência. Jaque, obrigada, também, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pelas conversas informais e por me fazer acreditar que sou capaz.

Á todo o pessoal do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, pela convivência, pelos momentos de descontração, pela ajuda e por nunca me deixarem desanimar.

Aos membros da banca pela paciência em corrigir este trabalho e pelas as sugestões dadas. Em especial a Professora Eliana, que desde a iniciação científica me orientou e sempre acreditou em mim. Profe, obrigada por todos os ensinamentos e pelo apoio.

Á CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, não tenho palavras pra expressar a minha gratidão a cada um de vocês. Pessoal, MUITO OBRIGADA POR TUDO!

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”

(Henry Ford)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS iii
LISTA DE FIGURAS iv
RESUMO v
ABSTRACT vi
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 2
2.1 Objetivo geral 2
2.2 Objetivos específicos 2
3 REVISÃO DA LITERATURA 3
3.1 Micotoxinas 3
3.2 Ocratoxina A (OTA) 4
3.3 Métodos de degradação de micotoxinas 8
3.4 Enzima Peroxidase 12
4 MATERIAL E MÉTODOS 17
4.1 Material 17
4.1.1 Farelo de arroz e padrões de ocratoxina A e peroxidase. 17
4.1.2 Instrumentação 17
4.1.3 Reagentes e solventes 17
4.2 Métodos 17
4.2.1 Preparo da solução padrão de ocratoxina A 17
4.2.2 Obtenção da enzima peroxidase 18
4.2.2.1 Atividade da peroxidase extraída das frações granulométricas do farelo de arroz 18
4.2.2.2 Caracterização química da fonte enzimática 18
4.2.2.3 Extração enzimática 18
4.2.2.4 Purificação enzimática 18
4.2.2.5 Determinação da atividade enzimática 19
4.2.3 Extração e quantificação da ocratoxina A 20
4.2.4. Determinação da cinética de redução 21
4.2.5. Determinação da afinidade entre a ocratoxina A e as enzimas peroxidase 22
4.2.6. Avaliação do mecanismo de redução da ocratoxina A 23
4.2.7. Avaliação da aplicabilidade da peroxidase do farelo de arroz em sucos de uva 23

4.2.8 Tratamento de dados 24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
5.1 Frações granulométricas do farelo de arroz e seu efeito na atividade da peroxidase 25
5.2 Caracterização química do farelo de arroz..... 26
5.3 Extração da ocratoxina A..... 26
5.4. Redução dos níveis da ocratoxina A por ação da enzima peroxidase em meio reacional..... 28
5.5 Determinação dos parâmetros K_M e $V_{máx}$ para as peroxidases. 33
5.6 Avaliação da aplicabilidade da peroxidase do farelo de arroz em sucos de uva 37
6 CONCLUSÃO..... 43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Limites máximos toleráveis de ocratoxina A em alimentos. 6
Tabela 2 Rendimento granulométrico, proteína solúvel e atividade da enzima peroxidase em cada fração obtida do farelo de arroz. 25
Tabela 3 Parâmetros analíticos avaliados em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL). 27
Tabela 4 Recuperação de ocratoxina A em sistema aquoso. 28
Tabela 5 Ocratoxina A após a ação da peroxidase comercial e da obtida de farelo de arroz na proporção 1:10 (E:S) e com concentração de OTA inicial de 20 ng mL^{-1}. 30
Tabela 6 Ocratoxina A após a ação da peroxidase comercial e da obtida de farelo de arroz na proporção 1:5 (E:S) e com concentração de OTA inicial de 20 ng mL^{-1}. 30
Tabela 7 Ocratoxina A após a ação da peroxidase comercial e da obtida de farelo de arroz na proporção 8:1 (E:S) para a comercial e concentração de OTA inicial de 10 ng mL^{-1}.... 31
Tabela 8 K_M e $V_{máx}$ para peroxidase comercial e a obtidas de farelo de arroz..... 36
Tabela 9 Contaminação natural e percentuais de recuperação de OTA em sucos de uva... 39
Tabela 10 Ocratoxina A após a ação da peroxidase obtida do farelo de arroz nos sucos de uva e contaminação de 13 ng mL^{-1}. 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da ocratoxina A 5
Figura 2 Esquema cíclico da ação das peroxidases. 13
Figura 3 Gráfico de velocidade versus concentração de substrato e equação de Michaelis-Menten 16
Figura 4 Equação e gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk 16
Figura 5 Cromatograma de eluição da ocratoxina A. 28
Figura 6 Gráfico de velocidade versus concentração de ocratoxina A (OTA) para a peroxidase comercial 34
Figura 7 Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a peroxidase comercial ... 34
Figura 8 Gráfico de velocidade versus concentração de ocratoxina A (OTA) para a peroxidase do farelo de arroz 35
Figura 9 Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a peroxidase do farelo de arroz 35

RESUMO

A ocratoxina A é um composto formado a partir do metabolismo secundário de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Uma vez que a presença dessa micotoxina nos alimentos causa sérios danos à saúde humana e animal, surge o interesse pelo desenvolvimento de métodos que visem a redução dos seus níveis em diferentes matrizes. Diversos processos de descontaminação têm sido propostos, sendo que os métodos de redução biológica tem recebido destaque. Esses métodos consistem na aplicação de micro-organismos ou de suas enzimas, o que gera a biotransformação ou degradação da toxina produzindo metabólitos com menor ou nenhuma toxicidade. Diante disso, o objetivo geral do trabalho foi avaliar o efeito da peroxidase na redução dos níveis de ocratoxina A. As enzimas peroxidases testadas foram a comercial e a obtida do farelo de arroz. Para a extração enzimática foram utilizadas as frações granulométricas do farelo de arroz de 48 a 100 mesh, sendo estas frações caracterizadas quimicamente. A peroxidase foi extraída do farelo de arroz em tampão 10 mM pH 5,0 e purificada por partição trifásica, obtendo 77,1% de recuperação e 9,2 para o fator de purificação. O método utilizado para a extração da ocratoxina A do sistema aquoso foi por partição líquido-líquido utilizando como solvente o clorofórmio, sendo esse método validado segundo os parâmetros de linearidade (0,1 a 20 ng mL^{-1}), coeficientes de correlação (0,9997) e de determinação (0,9994), e limites de detecção (0,02) e quantificação (0,03). A afinidade entre as peroxidases e a ocratoxina A foi verificada segundo os parâmetros de K_M e $V_{máx}$, resultando em 0,00027 mM e 0,000015 mM min^{-1}, respectivamente, para a peroxidase comercial, e 0,0065 mM e 0,000031 mM min^{-1} para a obtida do farelo de arroz. Com relação aos percentuais de redução de ocratoxina A, foram avaliadas 3 proporções enzima:substrato (1:10, 1:5 e 8:1 para a comercial e 1:10, 1:5 e a com atividade de 0,063 U mL^{-1} para a do farelo), sendo que as proporções que forneceram maior redução foi a de 8:1 para a enzima comercial (0,063 U mL^{-1}) e a correspondente a 0,063 U mL^{-1} para a enzima obtida do farelo. Os percentuais de redução de ocratoxina A foram de 59% para a peroxidase comercial em 300 min e 41% para a peroxidase do farelo de arroz em 1440 min. O efeito de adsorção da ocratoxina A pela enzima peroxidase foi descartado uma vez que foi realizada a sua hidrólise com a enzima pepsina e verificado um percentual de 2,7% de adsorção, demonstrando que a redução foi por ação enzimática. A enzima obtida de farelo de arroz com atividade de 0,063 U mL^{-1} foi aplicada em suco de uva tinto e branco. Observou-se que para o primeiro não houve redução significativa, enquanto que para o segundo a redução foi de 17%. Neste trabalho, então, foi possível verificar a capacidade de redução dos níveis da ocratoxina A pela enzima peroxidase, tanto em sistema aquoso como no suco de uva integral branco.

Palavras-chave: descontaminação, enzima, micotoxina

ABSTRACT

Ochratoxin A is a compound formed by secondary metabolism of fungi from genera *Aspergillus* and *Penicillium*. The mycotoxin presence in food can cause serious damages to human and animal health. This aspect improves the interest in developing methods aimed at reducing their levels in different matrices. Several decontamination procedures have been proposed, and the biological reduction methods have been highlighted. These methods consist in the application of micro-organisms or their enzymes, which generates the biotransformation or degradation of the toxin producing metabolites with less or no toxicity. Thus, the overall objective of the study was to evaluate the effect of peroxidase in reducing ochratoxin A levels. The peroxidases enzymes tested were commercial and extracted from rice bran. For the enzyme extraction were used the particle size fraction 48 to 100 mesh of rice bran and this fraction was chemically characterized. The peroxidase was extracted from rice bran in buffer 10 mM pH 5.0 and purified by three-phase partitioning, yielding 77.1% of recovery and 9.2 for the purification factor. The ochratoxin A extraction method used was by liquid-liquid partition using chloroform as a solvent and this method was validated according to linearity (0.1 to 20 ng mL^{-1}), correlation coefficient (0.9997) and coefficient of determination (0.9994) and limits of detection (0.02 ng mL^{-1}) and quantification (0.03 ng mL^{-1}). The enzymes and ochratoxin A affinity was found according to the parameters K_M and $V_{máx}$, resulting in 0.00027 mM and 0.000015 mM min^{-1}, respectively, for commercial peroxidase, and 0.0065 mM and 0,000031 mM min^{-1} to rice bran enzyme. With respect to the percentage of ochratoxin A reduction, 3 proportion enzyme:substrate (1:10, 1: 5 and 8: 1 for commercial and 1:10, 1: 5 and with the activity of 0,063 U ml^{-1} for rice bran enzyme) were assessed. The proportion that provided the greatest reduction was 8:1 for the commercial enzyme (0.063 U mL^{-1}) and corresponding to 0.063 U mL^{-1} enzyme from rice bran. The percentage reduction of ochratoxin A obtained was 59% for the commercial peroxidase at 300 min and 41% for the rice bran peroxidase at 1440 min. The adsorption effect of ochratoxin A by the enzyme peroxidase has been dropped since its hydrolysis was carried out with pepsin enzyme and verified a percentage adsorption of 2.7%, showing that the reduction was by enzymatic action. The rice bran enzyme with 0,063 U mL^{-1} activity was applied in red and white grape juice. For the first juice no significant reduction was observed, whereas for the second the reduction percentage obtained was 17%. In this work was possible to verify the capacity reduction of ochratoxin A levels by peroxidase enzyme in both aqueous system and the white grape juice.

Key-word: decontamination, enzyme, mycotoxin

1 INTRODUÇÃO

A ocratoxina A é um composto formado a partir do metabolismo secundário de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* quando estes encontram-se em situações adversas durante o armazenamento inadequado de produtos alimentícios. Uma vez que a presença dessa micotoxina causa sérios danos à saúde humana e animal, surge o interesse pelo desenvolvimento de métodos que visem a redução desse contaminante (KHOURY; ATOUI, 2010).

Diversos processos de descontaminação têm sido propostos, dentre eles a utilização de métodos físicos e químicos. No entanto, esses métodos não são aceitos para uso prático, uma vez que interferem no valor nutricional e na palatabilidade dos alimentos. Como uma alternativa, tem-se estudado métodos de redução biológica das micotoxinas, que consistem na aplicação de micro-organismos ou de suas enzimas, o que gera a transformação ou degradação da toxina produzindo metabólitos com menor ou nenhuma toxicidade. Além disso, as características dos alimentos seriam preservadas, através da utilização de condições brandas de processo sem o uso de substâncias químicas nocivas (BATA; LÁSZTITY, 1999).

Alguns micro-organismos e enzimas têm sido investigados para a aplicação na redução biológica de micotoxinas, tais como *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011), ou ainda carboxipeptidase A e lipases (AMÉZQUETA et al., 2009). A peroxidase, por sua vez, é uma enzima pouco estudada nesse contexto, mas que poderia ser de interesse uma vez que apresenta a capacidade de oxidar compostos orgânicos e inorgânicos, doadores de elétrons, na presença de um cofator, o peróxido de hidrogênio. Diante desse modo de ação relacionado à estrutura da ocratoxina A, acredita-se que a peroxidase seja promissora na redução da referida micotoxina (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Outro aspecto positivo da peroxidase é que ela pode ser obtida de coprodutos agroindustriais, como por exemplo, o farelo de arroz. Com isso, sua utilização torna-se uma alternativa à utilização de uma enzima comercial e, também, para agregar valor ao farelo de arroz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da peroxidase na redução dos níveis de ocratoxina A.

2.2 Objetivos específicos

Estudar as condições ideais para a extração da micotoxina em sistema aquoso.

Avaliar a cinética de redução dos níveis da micotoxina através da avaliação da ação da peroxidase comercial e da peroxidase extraída do farelo de arroz.

Avaliar a afinidade das enzimas estudadas com a ocratoxina A.

Verificar a aplicabilidade da peroxidase extraída do farelo de arroz quanto a degradação da micotoxina em suco de uva.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos toxigênicos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillium*, quando estes se encontram em situações adversas. As principais características destes compostos são de atuarem em baixas concentrações, possuírem baixa massa molecular, um amplo espectro de toxicidade e serem não-imunogênicos e termoestáveis. A biossíntese desses metabólitos pode ocorrer durante o período de pré e pós-colheita e ainda durante toda a cadeia produtiva (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). Os tricotecenos, por exemplo, são produzidos ainda no campo enquanto que a ocratoxina A e as aflatoxinas são sintetizadas no pós-colheita, sendo que a contaminação por aflatoxinas também pode ocorrer no campo (TURNER et al., 2009). Além disso, essa síntese está relacionada com o desbalanço de nutrientes e a variação das condições ambientais tais como atividade da água do produto armazenado, temperatura, umidade, composição gasosa do ambiente, dentre outros (VARGA et al., 2005). Um exemplo que se pode destacar é o fungo da espécie *Aspergillus parasiticus*. Este micro-organismo possui a capacidade de deslocar a biossíntese da aflatoxina B1 para a aflatoxina G1 ou vice-versa, conforme a variação da atividade de água e da temperatura do meio em que se encontra, demonstrando, assim, a influência dos fatores ambientais na síntese das micotoxinas (SCHMIDT-HEYDT et al., 2010 *apud* SCHMIDT-HEYDT et al., 2012).

Em geral, as micotoxinas contaminam grande parte dos produtos agrícolas e alimentos produzidos, provocando sérios danos às lavouras, à produção de alimentos e à saúde humana e animal (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011). A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre através de grãos, frutas e de produtos derivados dessas matérias-primas, tais como vinho, cerveja, frutas secas, dentre outros (ALGÜL; KARA, 2014; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; CAST, 2003; CASTELLARI et al., 2001; IMPERATO et al., 2011; KUMAR et al., 2012; LASRAM et al., 2012; MAJEED et al., 2013; SHUNDO et al., 2006; WASKIEWICZ et al., 2013). Além disso, produtos de origem animal, tais como leite, queijo e carnes, também são considerados veículos de contaminação. Uma vez que esses metabólitos sejam ingeridos surgem as micotoxicoses, denominação dada aos danos causados ao organismo decorrente dessa ingestão. A gravidade desse dano depende da toxicidade da micotoxina, do grau de exposição, da idade

e estado nutricional do indivíduo e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais o indivíduo esteja exposto (PERAICA et al., 2000).

Segundo Sobczack (2013), a FAO estima que cerca de 25% dos alimentos produzidos mundialmente estejam contaminados com micotoxinas, sendo o milho um dos cereais mais predispostos a tal contaminação. Estudos demonstram que aproximadamente 45% dos grãos produzidos no Brasil estão contaminados com micotoxinas, representando em torno de 25 milhões de toneladas de milho por ano. Além disso, o autor destaca que 45,9% das rações animais produzidas no Brasil, no ano de 2009, apresentaram contaminação. Dentre as micotoxinas com grande importância agroeconômica e na saúde pública, estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas entre outras (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; CAST, 2003; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; PERAICA et al., 2000).

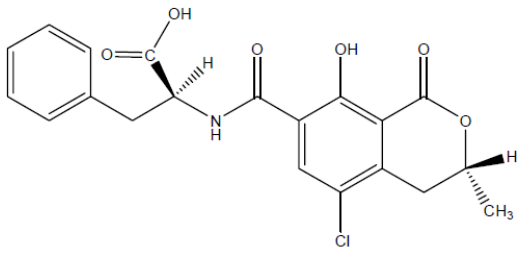
O Brasil dispõe de legislação para algumas micotoxinas desde 2011. Os limites máximos toleráveis para micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona, em diversos alimentos, matérias primas e bebidas estão apresentados na resolução de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011).

3.2 Ocratoxina A (OTA)

A ocratoxina A (OTA) foi primeiramente descoberta por Van der Merve et al. (1965), na África do Sul, como um metabólito fúngico tóxico para animais, produzido por uma cepa de *Aspergillus ochraceus*. Atualmente, os gêneros mais conhecidos como produtores da ocratoxina A são *Aspergillus* (em regiões de clima temperado da Europa e da América do Norte) e *Penicillium* (em regiões de climas mais quentes, como a América do Sul e África) (RINGOT et al., 2006; SCHMIDT-HEYDT et al., 2012). A ocratoxina A é um pentacetídeo formado por uma isocumarina ligada a uma fenilalanina e possui ainda, em sua estrutura, uma molécula de cloro, principal responsável por sua toxicidade (Figura 2). Com massa molar de 403,8 g/mol, a ocratoxina A apresenta uma estrutura cristalina, fluorescência verde e solubilidade em solventes polares orgânicos quando em meio ácido. Estabilidade a acidez e a altas temperaturas também são características dessa molécula (KHOURY; ATOUI, 2010). Cereais, uvas, café, especiarias e cacau são alguns alimentos em que a ocratoxina A pode ser encontrada e, devido a sua termoestabilidade, pode ser encontrada ainda nos produtos derivados dessas matérias-primas (AMÉZQUETA et al., 2009).

Em 1993 a IARC (International Agency for Research on Cancer) classificou a ocratoxina A como possível carcinogênica para humanos (grupo 2B), o que despertou o interesse no estudo da toxicidade dessa molécula. O efeito marcante dessa micotoxina é a sua nefrotoxicidade, sendo que, além disso, possui característica de ser hepatotóxica, teratogênica, neurotóxica, imunotóxica e, em nível molecular, inibe a biossíntese proteica através da competição pela fenilalanina. A ocratoxina A também está relacionada com a inibição da fertilidade e com a Nefropatia Endêmica dos Balcãns, uma doença renal crônica encontrada no Sudeste da Europa (KHOURY; ATOUI, 2010; RINGOT et al., 2006; SCHMIDT-HEYDT et al., 2012).

Figura 1 Estrutura química da ocratoxina A



Fonte: KHOURY; ATOUI, 2010.

Diante dos riscos a saúde, do crescimento do comércio global e do aumento do transporte de alimentos para diferentes países, se faz necessário o desenvolvimento de regulamentos com o objetivo de limitar o conteúdo de micotoxinas em alimentos e produtos agrícolas. Para isso, no Brasil, a resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre os limites máximos tolerados para as micotoxinas em alimentos, apresenta os níveis de ocratoxina A em vinho e seus derivados, feijão, especiarias, entre outros, sendo que estes variam entre 2 μg kg^{-1} até 30 μg kg^{-1}, dependendo do alimento (Tabela 1). No entanto, em janeiro de 2014, entrou em vigor o anexo III onde o limite máximo tolerado de ocratoxina A em cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada passou de 10 para 20 μg kg^{-1} (BRASIL, 2011). A União Européia, por sua vez, também apresenta níveis máximos de ocratoxina A estabelecidos para alguns alimentos. Para cereais não processados, por exemplo, esse nível é de até 5 μg/kg e para produtos derivados desses cereais é de 3 μg kg^{-1} (EUROPEAN COMMISSION (EC), 2006).

Tabela 1 Limites máximos toleráveis de ocratoxina A em alimentos.

Alimento	LMT (µg kg^{-1})
Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
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 (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	30
Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
Produtos de cacau e chocolate	5
Amêndoa de cacau	10
Frutas secas e desidratadas	10

Fonte: BRASIL (2011)

Com relação à ocorrência de ocratoxina A em cereais e seus produtos, Majeed et al. (2013), determinaram que amostras de arroz, milho e produtos de milho, apresentavam níveis médios de OTA de 12,94 µg kg^{-1}, 5,29 µg kg^{-1} e 3,69 µg kg^{-1}, respectivamente. Tais níveis apresentam-se acima dos permitidos pela União Européia (5 µg kg^{-1}) para o arroz e para o milho, porém abaixo dos níveis estabelecidos pela legislação brasileira (20 µg kg^{-1}). No entanto, os produtos de milho estudados apresentam-se dentro dos limites estipulados pelas legislações citadas. Algül; Kara (2014) avaliaram a presença de OTA em farinhas de milho de diferentes cidades da Turquia e verificaram que os níveis variaram de 0,37 µg kg^{-1} a 25,34 µg kg^{-1}, dependendo da origem. Kumar et al. (2012) verificaram a presença de OTA em amostras de trigo de diferentes regiões da Índia, sendo que 58% das amostras estavam contaminadas com quantidades detectáveis de OTA

variando de 1,36 a 21,17 μg kg^{-1} e 26% das amostras excederam o nível de 5 μg $kg^{-1,}$ permitido pela União Européia.

Em diferentes tipos de especiarias e ervas estudadas por Waskiewicz et al. (2013), foi observado que a pimenta de caiena, o grão da pimenta preta entre outros, apresentavam níveis de contaminação de 45,64 μg kg^{-1} e 23,57 μg kg^{-1}, respectivamente. Considerando que os níveis permitidos para esses alimentos são de 15 μg kg^{-1}, para a União Européia, e de 30 μg kg^{-1}, para a legislação brasileira, observa-se que ambas as especiarias em destaque apresentam-se fora dos limites aceitáveis na União Européia. No Brasil, por sua vez, a pimenta de caiena apresenta-se fora dos limites, enquanto que o grão da pimenta preta apresenta contaminação dentro do permitido pela legislação.

Dentro dos vinhos e seus derivados, Castellari et al. (2001) verificaram a presença de OTA em dois vinho tintos analisados sendo que os teores encontrados foram de 3,8 e 1,5 ng mL^{-1} estando somente o de menor incidência de acordo com a legislação brasileira e o outro não. Com relação à contaminação de sucos de uva por OTA, Shundo et al. (2006) verificaram que todas as amostras de sucos analisadas apresentavam-se de acordo com as legislações uma vez que a OTA não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Para os vinhos, também analisados por estes autores, a contaminação por OTA foi encontrada em 9 dos 29 vinhos tintos brasileiros em níveis variando de 0,10 a 1,33 ng mL^{-1} e em 18 dos 34 vinhos tintos importados, com níveis variando de 0,03 a 0,32 ng $mL^{-1.}$ Considerando o limite máximo permitido pela legislação brasileira para esses produtos (2 ng mL^{-1}), observa-se que todos estão abaixo dos limites máximos tolerados. O nível de contaminação de OTA em uvas foi avaliada por Lasram et al. (2012). Os autores verificaram que 58% das uvas produzidas em diferentes áreas geográficas da Tunisia apresentaram níveis detectáveis de OTA que variaram de 0,05 a 5,85 μg L^{-1}, e que apenas 4 das 39 amostras excederam o limite fixado pela União Européia para vinhos e sucos de uva. Imperato et al. (2011), por sua vez, relataram que os níveis de OTA encontrados em amostras de uva passa foram de 10 μg kg^{-1}, estando este exatamente no limite permitido pela legislação brasileira. Woese (2000) avaliou a presença de OTA em 37 sucos de uva e verificou que 29 deles foram positivos, sendo que 8 apresentaram níveis de OTA superiores ao limite máximo tolerável estabelecido pela União Européia (0,5 ng mL^{-1}). No entanto, mais dados relacionados á ocorrência de OTA em sucos de uva são necessários.

Além disso, são necessárias medidas que unifiquem os limites máximos permitidos e também que sejam estudados métodos de degradação desses metabólitos uma vez que se tem conhecimento dos efeitos tóxicos causados por eles.

3.3 Métodos de degradação de micotoxinas

Uma vez que as micotoxinas estejam presentes nos alimentos, é difícil reduzir sua concentração devido à sua estabilidade. Por esse motivo, muitos procedimentos têm sido desenvolvidos na tentativa de descontaminar tais produtos (COLE, 1986 *apud* BRYDEN, 2012). Os objetivos dos métodos de descontaminação consistem em destruir ou modificar as micotoxinas e, com isso, reduzir seus teores a níveis aceitáveis e seguros, evitando a alteração do valor nutricional do produto. Sendo assim, diferentes métodos físicos, químicos e biológicos têm sido estudados para a desintoxicação de produtos para a alimentação humana e animal. Dentre os métodos físicos destacam-se classificação, corte, moagem úmida e seca, lavagem, cozimento, extrusão, entre outros (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). Os químicos, por sua vez, constituem os tratamentos com ozônio, amônia, cloro, bissulfito de sódio, hidróxido de sódio e de cálcio, entre outros. No entanto, tais métodos, não têm sido aceitos para uso prático, pois utilizam substâncias químicas nocivas, não apresentam resultados satisfatórios, além de alguns utilizarem condições drásticas, o que gera perdas significativas no valor nutricional e na palatabilidade dos produtos (BATA; LÁSZTITY, 1999). Então, como uma alternativa, têm-se estudado métodos de degradação biológica que consistem na aplicação de células de um determinado micro-organismo, ou de suas enzimas, o que gera a biotransformação ou degradação da toxina produzindo metabólitos menos tóxicos ou que não apresentem toxicidade ao serem ingeridos (AMÉZQUETA et al, 2009; BASAPPA; SHANTHA, 1996 *apud* SWEENEY; DOBSON, 1998; BATA; LÁSZTITY, 1999).

Os métodos físicos têm sido utilizados com graus variáveis de sucesso. Segundo Bullerman; Bianchini (2007) as etapas de classificação e corte podem reduzir as concentrações das micotoxinas através da remoção do material contaminado, no entanto não destroem os metabólitos. Sydenham et al. (1994) utilizaram a lavagem como um método de descontaminação e encontraram que as concentrações de fumonisinas no milho foram reduzidas em 26-69%. Cenkowski et al. (2007) estudaram o efeito de vapor superaquecido na descontaminação de grãos de trigo e verificaram que uma redução de 52% na concentração de DON foi obtida a 185 °C durante 6 min de exposição. Além disso,

irradiação com raios gamma, micro-ondas ou luz ultravioleta têm sido utilizados e geralmente, diminuem a concentração das micotoxinas nos produtos testados (CAST, 2003). Para a degradação da OTA, especificamente, alguns métodos físicos, tais como processos de filtração, limpeza, torrefação e extrusão foram avaliados por Gambuti et al. (2005), Scudamore; Banks; MacDonald (2003), Castellanos-Onorio et al. (2011) e Scudamore; Banks; Guy (2004), respectivamente. Gambuti et al. (2005) avaliaram a filtração de vinho em membrana de 10 μm e verificaram que não ocorreu diminuição significativa nos níveis da OTA. Scudamore; Banks; MacDonald (2003), por sua vez, observaram uma redução de 2-3% de OTA em cevada utilizando apenas um processo de limpeza dos grãos. Os autores comentam que, ainda que haja uma redução na contaminação por OTA, esse nível é muito baixo, não garantindo a eficiência do método. Castellanos-Onorio et al. (2011) estudaram dois diferentes métodos de torrefação para café, a temperatura de 230°C, e verificaram que para a técnica de leito fluidizado, o percentual de redução encontrado foi de 75%. Para o cilindro rotativo, por sua vez, o percentual encontrado foi de 96%. No entanto, os autores comentam que a fim de se manter os benefícios antioxidantes do café, surge a busca pelo consumo de um café menos torrado e, uma vez que o processo de torrefação seja mais brando, a degradação da referida micotoxina se torna menos eficiente. Ainda nesse contexto, Scudamore; Banks; Guy (2004) verificou que com umidade de 17,5% a 191-196 °C, 31% de redução de ocratoxina A foi obtida utilizando o processo de extrusão da farinha de trigo integral. Ainda pode-se destacar o estudo de Vidal et al., (2015) que verificou o efeito da temperatura e do tempo de cozimento de produtos de padaria feitos a partir de trigo na redução de ocratoxina A. A máxima redução obtida foi a 200 °C durante 40 min (64%) enquanto que a 140°C, para o mesmo tempo, a redução encontrada foi de 21% .

Com relação aos métodos químicos, Abd Alla (1997) *apud* Zinedine et al. (2007) demonstrou que o percentual de degradação da micotoxina zearalenona, determinada em milho coletado no Egito, foi de 83,9% com 10% de H_2O_2 a 80ºC durante 16 h. Young et al. (1987) *apud* Jouany (2007) demonstraram, por sua vez, que tratamentos de milho contaminado com soluções de bissulfito de sódio a 80ºC durante 18 h convertia o DON em DON-sulfonado conjugado que parece não apresentar toxicidade para porcos. Em termos de métodos de degradação química de OTA, alguns são citados por Amézqueta et al. (2009) como sendo eficazes contra essa micotoxina, tais como peróxido de hidrogênio alcalino, hidróxido de sódio, monometilamina ou de amônio com tratamentos de hidróxido

de cálcio e soluções etanólicas. Além desses, a utilização de ozônio e de adsorventes também foi observada. McKenzie et al. (1997) estudaram a degradação de diversas micotoxinas utilizando ozônio e verificaram que tratamentos de 15 s com a utilização de uma solução de 10% de ozônio ocasionou uma redução de 32 μM a níveis não detectáveis de OTA em HPLC. Com relação aos adsorventes, alguns como aluminiosilicatos, carvão ativado, bentonita, caseinato de potássio entre outros, foram testados. Castellari et al. (2001) estudaram diversos adsorventes que poderiam ser utilizados em vinhos e verificaram que os adsorventes hidrofóbicos e carregados positivamente tais como carvões ativados, gel de sílica carregados positivamente, albumina de ovo, gelatina e o caseinato de potássio foram os mais eficazes na redução do teor de OTA em vinhos tintos. Com base nestas observações, os autores postularam que a OTA estava principalmente adsorvida através da carga negativa existentes no grupo carboxila do seu radical fenilalanina. Os autores também verificaram que o caseinato de potássio removeu mais de 82% de OTA quando utilizado a 150 g/hL. Var; Kabak; Erginkaya (2008) estudaram a adsorção de ocratoxina A de vinho branco utilizando carvão ativado e verificaram que o vinho contendo 5 ng mL^{-1} de ocratoxina A quando tratado com 1 mg mL^{-1} de carvão ativado resultou na adsorção de 87% da toxina disponível. Além desse adsorvente, os autores estudaram a bentonita para a redução de ocratoxina em vinho. No entanto, os resultados encontrados foram inferiores, uma vez que nas mesmas concentrações utilizadas para o carvão ativado e para a ocratoxina A (1 mg mL^{-1} e 5 ng mL^{-1}) o percentual de redução encontrado foi de 2,1%. Apesar desses resultados, o uso de adsorventes não tem sido incentivado devido à adsorção de alguns nutrientes e por causarem reações adversas nos consumidores (HUWIG et al, 2001; QUINTELA et al., 2013).

Dentro dos métodos biológicos são citados estudos que demonstram a capacidade de alguns gêneros de fungos filamentosos, protozoários, bactérias e leveduras, em degradar as micotoxinas. Ciegler et al. (1966) descreveram a capacidade de *Flavobacterium aurantiacum* B-184 em degradar irreversivelmente aflatoxinas em meio líquido. Faraj; Smith; Harran (1993), por sua vez, demonstraram que *Aspergillus niger, Rhizopus oryzae* e *Bacillus stearotherrnophilus* geraram uma degradação de aflatoxinas em, respectivamente, 80, 70 e 87%. Além disso, Varga et al. (2005) demonstraram que a zearalenona foi completamente degradada por isolados de *Rhizopus,* incluindo cepas de *R. stolonifer, R. oryzae* e *R. microsporus*. Niderkorn; Boudra; Morgavi (2006) investigaram a habilidade de espécies de bactérias ácidas, láticas e propiônicas de remover DON,

zearalenona e fumonisina B_1 e B_2 de meio de cultura contaminado, encontrando que a maior eficiência foi a da espécie lática. A remoção foi superior a 55% para DON, 82% para fumonisina B_1, 100% para fumonisina B_2 e 88% para zearalenona. Os autores acreditam que a redução tenha ocorrido por meio de ligação entre as micotoxinas e parede celular bacteriana, pois não foram observadas diferenças entre a incubação de bactérias viáveis e não viáveis e não foram observados produtos de degradação nos cromatogramas. Em termos de degradação da ocratoxina A, Varga et al. (2005) estudaram a aplicação de isolados de *Rhizopus* e verificaram que eles eram capazes de degradar mais de 95% da OTA durante 16 dias. Meca; Blaiotta; Ritieni (2010) avaliaram, por sua vez, a redução de OTA durante a fermentação de vinho Moscato italiano e verificaram que a sua concentração diminuiu 42,6% após 21 dias de fermentação para as 16 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Petruzzi et al. (2014) também avaliaram a capacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em degradar OTA e obtiveram até 57,2% de remoção. Abrunhosa; Santos; Venâncio (2002) avaliaram a capacidade de degradação de fungos filamentosos isolados de uvas portuguesas. Como resultado, 51 das 76 cepas testadas, predominantemente espécies de *Aspergillus*, foram positivas, podendo degradar mais de 80% da OTA inicial. Outros micro-organismos isolados das uvas, como por exemplo *Alternaria*, *Cladosporium* e *Penicillium* também apresentaram capacidades degradativas significativas. Ainda nesse contexto, Péteri et al. (2007) estudaram a degradação de OTA por leveduras produtoras de astaxantina, onde foi verificado mais de 90% de degradação da OTA inicial em 15 dias. Além disso, os autores comentam que uma das cepas analisadas tem a capacidade de converter OTA em ocratoxina α (OTα) e isso se dá pela ação da enzima carboxipeptidase, capaz de quebrar ligações peptídicas presentes na estrutura da OTA.

A tendência referente à redução da contaminação por micotoxinas estão relacionadas à utilização de enzimas. Liu et al. (1998) investigaram e confirmaram a capacidade de detoxificação da aflatoxina B_1 por multienzimas extraídas de *Armillariella tabescens*, principalmente quando a micotoxina encontrava-se em baixas concentrações. Das; Mishra (2000a) estudaram a degradação *in vitro* da mesma micotoxina, porém utilizando peroxidase (PO) extraída da raiz forte. Os percentuais de degradação obtidos foram comparados com os da PO comercial, sendo esses valores de 33,7% e 54,7%, respectivamente. A aplicação desse processo foi verificada pelos mesmos autores, onde foi realizado o estudo da degradação utilizando a mesma micotoxina e a mesma enzima, só

que dessa vez em amendoim (DAS; MISHRA, 2000b). Os resultados variaram de 28,1% até 53,2%, respectivamente para PO extraída da raiz forte e para a comercial. Para a degradação de ocratoxina A, Stander et al. (2000) realizaram uma triagem de hidrolases comerciais acerca da capacidade dessas enzimas em degradar a OTA a compostos não tóxicos. Das 23 lipases e esterases analisadas, apenas uma lipase obtida de *Aspergillus niger* apresentou essa capacidade. Abrunhosa; Santos; Venâncio (2006) estudaram a aplicação de proteases e de uma enzima bruta obtida de *Aspergillus niger* para a degradação de OTA. Para a protease A e para a pancreatina, foram obtidas atividades hidrolíticas de 87,3% e 43,4%, respectivamente, após incubação de 25 h. Os autores verificaram, também, que algumas enzimas comerciais não foram capazes de hidrolisar a OTA. Com relação à enzima bruta extraída de *Aspergillus niger*, foi obtida 99,8% de hidrólise.

Dados da literatura destacam a capacidade de micro-organismos em degradar micotoxinas, no entanto, a avaliação do seu sistema enzimático ou ainda de enzimas específicas quanto à redução de micotoxinas tem destaque referente a futura aplicação industrial. Relacionado à ocratoxina A, algumas enzimas como proteases, carboxipeptidases, lipases e hidrolases já foram avaliadas quanto a capacidade redutora. No entanto, poucos estudos são apresentados utilizando a enzimas oxidativas, como a peroxidase, para a redução de ocratoxina A, sendo esta uma enzima a ser investigada.

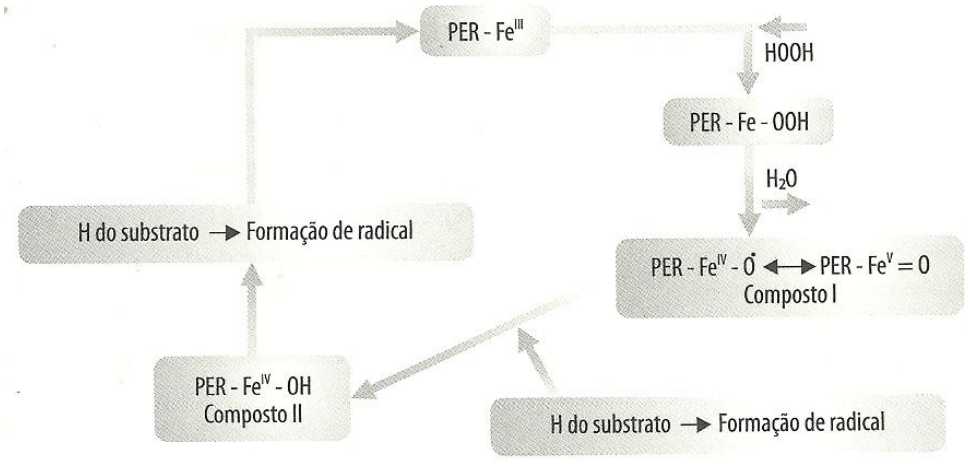
3.4 Enzima Peroxidase

Enzimas são proteínas com capacidade catalítica e que apresentam elevada especificidade por seu substrato. Elas são os catalisadores mais eficientes conhecidos podendo aumentar a velocidade de uma reação em até 10^{20} enquanto que outros catalisadores aumentam a velocidade em torno de 10^2 a 10^4. Para que haja transformação do substrato em produto, é necessária a formação de um complexo entre a enzima e o substrato. O local onde ocorre essa transformação é denominado sítio ativo sendo este localizado em uma fenda na superfície da proteína e formado por aminoácidos (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

O tipo de reação catalisada pela enzima dá a ela seu nome, seguido pelo sufixo –*ase*. Elas são agrupadas em seis classes, tais como: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. As peroxidases são classificadas como oxidorredutases (EC 1.11.1.7) que catalisam a oxidação de várias substâncias orgânicas e

inorgânicas, doadoras de prótons (mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis entre outros), na presença de peróxidos (cofator), gerando radicais livres. Na ausência de peróxidos, elas podem oxidar os compostos com o auxilio de oxigênio molecular (KOBLITZ et al., 2010). A Figura 2 ilustra o mecanismo de ação das peroxidases.

Figura 2 Esquema cíclico da ação das peroxidases.



Fonte: KOBLITZ et al., 2010

Tais enzimas são, em geral, glicoproteínas e podem ser encontradas sob várias isoformas. Além disso, apresentam como vantagem a termoestabilidade, sendo utilizadas como indicador biológico de tratamento térmico, podendo, ainda serem regeneradas. A massa molecular dessas enzimas pode variar de 30000 a 150000 Da e elas podem ser classificadas como às que contêm ferro no sítio ativo (ferriprotoporfirina-peroxidases e verdo-peroxidases) e aquelas quem contêm FAD no sítio ativo, denominadas flavoproteína- peroxidases. Dentre elas, as mais importantes são aquelas que contêm como grupo prostético a ferriprotoporfirina III e que incluem a maior parte das peroxidases de vegetais superiores (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009; KOBLITZ et al., 2010).

As peroxidases podem ser encontradas em células animais, vegetais e em diferentes micro-organismos. Dentre as fontes vegetais de obtenção da peroxidase estão pêssego, inhame, mandioca, alcachofra, batata doce entre outras (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009; KOBLITZ et al., 2010).

Um grande interesse por esta enzima surge devido as suas múltiplas aplicações em laboratórios de pesquisa, como por exemplo, na construção de biossensores, na indústria de papel e celulose, na indústria de alimentos, em análises bioquímicas, entre

outras. Por esse motivo, peroxidases de diferentes fontes vegetais têm sido exploradas. A mais conhecida é a extraída do rabanete devido a sua elevada atividade e estabilidade frente uma série de substratos (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Maciel; Gouvêa; Pastore (2006) demonstraram que a folha de *Copaifera langsdorffii* (árvore leguminosa, nativa e amplamente distribuída no território brasileiro), pode ser uma nova fonte de peroxidase com alta atividade. Esta, quando comparada a peroxidase do rabanete apresentou alta atividade (81,6%) sendo ambas obtidas nas mesmas condições. As peroxidases de folhas de *Copaifera langsdorffii* e raiz forte apresentaram atividade de 20 e 24,4 U mL^{-1}, respectivamente. Jongmevasna; Yaiyen; Prousoontorn (2013) extraíram peroxidase de mandioca e obtiveram, para o extrato bruto, uma atividade específica de 550 U mL^{-1}, sendo que essa atividade foi melhorada com diversas etapas de purificação chegando a 8200 U mL^{-1}. No entanto, o rendimento foi reduzido de 100 % (extrato bruto) para 4% (extrato purificado). Fontan et al., (2012) determinaram a cinética de inativação da peroxidase de água de coco, sendo que no tempo 0 min de exposição, a peroxidase apresentava uma atividade de 30,23 U mL^{-1}. Além disso, pode-se destacar o estudo em que Feltrin (2013) caracterizou a peroxidase extraída do farelo de arroz, cinética e termodinamicamente, demonstrando que a enzima purificada apresenta uma atividade específica de 0,11 U mg^{-1}.

As peroxidases, atualmente, têm sido aplicadas na degradação de compostos fenólicos contaminantes de águas residuais tais como pentaclorofenol (PCP) e corantes têxteis. Mohan et al. (2005) determinaram o tempo ótimo de contato, o pH ótimo e as concentrações de peróxido, de enzima e de corante ótimas para a degradação do mesmo utilizando a enzima peroxidase livre. Nas condições otimizadas foi obtido um percentual de 65% de redução do corante. Niu et al. (2013) estudaram a degradação de pentaclorofenol presente em água através da aplicação da enzima peroxidase livre e imobilizada. Os autores verificaram que os percentuais de remoção foram de 47% e 83%, respectivamente. Além disso, podem ser utilizadas na síntese de vários compostos aromáticos e na remoção de peróxido presente em resíduos industriais e alimentos (ZHANG et al., 2007).

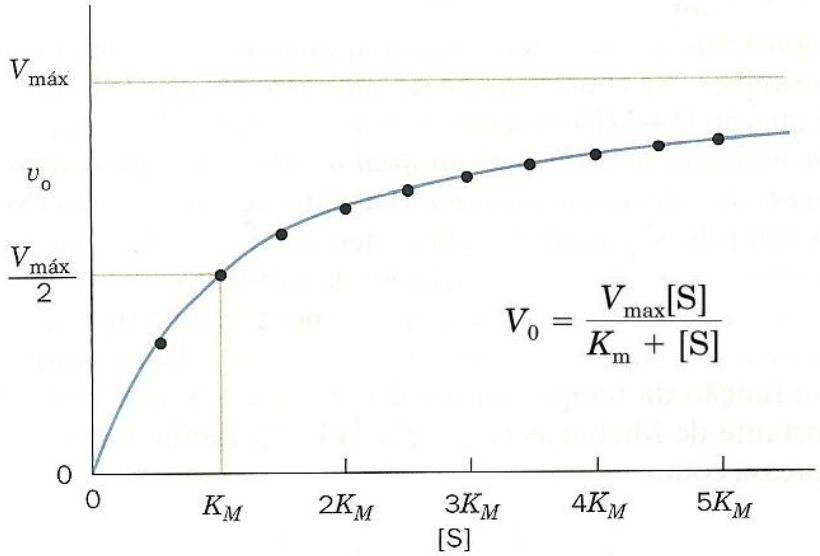
Com relação à atuação da enzima peroxidase como agente de degradação de micotoxinas, poucos estudos são encontrados. No entanto, Das; Mishra (2000a) encontraram percentuais de 29,1%, 38,3% e 54,7% quando aplicaram as peroxidases de raiz forte B e C (B: precipitação com 68% de sulfato de amônio e C: precipitação com

31,2% de sulfato de amônio) e a comercial na degradação da micotoxina aflatoxina B_1 (312 μg mL^{-1}), sendo que estas enzimas apresentavam atividades específicas de 20 U mg $proteína^{-1}$, 30 U mg $proteína^{-1}$ e 200 U mg $proteína^{-1}$, respectivamente. Os mesmos autores, por sua vez, verificaram percentuais de degradação de 28,1%, 35,5% e 53,2% para as peroxidases da raiz forte A e B (A: precipitação com 42,3 g de sulfato de amônio e B: precipitação com 17,23 g de sulfato de amônio) e comercial, respectivamente, quando foram aplicadas na degradação também de aflatoxina B_1 (374,4 μg $100g^{-1}$), no entanto em amendoim (DAS; MISHRA, 2000b). Garda-Buffon; Kupski; Badiale-furlong (2011) demonstraram a habilidade dos fungos *Aspergillus oryzae e Rhizopus oryzae* em reduzir os níveis da micotoxina DON relacionando esse fato com a atividade da enzima peroxidase produzida por estes micro-organismos. Torna-se interessante, então, estudar a habilidade da enzima peroxidase em degradar diferentes classes de micotoxinas em diferentes meios e matérias-primas.

Uma vez que se deseja determinar a velocidade de reação e a eficiência global de uma enzima, é necessário realizar o estudo da cinética enzimática. Adrian Brown, em 1902, deu início a este estudo investigando as velocidades de hidrólise da sacarose pela enzima β-frutofuranosidase de leveduras. Ele observou que quando a concentração da sacarose é muito maior do que a de enzima, a velocidade da reação torna-se independente da concentração. Ele, portanto, propôs que a reação global é composta por duas reações elementares, nas quais o substrato forma um complexo com a enzima que se decompõe, subsequentemente, em produto e enzima. A equação de Michaelis-Menten descreve a velocidade dessa reação enzimática, em função da concentração do substrato. A partir dessa equação, determina-se a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima de reação ($V_{máx)}$, sendo que ela descreve uma hipérbole retangular semelhante á mostrada na Figura 3 (VOET; VOET; PRATT, 2008).

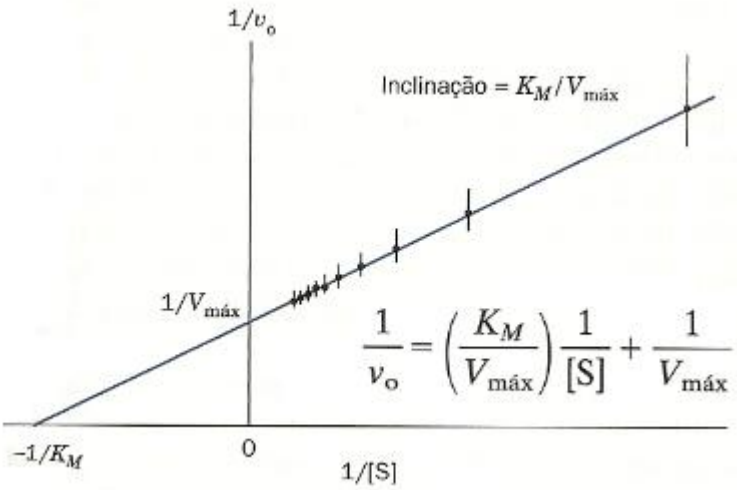
Na prática, entretanto, é difícil obter os valores de $V_{máx}$ e K_M com precisão a partir dos gráficos de velocidade *versus* concentração de substrato. Então, um método mais adequado para determinar esses parâmetros foi formulado por Hans Lineweaver e Dean Burk, que nada mais é que o inverso da equação de Michaelis-Menten. Se essas grandezas forem colocadas em um gráfico, o denominado gráfico de Lineweaver-Burk ou gráfico de duplo-recíproco (Figura 4), a inclinação da linha é $K_M V_{máx}^{-1}$ e a interseção no eixo Y, será $1 V_{máx}^{-1}$ (VOET, VOET, 2006; VOET; VOET; PRATT, 2008).

Figura 3 Gráfico de velocidade versus concentração de substrato e equação de Michaelis-Menten



Fonte: VOET, VOET, 2006 modificada.

Figura 4 Equação e gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk



Fonte: VOET, VOET, 2006; VOET; VOET; PRATT, 2008 modificada

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Farelo de arroz e padrões de ocratoxina A e peroxidase.

O farelo de arroz foi obtido no comércio local da cidade de Rio Grande/RS. Os padrões da ocratoxina A e da enzima peroxidase foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*. Todos os materiais foram armazenados a -18 °C.

A enzima peroxidase comercial foi ressuspendida em água destilada e as soluções obtidas a partir dessa foram, também, armazenadas a -18 °C.

4.1.2 Instrumentação

Os principais equipamentos utilizados foram balança analítica de precisão Bioprecisa FA2104N, centrífuga refrigerada CIENTEC CT-5000R, cromatógrafo líquido Shimadzu, espectrofotômetro Biospectro SP220.

4.1.3 Reagentes e solventes

Os principais reagentes e solventes utilizados foram acetonitrila grau HPLC e P.A. (Vetec), água ultrapura, clorofórmio P.A. (Proquimios), reagente de Folin Ciocalteau 2 M (Próton Química), guaiacol P.A. (Vetec) e ácido acético glacial (Merck).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da solução padrão de ocratoxina A

A ocratoxina A, frasco contendo 5 mg, foi dissolvida em 100 mL de benzeno:acetonitrila (98:2) em balão volumétrico, resultando em uma solução estoque de concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$. Essa solução foi acondicionada em frascos âmbar contendo 10 mL da solução, que foram secos em corrente de nitrogênio, obtendo-se uma massa de 500 µg em cada frasco. Para a obtenção da solução trabalho, a micotoxina foi ressuspensa em benzeno:ácido acético (99:1) sendo sua concentração confirmada, em espectrofotômetro e utilizando a Equação 1, onde Abs: absorvância lida a 333 nm; MM: massa molecular da ocratoxina A (403,8 g mol^{-1}); FC: fator de correção do equipamento; d: largura da cubeta e ε: absortividade molar da ocratoxina A em benzeno:ácido acético (99:1) (5550 L cm^{-1} mol^{-1}). As soluções obtidas foram armazenadas a -18 °C.

$$\text{OTA } (\mu g.mL^{-1}) = \frac{Abs.MM.\ 1000.\ FC}{d.\varepsilon} \quad (1)$$

4.2.2 Obtenção da enzima peroxidase

4.2.2.1 Atividade da peroxidase extraída das frações granulométricas do farelo de arroz

Para a realização deste estudo, 300 g de farelo de arroz integral foram agitados mecanicamente utilizando peneiras com variação de malhas de 150 µm até 710 µm (100 a 24 mesh) durante 15 min. A partir disso, foi calculado o rendimento de farelo retido, o teor de proteína solúvel e a atividade da enzima peroxidase (item 5.2.2.4) em cada malha granulométrica avaliada. O teor de proteína solúvel e a atividade da enzima peroxidase também foram avaliados para o farelo sem peneiramento.

4.2.2.2 Caracterização química da fonte enzimática

A caracterização química foi determinada segundo métodos descritos pela AOAC (2000). A umidade foi determinada pelo método gravimétrico de secagem em estufa a 105 °C (n° 935.29); os lipídios pela extração com éter de petróleo (n° 920.85); os níveis proteicos pelo método de micro-Kjeldahl (n° 920.87); as cinzas pelo método gravimétrico através de incineração das amostras em mufla a 550 °C (n° 923.03) e as fibras pelo método de digestão ácido-básica (nº 991.43). Os carboidratos foram determinados por diferença.

4.2.2.3 Extração enzimática

A enzima peroxidase foi extraída do farelo de arroz segundo Feltrin (2013), utilizando 5 g da matéria-prima e 50 mL de tampão fosfato 10 mM pH 5. A mistura foi colocada em mesa agitadora orbital a 100 rpm durante 60 min a temperatura ambiente, centrifugada a 4 °C por 10 min a 3220 x *g*, filtrada e avolumada para 50 mL, obtendo-se o extrato bruto enzimático, armazenado em freezer a -18 °C.

4.2.2.4 Purificação enzimática

A enzima peroxidase foi purificada pelo método de partição trifásica (TPP) descrito por Özer, et al (2010) com modificações. Em um tubo de centrifuga de 50 mL foi adicionado 20 mL do extrato bruto enzimático e este foi saturado com 50% (m/v) de

sulfato de amônio a temperatura ambiente, sendo a mistura homogeneizada manualmente. Acetona foi adicionada em uma proporção 1:1 e o sistema foi homogeneizado manualmente durante 1 min seguido de repouso por 1 h para a separação de fases. A mistura foi centrifugada a 3220 x *g*, durante 10 min a 4 °C para auxiliar na separação das fases. A camada superior, rica em acetona, foi removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, assim como a camada inferior (salina). Na interface precipitada, contendo a enzima, foi adicionado 20 mL de tampão fosfato 5mM pH 5,5 e a mistura foi homogeneizada manualmente durante 2 min, filtrada e armazenada em freezer a -18 °C.

Os parâmetros recuperação (RP) e fator de purificação (FP) foram calculados utilizando as Equações 2 e 3 (CURVELO-SANTANA et al., 2008), respectivamente, sendo ATP: atividade total da enzima purificada; ATB: atividade total da enzima bruta; AEP: atividade específica da enzima purificada; AEB: atividade específica da enzima bruta.

$$RP=\frac{ATP}{ATB}.100 \quad (2)$$

$$FP=\frac{AEP}{AEB} \quad (3)$$

4.2.2.5 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade específica foi realizada a partir do método de Devaiah; Shetty (2009) com modificações. O meio reacional continha 2 mL de água; 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 5,5; 0,5 mL de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%, sendo a transmitância da reação obtida em espectrofôtometro a 470 nm. A atividade específica (U mg^{-1}) foi calculada pela razão da atividade da enzima (U mL^{-1}) e o teor de proteína solúvel (mg mL^{-1}).

Para o cálculo da atividade enzimática, U mL^{-1}, foi empregada a Equação 4, baseada na equação descrita por Zeraik et al. (2008) onde: U mL^{-1}: unidade de atividade da peroxidase por mL de extrato; A: absorvância; FD: fator de diluição (diluição do extrato bruto enzimático); V: volume total do tubo de reação (mL); 10^6: conversão de mol para μmol; ε: absortividade molar do tetraguaiacol (26600 L mol^{-1} cm^{-1}); d: tamanho horizontal da cubeta (cm) e t: tempo de reação (min). Uma unidade da atividade da peroxidase

representou a quantidade de enzima que catalisou a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 min.

$$\frac{U}{mL} = \frac{A.FD.V.10^6}{\varepsilon.d.t.1000} \quad (4)$$

O teor de proteína solúvel foi determinado pelo método de Lowry (1951), utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). A transmitância obtida nessa reação foi lida em espectrofotômetro a 660 nm.

4.2.3 Extração e quantificação da ocratoxina A

Para a extração da ocratoxina A, foi utilizada a técnica de extração por partição líquido-líquido, que consiste na adição de 3 mL de clorofórmio (CH_3Cl) seguidos de agitação em vórtex durante 30 s, 3 min em banho ultrassônico de 25 kHz e centrifugação a 621,6 x *g* durante 5 min. A fase orgânica foi retirada com o auxilio de um pipetador automático e o procedimento foi repetido 3 vezes. O volume final obtido foi seco em banho-maria a 75ºC.

Para avaliar o desempenho do método de extração foram determinadas as figuras de mérito: recuperação, linearidade e limites de detecção e quantificação (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003). A recuperação foi avaliada em tubos de ensaio onde, primeiramente a micotoxina foi adicionada em três níveis de concentração: 0,7 ng mL^{-1}, 3,7 ng mL^{-1} e 22,3 ng mL^{-1}. Após, o solvente foi evaporado durante 12 h, à temperatura ambiente, e foram adicionados os constituintes do sistema tamponante, sendo estes 2 mL de tampão fosfato 5mM pH 5,5, 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08% e 3 mL de água, resultando em um volume útil de 6 mL. A micotoxina foi extraída e quantificada, sendo o percentual de recuperação obtido através da Equação 5.

$$\text{\% de recuperação} = \frac{\text{OTA final(ng mL}^{-1})}{\text{OTA inicial(ng mL}^{-1})} \times 100 \quad (5)$$

A linearidade foi determinada através da construção da curva analítica. Para tal, foram realizadas soluções de ocratoxina A em concentrações crescentes, sendo estas de 0,1 a 20 ng mL^{-1}. A partir dessa curva, foram obtidos os coeficientes de correlação e determinação.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados através do método da relação sinal-ruído. Concentrações decrescentes de ocratoxina A foram injetadas até que se obtivessem um sinal de 5 e 10 vezes maior, respectivamente, que o sinal gerado pela linha de base (ruído) (INMETRO, 2003; MOREU e SIQUEIRA, 2010).

A quantificação, por sua vez, foi realizada segundo Kupski; Badiale-Furlong (2015) em que foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu (Quioto, Japão), com detector por fluorescência. A coluna utilizada foi Kromasil C18 com partículas de 5 µm e 100 A e dimensões de 150 x 4,6 mm. Os solventes empregados na fase móvel foram água ultrapura acidificada com 1% de ácido acético glacial e acetonitrila na proporção 1:1 (v/v). Os demais parâmetros utilizados no método foram vazão da fase móvel de 1 mL min^{-1}, temperatura da coluna de 35 °C, comprimento de onda de excitação de 333 nm e de emissão de 460 nm.

4.2.4. Determinação da cinética de redução

A avaliação da redução dos níveis de ocratoxina A foi realizada segundo Feltrin (2013) com algumas modificações. Em reator tipo Erlenmeyer, foi adicionada a micotoxina e o solvente foi evaporado durante 12 h, à temperatura ambiente. As proporções de enzima:substrato avaliadas foram de 1:10 (p/p) e 1:5 (p/p) para as enzimas comercial e extraída do farelo. Além dessas proporções, foi testada a proporção 8:1 (p/p) para a enzima comercial correspondendo a uma atividade de 0,063 U mL^{-1}. A mesma atividade enzimática (0,063 U mL^{-1}) foi testada para a enzima obtida de farelo de arroz. Isto se deve pela diferença do grau de purificação entre as enzimas testadas. A massa de ocratoxina A adicionada nos reatores correspondentes às proporções 1:10 e 1:5 (p/p) foi de 2 µg (20 ng/mL) enquanto que para a proporção 8:1 (p/p), a massa adicionada foi de 1 µg (10 ng/mL).

Após, foram adicionados os constituintes do reator, sendo estes 40 mL de tampão fosfato 5mM pH 6,0, para a enzima comercial, e pH 5,5, para a enzima do farelo, 20 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%, 40 mL de água e a enzima peroxidase (proporções 1:10 (p/p) e 1:5 (p/p)). Para as demais proporções, os constituintes foram 33,3 mL de água, 33,3 mL de tampão fosfato 5mM pH 6,0, para a enzima comercial, e pH 5,5, para a enzima do farelo, 16,7 mL de peróxido de hidrogênio em uma proporção 2:1 (p/p) peróxido:substrato e 16,7 mL de enzima, totalizando um volume útil de 100 mL. Em seguida, a enzima foi adicionada ao sistema e este foi deixado em agitação orbital de 150

rpm, á 25 °C, sendo a amostragem realizada nos tempos 0, 15, 30, 60, 300 e 1440 min, retirando-se um volume de 6 mL. A concentração da micotoxina foi obtida através de extração e quantificação conforme o item 5.2.3.

A velocidade de redução foi determinada a partir da diferença entre a concentração inicial e final da ocratoxina A de acordo com tempo de reação (Equação 6).

$$v = \frac{\text{OTA inicial (ng mL}^{-1}\text{)-OTA final (ng mL}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de reação (min)}} \quad (6)$$

O percentual de redução foi determinado utilizando-se a Equação 7 através da razão entre a variação da concentração da micotoxina e a concentração inicial da mesma.

$$\text{\% de redução} = 100 - \frac{\text{OTA final(ng mL}^{-1}\text{)}}{\text{OTA inicial(ng mL}^{-1}\text{)}} \text{ x } 100 \quad (7)$$

4.2.5. Determinação da afinidade entre a ocratoxina A e as enzimas peroxidase

Os parâmetros K_M e $V_{máx}$ foram determinados através da medida da atuação da enzima, obtida pela velocidade média de redução da ocratoxina A, em relação a diferentes concentrações da referida micotoxina. Em tubos de ensaio foi adicionada a ocratoxina A nas concentrações de 1,7; 8,3; 15; 18,3; 27,5; e 31,7 ng mL^{-1} quando testada a enzima comercial, onde a concentração enzimática adicionada nesse teste (3,17 ng mL^{-1}) foi correspondente a proporção enzima:substrato 1:10 da última concentração de OTA avaliada (31,7 ng mL^{-1}). Para a enzima extraída do farelo de arroz, as concentrações utilizadas de micotoxina foram 8,3; 15; 21,7; 28,3 e 35,0 ng mL^{-1} e a concentração enzima adicionada foi de 3,5 ng mL^{-1}. O solvente foi evaporado durante 12 h, à temperatura ambiente, e após foram adicionados os constituintes do reator, sendo estes 2 mL de tampão fosfato 5mM pH 6,0, para a enzima comercial, e pH 5,5, para a enzima do farelo, 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%, 3 mL de água e a enzima. A reação ocorreu durante 15 min e após a micotoxina foi extraída e quantificada conforme o item 5.2.3.

O efeito da concentração sobre a ação enzimática foi descrito pela constante de Michaelis-Menten (K_M), que foi obtido a partir do gráfico da velocidade versus a concentração de substrato. Os parâmetros foram obtidos através da linearização da equação de Michaelis-Menten, o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, onde os valores

de K_M e $V_{máx}$ foram calculados a partir do coeficientes angular e linear da Equação 8, respectivamente.

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{Km}{Vmáx}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmáx} \quad (8)$$

4.2.6. Avaliação do mecanismo de redução da ocratoxina A

A possibilidade de adsorção da ocratoxina A pela enzima foi verificada através da hidrólise da enzima peroxidase comercial segundo metodologia descrita Sgarbieri (1996), com algumas modificações.

Em um reator tipo Erlenmeyer, foi adicionada a micotoxina (10 ng mL^{-1}), sendo o solvente da solução evaporado durante 12 h, à temperatura ambiente. Os constituintes do meio reacional foram adicionados, totalizando um volume útil de 50 mL (10 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%, 20 mL de tampão 5 mM pH 6,0, 20 mL de água). A enzima inativada durante 60 min a 80 °C foi adicionada ao reator (0,05 µg), mantido sob agitação orbital de 150 rpm a 25±5°C. A amostragem inicial foi realizada nos tempos 0 e 15 min, retirando-se um volume de 6 mL. Após esse tempo, a enzima foi precipitada com TCA 10% e a mistura foi centrifugada a 3220 x *g*, durante 15 min a 4°C. O precipitado (enzima inativada) foi ressuspenso em 38 mL de solução contendo a enzima pepsina (1,5 mg mL^{-1} em HCl 0,1 M), mantendo o sistema a 37 °C a 150 rpm. O acompanhamento da liberação de OTA com a ação da pepsina na degradação de peroxidase inativada foi realizada pela retirada de 6 mL nos tempos de 60, 120 e 180 min. A concentração da micotoxina foi obtida através de extração e quantificação conforme o item 5.2.3.

4.2.7. Avaliação da aplicabilidade da peroxidase do farelo de arroz em sucos de uva

A fim de se verificar uma aplicação para a peroxidase obtida do farelo de arroz, esta foi adicionada em sucos de uva na presença da micotoxina e avaliada a cinética de redução. Dois tipos de suco integral foram avaliados, tinto e branco, ambos comerciais. Primeiramente, foi determinada a presença de OTA nos sucos, sendo esta extraída e quantificada segundo o item 5.2.3.

A recuperação da micotoxina, tendo como matriz o suco, também foi determinada. Em tubos de ensaio foi adicionada a ocratoxina A com base na determinação prévia da contaminação. Para o suco branco, após a adição da micotoxina, as concentrações corresponderam a 0,7; 3,4 e 20,7 ng mL^{-1} e para o tinto 3,4; 11,1 e 20,7 ng mL^{-1}. Após, o solvente foi evaporado durante 12 h, à temperatura ambiente, e o suco foi adicionado, resultando em um volume útil de 6 mL. A micotoxina foi extraída e quantificada, sendo o percentual de recuperação obtido através da Equação 5.

Com relação à avaliação da redução da micotoxina, os testes foram realizados em um reator tipo Erlenmeyer com volume útil de 100 mL de suco. A micotoxina foi adicionada (13 ng mL^{-1}) ao reator e o solvente evaporado durante 12 h, à temperatura ambiente. Após, foi adicionado o suco e o peróxido de hidrogênio em uma proporção 2:1 (p/p) peróxido:substrato, sendo a mistura agitada em banho ultrassônico durante 10 min. Em seguida, a enzima foi adicionada ao sistema e este foi deixado em agitação orbital de 150 rpm, á 25 °C, sendo a amostragem realizada nos tempos 0, 15, 30, 60, 300 e 1440 min, retirando-se um volume de 6 mL para a quantificação de OTA conforme o item 5.2.3. Cabe salientar que para o suco tinto, a centrifugação foi aumentada para 2486,4 x *g* uma vez que com 621,6 x *g* não foi possível a separação das fases. O percentual de redução foi determinado utilizando-se a Equação 7 através da razão entre a variação da concentração da micotoxina, nos diferentes tempos, e a concentração inicial da mesma.

4.2.8 Tratamento de dados

Os resultados das triplicatas de cada experimento foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com 95% de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Frações granulométricas do farelo de arroz e seu efeito na atividade da peroxidase

O estudo foi realizado com o objetivo de relacionar a eficiência da extração e o tamanho de partícula uma vez que elevada atividade enzimática resulta em maior aplicabilidade. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Rendimento granulométrico, proteína solúvel e atividade da enzima peroxidase em cada fração obtida do farelo de arroz.

Mesh	Abertura (μm)	Rendimento de farelo retido (%)	Proteína Solúvel (mg mL^{-1})	Atividade da PO (U g^{-1})*
24	710	15,5	2,2 (1,2)^{e}	0,43 (7,4)^{e}
28	600	6,6	3,2 (2,5)^{e}	1,61 (6,1)^{d}
32	500	3,1	5,4 (4,9)^{d}	1,86 (7,7)^{d}
35	425	10,4	6,5 (5,7)^{d}	3,03 (7,0)^{c}
42	355	13,7	10,8 (2,8)^{bc}	3,65 (6,5)^{b}
48	300	10,5	11,5 (3,9)^{ab}	4,21 (2,7)^{a}
65	212	31,0	12,8 (3,7)^{a}	4,00 (1,7)^{ab}
100	150	6,9	12,7 (6,0)^{a}	4,14 (8,9)^{ab}
Sem peneirar	-	-	9,4 (2,1)^{c}	2,94 (6,6)^{c}

*Média (% Coeficiente de Variação). Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Para a análise dos resultados, levou-se em consideração a atividade enzimática e não a atividade específica uma vez que o extrato não passou por nenhum processo de purificação. Por esse motivo, o teor de proteína solúvel poderia estar sendo subestimado uma vez que contabiliza todas as proteínas presentes no extrato e não apenas a enzima de interesse. Isso pode ser confirmado por Luh et al., 1991 *apud* Paucar-Menacho et al., 2007. Segundo o autor, além das proteínas sem capacidade catalítica, o farelo de arroz contém vários sistemas enzimáticos, dentre os quais se destaca a presença das enzimas α-amilase, β-amilase, catalase, lipases, lipoxigenases e peroxidases.

As frações que obtiveram os maiores valores de atividade enzimática foram as de 48 a 100 mesh, sendo que estes, não diferiram significativamente (Tabela 2). Ao comparar os valores de atividade da peroxidase para as malhas citadas anteriormente com os valores encontrados para o farelo sem peneirar, nota-se uma diminuição de 29% no

valor da atividade demonstrando, então, a necessidade do peneiramento quando se busca uma atividade mais elevada. Em termos de rendimento, a malha que obteve o maior percentual foi a de 65 mesh, estando essa dentro da faixa de malhas que obtiveram os maiores valores de atividade enzimática.

O teor de proteína solúvel e a atividade enzimática, para as diferentes malhas, aumentaram com a diminuição do tamanho de partícula. Quanto menor o esse tamanho, mais efetiva é a extração do analito de interesse, uma vez que o contato entre o solvente e a matriz é facilitado, devido ao aumento da superfície de contato. Para extração enzimática, então, foram utilizadas as frações que obtiveram os maiores valores de atividade enzimática, sendo estas de 48 a 100 mesh.

5.2 Caracterização química do farelo de arroz

Após determinada a granulometria que seria utilizada para a obtenção enzimática (48 a 100 mesh), o farelo de arroz foi caracterizado quimicamente. O teor de umidade do farelo peneirado foi determinado, primeiramente, sendo este de 10,3%. A partir desse dado, foram calculadas as demais frações da composição, em base seca. Os resultados obtidos foram de 18,1% de lipídeos, 13,6% de cinzas, 14,3% de proteínas, 9,3% de fibras e 34,4% de carboidratos. Os teores dos componentes determinados no farelo de arroz apresentam-se similares aos apresentados na literatura (MOONGNGARM; DAOMUKDA; KHUMPIKA, 2012; SCHMIDT; FURLONG, 2012; FELTRIN 2013). Pequenas variações existentes entre os autores são justificadas devido a fatores associados ao tipo de solo, ao clima, a qualidade da matéria-prima utilizada, ao processo de beneficiamento empregado e ao grau de polimento ao qual o grão foi submetido (AMISSAH et al., 2003).

5.3 Extração da ocratoxina A

Os indicativos de mérito determinados para o método de extração de OTA estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros analíticos avaliados em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL).

Parâmetro	Ocratoxina A
Equação da curva	y = 11025,21x + 719,32
Linearidade (ng mL^{-1})	0,1 a 20
Coeficiente de correlação	0,9997
Coeficiente de determinação	0,9994
LDi (ng mL^{-1})	0,05
LQi (ng mL^{-1})	0,1
LDm (ng mL^{-1})	0,02
LQm (ng mL^{-1})	0,03

Onde: LD_i = limite de detecção do CLAE-FL; LQ_i = limite de quantificação do CLAE-FL; LD_m = Limite de detecção do método; LQ_m = limite de quantificação do método

Segundo INMETRO (2003), o valor recomendado para o coeficiente de correlação é acima de 0,90 enquanto que a Anvisa recomenda valores iguais ou superiores a 0,98 (BRASIL, 2003). Diante disso, os valores obtidos para os parâmetros apresentados cumprem as recomendações de análise de confiabilidade, sendo o método utilizado adequado. Além disso, a linearidade da curva apresentou ampla faixa de aplicação.

Com relação aos limites de detecção e de quantificação, estes foram determinados através da relação sinal/ruído na qual se estabeleceu a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado e quantificado, respectivamente. Kupski; Badiale-Furlong (2015) validaram o método QuEChERS para a determinação de ocratoxina A em farinha de trigo por CLAE-FL sendo que os valores de LDi e LQi foram de 0,05 ng mL^{-1} e 0,1 ng mL^{-1}, respectivamente, sendo estes os mesmo encontrados no presente estudo, pois foi utilizada a mesma coluna cromatográfica para a determinação. Com relação ao LDm e LQm os autores encontraram 0,25 e 0,50 ng g^{-1}, valores superiores aos determinados neste estudo. Essa diferença é justificada pelo tipo de amostra analisada. No presente trabalho, a amostra da qual foi extraída a micotoxina foi constituída por água, tampão e peróxido de hidrogênio, componentes que não oferecem interferência à extração, enquanto que Kupski; Badiale-Furlong (2015) extraíram ocratoxina A de farinha de trigo, uma matéria-prima complexa em que seus componentes podem influenciar a extração do analito.

Os percentuais de recuperação foram determinados e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

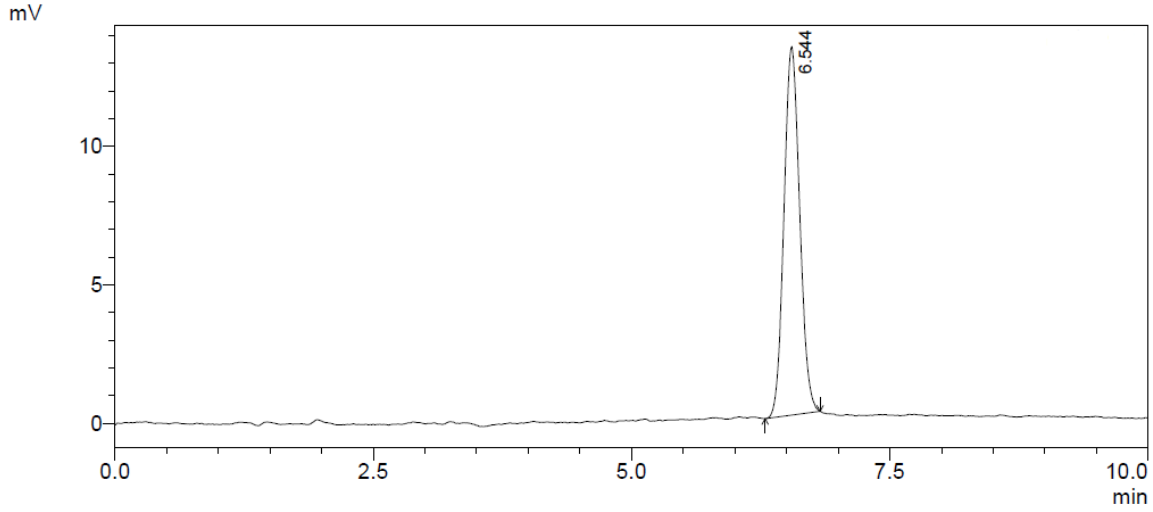
Tabela 4 Recuperação de ocratoxina A em sistema aquoso.

Nível	OTA (ng mL^{-1})	Recuperação (%)*	Recuperação média (%)*
1	0,7	91 (4)	
2	3,7	90 (11)	94 (7)
3	22,3	101 (5)	

*Média (% CV).

Segundo Moreau e Siqueira (2010) são desejáveis recuperações próximas a 100%, porém admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Para a análise de resíduos, os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70% e 120% com precisão de até ± 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de 15%. Diante do exposto, os resultados de recuperação obtidos são satisfatórios, pois encontram-se dentro dos limites estipulados. É importante ressaltar a ausência de interferentes e de co-eluição de compostos na corrida cromatográfica, conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5 Cromatograma de eluição da ocratoxina A.



5.4. Redução dos níveis da ocratoxina A por ação da enzima peroxidase em meio reacional

Para fins de comparação, os testes de redução da ocratoxina A e os parâmetros K_M e $V_{máx}$ foram realizados utilizando uma peroxidase comercial e a peroxidase extraída do farelo de arroz. Cabe salientar que a peroxidase extraída do farelo de arroz foi purificada segundo o item 5.2.2.3 e foram obtidos os valores de 77,1% e 9,2 para a

recuperação (RP) e para o fator de purificação (FP), respectivamente. Feltrin (2013) utilizou o mesmo procedimento de purificação também para a peroxidase extraída do farelo de arroz, estudando diversos percentuais de saturação de sulfato de amônio e de proporção extrato bruto:acetona. Neste trabalho foram utilizados uma saturação de 50% de sal e uma proporção de 1:1 extrato bruto:acetona. Assim, comparando com as mesmas condições, o autor obteve os valores de RP e FP, para 50% de saturação de 67% e 1,76; RP e FP para a proporção extrato bruto:acetona (1:1) de 38% e 4,31, sendo estes inferiores aos obtidos neste trabalho. No método utilizado por Feltrin (2013), as homogeneizações do extrato foram realizadas com vórtex, o que poderia desnaturar a enzima parcialmente, devido às forças de cisalhamento, diminuindo, assim, os valores obtidos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). Então, para esse trabalho, foram realizadas homogeneizações manuais e lentas.

Vetal; Rathod (2014) estudaram a partição trifásica para a peroxidase extraída da casca da laranja. Assim como Feltrin (2013), os autores estudaram diferentes concentrações de sulfato de amônio. No entanto, no estudo de Vetal; Rathod (2014), foi avaliada a proporção de extrato bruto:t-butanol, isso porque no método original descrito por Özer, et al (2010) utilizou-se *t*-butanol e não acetona. Feltrin (2013) descreve que o uso de acetona foi decorrente da sua fácil recuperação ao final do processo e menor toxicidade. Diante do exposto, Vetal; Rathod (2014) encontraram os valores de 94% e 18,20 para a RP e FP, respectivamente, superiores aos encontrados neste trabalho. A troca do solvente desidratante (*t*-butanol por acetona) pode ter afetado os resultados.

É importante ressaltar a continuidade dos estudos visando a purificação da peroxidase obtida de farelo de arroz, por este se tratar de um co-produto com baixo valor agregado e disponível em grande quantidade.

Os resultados obtidos para a redução da concentração de ocratoxina A utilizando uma proporção enzima:substrato (E:S) 1:10 estão apresentados na Tabela 5. Segundo Lehninger; Nelson; Cox (2002), a velocidade máxima de uma reação enzimática será atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo enzima:substrato e a concentração da enzima livre for significativamente pequena. Nessas condições, a enzima está “saturada” com seu substrato. Tal colocação justifica o porquê da utilização dessa proporção enzima:substrato.

Tabela 5 Ocratoxina A após a ação da peroxidase comercial e da obtida de farelo de arroz na proporção 1:10 (E:S) e com concentração de OTA inicial de 20 ng mL^{-1}.

Tempo (min)	OTA (ng mL^{-1})*	
	PO comercial**	PO do farelo de arroz***
0	$4,3 \pm 0,8^{c}$	$6,7 \pm 1,2^{b}$
15	$5,8 \pm 0,5^{bc}$	$6,2 \pm 0,6^{b}$
30	$6,3 \pm 0,5^{bc}$	$7,1 \pm 1,2^{b}$
60	$8,6 \pm 0,2^{b}$	$7,2 \pm 0,3^{b}$
300	$12,7 \pm 2,2^{a}$	$15,1 \pm 1,0^{a}$
1440	$12,2 \pm 0,7^{a}$	$13,4 \pm 1,5^{a}$

*Média ± desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p<0,05$). **A (atividade enzimática): 0,2146 U mL^{-1}. *** A: 0,4705 U mL^{-1}

Os valores apresentam um comportamento ascendente, o que não caracteriza uma curva de redução. O comportamento esperado seria a redução da concentração da micotoxina decorrente da atuação enzimática ao longo do tempo. Acredita-se que nesse teste ocorreram problemas de solubilização da micotoxina no meio, o que pode ter impedido a atuação ou saturação enzimática ou, ainda, mascarado seu efeito.

Diante desse efeito, após a adição dos constituintes do meio reacional, os reatores foram deixados em banho ultrassônico de 25 kHz durante 10 min. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para proporção E:S a 1:5. Os resultados demonstram que para uma redução significativa na concentração de ocratoxina A são necessários 1440 min de ação para ambas as enzimas, sendo que os percentuais de redução obtido para as peroxidases comercial e do farelo de arroz foram de 6% e 23,5%, respectivamente, considerando uma adição de ocratoxina A de 20 ng mL^{-1}.

Tabela 6 Ocratoxina A após a ação da peroxidase comercial e da obtida de farelo de arroz na proporção 1:5 (E:S) e com concentração de OTA inicial de 20 ng mL^{-1}.

Tempo (min)	OTA (ng mL^{-1})*	
	PO comercial**	PO do farelo de arroz**
0	$20,9 \pm 1,3^{a}$	$19,9 \pm 1,5^{a}$
15	$22,0 \pm 0,3^{a}$	$20,0 \pm 1,0^{a}$
30	$21,4 \pm 0,1^{a}$	$20,6 \pm 0,2^{a}$
60	$22,4 \pm 1,6^{a}$	$19,1 \pm 0,5^{a}$
300	$22,5 \pm 0,8^{a}$	$20,1 \pm 0,5^{a}$
1440	$18,8 \pm 0,6^{b}$	$15,3 \pm 2,2^{b}$

*Média ± desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p<0,05$). **A (atividade enzimática): 0,5210 U mL^{-1}. *** A: 0,4697 U mL^{-1}

A concentração de ocratoxina A não diminui linearmente, o que pode ter sido consequência da concentração, tanto da enzima como da micotoxina, estar na ordem de traço (RIBANI et al., 2004). Além disto, a interação entre elas pode não ter sido efetiva de início, devido a esta baixa concentração, gerando a variação observada em todos os testes realizados. Outro fator é o extrato enzimático ser formado por um mix de enzimas, não só a peroxidase, o que dificulta a análise especifica da enzima de interesse.

Na busca por um percentual de redução maior, foi testada a interação E:S na proporção 8:1 para a enzima comercial e na mesma proporção de atividade enzimática (U mL^{-1}) para a enzima extraída do farelo de arroz. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Ocratoxina A após a ação da peroxidase comercial e da obtida de farelo de arroz na proporção 8:1 (E:S) para a comercial e concentração de OTA inicial de 10 ng mL^{-1}.

Tempo (min)	**OTA (ng mL^{-1})***	
	PO comercial**	**PO do farelo de arroz*****
0	$7,3 \pm 0,1^{c}$	$9,1 \pm 0,8^{b}$
15	$9,3 \pm 0,2^{a}$	$10,2 \pm 0,3^{a}$
30	$5,8 \pm 0,3^{b}$	$7,9 \pm 0,4^{c}$
60	$7,6 \pm 0,4^{c}$	$8,0 \pm 1,6^{bc}$
300	$4,1 \pm 0,2^{d}$	$7,6 \pm 0,0^{c}$
1440	$4,3 \pm 0,2^{d}$	$5,9 \pm 0,3^{d}$

*Média ± desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p<0,05$). **A (atividade enzimática): 0,063 U mL^{-1}. *** A: 0,063 U mL^{-1}.

Os resultados demonstram que para uma redução significativa são necessários 300 min de ação para a enzima comercial e 1440 min para a enzima obtida do farelo de arroz, sendo que os percentuais de redução obtidos foram maiores, de 59% para a peroxidase comercial e 41% para a peroxidase do farelo de arroz, considerando uma adição de ocratoxina A de 10 ng mL^{-1}.

O fato da redução de ocratoxina A ter se apresentado elevada no teste em que uma maior concentração de enzima foi utilizada não é usual. Esse comportamento pode ser explicado uma vez que a ocratoxina A não é o substrato ideal da enzima utilizada. Além disso, a peroxidase extraída do farelo não é uma enzima altamente purificada, o que gera a necessidade da adição de uma maior concentração de enzima do que substrato.

Poucos são os estudos relacionados à degradação de ocratoxina A com a enzima peroxidase. Por esse motivo, tona-se difícil a comparação dos resultados obtidos

neste trabalho. Das; Mishra (2000a) avaliaram a ação degradativa da enzima sobre a aflatoxina B_1. Para tal, foi utilizada a enzima comercial e duas parcialmente purificadas extraídas do rabanete. Como resultado, os autores obtiveram que as enzimas purificadas, com atividade específica de 20 e 30 U mg^{-1}, demonstraram 30 e 38% de redução, respectivamente. Diante do exposto, observa-se que a peroxidase extraída do farelo de arroz apresentou uma maior capacidade de redução frente à ocratoxina A, pois foi obtido um percentual superior (41% para a peroxidase obtida do farelo de arroz) quando utilizada uma enzima com menor atividade específica (0,05 U mg^{-1}). Além disso, destaca-se que os autores utilizaram concentrações elevadas de micotoxina (0,312 mg mL^{-1}) o que indica a maior eficiência da peroxidase do farelo de arroz uma vez que, neste trabalho, foram utilizadas concentrações em escala traço.

Feltrin (2013) avaliou a degradação de deoxinivalenol pela mesma enzima e observou que a concentração da micotoxina também variou ao longo do tempo. O autor justificou tal acontecimento devido a possibilidade de adsorção da micotoxina pela enzima. Diante disso, foi avaliada a possibilidade desse efeito através da hidrólise da peroxidase comercial após interação com a micotoxina. O tempo de contato entre a enzima inativada termicamente e a micotoxina foram de 0 e 15 min, onde a concentração de OTA determinada no reator foi a mesma inicialmente adicionada ao sistema (10 ng mL^{-1}) tanto para 0 como 15 min. Este resultado foi o esperado, pois a inativação impediu a ação redutora da enzima. Após esse tempo, a peroxidase foi precipitada e a pepsina adicionada, para que ocorresse a hidrólise da sua estrutura primária liberando a ocratoxina A, se adsorvida. Durante os tempos de reação de hidrólise de 60, 120 e 180 min, a concentração da micotoxina foi de 0,33; 0,24 e 0,25 ng mL^{-1}, respectivamente. Estes resultados demonstram uma adsorção mínima de, em média 2,7 %. Esta baixa adsorção pode ser decorrente da interação da enzima e da micotoxina na própria concavidade do sitio ativo, mas ausente de catálise pela inativação térmica que afetou a estrutura tridimensional principalmente de subunidades adjacentes. Este dado confirma que a redução da concentração de OTA observada neste estudo não foi por adsorção, mas sim por ação enzimática. Estudos envolvendo a definição do mecanismo de atuação da enzima peroxidase sobre OTA são necessários para caracterização bioquímica da redução da micotoxina.

5.5 Determinação dos parâmetros K_M e $V_{máx}$ para as peroxidases.

Primeiramente, foram construídos os gráficos de velocidade média versus concentração de ocratoxina para as duas enzimas (Figuras 6 e 8). Em seguida, foram determinados os parâmetros K_M e $V_{máx,,}$ a partir dos gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figuras 7 e 9).

Para a construção do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a peroxidase do farelo de arroz, foram utilizadas apenas quatro concentrações de ocratoxina A, uma vez que a concentração de 35 ng mL^{-1} resultou em uma velocidade negativa (Figuras 8 e 9). Vários testes foram realizados e esse comportamento permaneceu. Por esse motivo, o coeficiente de determinação obtido (0,9539) não foi tão satisfatório quanto o da peroxidase comercial (0,9994). Uma hipótese para tal comportamento é que a micotoxina em questão possa estar atuando como um inibidor incompetitivo quando em concentrações elevadas, e com isso diminuindo a velocidade de reação. É importante também ressaltar a importância da pureza da enzima, o que dificulta a avaliação exata do mecanismo. Segundo Voet; Voet (2006), os inibidores são susbstâncias que modificam a atividade de uma enzima por combinarem-se com ela de tal maneira que influenciam a ligação com o substrato. Neste caso, o inibidor incompetitivo liga-se diretamente ao complexo enzima-substrato e não a enzima livre. Essa ligação causa alguma distorção estrutural no sitio ativo que torna a enzima cataliticamente inativa, diminuindo, assim, a velocidade máxima.

Figura 6 Gráfico de velocidade versus concentração de ocratoxina A (OTA) para a peroxidase comercial

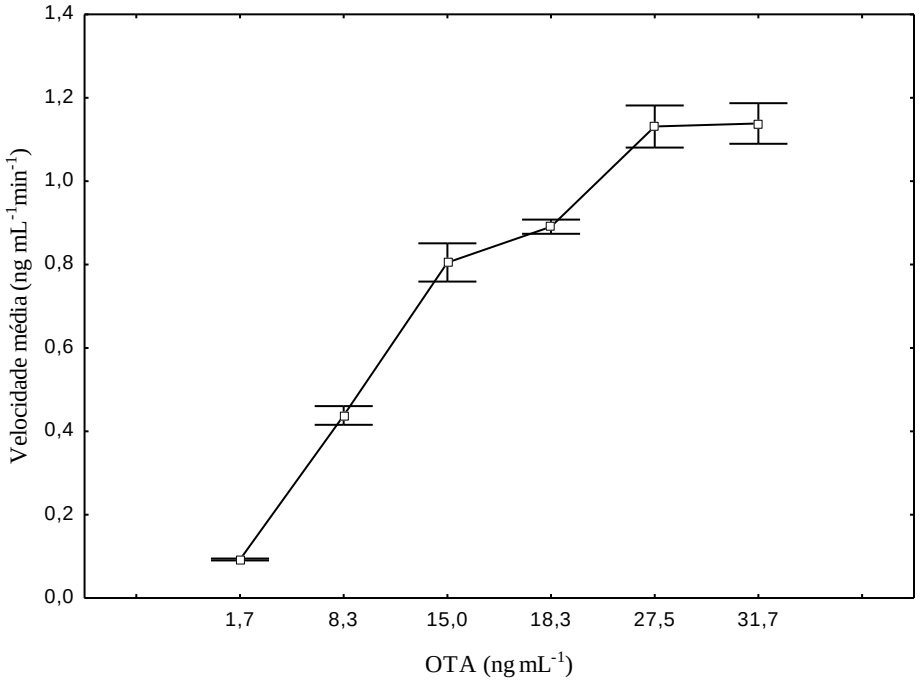


Figura 7 Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a peroxidase comercial

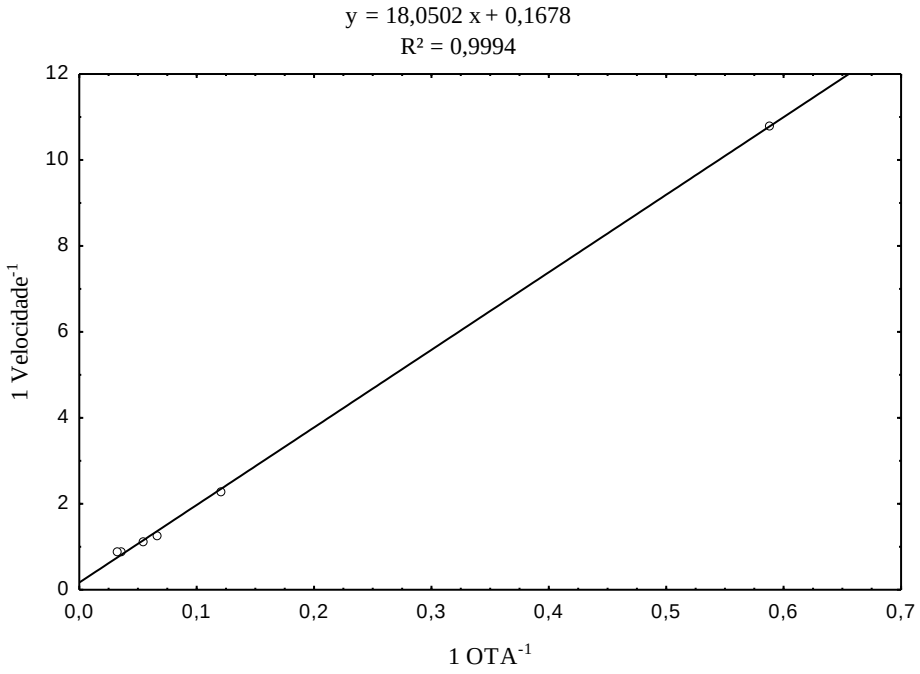


Figura 8 Gráfico de velocidade versus concentração de ocratoxina A (OTA) para a peroxidase do farelo de arroz

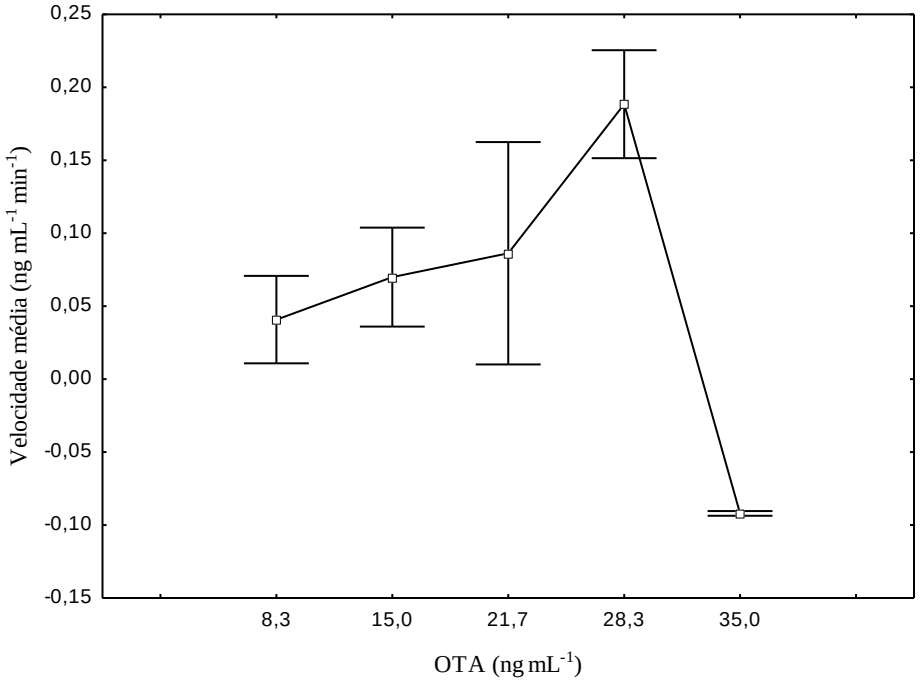
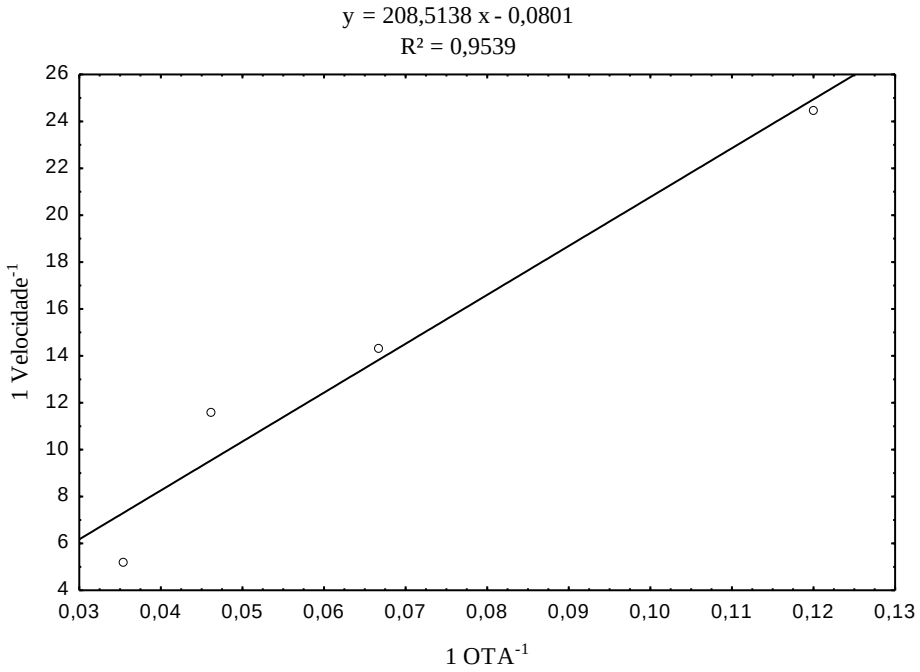


Figura 9 Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a peroxidase do farelo de arroz



Uma vez determinados os gráficos de Lineweaver-Burk e utilizando a Equação 6, foram calculados os parâmetros K_M e $V_{máx}$, apresentados na Tabela 8. Segundo Campbell; Farrell (2007), o K_M é igual à concentração de substrato na qual 50% dos sítios ativos da enzima estão ocupados pelo substrato e por isso, nessa concentração, a reação ocorre com metade de sua velocidade máxima. Além disso, esse parâmetro caracteriza o inverso de uma medida de afinidade, pois ele mede o quão fortemente o substrato está ligado á enzima. Quanto maior o seu valor, menor quantidade de substrato estará ligado à ela, logo menor é a afinidade entre eles. Os resultados obtidos demonstram que a enzima comercial apresentou maior afinidade pela ocratoxina A do que a enzima extraída do farelo de arroz, ou seja, a enzima do farelo apresentou concentração menor de substrato ligado a ela. Essa diferença é explicada devido ao grau de purificação de ambas as enzimas.

Tabela 8 K_M e $V_{máx}$ para peroxidase comercial e a obtidas de farelo de arroz.

Peroxidase	**K_M (mM)**	**$V_{máx}$ (mM min^{-1})**
Comercial	0,00027	0,000015
Farelo de arroz	0,0065	0,000031

Feltrin (2013) determinou os mesmo parâmetros para a peroxidase do farelo de arroz purificada, no entanto, utilizou o guaiacol como substrato, sendo este o substrato universal utilizado para enzimas oxidativas. Os resultados obtidos pelo autor foram de 0,06 mM para o K_M e 666,66 U mg^{-1} para o $V_{máx,}$ sendo estes superiores aos encontrados neste estudo. O mesmo comportamento foi apresentado pelos valores obtidos por Abrunhosa; Venâncio (2007) e Suzuki et al. (2006). Com relação aos primeiros autores, foi estudada uma enzima isolada e purificada de *Aspergillus niger* com capacidade de hidrolisar a ocratoxina A. Para tal enzima, os valores obtidos para os parâmetros K_M e $V_{máx}$ foram de de 0,5 mM e 0,44 μM min^{-1}, respectivamente, quando a reação foi realizada a 37 °C, com pH de 7,5. Suzuki et al. (2006), por sua vez, determinou o K_M de duas isoenzimas de peroxidase extraídas de sementes de trigo sarraceno frente a diversos substratos sendo estes quercetina, o-dianisidina, ABTS, ácido ascórbico e guaiacol. Os valores de K_M variaram de 0,043 mM para o ácido ascórbico até 0,288 mM para o guaiacol.

A variação entre os resultados apresentados na literatura e os obtidos neste trabalho pode ser justificada por diversos fatores relacionados à quantificação do analito. O primeiro deles é com relação à concentração da ocratoxina A. Os testes realizados neste trabalho utilizaram a concentração da micotoxina em ng mL^{-1}, enquanto que os testes

realizados por Feltrin (2013), por exemplo, com guaiacol, foram em μg mL^{-1} resultando, assim, em valores superiores. Os testes com a micotoxina foram realizados com baixas concentrações uma vez que em alimentos, estas toxinas são quantificadas em concentrações em torno de μg kg^{-1}. Um exemplo é o arroz que, segundo Majeed et al. (2013), apresentou uma concentração de ocratoxina A de 12,94 μg kg^{-1}. Além disso, os limites máximos toleráveis (LMT) apresentados nas legislações também encontram-se descritos em μg kg^{-1}, como é o caso de diversos países tais como Brasil e para os que compõem a União Européia. Para o mesmo alimento citado anteriormente, os LMT apresentados, respectivamente, são de 5 e 20 μg kg^{-1}.

Outra justificativa para as variações é com relação ás técnicas de quantificação/separação. Para as determinações realizadas com o guaiacol foi utilizada a espectrometria no UV/Vis, enquanto que para a ocratoxina A foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Tal técnica apresenta uma maior sensibilidade do que a espectrofotometria, podendo, por esse motivo, separar e quantificar compostos em concentrações muito baixas. O mesmo não ocorre com a espectrometria uma vez que, se utilizadas soluções de guaiacol em concentração traço, o metabólito formado a partir da reação com a enzima (tetraguaiacol) não seria detectado por essa técnica.

5.6 Avaliação da aplicabilidade da peroxidase do farelo de arroz em sucos de uva

As condições em que a enzima apresentou uma atividade de 0,0634 U mL^{-1} foram escolhidas para avaliar a redução da ocratoxina A nos sucos de uva. Cabe salientar que essas condições foram as que forneceram a maior redução da OTA avaliada no sistema aquoso. Além disso, estes testes foram realizados apenas com a peroxidase extraída do farelo de arroz devido ao alto custo da enzima comercial o que inviabiliza a aplicação industrial.

A escolha do suco de uva é justificada devido, principalmente, ao seu processo industrial de produção. Diversas são as etapas de produção do suco e, dentre elas, encontra-se a pasteurização (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). A aplicação da enzima como forma de redução da contaminação de OTA pode ocorrer previamente a esta etapa. Em sucos, é necessário que esta enzima esteja inativa após o processo, uma vez que sua atividade está intimamente ligada ao desaparecimento do aroma e ao surgimento de *off-flavous* em produtos vegetais. Além disso, essas podem participar da alteração da cor e da

destruição do valor nutritivo desses produtos (oxidação de vitamina C e de aminoácidos) (KOBLITZ et al., 2010).

Como a aplicação da peroxidase extraída do farelo de arroz foi realizada, também, com o intuito de reduzir custos de produção, uma vez que esta foi obtida de um subproduto industrial, não é viável e indicado adicionar mais uma etapa de inativação enzimática em um processamento alimentício. Então, como a pasteurização faz parte do processamento do suco, optou-se por verificar a aplicação neste produto.

A contaminação natural dos sucos e os percentuais de recuperação foram determinados, sendo que os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9. Segundo a resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, para os sucos de uva, o limite máximo tolerável de ocratoxina A é de 2 μg kg^{-1} (ng mL^{-1}), estando os resultados obtidos dentro desse limite. Poucos são os relatos apresentados na literatura referentes à contaminação de sucos de uva por ocratoxina A. No entanto, a contaminação de vinhos e uvas é largamente estudada. Segundo Varga; Kozakiewicz (2006), a proporção de amostras de suco de uva contaminados com ocratoxina A foi bem elevada, em alguns estudos, especialmente para sucos de uva tintos, mas inferior para as amostras de suco branco. O mesmo pode ser confirmado neste trabalho uma vez que a contaminação natural do suco tinto foi mais elevada que a do branco. Além disso, Rosa et al. (2004) avaliaram a ocorrência de ocratoxina A em vinho e suco de uva comercializados no Rio de Janeiro e verificaram que de 64 amostras de suco de uva e polpa congelada, 25% estavam contaminadas com ocratoxina A, em concentrações variando de 0,021 a 0,1 ng mL^{-1}. Shundo et al. (2006), por sua vez, estudaram a presença de ocratoxina A em vinhos e sucos de uvas comercializados na cidade de São Paulo, não sendo detectada em nenhuma das amostras de suco analisadas.

Os percentuais obtidos para as recuperações da ocratoxina A nos sucos (Tabela 9) estão de acordo com Moreau; Siqueira (2010), sendo que para a análise de resíduos, os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70% e 120% com precisão de até ± 20%. Os autores citados anteriormente também determinaram a recuperação nos produtos analisados. Shundo et al. (2006) avaliaram a recuperação em um nível de 0,4 ng mL^{-1} e obteve um valor de 86,2% com desvio padrão relativo de 2,01%. Rosa et al. (2004), por sua vez, obteve um valor de 91,6% de recuperação. Os valores obtidos neste trabalho estão similares aos apresentados pelos autores.

Tabela 9 Contaminação natural e percentuais de recuperação de OTA em sucos de uva.

Suco	Contaminação natural (ng mL^{-1})*	OTA adicionada (ng mL^{-1})	Recuperação (%)*	Recuperação Média (%)*
Branco	< LQ	0,7	83 (9)	97 (6)
		3,4	95 (6)	
		20,7	111 (4)	
Tinto	1,98 (3)	3,4	84 (3)	93 (4)
		11,1	96 (6)	
		20,7	98 (4)	

*Média (% CV).

Diante dos resultados de contaminação natural, aos sucos foram adicionados 13 ng mL^{-1} de OTA para o teste de redução da micotoxina, sendo os valores de concentração de ocratoxina A apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 Ocratoxina A após a ação da peroxidase obtida do farelo de arroz nos sucos de uva e contaminação de 13 ng mL^{-1}.

Tempo (min)	OTA (ng mL^{-1})*	
	Suco Branco	Suco Tinto
0	12,9 ± 0,3^{a}	12,1 ± 0,6^{a}
15	13,3 ± 0,5^{a}	12,5 ± 0,5^{a}
30	13,4 ± 0,8^{a}	12,2 ± 0,6^{a}
60	11,9 ± 0,2^{ab}	11,7 ± 0,7^{a}
300	13,3 ± 1,1^{a}	12,2 ± 0,7^{a}
1440	10,8 ± 0,3^{b}	12,7 ± 0,6^{a}

*Média ± desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p<0,05$). AE da peroxidase do farelo: 0,05 U mg proteína^{-1}.

Os valores demonstram que para o suco branco ocorreu uma redução significativa (17%) na concentração de ocratoxina A no tempo de 1440 min. Para o suco tinto, por sua vez, não ocorreu diferença na concentração da micotoxina ao longo do tempo de processo.

O pH dos sucos foi verificado uma vez que acreditava-se que este poderia ser um fator que pudesse ter afetado a atividade enzimática. O pH dos sucos determinados foram de 3,3 e 3,5, para os sucos branco e tinto, respectivamente. A partir disso, foi avaliada a atividade da peroxidase utilizando um tampão com pH 3,5. A atividade específica da enzima no pH ótimo (5,5) foi de 0,456 U mg enquanto que e no pH 3,5 foi de

0,265 U mg, sendo que esses valores apresentam diferença significativa ($p<0,05$). Segundo Marzzoco; Torres (1999), as enzimas possuem um pH ótimo (ou um intervalo de pH) no qual a sua atividade é máxima, sendo que em pH maior ou menor, essa atividade diminui. Isso acontece, pois as enzimas apresentam grupos tituláveis em alguns resíduos formadores das cadeias laterais dos aminoácidos. Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns destes grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula da enzima a conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Por outro lado, quando o substrato contem grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar suas cargas. Portanto, a eficiência da catálise dependerá, então, que a enzima e o substrato estejam com conformações e carga adequadas para permitir a interação.

Outra hipótese é a presença de compostos fenólicos nos sucos que podem atuar como inibidores enzimáticos ou ainda, como substrato Nos sucos, a concentração desses compostos variam de acordo com a espécie, maturação, condições de cultivo das uvas e da tecnologia aplicada para obter o suco. Suas concentrações também diferem entre os tecidos de uvas, uma vez que a polpa é rica em ácidos fenólicos e a pele rica em flavonoides (flavonóis, flavanóis e antocianinas). Assim, sucos de uva comercialmente disponíveis variam muito em número e tipo de compostos fenólicos (MORENO-MONTORO et al., 2015; NACZK; SHAHIDI, 2006). Segundo Moreno-Montoro et al. (2015) a classe de compostos fenólicos que surge em maior concentração, no suco tinto, são as antocianinas (285 mg. L^{-1}) seguidas dos flavonóides (98 mg. L^{-1}). No suco branco, a concentração de flavonoides encontrada foi de 67,2 mg L^{-1}. Com relação aos ácidos fenólicos, o que se apresentou em maior concentração, no suco tinto, foi o ácido gálico com 2,01 mg L^{-1}, enquanto que no suco branco foi o m- ácido hidroxibenzóico com 2,66 mg L^{-1}.

Com relação á ação inibitória desses compostos, estudos que utilizam compostos fenólicos com esse objetivo são descritos na literatura e, estando relacionado à atividade da peroxidase, são aplicados métodos em que se avalia a atividade antioxidante desses compostos relacionando com a inibição da atividade da referida enzima (COLLA et al., 2007; MOJICA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007). Um exemplo disso é o estudo realizado por Oliveira et al. (2007) que avaliaram a atividade antioxidante de compostos fenólicos extraídos de diversos vegetais através de métodos de inibição do escurecimento

enzimático catalisada pela peroxidase. Os autores apresentaram percentuais de inibição que variaram de 10% (polpa de berinjela) até 98% (polpa de laranja), dependendo da fonte fenólica. Isso demonstra a capacidade desses compostos em inibir a atividade da peroxidase.

Estudos apresentados na literatura demonstram que o conteúdo de compostos fenólicos totais dos sucos de uva tinto (2015 mg L^{-1}) são superiores aos presentes nos sucos de uva brancos (550 mg L^{-1}), justificando a não redução da concentração de ocratoxina A no suco tinto versus os 17% de redução encontrados no suco branco (TOALDO et al., 2015). Além disso, devido à elevada concentração de compostos fenólicos no suco tinto, é possível também que a enzima esteja atuando, primeiramente, na degradação destes compostos, caso não ocorra inibição enzimática, e não na ocratoxina A. Uma vez que o suco branco apresenta concentrações menores, foi possível verificar a redução (MORENO-MONTORO et al., 2015).

A aplicação da peroxidase é considerada, então, satisfatória frente aos métodos físicos e químicos comumente utilizados na degradação de ocratoxina A. No entanto, estudos são necessários para que as condições de reação da enzima nos sucos de uva ou em qualquer outro produto alimentício sejam otimizadas para que o percentual de redução possa ser aumentado. Com isso, a enzima pode vir a ser utilizada, por exemplo, na redução de ocratoxina A em vinho, substituindo os adsorventes estudados por Castellari et al. (2001). Ainda que os autores tenham obtido percentuais de redução elevados (82%), o uso de adsorventes não tem sido bem visto devido à adsorção de alguns nutrientes, efeito não observado quando utilizada a enzima. O mesmo pode-se dizer para o estudo de Var; Kabak; Erginkaya (2008) em que a adsorção de ocratoxina A de vinho branco utilizando carvão ativado foi estudada e os autores verificaram que quando o vinho estava contaminado com 5 ng mL^{-1} de ocratoxina A e foi tratado com 1 mg mL^{-1} de carvão ativado, 87% da toxina disponível foi adsorvida.

Outra aplicação da peroxidase seria juntamente a um processo físico. Gambuti et al. (2005) verificaram que ao filtrar o vinho utilizando uma membrana de 10 μm não ocorria diminuição significativa nos níveis de ocratoxina A. Então, como alternativa, a enzima peroxidase poderia ser aplicada antes ou após esse processo, resultando em uma diminuição significativa da concentração da micotoxina no vinho. Além disso, a imobilização da enzima também parece ser uma alternativa viável, uma vez que Niu et al. (2013) verificou que há diferença entre a ação da peroxidase livre e imobilizada frente a

degradação de pentaclorofenol presente em água. Ainda que o substrato estudado pelo autor não seja a ocratoxina A, acredita-se que o processo de imobilização possa ser utilizado na indústria de alimentos como, por exemplo, na produção de vinho, possibilitando um maior percentual de redução da micotoxina e ainda a reutilização da enzima.

A enzima peroxidase poderia ser uma alternativa, ainda, para o estudo realizado por Castellanos-Onorio et al. (2011). Os autores verificaram que para ocorrer uma redução de 96% na concentração de ocratoxina A foi necessária uma exposição do grão durante 15 min a 230°C. No entanto, esse processo geraria uma diminuição nos antioxidantes presentes no café, o que não é desejado. A partir destas informações, vislumbra-se a possibilidade de aplicação da enzima, uma vez que possa ser adicionada a esse grão, auxiliando na redução da contaminação e evitando processos de torrefação tão drásticos.

6 CONCLUSÃO

As condições de extração da ocratoxina A do meio reacional foram determinadas, sendo elas satisfatórias uma vez que apresentaram parâmetros de validação de acordo com os estabelecidos na literatura.

As peroxidases obtiveram valores de K_M e $V_{máx}$ de 0,00027 mM e 0,000015 mM min^{-1} para a peroxidase comercial e 0,0065 mM e 0,000031 mM min^{-1} para a peroxidase do farelo de arroz, respectivamente.

Com relação à redução da ocratoxina A, um percentual de 59% foi obtido utilizando a proporção enzima:substrato 8:1 para a enzima comercial. Para a enzima obtida do farelo de arroz, por sua vez, foi obtido 41% de redução da concentração da micotoxina, quando utilizada a mesma atividade enzimática do teste anterior (0,063 U mL^{-1}) .

A adição de uma peroxidase com 0,063 U mL^{-1} gerou um percentual de redução de 17% no suco branco. Porém, não houve efeito significativo no suco tinto.

A capacidade de redução dos níveis da ocratoxina A pela enzima peroxidase foi verificada, tanto em sistema reacional como no suco de uva integral branco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD ALLA, E. S. Zearalenone: toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. **Molecular Nutrition & Food Research.** v. 41, n. 6, p. 362-365, 1997

ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**. v. 20, 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, p. 7493-7496, 2002.

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

ALGÜL, I.; KARA, D. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey. **Food Chemistry.** v. 157, p. 70-76, 2014.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control.** v. 20, p. 326-333, 2009.

AMISSAH, J. G. N.; ELLIS, W. O.; ODURO, I.; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control.** v. 14, p. 21-24, 2003.

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

BASAPPA, S. C.; SHANTHA, T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds - a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology.** v. 33, n. 2, p. 95-107, 1996.

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

BRASIL**.** Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Seção 1, p. 72.

BRASIL. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**. v. 173, p. 134– 158, 2012.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology.** v. 119, p. 140-146, 2007.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica.** Tradução da 5ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2007.

CAST. **Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems.** Ames, Iowa, USA, 2003.

CASTELLANOS-ONORIO, O.; GONZALEZ-RIOS, O.; GUYOT, B.; FONTANA, T. A.; GUIRAUD, J. P.; SCHORR-GALINDO, S.; DURAND, N.; SUÁREZ-QUIROZ, M. Effect of two different roasting techniques on the ocratoxina A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Control.** v. 22, p. 1184-1188, 2011.

CASTELLARI, M.; VERSARI, A.; FABIANI, A.; PERPINELLO, G. P.; GALASSI, S. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 3917-3921, 2001.

CENKOWSKI, S.; PRONYK, C.; ZMIDZINSKA, D.; MUIR, W.E. Decontamination of food products with superheated steam. **Journal of Food Engineering.** v. 83, p. 68-75, 2007.

CIEGLER, A.; LILLEHOJ, E. B.; PETERSON, R. E.; HALL, H. H. Microbial detoxification of aflatoxin. **Applied Microbiology.** v. 14, n. 6, p. 934-939, 1966.

COLE, R. J. Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. **Academic Press**, 1986.

COLLA, L. M.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.

CURVELO-SANTANA, J. C.; SEVERO JÚNIOR, J. B.; BIAZUS, J. P. M.; de SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Purificação de amilase de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leito expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology.** p. 132-137, 2008.

DAS, C.; MISHRA, H. N. *In vitro* degradation of aflatoxin B_1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry.** v. 68, p. 309-313, 2000a.

DAS, C.; MISHRA, H. N. *In vitro* degradation of aflatoxin B_1 in groundnut (*Arachis hypogeal)* meal by horse radish peroxidase. **LWT - Food Science and Technology.** v. 33, n. 4, p. 308-312, 2000b.

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

EUROPEAN COMMISSION. Regulamento n.º 1881/2006, de 19 de dezembro fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. União Europeia, 2006.

FARAJ, M. K.; SMITH, J. E.; HARRAN, G. Aflatoxin biodegradation: effects of temperature and microbes. **Mycological Research.** v. 97, n. 11, p. 1388-1392, 1993.

FELTRIN, A. C. P. **Obtenção de peroxidase e avaliação de ação biodeagradativa de Deoxinivalenol.** 2013. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2013.

FONTAN, R. C. I.; ALCÂNTARA, L. A. P.; NETO, S. C. A. L.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, G. C. R. Cinética de inativação da peroxidase em água de coco. **Semina: Ciencias Agrárias,** v. 33, n. 1, p. 249-258, Londrina, 2012.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; GENOVESE, A.; UGLIANO, M.; RITIENI, A.; MOIO, L. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. **American Journal of Enology and Viticulture.** v. 56, n. 2, p. 155-162, 2005.

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.

HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry.** v. 115, p. 1177–1186, 2009.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**. v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters.** v. 122, p. 179-188, 2001.

IMPERATO, R.; CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; VENEZIANO, A.; RASTRELLI, L. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. **Food Control.** v. 22, p. 1905-1910, 2011.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2003.

JONGMEVASNA, W.; YAIYEN, S.; PROUSOONTORN, M. H. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz of cv. KU50) peroxidase and its potential for the detection of some thiol compounds based on the inhibitory effect of 3,3’,5,5’-tetramethylbenzidine oxidation. **Process Biochemistry.** v. 48, p. 1516-1523, 2013.

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

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. **Toxins.** v. 2, p. 461-493, 2010.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos – Teoria e aplicações praticas.** Editora Guanabara Koogan LTDA. Rio de Janeiro, 2010.

KUMAR, R.; ANSARI, K. M.; SAXENA, N.; DWIVEDI, P. D.; JAIN, S. K.; DAS, M. Detection of Ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control.** v. 26, p. 63-67, 2012.

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.

LASRAM,S.; OUESLATI, S.; MLIKI, A.; GHORBEL, A.; SILAR, P.; CHEBIL, S. Ochratoxin A and ochratoxigenic black Aspergillus species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control.** v. 25, p. 75-80, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica.** 3ª ed. Sarvier, São Paulo, 2002.

LIU, D.; YAO, D.; LIANG, R.; MA, L.; CHENG, W.; GU, L. Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens.* **Food and Chemical Toxicology.** v. 36, p. 563-574, 1998.

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

LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. Rice bran: chemistry and technology. 2ª ed. New York, 1991.

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

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R.; IQBAL, S. Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science.** v. 58, p. 446-450, 2013.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** 2ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 1999.

McKENZIE, K. S.; SARR, A. B.; MAYURA, K.; BAILEY, R. H.; MILLER, D. R.; ROGERS, T. D.; NORRED, W. P.; VOSS, K. A.; PLATTNER, R. D.; KUBENA, L. F.; PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology.** v. 35, 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, p. 579-583, 2010.

MOHAN, S. V.; PRASAD, K. K.; RAO, N. C.; SARMA, P. N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere.** v. 58, p. 1097-1105, 2005.

MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; de MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α-amylase and α-glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International.** 2014.

MOONGNGARM, A.; DAOMUKDA, N.; KHUMPIKA, S. Chemical compositions, phytochemicals and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer and rice germ. **APCBEE Procedia.** v. 2, p. 73-79, 2012.

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

MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; GIMENEZ-MARTINEZ, R.; NAVARRO-ALARCON, M.; RUFIÁN-HENARES, J. A. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. **Journal of Food Composition ans Analysis.** v. 38, p. 19-26, 2015.

NACZK,M. SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 41, p. 1523 – 1542, 2006.

NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro.* **Journal of Applied Microbiology.** v. 101, p. 849–856, 2006.

NIU, J.; XU, J.; DAI, Y.; XU, J.; GUO, H.; SUN, K.; LIU, R. Immobilization of horseradish peroxidase by electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of pentachlorophenol in water. **Journal of Hazardous Materials.** v. 246-247, p. 119-125, 2013.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição.** v. 18, n. 3, p. 267-275. Araraquara, 2007.

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

PAUCAR-MENACHO, L. M.; da SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S.; GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ-orizanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 27, p. 45-53, 2007.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Boletín de la organización mundial de la salud - Recopilación de artículos.** n. 2, 2000.

PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C.; VARGA, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food Microbiology.** v. 24, 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, p. 373-377, 2014.

QUINTELA, S.; VILLARÁN, M. C.; de ARMENTIA, I. L.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A removal in wine: A review. v. 30, p. 439-445, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova.** v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos.** Editora Edgard Blücher LTDA. 1ª ed. São Paulo, 2004.

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

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, 2007.

ROSA, C.A.; MAGNOLI, C.E.; FRAGA, M. E.; DALCERO, A. M.; SANTANA, D. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil**.** **Food Additives & Contaminants.** v. 21, n. 4, p. 358-364, 2004.

SCHMIDT-HEYDT, M.; RÜFER, C. E.; ABDEL-HADI, A.; MAGAN, N.; GEISEN, R. The production of aflatoxin B1 or G1 by *A. parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. **Mycotoxin Research**. v. 26, n. 4, p. 241-246, 2010.

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, p. 233-241, 2012.

SCHMIDT, C. G.; FURLONG, E. B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae.* **Bioresource Technology.** v. 123, p. 36-41, 2012.

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MACDONALD, S. J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. **Food Additives and Contaminants**. v. 20, n. 12, p. 1153–1163, 2003

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J. N.; GUY, R. C. E. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. **Food Additives and Contaminants.** v. 21, n. 5, p. 488–497, 2004.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, degradações, modificações,** São Paulo: Livraria varela, 1996.

SHUNDO, L.; de ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; SABINO, M. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 37, p. 533-537, 2006.

SOBCZACK, A. **Micotoxinas acarretam prejuízo ao agronegócio.** Universo agro, 2003. Disponível em: http://www.uagro.com.br/editorias/pesquisa-e-

tecnologia/biotecnologia/2013/05/29/micotoxinas-acarretam-prejuizo-ao-agronegocio.html. Acesso em: 11 de set. 2013.

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.

SUZUKI, T.; HONDA, Y.; MUKASA, Y.; KIM, S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. **Phytochemistry.** v. 67, p. 219-224, 2006.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology.** v. 43, p. 141-158, 1998.

SYDENHAM, E. W.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; STOCKENSTRÖM, S.; SHEPARD, G. S.; THIEL, P. G. Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments**. Food Additives and Contaminants**. v. 11, n. 1, p. 25–32, 1994.

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; ALVES, T. L.; de GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; CUNHA, H. P.; da SILVA, E. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juice from Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry.** v. 173, p. 527-535, 2015.

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

VAN DER MERVE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature.** v. 205, p. 1112–1113, 1965.

VAR, I.; KABAK, B.; ERGINKAYA, Z. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. **Food Control.** v. 19, p. 592-598, 2008.

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, p. 321-328, 2005.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-devived products. **Trends in Food Science & Technology.** v. 17, p. 72-81, 2006.

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,** 2014.

VIDAL, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. **Food Chemistry.** v. 178, p. 276-286, 2015.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica.** 3ª ed. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, 2006.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular.** 2ª ed. Artmed Editora S.A., Porto Alegra, 2008.

WOESE, K. Ochratoxin A in grape juice and wine. **Mycotoxin Research.** v. 16, p. 132–135, 2000.

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.

YOUNG, J. C.; TRENHOLM, H. L.; FRIEND, D. W.; PRELUSKY, D. B. Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 35, p. 259–261, 1987.

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

ZHANG, J,; YE, P.; CHEN, S.; WANG, W. Removal os pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidase. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 59, p. 307-314, 2007.

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, p. 1–18, 2007.