



FURG

Dissertação de Mestrado

**Aplicação de Peroxidase para degradação de
Deoxinivalenol**

**Ana Carla Penteado Feltrin
Química**

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por me proporcionar a alegria de poder realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Renato e Eliane, pelo carinho, atenção e comprometimento a mim dedicados, por aceitarem e apoiarem minhas decisões, pela força e aconselhamento. Essa conquista é de vocês e por vocês. Obrigada por serem a base de quem sou hoje!

Meu maninho Claudio, obrigada “cabeça” por estar presente nos momentos bons e ruins com paciência (ou não) nos últimos anos. A toda família pelo incentivo!

À minha orientadora Jaqueline, te agradeço por me aceitar como tua orientada mesmo sem me conhecer. Tua atenção, apoio, incentivo e paciência desde minha chegada, durante o desenvolvimento do trabalho, em cada disciplina desenvolvida, cada conversa e conselho, podes ter certeza nunca esquecerei. Bem mais que pela orientação, te agradeço pela amizade, confiança e dedicação em mim depositadas.

À minha co-orientadora Eliana, prof. és merecedora de admiração por tua dedicação com o laboratório, disposição e empenho ao ajudar e ensinar a todos em qualquer tempo, sem dúvida um exemplo a ser seguido. Nesses dois anos me mostraste alguns valores algumas vezes esquecidos e como é bom quando a gente faz o que gosta.

À minha amiga e companheira de mesa Larine, a ti tenho que agradecer muito e acho que por todos os dias passados no mestrado, não teve nenhum momento que precisei braçal ou intelectualmente que não estivesse disponível e pronta para ajudar. Muito obrigada por tua paciência diária, te admiro muito pelo comprometimento constante com o que tu fazes e com quem te cerca.

À Fernanda e a Jesus, dois exemplos de força e determinação, me mostraram que tudo é possível com um pouco de força de vontade. À Anelise por estar sempre pronta a ajudar, obrigada pelo ombro amigo, pelo empréstimo dos ouvidos para “chorumelas” e pelas inúmeras risadas, teu bom humor é invejável!

Aos meus “*best friends forever*” Dini, Valéria e Tiago S., obrigada por fazerem parte da minha vida. Não tenho muitos amigos, mas os que tenho são os melhores do mundo, sei que posso contar com vocês sempre. Ao querido mestre prof. Márcio, obrigada por

teu incentivo e atenção, quero que saibas que se cheguei até aqui hoje, foi porque um dia me disseste que conseguiria.

Ao Tiago, por estar fazendo parte da minha vida nesse momento, e espero que em muitos outros, obrigada meu bem por tonar os últimos meses mais leves e felizes! Aos meus colegas de pós Cátia, Elisane, Rafael A. e Rafael C. muito obrigada pelo carinho, amizade e pelo companheirismo nos estudos durante esses dois anos.

Aos colegas de laboratório, Cris, Tai, Lú, Renata, Muriele, Elisa, Lidi, Adri, Náthali, Annie, Fran, Katherine, Paula, Carol, Guta, Antônio e prof. Leonor, obrigada pela paciência, risadas e conversas diárias. Aos ex-colegas Júlio, Denise e Ricardo, agradeço pela recepção no grupo de trabalho e pela paciência ao ensinar cada detalhe cotidiano no laboratório. Às colegas de apê Pri e Pico, obrigada por me “aturarem” todos os dias.

Aos queridíssimos alunos de iniciação científica, Carlos, Milena, Stéfani, Andressa, Henrique, Rosana e Gustavo, obrigada pela dedicação de cada um com o trabalho. E já que só os fortes sobrevivem, em especial agradeço a minha “curica” Rosana e ao Henrique pelo comprometimento e atenção, esse trabalho também é de vocês.

Aos laboratórios: Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) e Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) pela grande colaboração com o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE APÊNDICES.....	xi
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 MICOTOXINAS.....	5
3.1.1 Deoxinivalenol	7
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE DON	9
3.3 DEGRADAÇÃO DE DON.....	10
3.4 ENZIMAS.....	14
3.4.1 Extração, concentração e purificação de enzimas.....	14
3.4.2 Caracterização enzimática.....	14
3.4.3 Peroxidases	19
3.5 APLICAÇÃO DA PEROXIDASE EM DESCONTAMINAÇÃO.....	21
4.MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAL	24
4.1.1 Subprodutos agroindustriais	24
4.1.2 Padrões de micotoxinas e peroxidase	24
4.1.3 Instrumentação	24
4.1.4 Reagentes e solventes	26
4.2 MÉTODOS.....	28
4.2.1 Caracterização química da fonte enzimática	26
4.3 OBTENÇÃO ENZIMÁTICA	29
4.3.1 Estabelecimento das condições de extração.....	29
4.3.2 Moduladores de atividade enzimática.....	30
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA	31
4.5 PURIFICAÇÃO DAS PEROXIDASES.....	31

4.5.1	Concentração protéica.....	31
4.5.2	Cromatografia de exclusão molecular – Sephadex G-100.....	31
4.5.3	Partição trifásica (TPP).....	32
4.6	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	31
4.6.1	Parâmetros cinéticos	33
4.6.2	Estabilidade enzimática	34
4.6.3	Parâmetros termodinâmicos	36
4.6.4	Determinação da massa molecular.....	36
4.7	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL	37
4.7.1	Condições cromatográficas para separação e quantificação de Deoxinivalenol e De-epoxi-Deoxinivalenol.....	37
4.7.2	Validação de método analítico.....	39
4.7.3	Cinética de degradação	40
4.7.4	Extração de Deoxinivalenol do sistema reacional.....	41
4.8	RECUPERAÇÃO DE SOLVENTE ORGÂNICO	42
4.9	TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS E LIMPEZA DE VIDRARIA.....	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUBPRODUTOS	44
5.2	CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA PEROXIDASE.....	44
5.2.1	Moduladores de atividade enzimática.....	51
5.3	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA	53
5.3.2	Cromatografia de exclusão molecular.....	56
5.3.2	Partição trifásica (TPP)	56
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	59
5.4.1	Tempo ótimo de reação	59
5.4.2	Temperatura ótima da enzima	59
5.4.3	pH ótimo de reação.....	60
5.4.4	Força iônica do tampão de reação.....	61
5.4.5	Parâmetros cinéticos	62
5.4.6	Estabilidade da enzima.....	63
5.4.7	Determinação da massa molecular.....	69

5.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL	71
5.5.1 Condições cromatográficas otimizadas para separação e determinação de Deoxinivalenol e Deepoxi-Deoxinivalenol em HPLC-UV, HPLC-DAD e LC-MS/MS	71
5.5.2 Validação do método analítico	74
5.5.3 Estudo da cinética de degradação de DON.....	74
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos tricotecenos tipos A (Toxina T-2) (a), B (DON) (b), C (Crotocina) (c) e D (Roridina E) (d).	6
Figura 2. Mecanismo de purificação por cromatografia de exclusão molecular (http://www.ioc.fiocruz.br/gpesb/aulas_artigos/Aula_SecMals.pdf).	16
Figura 3. Reação proposta para polimerização de BPA (bisenol A) catalisada por BGP (peroxidase abóbora amarga) (KARIM e HUSAIN, 2009).	23
Figura 4. Representação esquemática do desenvolvimento experimental.....	28
Figura 5. Superfícies de resposta geradas através do planejamento experimental DCCR 2 ³ , para extração da enzima PO de FA.....	48
Figura 6. Superfícies de resposta geradas através do planejamento experimental DCCR 2 ³ , para extração da enzima PO de FS.....	49
Figura 7. Influência da força iônica (mmol L^{-1}) do tampão fosfato pH 5,5 na extração da enzima PO para FA (a) e pH 5 na extração de FS (b).	50
Figura 8. Sistemas de agitação utilizados para extração da PO (a) FA e (b) FS. Onde: agitação orbital (1) 100 rpm, agitação ultrassônica (2) 40 kHz, (3) 37 kHz, (4) 25 kHz e (5) em blender.	51
Figura 9. Perfil de eluição obtido a partir de cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, das POs de FA (a) e FS (b)......	55
Figura 10. Perfil do efeito do tempo (min) na reação na atividade da enzima PO de FA (a) e PO de FS (b)......	59
Figura 11. Perfil do efeito da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na reação da enzima PO de FA (a) e PO de FS (b) em pH 6 a 30 $^{\circ}\text{C}$	60
Figura 12. Perfil do efeito do pH do tampão fosfato utilizado na reação da enzima PO FA (a) e PO FS e (b) em pH 6.	61
Figura 13. Efeito da força iônica (mmol L^{-1}) do tampão fosfato de reação da enzima PO de FA (a) e PO de FS.	62
Figura 14. Reação de formação do composto oxidado tetraguaiacol.	62
Figura 15. Estabilidade em pH da enzima PO de FA (a) e PO de FS (b) incubadas em diferentes pH a temperatura de refrigeração (10 $^{\circ}\text{C}$).	64

- Figura 16.** Curvas de correlação entre a Massa Molecular (kDa) e o fator de retenção no gel SDS-PAGE, para padrão de marcador molecular para FA (a) e FS (b).....69
- Figura 17.** Perfil eletroforético do extrato proteico para PO de FA, realizado em amostras em condições de desnaturação e *in natura*. Onde: (1) padrão de massa molecular, (2) extrato bruto *in natura*, (3) extrato bruto desnaturado, (4) extrato bruto precipitado com acetona, (5) extrato purificado por Sephadex G-100, (6) extrato purificado por TPP e (7) padrão de HRP 44 kDa.....70
- Figura 18.** Perfil eletroforético do extrato proteico para PO de FS, realizado em amostras em condições de desnaturação e *in natura*. Onde: (1) padrão de massa molecular, (2) extrato bruto *in natura*, (3) extrato bruto desnaturado, (4) extrato bruto precipitado com acetona, (5) extrato purificado por Sephadex G-100, (6) extrato purificado por TPP, (7) padrão de HRP 44 kDa e (8) extrato purificado *in natura*.....70
- Figura 19.** Cromatogramas de eluição de DON (a) e De-DON (b) em diferentes proporções de FM. FM: H₂O: ACN: tampão fosfato (1) 85:5:10, (2) 80:10:10 e (3) 85:10:5.72
- Figura 20.** Perfil cromatográfico encontrado para DON (a) e De-DON (b) em diferentes dias de análise. Em (1) 8 h após separação e em (2) 12h.72
- Figura 21.** Cromatogramas de eluição de DON (a) e De-DON (b) em diferentes razões de FM em HPLC-DAD. Sendo H₂O:ACN em (1) 30:70 – 0,5 mL min⁻¹, (2) 80:20 – 0,5 mL min⁻¹, (4) 30:70 – 0,3 mL min⁻¹, (5) 30:70 – 0,2 mL min⁻¹, (6) 25:75 – 0,2 mL min⁻¹ e em (3) H₂O:ACN:MeOH 25:70:5 – 0,5 mL min⁻¹..... 74
- Figura 22.** Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk da PO para farelo de arroz nas formas bruta (a) e pura (b) e para PO de FS nas formas bruta (c) e pura (d)..... 97
- Figura 23.** Dados de ln/[A] em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 25 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FA bruta.98
- Figura 24.** Dados de ln/[A] em função do tempo para cálculo do K_d a 70 °C (a), 80 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FA bruta.99
- Figura 25.** Dados de ln/[A] em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 25 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FA purificada..... 100
- Figura 26.** Dados de ln/[A] em função do tempo para cálculo do K_d a 70 °C (a), 80 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FA purificada. 101

Figura 27. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 25 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FS bruta.	102
Figura 28. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 70 °C (a), 80 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FS bruta.	103
Figura 29. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 30 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FS purificada.....	104
Figura 30. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 80 °C (a), 90 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FS purificada.	105
Figura 31. Constantes de desnaturação térmica $\ln(K_d)$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) da PO de FA bruta (a), purificada (b) e PO de FS bruta (c) e purificada (d).	106
Figura 32. Comparação entre as curvas analíticas encontradas nos dois sistemas para DON (a) e De-DON (b) em tampão fosfato em HPLC-UV e HPLC-DAD.	107
Figura 33. Comparação entre as curvas analíticas encontradas para DON em tampão fosfato e ACN em HPLC-DAD, nas duas colunas testadas.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites Máximos Tolerados (LMT) da presença de DON em alimentos.....	8
Tabela 2. Métodos físicos de descontaminação de DON.	12
Tabela 3. Níveis e variáveis analisadas no delineamento composto central rotacional DCCR 2 ³	30
Tabela 4. Caracterização química de FA e FS.	44
Tabela 5. Matriz do planejamento experimental DCCR 2 ³ , com variáveis e níveis avaliados em função da atividade específica (U mg ⁻¹) de PO de FA e FS.....	45
Tabela 6. Efeitos sobre a atividade específica (U mg ⁻¹) no DCCR 2 ³ utilizado na extração da PO.	46
Tabela 7. ANOVA para a resposta em atividade específica (U mg ⁻¹) para o DCCR 2 ³ da extração da PO.	47
Tabela 8. Efeito de moduladores na atividade da PO de FA e FS em termos de atividade relativa (%) e RSD (%).	54
Tabela 9. Purificação de PO obtida de FA e FS.	54
Tabela 10. Efeito da saturação de sulfato de amônio e efeito da razão extrato bruto:acetona na purificação da enzima PO obtida de FA e FS.....	57
Tabela 11. Etapas de purificação por TPP das PO obtida de FA e FS.....	58
Tabela 12. Parâmetros cinéticos da PO de FA e FS.	63
Tabela 13. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FA na forma bruta.	65
Tabela 14. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FA na forma purificada.	66
Tabela 15. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FS na forma bruta.	66
Tabela 16. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FS na forma purificada.	67
Tabela 17. Testes realizados para melhor separação de DON e De-DON.....	71
Tabela 18. Valores de diferentes parâmetros avaliados para validação de método analítico.....	75

Tabela 19. Resultados encontrados durante avaliação da cinética de degradação de DON em diferentes sistemas reacionais.....	78
--	----

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice 1.** Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk da PO de FA extrato bruto (a), extrato puro (b) e para PO de FS extrato bruto (c) e extrato puro (d).....97
- Apêndice 2.** Gráficos de $\ln/[A]$ (v/v_0) em função do tempo, para obtenção do K_d , os valores dos coeficientes angulares encontrados correspondem ao valor da constante de dissociação (K_d).....98
- Apêndice 3.** Obtenção da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d), realizada pela linearização da equação de Arrhenius, onde o coeficiente angular corresponde a E_d/R106
- Apêndice 4.** Comparação entre as curvas analíticas encontradas nos dois sistemas para DON e De-DON em tampão fosfato em HPLC-UV e HPLC-DAD e DON em tampão fosfato e ACN em HPLC-DAD.....107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔG^* - Variação da energia livre de Gibbs

ΔH^* - Variação de entalpia

ΔS^* - Variação da entropia

α - Fator de separação

ACN - Acetonitrila

A_e - Atividade específica

A_{eEB} - Atividade específica do extrato bruto

A_{eEP} - Atividade específica do extrato puro

$A_{e\text{máx}}$ - Atividade específica máxima

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ar - Atividade relativa

A_tEB - Atividade total do extrato bruto

A_tEP - Atividade total do extrato puro

BSA - Albumina de Soro Bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin*

C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CE - Comissão de enzimas

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CM - Carboximetil

D - Valor da redução decimal

DAD - Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

De-DON - De-epoxi-Deoxinivalenol

DEAE - Dimetilaminoetil

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

DON – Deoxinivalenol

ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detector*

E_d - energia da reação de desativação

ESI- - Ionização por Eletrospray no modo negativo, do inglês *Electrospray Ionization Negative Mode*

E.U.A. – Estados Unidos da América

FA – Farelo de Arroz

FID – Detector com Ionização de Chama, do inglês *Flame Ionization Dectector*

FL – Fluorescência

FM – Fase móvel

FS – Farelo de Soja

FP – Fator de purificação

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GL – Graus de liberdade

HFBA - Ácido heptafluorobutirato anidro, do inglês *Heptafluorbutyric Anhydride Acid*

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

HRP – Peroxidase de rabanete, do inglês *Horseradish Peroxidase*

k – Fator de retenção

K - Constante de Boltzmann

K_d – Constante cinética de desnaturação térmica

K_M – Constante de Michaelis-Mentem

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LC-ESI-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria e Massas tandem Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*.

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MRM – Monitoramento de Múltiplas Reações do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS –Espectrômetro de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MQ – Média dos Quadrados

NADH – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

P.A. – Grau pró-análise

PEG - Polietilenoglicol

PFPA - Pentafluoropropiônico anidro, do inglês *Pentafluoropropionic anhydride*

pH – Potencial hidrogeniônico

PO - Peroxidase

r – Coeficiente de correlação

R - Constante dos gases

REC – Recuperação

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

s – estimativa do desvio padrão

SAB – Sistema Aquoso Bifásico

SDS – Dodecil Sulfato Sódico, do inglês *sodium dodecyl sulfate*

SQ – Soma dos Quadrados

$t_{1/2}$ - Tempo de meia-vida

T – Temperatura absoluta

TF – Tampão fosfato

TFAA – Ácidotrifluoroacético, do inglês *Trifluoroacetic Anhydride Acid*

THF – Tetrahidrofurano

TPP – Partição trifásica, do inglês *Three-phase Partitioning*

t_R – Tempo de retenção

U – Unidades de enzima

UV – Ultravioleta

V - Volts

$V_{\text{máx}}$ – Velocidade máxima

x_m – Média de medidas em réplicas

z - Variação de temperatura de um sistema

RESUMO

Título: Aplicação de Peroxidase para degradação de Deoxinivalenol

Autor: Ana Carla Penteado Feltrin

Orientador: Profa.Dra. Jaqueline Garda Buffon

Deoxinivalenol (DON), uma das principais micotoxinas encontradas em matrizes alimentares, é um composto químico que possui em sua estrutura um anel epóxido que lhe confere alto grau de toxicidade. A aplicação de enzimas em processos de degradação de DON vem se destacando, pela estabilidade durante o processo reacional e baixo custo de produção. O objetivo desse trabalho foi estudar o potencial de peroxidase proveniente de farelo de arroz (FA) e farelo de soja (FS) para degradar DON. As condições de obtenção da PO a partir de FA foram definidas por planejamento experimental DCCR 2³, sendo extraída de 5 g de farelo com 50 mL de tampão fosfato 0,04 mol L⁻¹ pH 5, agitados orbitalmente durante 60 min a 100 rpm, e para a PO obtida de FS as condições diferenciaram somente quanto a solução extratora, tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 4,7. A técnica que apresentou melhores índices de purificação para a enzima foi a partição trifásica apresentando fator de purificação e recuperação de 5,6 e 50 % para a obtida de FA e 13,61 e 50 % para FS. A PO de FA apresentou maior atividade em tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ pH 5,5 para as formas bruta e pura, diferindo na temperatura de reação de 25 °C e 10 °C, K_M de 0,15 e 0,06 mmol L⁻¹ e V_{máx} de 769 e 667 U mg⁻¹, respectivamente. A PO de FS as condições foram: tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ pH 5, reação a 35 e 30 °C durante 10 e 5 min, K_M de 0,17 e 0,05 mmol L⁻¹ e V_{máx} de 196 e 182 U mg⁻¹, respectivamente. A PO de FA demonstrou maior estabilidade em pH 5 enquanto que a de FS em pH 6, ambas enzimas apresentaram maior estabilidade térmica a 0 °C, as massas moleculares encontradas por eletroforese foram 41 e 34 kDa, respectivamente. Ao final das etapas de obtenção, purificação e caracterização obteve-se uma atividade específica de 116 e 794 U mg⁻¹, e 4363 e 17453 U g⁻¹, respectivamente para PO de FA e FS. A determinação de DON e De-DON foi realizada por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para avaliação dos ensaios de degradação. A enzima comercial HRP, mostrou maior potencial de redução sobre DON (55% após 1 h de reação), no entanto em 3 h de reação, a concentração inicial da micotoxina DON foi verificada, o que evidencia que a redução pode ocorrer por adsorção ou por formação de um composto de degradação que apresente a mesma massa molecular. O emprego da enzima PO obtida de FA e FS na degradação necessita de uma avaliação cinética micotoxicológica para definição das condições de redução significativa dos níveis de DON.

Palavras-chave: Peroxidase, Deoxinivalenol, degradação, farelo de soja e farelo de arroz.

ABSTRACT

Title: Application of Peroxidase to degradation Deoxynivalenol

Author: Ana Carla Penteado Feltrin

Advisor: Prof. Dr. Jaqueline Garda Buffon

Deoxynivalenol (DON), a major mycotoxins found in food matrices, is a chemical compound that has a ring in its structure epoxide which gives a high degree of toxicity. The application of enzymes in the degradation processes DON has been highlighted by the reaction during the process stability and low production cost. The aim of this work was to study the potential of peroxidase from rice bran (RB) and soybean meal (SBM) to degrade DON. The conditions for obtaining the PO from FA were determined in experimental design DCCR 2³ is extracted from 5 g of bran with 50 ml phosphate buffer 0,04 mol L⁻¹ pH 5 orbitally shaken for 60 min at 100 rpm, and to PO obtained from FS conditions differed only as the extraction solution, phosphate buffer 0,01 mol L⁻¹ pH 4,7. The technique presented the best rates for the enzyme purification was presenting the partition phase recovery and purification factor of 5,6 and 50% for RB and obtained 13,61 and 50% for SBM. The RB showed a higher PO activity in phosphate buffer 5 mmol L⁻¹ at pH 5,5 for pure and crude forms, differing in reaction temperature from 25 ° C to 10 ° C, K_M of 0,15 and 0,06 mmol L⁻¹ and V_{max} of 769 and 667 U mg⁻¹, respectively. The PO RB showed increased stability at pH 5 while SBM at pH 6, both enzymes had higher thermal stability at 0 °C, the molecular weights found for electrophoresis were 41 and 34 kDa, respectively. At the end of the steps of obtaining, purification and characterization obtained a specific activity of 116 and 794 U.mg⁻¹, and 4363 and 17453 U g⁻¹, respectively for PO RB and SBM. The determination of DON and De-DON was performed by HPLC-DAD and LC-ESI-MS/MS to evaluate the degradation tests. The commercial enzyme HRP showed the greatest reduction potential of DON (55% after 1 h of reaction), but with 3 h reaction initial concentration of the mycotoxin DON was measured, which demonstrates that the reduction may be occurring by adsorption or degradation with formation of the compound that show the same molecular weight. PO enzyme from FA and FS, can be applied to degradation need the micotoxin kinetic evaluation to define the reduction conditions of DON.

Keywords: Peroxidase, Deoxynivalenol, degradation, soybean meal and rice bran.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas têm um alto potencial tóxico, decorrente de suas propriedades físico-químicas, sendo por isso necessárias concentrações muito baixas ($\mu\text{g kg}^{-1}$), para desencadear danos agudos e crônicos em animais, em cultivo celular e humanos. Dentre seus efeitos está a carcinogenicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade, mutagenicidade, efeitos estrogênicos que causam diminuição da reprodução e do desenvolvimento da espécie. Esses compostos tóxicos são produzidos por espécies de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e quimicamente apresentam grupamentos como pironas, antraquinonas, cumarinas, macrolídeos, esteróides, lactonas e polipeptídeos cíclicos, que justificam um amplo espectro de seus efeitos tóxicos (CIGIC e PROSEN, 2009; SHERIF *et al.*, 2009; HOOFT *et al.*, 2011; ZAIN, 2011).

Dentre essas micotoxinas, Deoxivalenol (DON) tem sido estudado em amostras de alimentos e ambientais, pois apresenta alta estabilidade mesmo sob condições drásticas. DON possui uma estrutura química altamente reativa, onde se destaca um anel epóxido entre os carbonos 12 e 13 e uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10. Frequentemente, esta toxina é detectada em cereais utilizados como matéria-prima para a produção de alimentos, esta é considerada um contaminante que oferece grande perigo a saúde de humanos e animais. Sua alta ocorrência e a crescente divulgação de estudos epidemiológicos em diversos países no mundo norteiam a busca por alternativas que visem sua degradação e/ou descontaminação, com fim de diminuir a sua toxicidade. Os processos de descontaminação envolvem procedimentos físicos, químicos e biológicos, sendo que os físicos e químicos demonstram elevados percentuais de degradação, podendo modificar a estrutura nativa, resultando em compostos por vezes mais tóxicos que os iniciais.

Estudos recentes relatam o emprego de agentes biológicos como alternativa para processos de redução ou descontaminação de DON, estes, ao contrário de processos químicos e físicos, apresentam menor efeito nas propriedades finais das matrizes onde se encontra o contaminante. Enzimas tem se mostrado como agentes eficientes para degradação em decorrência de sua especificidade sobre grupamentos

químicos, possibilitando a redução dos efeitos tóxicos e, muitas vezes, a eliminação total.

A descontaminação de DON por via enzimática possibilita a aplicação industrial, principalmente quando relacionada ao processamento de alimentos tanto para consumo humano como animal, mostrando-se como uma perspectiva interessante para o desenvolvimento de novas tecnologias. A especificidade enzimática juntamente com a atuação em condições moderadas, já tem sido utilizada no tratamento de efluentes e na redução da carga orgânica de resíduos sólidos.

Para fins de biorremediação, as enzimas oxidativas, como por exemplo, a Peroxidase (PO) tem sido bastante estudada (BON, FERRARA e CORVO, 2008). A PO age em estruturas de compostos tendo como mecanismo de ação a oxidação de grupamentos doadores de elétrons. Se tratando da degradação de DON, a perda de sua toxicidade se dá principalmente pela quebra do anel epóxido. Sendo assim, esta enzima, pode atuar sobre o anel epóxido presente na estrutura química da micotoxina, deepoxidando-a, podendo resultar na descontaminação total do material (GARDABUFFON, KUPSKI E BADIALE-FURLONG, 2011).

Os resíduos agroindustriais tem se destacado como fontes para obtenção de enzimas com aplicação para diversos fins. O farelo de soja (FS) e o farelo de arroz (FA), provenientes da extração do óleo e beneficiamento dos grãos são bons exemplos de fontes, pelo aporte proteico e valor comercial.

Soja e arroz são consideradas as principais culturas do Rio Grande do Sul, segundo dados do CONAB (2013) é estimada uma produção de 7.933,20 mil toneladas de arroz na safra 2012/13, correspondendo a 66,9% da produção nacional. Para soja a produção estimada no mesmo período é de 12.534,9 mil toneladas. O farelo como subproduto, é um resíduo dos processos agroindustriais e apresenta alto valor nutritivo, não na sua totalidade, mas principalmente quando empregado na produção de rações animais (KHAN *et al.*, 2011). Estudos desenvolvidos com estes subprodutos (FA e FS) relataram a alta concentração protéica, destacando-se diversas classes enzimáticas que podem estar vinculadas a um emprego comercial (INDIANI *et al.*, 2000; CAO *et al.*, 2009).

Considerando então, a evolução de processos ambientais na gestão de resíduos industriais, em caráter de reutilização, redução da fonte e reciclagem, conceituando

assim tecnologias limpas sem o uso de produtos que agridam o meio ambiente, é que esse trabalho propõe o estudo da extração e purificação da enzima PO a partir de subprodutos agroindustriais, FA e FS, para aplicação na degradação da micotoxina DON.

O presente trabalho propõe a aplicação da enzima PO na degradação da micotoxina DON, com prévio estudo da obtenção, purificação e caracterização enzimática. Esse projeto parte de estudos preliminares realizados no Laboratório de Micotoxinas e Ciências de Alimentos por Garda-Buffon e Badiale-Furlong (2010), que estudou a degradação de DON durante fermentação submersa e verificou que a maior atividade da enzima PO foi acompanhada pela maior velocidade de degradação da micotoxina, no intervalo de tempo entre 0 e 96 horas de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a degradação de DON empregando a enzima peroxidase extraída de farelo de arroz e farelo de soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever procedimento para extração de peroxidase a partir de farelo de arroz e farelo de soja.
- Estabelecer condições de purificação enzimática que propiciem sua maior eficiência.
- Estudar a diminuição dos níveis de DON em material contaminado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixa massa molecular, altamente tóxicos produzidos por fungos filamentosos. Uma grande variedade de espécies dos gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Alternaria* e *Trichoderma* podem produzir esses metabólitos. Cerca de 400 compostos são reconhecidos como micotoxinas (SALEM e AHMAD, 2010; SKRBIĆ *et al.*, 2012), porém apenas algumas podem ser detectadas em produtos alimentícios e rações produzidos a partir de cereais (trigo, centeio, milho, aveia e arroz), leguminosas e amendoins (BATA e LÁSZTITY, 1999; SALEM e AHMAD, 2010). Dentre as micotoxinas mais comumente encontradas em grãos de cereais estão as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, tricotecenos e zearalenona (BULLERMAN e BIANCHINI, 2007; ZAIN, 2011).

A produção e disseminação de micotoxinas por fungos em plantas é influenciada pela deficiência de nutrientes, e por um conjunto de fatores bióticos e abióticos, estando entre estas alterações climáticas que causam estresse para os mesmos, condição propícia para a produção micotoxicológica. Características dos climas temperado e tropical também favorecem o desenvolvimento de espécies fúngicas em cereais, tais como *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxinas, *Aspergillus ochraceus* produtores de ocratoxina A, *Fusarium graminearum* produtores de tricotecenos, zearalenona e produtor de ocratoxina A e *Penicillium verrucosum* produtor de ocratoxina A (MAGAN E ALDRED, 2007). Nas etapas seguintes após produção, como o transporte e armazenamento, os grãos contaminados entram em contato com grãos saudáveis, o que pode aumentar os níveis de contaminação.

Micotoxinas são capazes de causar depressões no sistema imunológico, dependendo do nível de exposição, aguda ou crônica, produzem efeitos cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e estrogênicos em animais. Essas doenças causadas por micotoxinas são chamadas micotoxicoses e acabam muitas vezes não sendo diagnosticadas devido ao seu amplo espectro de efeitos biológicos, explicados pelas

diversas estruturas químicas e origens biossintéticas. Sendo assim são classificadas pelos órgãos que afetam (hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas), essa classificação segue para químicos orgânicos, de acordo com a estrutura química (lactonas, cumarinas, pironas) e para bioquímicos pela origem biossintética (policetídeos, derivados de aminoácidos) (ZAIN, 2011).

Os tricotecenos, uma classe de micotoxinas, são compostos sesquiterpenóides tetracíclicos de baixa massa molecular (200-500 Da) que apresentam em comum uma dupla ligação entre os C-9 e C-10 e um grupo epóxido entre o C-12 e C-13 (PESTKA, 2007; WARTH *et al.*, 2010; MENEELY *et al.*, 2011; RUIZ *et al.*, 2011; ARUNACHALAM e DOOHAN, 2013). Dividem-se em 4 grupos, tipos A, B, C e D, esta diferença explicada em maioria pelo grupo funcional substituinte no C-8, (Figura 1). O grupo A, possui um grupo funcional isovaleril no C-8, nesse grupo está a Toxina T-2 a micotoxina de maior efeito agudo; no grupo B na posição 8 está uma carbonila, como no caso do DON e NIV (nivalenol). A crotocina classificada no grupo C, possui 2 anéis epóxido, sendo um entre os C-12 e C-13 e outra epoxidação adicional nos C-7 e C-8; no grupo D diferente dos demais está um anel macrocíclico com um diéster ou um triéster entre os C-4 e C-5, onde estão a satratoxina e roridina E (PESTKA, 2007; MENEELY *et al.*, 2011; RUIZ *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2012; ARUNACHALAM e DOOHAN, 2013).

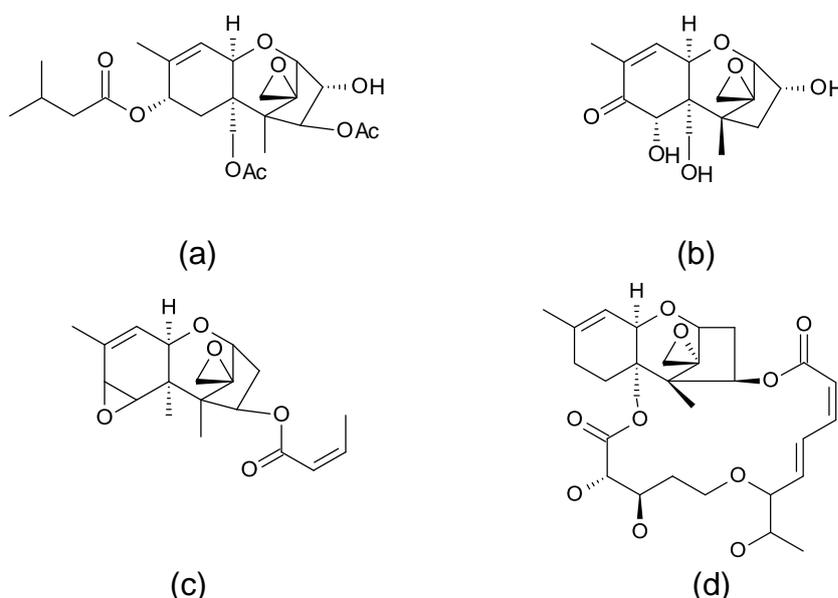


Figura 1. Estruturas químicas dos tricotecenos tipos A (Toxina T-2) (a), B (DON) (b), C (Crotocina) (c) e D (Roridina E) (d).

Os tricotecenos dos tipos A (Toxinas T-2 e HT-2, Diacetoxiscirpenol) e B (DON e NIV) são os tricotecenos que são detectados com maior frequência. A Toxina T-2 é mais tóxica que DON para mamíferos, embora DON seja a toxina mais frequente em trigo. A dupla ligação e o anel epóxido conferem a estas micotoxinas a possibilidade de inibir a síntese protéica em diferentes pontos. Como consequência os tecidos mais afetados são os que apresentam maior divisão celular, como o imunológico, as mucosas e o tecido sanguíneo (DÄNICKE *et al.*, 2006; DÖLL *et al.*, 2009).

3.1.1 Deoxinivalenol (DON)

DON é uma micotoxina pertencente ao grupo B dos tricotecenos, produzido principalmente por fungos das espécies *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*, principais contaminantes de milho, trigo e cevada em regiões de clima temperado. DON é também conhecido como Vomitoxina pela indução a efeitos eméticos após exposição. Sua molécula possui sete centros estéreo, um sistema sesquiterpeno de anel tricíclico, cuja fórmula molecular é $C_{15}H_{20}O_6$ denominada tricotec-9-en-8-ona, 12,13-epoxi-3,7,15-tri-hidroxi-(3 α ,7 α)-(9Cl) (KLINGLMAYR *et al.*, 2010; WARTH *et al.*, 2010). Além de três hidroxilas, há também um grupamento cetônico conjugado e um éter cíclico (NAGY *et al.*, 2005, MA e GUO, 2008; BENSASSI *et al.*, 2009; TURKER e GÜMÜS, 2009). Também possui ponto de ebulição de 543.9 ± 50.0 °C e ponto de fusão de 151–153 °C, por ser considerado um composto polar frente a outras toxinas é solúvel em solventes orgânicos polares e até mesmo em mistura com água (SOBROVA *et al.*, 2010).

A rota biossintética para a formação de DON começa com a ciclização do farnesil pirofosfato para tricodieno pela enzima síntase tricodieno. A via posterior envolve uma série de reações de oxigenações, isomerizações, ciclizações e esterificações (SWEENEY e DOBSON, 1999). DON é um composto muito estável a pH abrangendo uma faixa de 1 a 10 e a temperaturas de 170 a 350 °C (SOBROVA *et al.*, 2010). Devido a sua estabilidade, este composto pode permanecer nos alimentos por um longo período de tempo, causando efeitos adversos à saúde (LATTANZIO *et al.*, 2011).

Esse tricoteceno, assim como os demais, tem seu efeito tóxico relacionado ao anel epóxido. A exposição aguda (altas doses) induz a efeitos radiomiméticos, vômitos, diarreia, leucocitose, hemorragias e necrose do trato gastrointestinal. Estudos mostram

que a toxicidade crônica leva a anorexia, imunotoxicidade, necrose no trato gastrointestinal e tecidos linfóides. A ingestão diária tolerável de 1 $\mu\text{g kg dia}$ foi estabelecida pela União Europeia com base em efeitos imunotóxicos e tóxicos em geral de dois anos de estudo em cobaias (KOLF-CLAUW *et al.*, 2009). Por essa razão, várias nações vêm implementando regulamentos para evitar uma exposição a produtos com uma concentração elevada da micotoxina DON. No Brasil, está em vigor uma nova legislação que dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, entre elas, estão estabelecidos os limites para DON (Tabela 1).

Tabela 1. Limites Máximos Tolerados (LMT) da presença de DON em alimentos.

APLICAÇÃO	LMT ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	ALIMENTO
2011	750	Arroz beneficiado e seus derivados.
	200	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)
2012	2000	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.
	1750	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.
	3000	Trigo e milho em grãos para posterior processamento
2014	1500	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.
	1250	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.
2016	1000	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.
	750	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011.

No entanto, para controle e manutenção da ausência da ingestão ou de acordo com a tolerada diariamente, se torna necessário adequação de laboratórios para avaliação da contaminação, bem como o de estes desenvolverem métodos executáveis e adaptados para a avaliação da contaminação micotoxicológica e posterior estudos da exposição a que humanos e animais estão submetidos.

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE DON

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com avanços significativos a fim de melhorar a determinação de micotoxinas, em geral em amostras de cereais e derivados. As razões para a determinação de micotoxinas são: o controle e monitoramento da qualidade de fontes alimentares, a ocorrência das micotoxinas, para assim determinar a exposição que há durante o consumo de produtos contaminados, e o cumprimento da legislação. A avaliação da descontaminação e detoxificação, para maior compreensão da relação entre os fungos e os seus metabólitos, e para estudar o seu destino durante processamento de grãos, são também atividades em que a determinação das micotoxinas se torna necessária (GARDA-BUFFON, 2008; MENEELY *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*), talvez a mais frequente técnica aplicada para determinação de micotoxinas, vem sendo utilizado em muitos trabalhos em relação a DON, principalmente utilizando detector UV (ultravioleta). Este é detectado em um comprimento de onda de 219 nm. A utilização da cromatografia líquida acoplada a detector de espectômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) para detecção de micotoxinas é cada vez maior, desempenhando um papel importante na análise devido a sua alta seletividade e sensibilidade (REN *et al.*, 2007). Esta permite a determinação de tricotecenos e também a determinação simultânea de micotoxinas multiclases em diferentes matrizes (CAVALIERE *et al.*, 2006; MENEELY *et al.*, 2011). Métodos multimicotoxinas são também altamente estudados e, por conseguinte atraem forte interesse (KRSKA e MOLINELLI, 2007).

Os métodos para quantificação, determinação, confirmação e rastreio de concentrações de DON em amostras, geralmente utilizam a técnica de separação cromatográfica para obtenção de resultados precisos, tanto por cromatografia de camada delgada (CCD), como também cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e líquida acopladas a detectores específicos como UV, fluorescência (FL), MS, detector com ionizador de chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*), detector com arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detection*), e detector de captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*).

Para determinação de tricotecenos em geral, a técnica mais empregada é a GC, utilizando detectores de MS e FID. Embora tenha alta precisão para compostos mais voláteis e apolares, compostos polares e pouco voláteis também podem ser analisados com o auxílio da derivatização. Para DON, a derivatização se realiza por reações de silanização, acilação e alquilação (MENEELY *et al.*, 2011; RAN *et al.*, 2013). A acilação emprega ácido trifluoroacético (TFAA, do inglês *Trifluoroacetic Anhydride*) (JELÉN e WÁSOWICZ, 2008), ácido heptafluorobutirato anidro (HFBA) (VEGA e CASTILLO, 2006) e pentafluoropropiônico anidro (PFPA) (IBÁÑEZ-VEA, LIZARRAGA E GONZÁLEZ-PEÑAS 2011), nesses casos há a utilização de detectores de MS, FID (JELEN e WASOWICZ, 2008) e ECD (VEGA e CASTILLO, 2006).

Todos os métodos para a análise de DON propõe a extração a partir da matriz em um solvente orgânico seguido por uma etapa de *clean-up* para remover quaisquer impurezas ou interferentes, além de concentrar o extrato para sua quantificação (JUAN *et al.*, 2012). Os métodos devem ser validados através do estabelecimento de vários indicativos de eficiência: sensibilidade, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, robustez e recuperação (CIGIĆ e PROSEN, 2009).

3.3 DEGRADAÇÃO DE DON

Algumas alternativas vêm sendo utilizadas para o controle da contaminação de DON no campo, tais como rotação de culturas, silagem e uso de fungicidas. Os conservantes à base de ácidos alifáticos são usados para prevenir a deterioração e contaminação de produtos armazenados, especialmente produtos alimentares. Uma alternativa ao uso de fungicidas são óleos essenciais e antioxidantes que impedem o crescimento e acumulação de micotoxinas em grãos parcialmente secos (JOUANY, 2007; KLINGLMAYR *et al.*, 2010).

Durante a pós-colheita, no armazenamento de produtos, para garantir que a contaminação com DON seja minimizada e que o grão armazenado possa prosseguir através da cadeia alimentar para o processamento, são recomendados cuidados de higiene e separação de grãos danificados fisicamente (JOUANY, 2007; MAGAN E ALDRED, 2007).

Há uma grande preocupação da indústria em busca de métodos para redução ou descontaminação de DON e demais micotoxinas antes do contato com a cadeia alimentar. Contudo, segundo Bata e Lásztity (1999) toda e qualquer que seja a estratégia de descontaminação micotoxicológica usada, deve atender alguns procedimentos básicos, tais como a inativação da micotoxina em compostos não tóxicos e a destruição de micélios e esporos fúngicos o que evita a formação de novas toxinas, mantendo o valor nutritivo, as propriedades químicas e físicas do material sem alterações significativas. Também deve ser considerado que o custo do procedimento deve ser inferior ao valor do produto descontaminado.

O DON pode ser desativado quando submetido a condições drásticas em soluções ácidas ou alcalinas, como também na presença de hidretos de alumínio, lítio e peróxidos ou por hidratação em autoclave, o que pode levar a abertura do anel epóxido. Tratamentos microbiológicos e enzimáticos também podem ser usados para alterar a estrutura desse tricoteceno, detoxificando-o (HE *et al.*, 2010).

As estratégias de degradação de DON visam remover ou reduzir suas concentrações a níveis aceitáveis. Reações de transformação em tricotecenos incluem alcalinização, oxidação, redução, hidrólise, hidratação e conjugação (HE *et al.*, 2010). Abordagens biológicas estão sendo estudadas aplicando micro-organismos e/ou enzimas em produtos contaminados e tem mostrado maior eficiência que os métodos físicos e químicos (VARGA *et al.*, 2005; AMÉZQUETA *et al.*, 2009).

Os processos físicos podem ter efeitos sobre a redução dos níveis de DON, incluindo limpeza, moagem, cozimento, forneamento, fritura, conservas e extrusão. A maior parte dos procedimentos aplicados a alimentos tem efeitos variáveis sobre esta toxina, conforme demonstrado na Tabela 2.

Processos como moagem, também diminuem significativamente os níveis de DON nos insumos alimentícios aonde são retiradas as camadas externas de grãos (farelo). De acordo com Sekiyama *et al.* (2007), um processo que vem sendo bastante utilizado atualmente principalmente para proteção animal, é a adição de adsorventes misturados a reações. Materiais adsorventes, não nutritivos, se unem a micotoxina no trato gastrointestinal, diminuindo assim sua biodisponibilidade á associações tóxicas. Os principais tipos de adsorventes são: aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado, carvão ativado, colestiramina, glucomanano e argila, bentonite, fragmentos de madeira

e zeólitas que vem sendo mais utilizadas por seus bons resultados na aplicação em alimentos (AMÉZQUETA *et al.*, 2009).

Tabela 2. Métodos físicos de descontaminação de DON.

Método	Fonte	Redução	Autores
Extrusão	-	180 °C + 1% Na ₂ S ₂ O ₅ – 95%	Cazzaniga <i>et al.</i> (2001)
Cozimento	Trigo	33 a 77%	Visconti <i>et al.</i> (2004)
Hidrotérmico	Trigo	96%	Dänicke <i>et al.</i> (2005)
Térmica	Trigo	52%	Pronyk, Cenkowski e Abramson (2006)
Forneamento	Pão, cookies e biscoitos	24, 71 e 35%, Respectivamente	Bullerman e Bianchini (2007)
Microondas por plasma	-	100%	Park <i>et al.</i> (2007)
Lavagem	Cevada e milho	65 a 69%	Pereira, 2008
Lavagem	Trigo	20 a 30%	Rubert <i>et al.</i> (2011)
Cozimento	Macarrão	43,2 e 66,6%	Farahany e Jinap (2011)

A técnica mais promissora para a detoxificação química de DON é a reação com bissulfito de sódio. O tratamento de milho contaminado (4,4 mg kg⁻¹) com solução de bissulfito de sódio a 80 °C por 18 h pode converter 85% de DON em um DON-sulfonado conjugado que parece ser não tóxico para porcos (BATA e LÁSZTITY, 1999; JOUANY, 2007; DÖLL e DÄNICKE, 2011; KARLOVSKY, 2011;).

Abramson *et al.* (2005) estudaram lotes de cevada canadense naturalmente contaminados com DON em concentrações de 4,3 a 18,4 µg g⁻¹. As amostras foram aquecidas a 80 °C, com pequenas quantidades de água ou solução 1 mol L⁻¹ de carbonato de sódio e incubadas por 8 dias, para o estudo da taxa de redução de DON. O tratamento com carbonato de sódio resultou em uma redução de 100% ao final dos 8 dias.

Os processos de degradação biológica são também conhecidos como biotransformação, biodegradação ou biorremediação e consistem em procedimentos que utilizam micro-organismos e enzimas para degradar contaminantes em compostos menos tóxicos ou não tóxicos (KALOGERAKIS e PSILLAKIS, 2005). Vários estudos

levam à identificação de micróbios, bactérias, leveduras, enzimas, ascomicetos filamentosos e basidiomicetos, como agentes capazes de detoxificar micotoxinas (PATHARAJAN *et al.*, 2011).

Bactérias do sistema digestivo de bovinos, ovinos, aves e ratos, são capazes de reduzir o grupo epóxido de tricotecenos, gerando derivados 9,12-dieno. A estrutura do produto da de-epoxidação de DON foi elucidada quase três décadas atrás. Desde então, a de-epoxidação de tricotecenos por populações mistas de bactérias ruminais e intestinais tem sido extensivamente documentado (ERIKSEN, PETTERSON e LUNDH 2004; JOUANY, 2007; KARLOVSKY, 2011).

Leveduras também vêm sendo empregadas em processos de degradação. O conhecimento sobre a interação de leveduras com micotoxinas, remonta há mais de três décadas (ZINEDINE *et al.*, 2007). Garda *et al.* (2005) empregando malte contaminado artificialmente com DON e Toxina T-2, e observaram que havia uma redução nos níveis de tricotecenos após 120 horas de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, de 47% e 46% para DON e Toxina T-2, respectivamente.

Objetivando a avaliação da capacidade de espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* em degradar DON em fermentação submersa, Garda *et al.* (2005) estudaram a cinética de degradação desta micotoxina. A degradação ocorreu durante o processo, onde se observou, a adsorção da toxina como via de degradação principal até o intervalo de 144 horas (74% de degradação). *Rhizopus oryzae* ocasionou a maior diminuição na concentração de DON, aproximadamente 90% em 240 horas, e *Aspergillus oryzae*, 74% de redução em 96 horas.

A ação degradadora de micro-organismos se estabelece por ação de vias enzimáticas específicas. A detoxificação enzimática está sendo discutida desde a década de 1970 como uma estratégia para a eliminação de micotoxinas de alimentos e grãos (KARLOVSKY, 2011). Assim, o uso de enzimas é explicado como mais conveniente do que o uso de produtos químicos ou métodos de descontaminação física ou química, uma vez que enzimas apresentam alta especificidade e fácil aplicação (ABRUNHOSA, SERRA e VENÂNCIO 2002).

3.4 ENZIMAS

Enzimas são macromoléculas protéicas, imprescindíveis aos seres vivos, pois aceleram as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais (SAID e PIETRO, 2004). Algumas das vantagens das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos, são a especificidade e a atuação em condições brandas de pH e temperatura, resultando em menores problemas ambientais e toxicológicos (SANTOS, 2007). Também conhecidas como biocatalisadores, as enzimas podem ser extraídas de tecidos animais (pancreatina, tripsina, pepsina e renina) e fontes vegetais (papaína, bromelina, ficina, malte, peroxidase) (BON, FERRARA e CORVO 2008).

De acordo com a classificação da Comissão de Enzimas (CE) para reações bioquímicas, a cada enzima é atribuído um número de quatro dígitos (ijkl). O primeiro nível de classificação (i) denota o tipo químico: oxidorreduções compõem a classe 1, transferases a classe 2, hidrolases a classe 3, liases a classe 4, isomerases a classe 5 e ligases compreendem a classe 6. O segundo (j) refere-se ao grupo funcional específico influenciado pela enzima. Por exemplo, 1.1 relacionado à oxirredutases atuantes no CH-OH grupo de doadores. O terceiro nível de classificação (k) implica nos cofatores utilizados pela enzima. Por exemplo, 1.1.1 denota oxirredutases atuantes em grupamentos CH-OH usando NAD^+ ou NADP^+ como aceptor. O quarto nível é específico para os substratos e produtos da reação. Por exemplo, a enzima 1.1.1.1 age sobre álcoois primários (HATZIMANIKATIS *et al.*, 2004).

A atividade de uma enzima é expressa em unidades (U), definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de 1 μmol de substrato por min sob condições ótimas (MOTAMED, GHAEMMAGHAMI e ALEMZADEH, 2009). Esta depende muito da estrutura da proteína, o número de cadeias peptídicas dessas estruturas, da natureza do substrato ou também da natureza do grupo prostético.

3.4.1 Extração, concentração e purificação de enzimas

As operações durante *downstream* são de extrema importância em termos de preparação, separando as proteínas por tamanho, carga e propriedades de ligação; finalidade de aplicação; e custos empregados nas etapas de extração (sólido-líquido), concentração (precipitação) e purificação (técnicas cromatográficas, sistema aquoso

bifásico (SAB) e partição trifásica (TPP, do inglês *three-phase partitioning*). A caracterização final das proteínas separadas e purificadas pode ser realizada por eletroforese para estabelecimento da massa molecular e confirmação de sua pureza (SRINIVAS, RASHMI e RAVAGHARAO, 1999).

A extração enzimática mais comumente utilizada ocorre pela homogeneização da fonte enzimática em solução tampão adequada. Exemplos de métodos de extração são, o congelamento/descongelamento, moagem úmida (blender), cisalhamento líquido sob alta pressão e sonificação (ultrassom). Nesta etapa, fatores como tempo de extração, pH e força iônica do meio utilizado para extração são de fundamental importância com vistas em manter a estabilidade da enzima e evitar ao máximo sua desnaturação (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008). Um segundo passo é a centrifugação que separa a subfração celular apropriada.

Técnicas de concentração proteica são basicamente utilizadas para eliminação de impurezas e aumento da atividade específica da enzima. A precipitação isoelétrica consiste na precipitação induzida por mudanças de pH. *Salting-out* com sais inorgânicos é o procedimento de precipitação mais utilizado, com base no aumento da força iônica e no decréscimo da atividade da água, havendo a diminuição da reação das moléculas de água e os grupos polares das proteínas. Solventes orgânicos (acetona e álcoois) também podem ser utilizados para a precipitação, sendo essa realizada pela diminuição da constante dielétrica, apresentando como vantagem a recuperação do solvente após utilização. A precipitação por polímeros como polietilenoglicol (PEG) segue o mesmo mecanismo dos solventes orgânicos, através da solvatação. Na ultrafiltração, basicamente, utiliza-se de uma membrana semipermeável que permite a separação das moléculas do solvente, das moléculas enzimáticas grandes, assim, apenas as moléculas pequenas podem permear a membrana quando a pressão osmótica é excedida (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

O método a ser empregado no processo de purificação depende muito da aplicação a ser dada a enzima em estudo. Enzimas com aplicações específicas como medicina clínica, área farmacêutica, biossensores e engenharia genética, exigem um grau de pureza mais elevado, por conta disso o custo do processo de purificação torna-se maior. Para aplicações industriais um menor grau de purificação é necessário. A atividade específica é uma medida da pureza da enzima, ela aumenta durante a

purificação e torna-se máxima e constante quando a enzima está pura (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002; COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

A purificação empregando cromatografia é baseada na separação de acordo com a distribuição dos componentes em fase estacionária e em uma fase móvel. Na cromatografia de troca-iônica, o mecanismo de separação está baseado nas cargas das proteínas presentes no extrato. A purificação por cromatografia de interação hidrofóbica é baseada na interação das regiões hidrofóbicas das proteínas com os grupos hidrofóbicos da matriz. A cromatografia de afinidade se baseia na ligação específica de enzimas com os ligantes (substratos ou inibidores) presentes no suporte da coluna, no caso da purificação por imunoafinidade são utilizados anticorpos que interagem especificamente com a enzima (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

A Figura 2 ilustra o mecanismo de purificação baseado na exclusão por massa molecular, onde a separação das moléculas de proteína ocorre de acordo com sua forma e massa molecular efetiva, utilizando matrizes (géis) com porosidade definida. O gel é descrito como uma matriz tridimensional, aberta, formada por ligações cruzadas, contendo poros de diferentes tamanhos, que permitem o acesso de apenas algumas moléculas. Um exemplo de matriz formada por ligações cruzadas de dextrana é o Sephadex. Nesta, moléculas maiores não conseguem penetrar nos poros do gel, enquanto as moléculas menores penetram o gel movendo-se mais lentamente por percorrerem um caminho maior (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

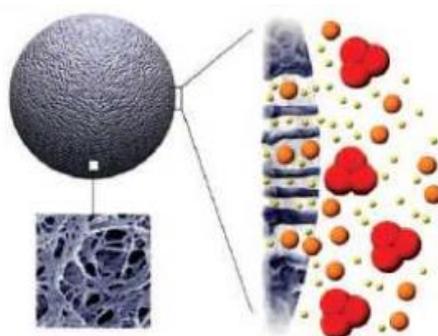


Figura 2. Mecanismo de purificação por cromatografia de exclusão molecular (http://www.ioc.fiocruz.br/gpesb/aulas_artigos/Aula_SecMals.pdf).

Técnicas de purificação utilizam também partição líquido-líquido em sistemas bifásicos e trifásicos, e são considerados métodos de purificação primária por não necessitarem da etapa de precipitação. Estes oferecem várias vantagens como baixo

tempo de processo, baixo consumo de energia, biocompatibilidade ambiental e biomolecular, pelas elevadas quantidades de água no sistema, além de remover ácidos nucleicos que são interferentes no processo (SRINIVAS, RASHMI e RAVAGHARAO, 1999; MOTAMED, GHAEMMAGHAMI e ALEMZADEH, 2009). A purificação por sistema aquoso bifásico pode ser de duas formas, uma utiliza dois polímeros (PEG – dextrana) e outra um polímero e um sal (PEG – sais fosfato, citrato, etc) que se separam em duas fases por diferenças de densidade, cada uma das fases é enriquecida com seu constituinte (BHAVSAR *et al.*, 2012).

A purificação por partição trifásica é um método praticamente novo e um procedimento simples e eficiente, sugerido para o enriquecimento de componentes protéicos tais como enzimas a partir de misturas complexas. Este é composto pela adição de um sal, geralmente sulfato de amônio ao extrato bruto, seguido de adição de um solvente orgânico para desidratação da fase salina. A mistura se separa em 2 fases e na interface destas há a concentração de proteínas, a fase superior retira do meio pigmentos, lípidos e inibidores da enzima, enquanto que os componentes polares como carboidratos são enriquecidos na fase inferior salina (PAULE *et al.*, 2004; OZER *et al.*, 2010).

Para a finalização da caracterização enzimática, a eletroforese é uma técnica de separação das massas moleculares pela diferença da mobilidade das proteínas num campo elétrico. A taxa de migração dessas partículas, quando submetidas a campo elétrico, é proporcional à força do campo e a carga efetiva das partículas é inversamente proporcional ao atrito dependendo de sua forma e tamanho. A eletroforese em gel (de amido, agarose e poliacrilamida) permite uma maior resolução das amostras. A revelação do gel de proteína pode ser feita empregando-se substâncias cromóforas específicas como Comassie Brilliant Blue, bromofenol – $ZnSO_4$ - ácido acético ou nitrato de prata. Um método comumente utilizado para estimativa de pureza e da massa molecular usa o detergente dodecildulfato de sódio (SDS).

3.4.2 Caracterização enzimática

O que possibilita a exploração das características bioquímicas de uma enzima, para a aplicação em biotecnologia e em processos industriais além de sua purificação é sua caracterização. Para tanto, são realizados estudos relativos a parâmetros cinéticos

e termodinâmicos. Fatores como concentração de substrato, pH do meio, temperatura, e adição de moduladores (ativadores ou inibidores de atividade) que podem influenciar na velocidade das reações enzimáticas (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002; BON, FERRARA e CORVO 2008; COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

A velocidade da reação catalisada por uma enzima, e como ela se altera em resposta a modificações nos parâmetros experimentais são avaliados pela cinética enzimática. Com isso, há a avaliação da influência de fatores (tempo, temperatura, pH e força iônica do meio reacional) que podem aumentar ou diminuir a velocidade de reação. No caso do pH, as enzimas possuem em seu sítio ativo grupos ionizados que podem sofrer alterações em pH baixo ou elevado, provocando alterações na conformação da enzima e até sua desnaturação. Em determinada temperatura, a enzima assume uma atividade máxima, temperaturas acima ou abaixo desta podem causar a inativação ou desnaturação (CAI *et al.*, 2012).

A concentração de substrato também é um fator que influencia na atividade específica das enzimas. Em concentrações consideravelmente baixas de substrato a velocidade inicial da reação aumenta com certa linearidade com o aumento do substrato. Com o aumento das concentrações de substrato a velocidade inicial segue aumentando, porém, de maneira cada vez menor. Em determinado momento o aumento da concentração de substrato e a velocidade inicial seguem aumentando lentamente, essa região de velocidade inicial parecida com um platô, está próxima a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

Para determinação dos parâmetros cinéticos K_M (constante de Michaelis e Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ deve-se manter a proporcionalidade entre taxa de reação enzimática e concentração enzimática. Concentrações muito baixas de substrato gerariam um modelo cinético de primeira ordem, com K_M e $V_{m\acute{a}x}$ tendendo ao infinito, enquanto que concentrações muito altas de substrato gerariam um modelo de ordem zero, onde se definiria $V_{m\acute{a}x}$, mas não seria possível definir K_M . O valor de K_M corresponde à concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima enzimática. Quanto menor o valor de K_M maior é a afinidade da enzima por seu substrato (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

Algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos além de seus resíduos de aminoácidos para a atividade. Outras, porém, requerem um componente

químico adicional chamado de cofator, que pode ser um ou mais íons inorgânicos (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002). Íons metálicos podem agir de diversas maneiras, entre elas como catalisador eletrofílico, estabilizando uma carga negativa em um intermediário de reação; nucleofílico, aumentando a acidez de uma molécula próxima como a da água na hidratação do CO₂ pela anidrase carbônica; ou até mesmo se ligando ao substrato aumentando o número de interações com a enzima (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008). Moduladores enzimáticos em sua maioria são íons inorgânicos, solventes orgânicos e detergentes que agem sobre o sítio ativo da enzima de tal forma a inibir ou favorecer a atividade enzimática.

Solventes orgânicos imiscíveis em água influenciam na dissolução das moléculas e a presença de uma fase separada pode levar a inativação da enzima, enquanto os miscíveis em água podem interagir com a enzima e causar diminuição em sua atividade, pois esses solubilizam a camada de água que envolve a enzima e a mantém cataliticamente ativa, estes são utilizados em concentrações moderadas. Alguns solventes orgânicos e detergentes atuam de forma primária rompendo as interações hidrofóbicas que constituem o núcleo das proteínas globulares o que pode levar a desnaturação (SERDAKOWSKI e DORDICK, 2007; MANDRICH *et al*, 2012).

3.4.3 Peroxidases

Peroxidases (CE 1.11.1.X) catalisam a oxidação de elétrons de uma variedade de xenobióticos oxidáveis usando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como molécula aceptora (TEKCHANDANI e GURUPRASAD, 1998; TAFAZOLI e O'BRIEN, 2005; MATHÉ *et al.*, 2010). Sua atividade foi identificada em plantas, micro-organismos e animais. Devido à sua natureza oxidativa, há diversas áreas onde a PO poderia substituir as técnicas atuais como oxidante químico (HAMID e REHMAN, 2009). A maior parte de degradação de poluentes orgânicos envolve reações de oxidação, sendo natural que o emprego de enzimas nessas reações desperte o interesse de pesquisadores. Assim, pode-se citar a remoção por precipitação ou transformação, de compostos tóxicos ou recalcitrantes, e a alteração das características de um determinado efluente, como a biodegradabilidade ou diminuição da toxicidade (KARIM e HUSAIN, 2009).

Algumas novas aplicações de POs incluem o tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos, a síntese de produtos químicos aromáticos e remoção

de peróxidos de materiais. Estes compostos são encontrados nas águas residuais de uma ampla variedade de indústrias, refino de petróleo, resinas e plásticos, madeira, corantes e produtos químicos, têxteis, de mineração, pesticidas, herbicidas e outros agroquímicos (MAY, 1999; HAMID e REHMAN, 2009). A redução de peróxidos à custa de um substrato doador de elétrons faz com que as POs se tornem úteis em processos industriais e aplicações analíticas (HAMID e REHMAN, 2009). Também, são especialmente e temporalmente associadas à diminuição na taxa de multiplicação e disseminação de patógenos, sugerindo a PO um papel ativo de resistência (CHITTOOR, LEACH E WHITE, 1997).

A PO pertence a uma classe de enzimas largamente distribuída em 3 superfamílias (vegetal, animal e micro-organismos). Essas enzimas, com origem microbiana ou vegetal, são utilizadas no tratamento de efluentes e resíduos industriais, resolvendo problemas específicos. Esta é facilmente extraída das células de alguns vegetais, nas plantas, a PO tem um papel importante, pois participa do processo delignificação e do mecanismo de defesa física contra tecidos danificados ou infectados (NICELL e WRIGHT, 1997; HAMID e REHMAN, 2009). Pelo que parece, segundo Veitch (2004) cada espécie vegetal contém um conjunto de isoenzimas de PO com potencial para realizar uma variedade de funções diferentes, com várias formas moleculares e uma ampla distribuição subcelular (MOTAMED, ALEMZADEH e GHAEMMAGHAMI, 2009).

O rabanete (*Armoracia rusticana*) é uma fonte rica de PO (VEITCH, 2004; LAVERY *et al.*, 2010), entre outras fontes vegetais de PO estão, pêssigo (*Prunus persica*), inhame (*Alocasia macrorrhiza*), mandioca (*Manihot utilissima*), alcachofra (*Cynara scolymus L.*), batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*), nabo (*Brassica campestris ssp rapifera*), abobrinha (*Cucurbitapepo*) (ZERAIK, SOUZA e FATIBELLO-FILHO, 2008), *Copaífera langsdorffii* (árvore leguminosa) (MACIEL, GOUVÊA e PASTORE, 2006), soja (NISSUM *et al.*, 2001), farelo de trigo (MANU e RAO, 2009), *Euphorbia cotinifolia* (planta medicinal) (KUMAR *et al.*, 2011), palmas (*Phoenix dactylifera L.*) (AL-SENAIDY e ISMAEL, 2011).

O estudo de diferentes fontes de PO possibilita a redução nos custos de produção dessa enzima, e viabiliza a aplicação em processos industriais. Nesse sentido, há a avaliação da reutilização de subprodutos da agroindústria, visto que esses em sua

grande maioria são empregados para desenvolvimento de rações animais por sua alta concentração de proteínas.

O farelo de arroz (FA) um subproduto do beneficiamento do arroz, é uma fonte da PO, além dessa enzima se destaca a presença de outras como lipases, lipoxigenases, catalases entre outras (LUH *et al.*, 1991). O FA apresenta um percentual de proteína que varia entre 12 a 20%. De acordo com a origem, expressivas variações podem ser encontradas para a sua composição química. Mesmo este sendo usado para produção de alguns alimentos e ração animal, boa parte vem sendo descartada, porém a extração de seus componentes viabiliza a reutilização desse subproduto com alto valor agregado (PESTANA, MENDONÇA e ZAMBIAZI, 2008).

Assim também se apresenta o farelo de soja (FS), que é produzido após a extração do óleo do grão de soja, e também utilizado para a alimentação animal, sendo mais rico em proteínas do que aqueles derivados de outras oleaginosas como a canola e o girassol. A PO de soja é fortemente relatada na literatura quanto a sua aplicação em processos de descontaminação ambiental, frente a corantes (SILVA *et al.*, 2013) e outros compostos orgânicos (PARKER *et al.*, 2012).

3.5 APLICAÇÃO DA PEROXIDASE EM DESCONTAMINAÇÃO

As POs e fenol-oxidases catalisam reações de oxidação de compostos aromáticos, uma das maiores classes de substâncias poluentes e tóxicas (BON, FERRARA e CORVO, 2008). Li *et al.* (2011) enfatizam que entre as tecnologias de tratamento aceitas, o processo enzimático com uma enzima redox (PO de rabanete, lignina-peroxidase, etc), na presença de H₂O₂ como um oxidante, obtém maior eficiência de remoção de compostos fenólicos orgânicos, tais como fenol, pentaclorofenol e hormônios.

Com a necessidade de melhoria na remediação biológica, técnicas como a tecnologia enzimática tem recebido grande atenção. Kinsley e Nicell (2000) avaliaram a aplicação de uma PO obtida de soja como catalisador da reação de oxidação e polimerização de compostos aromáticos, na presença de H₂O₂. Os produtos polimerizados precipitam com a solução, viabilizando uma degradação de 95% de fenol com adição de PEG como aditivo para aumento da vida ativa da enzima. Uma PO obtida de rabanete (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*) foi empregada em

processo de descontaminação de compostos fenólicos (WAGNER e NICELL, 2002), juntamente com H_2O_2 , resultando em 95% de remoção de fenóis (2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol e 2-metilfenol) em 3h.

Muitas aplicações têm sido estudadas na indústria química, clínica, bioquímica, alimentícia e biotecnológica que utilizam enzimas para produzir ou melhorar os produtos (MOTAMED, ALEMZADEH e GHAEMMAGHAMI, 2009; PERDANA *et al.*, 2012). Enzimas atuam sobre compostos específicos, e por simples reações podem aumentar a biodegradabilidade de substâncias tóxicas ou auxiliar na sua remoção. O tratamento enzimático de efluentes, como no processamento do papel auxilia o tratamento biológico, pois os tratamentos químicos acabam alterando ou destruindo a microflora que atua no processo de degradação e mineralização da matéria orgânica do efluente.

A degradação de hormônios estrogênicos naturais e sintéticos (estrone, estradiol, estriol e etinolestradiol) por HRP, foi estudada por Auriol *et al.* (2006). A reação catalisada pela enzima ($0,0017 \text{ U mL}^{-1}$), em tampão fosfato pH 7, $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, levaram a um percentual de degradação que variou entre 92 e 100% durante 1 h de tratamento. Segundo os autores este estudo demonstrou que o sistema catalisado por HRP é tecnicamente viável para a remoção dos principais estrogênios presentes no ambiente em baixas concentrações.

Karim e Husain (2009) avaliaram a aplicação da PO extraída de abóbora amarga em processo de degradação por polimerização oxidativa do composto bisfenol A. O composto se mostrou resistente à ação da enzima, porém, a oxidação foi aumentada com a adição do substrato guaiacol ao sistema como mediador redox. O sistema de degradação utilizado foi constituído por guaiacol ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$), H_2O_2 ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e $0,32 \text{ U mL}^{-1}$ da enzima, em tampão fosfato pH 7,0 a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, chegando a um percentual de degradação de bisfenol A de 90% em 4 h. O produto de degradação foi identificado como 4-isopropenilfenol Figura 4.

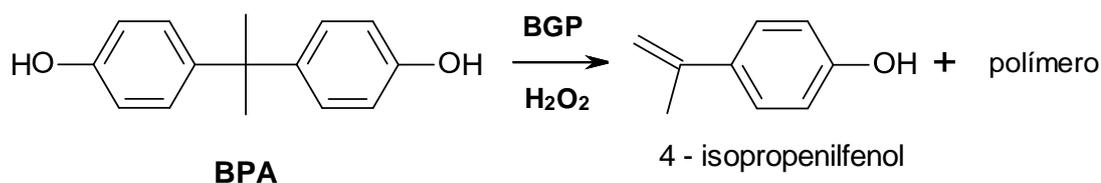


Figura 3. Reação proposta para polimerização de BPA (bisfenol A) catalisada por BGP (peroxidase de abóbora amarga) (KARIM e HUSAIN, 2009).

Uma HRP, com processo catalisado por H₂O₂ e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH), foi aplicada para remover pentaclofenol. Cerca de, 98% de pentaclofenol a uma concentração de 0,05 mmol L⁻¹ foi removido pelo sistema HRP-NADH-H₂O₂ a 30 °C em pH 5,0 durante 1 h. Segundo os autores, Li *et al.* (2011), em comparação a HRP convencional, o sistema com adição de H₂O₂ melhorou a degradação. A adição de O₂ em sistema HRP-NADH-H₂O₂ aumentou ataxa de remoção de PCP devido à promoção do radical hidroxila (*OH) e geração do ânion radical superóxido (*O₂⁻). A eficiência da remoção de pentaclofenol diminuiu quando *O₂⁻ e H₂O₂ foram removidos pela enzima catalase superóxido dismutase do sistema HRP-NADH-O₂, demonstrando que *OH/*O₂⁻ desempenharam um importante papel na degradação.

Silva *et al.* (2013), avaliaram o uso de um extrato bruto de PO obtido de cascas de sementes de soja, de modo a catalisar a remoção da cor de uma solução aquosa contendo o corante têxtil reativo Remazol Brilliant Blue R e do efluente sintético. Esse estudo obteve uma remoção máxima de corante de 86% após 13 min de reação usando H₂O₂ 100 mmol L⁻¹, enzima 70,4 U mL⁻¹ e 40 mg L⁻¹ do corante.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Subprodutos agroindustriais

As amostras de FA e FS foram adquiridas no comércio local, acondicionadas em embalagem apropriada à temperatura de 0 °C até sua utilização.

4.1.2 Padrões de micotoxinas e peroxidase

Os padrões das micotoxinas DON e De-epoxi-Deoxinivalenol (De-DON) foram adquiridos da *Sigma Chemical Company* (E.U.A.). Para a preparação das soluções estoque da micotoxina DON, esta foi solubilizada em benzeno:acetonitrila (95:5) para resultar em concentração de 100 µg mL⁻¹. As soluções de trabalho consistiram na diluição das soluções estoque para a concentração de 50 µg mL⁻¹. A determinação das concentrações das soluções foi realizada pela relação p/v e confirmadas pelo procedimento descrito por Bennett e Shotwell (1990) e Krska *et al.* (2007) utilizando a absorvidade molar do padrão em acetonitrila (219 nm). De-DON foi adquirido na concentração de 50 µg mL⁻¹ tendo como solvente acetonitrila.

O padrão de PO foi adquirido da *Sigma Chemical Company* (E.U.A.), como padrão enzimático de PO tipo VI obtida de raiz forte (HRP) liofilizada com concentração de 250 a 330 U mg sólido⁻¹.

4.1.3 Instrumentação

- Balança analítica de precisão FA2104N (Bioprecisa, São Paulo, Brasil);
- Banho termostático com agitação – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Banhos ultrassônicos 25, 37 e 40 kHz, 150 W - UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- Bomba de vácuo Primatec – (São Paulo, Brasil);
- Câmara de fluxo laminar – Laboconco Corporation (Missouri, USA);
- Centrífuga refrigerada CIENTEC CT-5000R (São Paulo, Brasil);
- Coluna analítica Ascentis C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm); (Supelco, USA);

- Coluna analítica Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); (Phenomenex, USA);
- Concentrador Tecnal TE-019 – (São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo líquido Shimadzu, disponível no Laboratório de Micotoxinas - FURG, equipado com sistema administrador CBM-20_A módulo LC-20AT, degaseificador DGU-20A₅ e detector UV-VIS SPD-20A, conectado em *software LC solution data acquisition*, injetor Rheodyne loop 20 µL;
- Cromatógrafo a líquido Waters (Milliford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição isocrática, Detector por Arranjo de Diodos 2996, sistema de aquisição de dados software Empower PDA.
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters, equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, separador de massas, Micromassas Quatro MicroTM API Waters, com fonte API, utilizado no modo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters;
- Destilador de Nitrogênio Tecnal TE-0363 – (São Paulo, Brasil);
- Digestor de proteínas Gerhardt – (São Paulo, Brasil);
- Eletroforese com fonte GSR modelo 300STD, acoplada a cuba vertical para uma ou duas placas da marca DIGEL.
- Espectrofotômetro Biospectro SP220 (São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro modelo Cary 100 – Varian UV-VISIBLE (Walnut Creek, USA)
- Estufa (temperatura 37 a 120 °C) – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Microdestilador de solventes Tecnal TE-019 – (São Paulo, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 – 1000 µL;
- Moinho Tecnal TE-631 – (São Paulo, Brasil);
- Mufla (550 °C) – Quimis (São Paulo, Brasil);
- pHmetro Lutron pH 206
- Refluxo para soxhlet – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Refluxo para fibras – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Vórtex Mixer Vixar – (Coreia);
- Shaker incubadora Tecnal TE-420 – (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração em membrana Supelco (USA);

- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3 Millipore (Millipore, USA).

4.1.4 Reagentes e solventes

- 2- Mercaptoetanol P.A. (AMRESCO, USA);
- Acetonitrila grau HPLC (Panreac, Espanha);
- Acetonitrila P.A. (Vetec, Brasil);
- Acetona P.A. (Synth, Brasil);
- Acetona recuperada em destilador de solventes;
- Ácido acético P.A. (Synth, Brasil);
- Acrilamida para eletroforese (Vetec, Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 M Ω cm);
- Albumina de soro bovino (INLAB, Brasil);
- Álcool Iso-Amílico P.A. (Vetec, Brasil);
- Azul de bromofenol P.A. (Vetec, Brasil);
- Benzeno P.A. (Vetec, Brasil);
- Bis-acrilamida (Vetec, Brasil);
- Carbonato de cálcio (Synth, Brasil);
- Cloreto de bário (Vetec, Brasil);
- Cloreto de magnésio (Vetec, Brasil);
- Cloreto de potássio (Vetec, Brasil);
- Cloreto de sódio (Synth, Brasil);
- Clorofórmio P.A. (Proquimios, Brasil);
- Coomassie Blue G-250 P.A. (AMRESCO, USA);
- Diclorometano P.A. (Merk, Alemanha);
- Dodecil sulfato de sódio (Bioagency, Brasil);
- Edta (Synth, Brasil);
- Éter de petróleo P.A. (Vetec, Brasil);
- Frascos de vidro (*via*l), com capacidade para 1,5 mL;
- Frascos de vidro âmbar com capacidade de 25, 50 e 100 mL;

- Folin Ciocalteu 2N (Próton Química, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Vetec, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec, Brasil);
- Gás nitrogênio;
- Glicina P.A. (Sigma Chemical Company – E.U.A.)
- Guaiacol P.A. (Vetec, Brasil);
- Hexano P.A. (Synth, Brasil);
- Hidróxido de sódio 1N (Vetec, Brasil);
- Membrana de acetato de celulose 0,45 µm de diâmetro de poro de 47 mm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil) com utilização na filtração de solventes para HPLC.
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA);
- Metanol P.A. (Synth, Brasil);
- Padrão de massa molecular para eletroforese 15 – 150 kDa (AMRESCO, USA).
- Padrões analíticos: Deoxinivalenol e Deepoxi-Deoxinivalenol (Sigma Chemical Company – E.U.A.);
- Padrão de enzima Peroxidase Horseradish (Sigma Chemical Company - E.U.A.);
- Peróxido de hidrogênio 30% (Êxodo Científica, Brasil);
- Persulfato de amônio (Sigma Chemical Company - E.U.A.);
- Sephadex G-100 (Sigma Chemical Company - E.U.A.);
- Sulfato de amônio (Synth, Brasil);
- Sulfato de cobre (Vetec, Brasil);
- Sulfato de manganês (Synth, Brasil);
- Sulfato ferroso (Vetec, Brasil);
- Tetracloroeto de carbono (Química Fina LTDA);
- Tetrametiletilenodiamina (Vetec, Brasil);
- Tetrahidrofurano 99% (Sigma Chemical Company - E.U.A.);
- Tween 80 P.A. (Synth, Brasil);
- Vidraria de rotina laboratorial (balões volumétricos, tubos de ensaio, pipetas volumétricas, copo de béquer,...).

4.2 MÉTODOS

O fluxograma das atividades executadas no estudo está descrito abaixo.

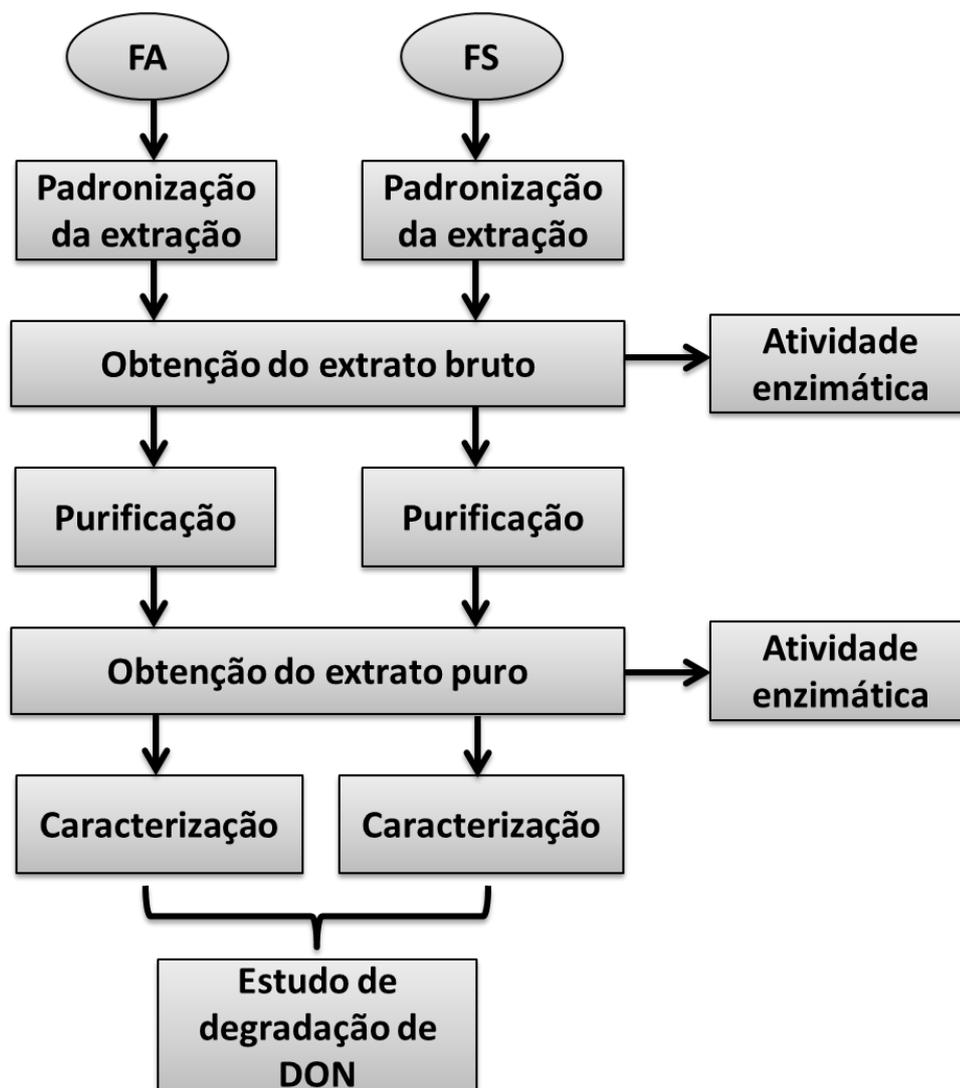


Figura 4. Representação esquemática do desenvolvimento experimental.

4.2.1 Caracterização química dos farelos

O teor de umidade foi determinado empregando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C de acordo com o método nº 935.29, os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo de acordo o método nº 920.85; a determinação de cinzas por método gravimétrico, através de incineração das amostras em mufla a 550°C; método nº 923.03; e os níveis protéicos determinados pelo método

de micro-kjeldahl, nº 920.87 e o teor de fibra bruta segundo o método nº 991.43, todas da A.O.A.C. (2000).

Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença, considerando o somatório dos teores de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e fibra alimentar total.

4.3 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS

4.3.1 Estabelecimento das condições de extração

A extração da enzima PO foi realizada a partir dos subprodutos agroindustriais, FA e FS. As condições iniciais para extração da enzima foram baseadas em método descrito por Cardinali *et al.* (2011), onde, o meio tamponante extrator a uma concentração de 5 mmol L⁻¹ foi adicionado aos farelos, seguido de agitação mecânica por 60 min a temperatura ambiente, para rompimento da estrutura celular e solubilização proteica. Para obter condições ótimas de extração da PO, as variáveis, tempo de extração, volume de solvente extrator e pH do solvente extrator, foram avaliadas através de delineamento composto central rotacional DCCR 2³. As variáveis e os níveis avaliados encontram-se na Tabela 3, gerando 17 experimentos que contavam com pontos centrais em triplicata, para determinação do erro experimental, e pontos axiais que viabilizam a maximização dos resultados da extração da PO em termos de atividade específica.

Os extratos enzimáticos brutos provenientes dos diferentes experimentos foram centrifugados a 3220 x g por 10 min a uma temperatura de 4 °C, os sobrenadante filtrados, para quantificação da proteína solúvel e da atividade específica da PO em cada um deles.

Após o estabelecimento das condições de extração foi avaliada a influência da força iônica do tampão fosfato nas concentrações variando entre 0,005 e 0,050 mol L⁻¹.

Foram testados também as condições de agitação orbital (100 rpm), agitação ultrassônica (25, 37 e 40 kHz) e blender (5 min).

Tabela 3. Níveis e variáveis analisadas no delineamento composto central rotacional DCCR 2³.

FA					
Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo (min)	34,8	45	60	75	85,2
pH	3,3	4	5	6	6,7
Volume (mL)	16,4	30	50	70	83,6

FS					
Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo (min)	34,8	45	60	75	85,2
pH	3,3	4	5	6	6,7
Volume (mL)	16,4	30	50	70	83,6

4.3.2 Moduladores de atividade enzimática

A avaliação do efeito de moduladores sobre a atividade enzimática foi verificada com a adição de sais inorgânicos, cloretos, sulfatos e carbonato, como cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl₂), cloreto de bário (BaCl₂), sulfato de manganês (MnSO₄), sulfato de ferro (FeSO₄), sulfato de cobre (CuSO₄) e carbonato de cálcio (CaCO₃); solventes orgânicos polares, acetona, acetonitrila (ACN), clorofórmio (CH₃Cl) e metanol (CH₃OH) e um apolar benzeno; detergentes, SDS e Tween 80; e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Estes adicionados em duas concentrações no solvente extrator. A escolha desses modulares foi realizada de acordo com dados da literatura (VERMA e SATYANARAYANA, 2012).

As duas concentrações adicionadas ao solvente extrator para os sais inorgânicos foram 0,1 mol L⁻¹ e 0,2 mol L⁻¹, os solventes orgânicos foram adicionados nas concentrações 5 e 10%, detergentes 0,1 e 0,5% e EDTA em concentrações de 0,01 mol L⁻¹ e 0,02 mol L⁻¹. Os resultados obtidos foram expressos em atividade relativa, de acordo com a Equação 3.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA

A determinação da atividade específica foi realizada a partir do método de Devaiah e Shetty (2009). O meio reacional foi constituído por 2 mL de água, 1,5 mL de tampão fosfato, 0,5 mL de guaiacol $0,080 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mL de H_2O_2 0,08%, a transmitância dos compostos oxidados foi obtida em espectrofotômetro a 470 nm. A atividade enzimática foi estimada em termos de atividade específica, através da reação de oxidação do substrato a tetraguaiacol caracterizado pela coloração laranja. Uma unidade de atividade específica da enzima PO foi definida como a massa de proteína capaz de causar um aumento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto (GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2010).

A quantificação de proteína nos extratos (mg mL^{-1}) foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) como padrão.

4.5 PURIFICAÇÃO DAS PEROXIDADES

Os extratos brutos obtidos de FA e FS foram submetidos a purificação empregando cromatografia de exclusão molecular (BOER *et al.*, 2006) e partição trifásica (OZER *et al.*, 2010), visando rendimento e fator de purificação das PO.

4.5.1 Concentração protéica

Os extratos enzimáticos brutos obtidos após estabelecidas as condições de extração foram submetidos à concentração proteica por precipitação de acordo com método de Boer *et al.* (2006) adaptado para este trabalho. Para isto foi empregado solvente orgânico, acetona na proporção 1:3. A mistura foi mantida sob refrigeração por 24 h, seguido de centrifugação a $3220 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 min, com posterior solubilização dos precipitados em tampão fosfato 5 mmol L^{-1} com pH 5 e pH 6, respectivamente para FA e para FS. A eficiência da etapa era indicada pela determinação da atividade específica e teor de proteína solúvel.

4.5.2 Cromatografia de exclusão molecular – Sephadex G-100

Seguindo método de Boer *et al.* (2006), o extrato enzimático obtido segundo o item 4.5.1, foi submetido à purificação em coluna cromatográfica de exclusão molecular

com dimensões de 1,5 cm de diâmetro x 30 cm de altura, empacotada com Sephadex G-100 por um período de 24 h antes do uso. Volumes de extrato enzimático correspondente a 35,4 mg de proteína para FA e 38 mg de proteína para FS foram eluídos na coluna cromatográfica em uma vazão de 0,4 mL min⁻¹. Alíquotas de 2 mL foram recolhidas para determinação da concentração protéica em espectrofotômetro a 280 nm e a medida da atividade específica da PO (item 4.4).

4.5.3 Partição trifásica (TPP)

Conforme procedimento de Ozer *et al.* (2010), em um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 2 mL de extrato enzimático bruto, foi adicionado sulfato de amônio, até obtenção de 50% de saturação a temperatura ambiente, seguido de homogeneização em vórtex. Após, foi adicionado acetona em uma proporção 1:1 e o sistema homogeneizado em vórtex durante 1 min, permanecendo em repouso por 1 h para separação das fases. A etapa seguinte foi a centrifugação a 3220 x g, 4 °C durante 10 min para melhor separação das fases.

A fase de topo (acetona) e de fundo (sal) foram separadas da interface formada durante a centrifugação. As fases, salina e contendo acetona, foram retiradas com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e na fração precipitada contendo a PO foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ pH 5 para o precipitado obtido de FA e pH 6 para FS. Em todas as fases e nos extratos enzimáticos purificados, foi determinada a atividade específica da PO (U mg⁻¹) e a concentração de proteína (mg mL⁻¹). Os parâmetros, percentual de saturação do meio com sulfato de amônio (20, 30, 40, 50 e 60%, m/v) e volume das fases de fundo e topo (extrato bruto: solvente - 1:0,5; 1:1; 1:1,5 e 1:2, v/v), foram avaliados quanto a sua influência no fator de purificação e recuperação da PO.

Os parâmetros recuperação e fator de purificação enzimática foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$REC (\%) = \frac{A_tEP}{A_tEB} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$FP = \frac{A_eEP}{A_eEB} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

REC – Recuperação enzimática

FP – Fator de purificação enzimática

A_tEP – Atividade total (U_t) do extrato purificado

A_tEB – Atividade total (U_t) do extrato bruto

A_eEP – Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) do extrato purificado

A_eEB – Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) do extrato bruto

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PO

Foram analisados fatores pH, tempo, temperatura, força iônica e concentração de substrato na atividade dos extratos enzimáticos. O efeito do tempo de reação foi estudado incubando a enzima e seu substrato em diferentes intervalos de tempo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 min. O efeito das temperaturas de incubação foram estudados em 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 e 80 °C. O efeito do pH na reação enzimática foi avaliado pela adição de tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ em pH de 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5. O efeito da força iônica do meio foi avaliada em diferentes concentrações salinas do tampão fosfato, 0,005; 0,010; 0,020; 0,030; 0,040 e 0,050 mol L⁻¹. Os resultados obtidos foram expressos em termos de atividade relativa, de acordo com a Equação 3:

$$A_r(\%) = \frac{A_e}{A_{em\acute{a}x}} \times 10 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

A_r – Atividade relativa

A_e – Atividade específica ($U\ mg^{-1}$)

$A_{em\acute{a}x}$ – Atividade específica máxima ($U\ mg^{-1}$)

4.6.1 Parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$, a atividade da PO foi avaliada em diferentes concentrações iniciais de substrato. O efeito de diferentes

concentrações de substrato enzimático guaiacol (de 8 a 160 mmol L⁻¹) sobre a atividade enzimática é descrita pela constante de Michaelis-Menten (K_M), que pode ser obtida através do gráfico da velocidade versus a concentração de substrato.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 4}$$

Os parâmetros cinéticos K_M e V_{máx} foram estimados a partir da linearização da equação de Michaelis-Menten pelo método gráfico de Lineweaver-Burk (Equação 5).

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação 5}$$

Os valores de K_M e V_{máx} foram obtidos pelos coeficientes angular e linear da Equação 5, respectivamente.

4.6.2 Estabilidade enzimática

A influência do pH na estabilidade enzimática foi avaliada através da solubilização do extrato enzimático, obtido de acordo com item 4.5.1, em tampão fosfato pH de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5, durante 40 dias sob temperatura de refrigeração (10 °C).

O estudo da termoestabilidade da PO dos extratos brutos e purificados por partição trifásica foi realizado incubando os extratos nas temperaturas de 0, 10, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 °C até perda total de atividade, em pH 6. A avaliação da termoestabilidade foi realizada até o momento em que não foi detectada ação enzimática.

A medida da atividade específica dos extratos indicou a estabilidade, conforme Equação 3. O tempo de meia vida (t_{1/2}) (Equação 6) no meio reacional, nas diferentes temperaturas também foi determinado pelo período em que a enzima manteve 50% de sua atividade (MDLULI, 2005);

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

$t_{1/2}$ - tempo de meia vida

K_d - constante de desnaturação térmica.

A constante de desnaturação térmica (K_d) da enzima em meio reacional foi determinado a partir do gráfico logarítmico semi-natural da atividade residual em função do tempo; a energia de desativação da reação (E_d) foi estabelecida de acordo com a Equação 7;

$$\ln K_d = \ln K - \left(\frac{E_d}{RT} \right) \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

E_d - energia da reação de desativação

K_d - constante de desnaturação térmica

K - constante de Boltzmann ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

T - temperatura absoluta em Kelvin

R - constante dos gases ($8,314 \times 10^{-3} \text{ KJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$).

O valor da redução decimal D (Equação 8), tempo necessário para a redução de 90% da atividade em uma determinada temperatura (MDLULI, 2005) e o valor de z (variação de temperatura em um sistema para que ocorra uma redução decimal na velocidade de reação) foi dado pelo inverso do coeficiente angular da reta construída a partir de $\log(D)$ versus a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (HEIDTMANN *et al.*, 2012).

$$D = \frac{2,30}{K_d} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

D – valor da redução decimal

K_d – constante de desnaturação térmica

4.6.3 Parâmetros termodinâmicos

A avaliação termodinâmica foi realizada para as temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade térmica da enzima, expressa em termos de energia livre de Gibbs (ΔG^*), o que possibilita o estudo de parâmetros como entropia de inativação (ΔS^*) e entalpia de inativação (ΔH^*), ambos relacionados à ΔG^* pela relação de Gibbs-Helmholtz, conforme Equação 9:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad \text{Equação 9}$$

4.6.4 Determinação da massa molecular das proteínas dos extratos enzimáticos

A avaliação da massa molecular e a confirmação da pureza do extrato purificado foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A coloração dos géis foi realizada em solução contendo: ácido acético 13,5% (v/v), metanol 54% (v/v) e Comassie Blue G-250 0,27% por aproximadamente 15 min, e a descoloração através de solução contendo 7% (v/v) de ácido acético e 30% (v/v) de metanol, sendo renovada a solução a cada 45 min até obtenção de uma revelação nítida (WEBER e OSBORN, 1969).

Para preparo das amostras para análise em eletroforese, retiraram-se alíquotas dos extratos brutos que correspondiam a 2 e 2,5 mg de proteína para os extratos de FA e FS respectivamente, sendo estes, precipitados com acetona, para concentração enzimática por precipitação. O sistema foi mantido sob refrigeração durante 24 h e posteriormente centrifugado (3220 x g, 4 °C durante 10 min). O precipitado obtido foi solubilizado em 100 µL de tampão de desnaturação (tris HCl 0,15 mol L⁻¹ pH 6,8, 10 % SDS, 20 % 2 - Mercaptoetanol, bromofenol e glicerol) e 12 µL de glicerol. Em seguida, as amostras foram submetidas à desnaturação em banho-maria a 100°C por 7 min e analisadas imediatamente ou após armazenadas a 0 °C (PORZIO e PEARSON, 1977).

As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba com miliamperagem fixada em 20 mA, 200V, durante 2 h e 30 min. As concentrações do gel de separação e do gel de concentração foram de 10,5% e 3,8%, respectivamente. A quantidade de proteína aplicada no gel foi padronizada em 400 µg por poço para FA e 200 µg por poço para FS. Cada sistema de separação proteica foi comparado simultaneamente por padrão

de massa molecular com variação de 15 a 150 kDa e por padrão de enzima HRP com massa molecular de 44 kDa.

4.7 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL

4.7.1 Condições cromatográficas para separação e quantificação de Deoxinivalenol e De-epoxi-Deoxinivalenol

O método cromatográfico para separação e quantificação das micotoxinas DON e De-DON, foi otimizado primeiramente em HPLC-UV e HPLC-DAD com detecção em 219 nm, através de uma eluição isocrática. Foram testadas duas colunas cromatográficas, Ascentis C18 com tamanho de partícula de 3 µm e 150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno e Gemini C18 com tamanho de partícula de 5 µm e 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno. Os solventes utilizados para eluição dos compostos foram: ACN, metanol, tampão fosfato em pH 6, 5 mmol L⁻¹, e água ultra pura de sistema Milli-Q com uma resistividade de 18,2 MΩ cm, estes solventes utilizados no sistema foram filtrados em bomba de vácuo com a utilização de membranas de acetato de celulose de 0,45 µm e também desgaseificados em banho ultrassônico de 40 kHz em temperatura ambiente.

As proporções testadas para a coluna Ascentis C18, foram: H₂O:ACN:tampão fosfato (TF) – 85:5:10, 80:10:10 e 85:10:5 e para a coluna Gemini C18, foram: H₂O:ACN:metanol – 30:70:0, 20:80:0, 20:75:5, e 25:75:0. A vazão de fase móvel (FM) avaliada variou de 0,2 a 0,5 mL min⁻¹ para a coluna Gemini C18 e 0,6 mL min⁻¹ para a coluna Ascentis C18.

A avaliação da separação de DON e De-DON foi realizada em padrões diluídos conforme item 4.1.2 através do tempo de retenção (t_R) de cada analito, fator de separação (α) e fator de retenção (k) (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). De acordo com as Equações 10 e 11 foram determinados k e α , respectivamente.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

k = fator de retenção;

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

t_M = tempo de retenção de um analito não retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

α = fator de separação;

k_2 = fator de retenção do segundo composto a eluir na corrida cromatográfica;

k_1 = fator de retenção do primeiro composto a eluir na corrida cromatográfica.

A confirmação da degradação de DON e presença de De-DON, ocorreu por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas sequencial. O cromatógrafo utilizado foi um Cromatógrafo a Líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica Kinetex 2,6 μm 100 Å (50 \times 3 mm de diâmetro interno), Phenomenex.

A fase móvel utilizada foi composta por metanol:H₂O ultrapura 5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (70:30, v/v) com eluição no modo isocrático e uma vazão de 0,2 mL min⁻¹. As condições cromatográficas foram otimizadas no LC-ESI-MS/MS, para diminuir o tempo de corrida já estabelecido em HPLC-DAD.

As condições no espectrômetro de massas foram otimizadas pela injeção direta da solução analítica do padrão de DON 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da injeção foi definido para DON (296,3 de massa molecular o modo de ionização da fonte (*electrospray* negativo), energia de colisão (11/8), voltagem do cone (17/17) e transição (*m/z*) íon precursor – íon produto (355>58,8 e 355>295,2-este usado para quantificação). Com essas condições definidas, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação.

4.7.2 Validação de método analítico

Após as condições de separação e quantificação das micotoxinas estabelecidas, foi realizada a validação. Neste trabalho, as figuras de mérito utilizadas para validação do método instrumental foram: linearidade, curva analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), sensibilidade, seletividade, exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade) (ANVISA, 2003; RIBANI, 2004; LANÇAS, 2009; HARRIS, 2011).

A avaliação da linearidade (R) foi realizada a partir da curva analítica, com relação à área do pico do analito (sinal da amostra – sinal do branco) (HARRIS, 2011). A faixa linear variou entre 0,49 a 4,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HPLC-UV, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS. Para construção das curvas analíticas foi preparada uma solução padrão contendo a mistura dos dois compostos em estudo.

A detectabilidade do método foi estabelecida de acordo com os limites de detecção e quantificação. Os LD e LQ foram estimados pela relação sinal/ruído, considerando, respectivamente a concentração que gerou no mínimo um sinal de 3 e 10 vezes maior que a razão do sinal pela linha de base (ruído). Os limites instrumentais foram obtidos pela calibração externa no solvente em uma solução padrão contendo a mistura dos dois compostos em estudo (LANÇAS, 2009).

A sensibilidade do método foi determinada pela inclinação da reta obtida pela curva analítica, correspondendo ao coeficiente angular da equação linear (LANÇAS, 2009). A seletividade foi avaliada pelo sinal do analito gerado em HPLC-DAD através do espectro eletrônico do sinal do analito comparado ao do padrão analítico.

A exatidão do método foi definida em termos de recuperação, sendo esta calculada com base na concentração conhecida do analito adicionada aos sistemas no estudo de cinética de degradação, conforme item 4.7.4 e determinada após extração e quantificação segundo metodologia desenvolvida. A recuperação, expressa em porcentagem, foi obtida correlacionando-se a concentração de DON pela curva analítica com o teor inicial no meio tamponante.

A precisão foi avaliada em função da repetibilidade (RIBANI, 2004), onde foram realizados ensaios em triplicata de extrações e quantificação utilizando o método de partição líquido-líquido. A partir das injeções das triplicatas foi calculado o RSD (%), obtido a partir da Equação 12.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}_m} \times 100$$

Equação 12

Onde:

S = estimativa do desvio padrão

Xm = média de uma série de medidas (replicatas)

4.7.3 Cinética de degradação

Após a definição das condições ótimas de obtenção, purificação e reação enzimática, além da caracterização bioquímica da enzima PO foi avaliado o potencial degradativo sobre DON. Os experimentos para verificar a degradação de DON foram realizados em meio tamponante, conduzidos segundo as condições ótimas de atividade das enzimas de FA e de FS na forma purificada e pela enzima HRP na forma comercial, acompanhando a ação da enzima PO, a concentração de DON e/ou formação de De-DON, visando à comparação da aplicabilidade e custo do processo de degradação micotoxicológica.

Os experimentos em que foi empregada a enzima PO obtida de FA, foram conduzidos sob as condições ótimas, empregando a proporção de solvente tampão fosfato pH 5,5 com força iônica de 5 mmol L⁻¹:ACN (80:20 – v/v), e temperatura de 20 °C. Quando utilizado a enzima obtida de FS, as condições foram tampão fosfato pH 5 com força iônica de 5 mmol L⁻¹:ACN (80:20 – v/v) a uma temperatura de 30 °C. Para a enzima comercial HRP, nos experimentos foi utilizado tampão fosfato em pH 6 com força iônica de 5 mmol L⁻¹ à temperatura ambiente (25 °C), conforme o descrito pelo fornecedor *Sigma Chemical Company* (E.U.A.).

A avaliação da cinética de degradação foi constituída de etapas que envolveram diferentes sistemas: na presença da micotoxina em meio tamponante (D); na presença da micotoxina em meio tamponante contendo PO e o cofator de atividade enzimática H₂O₂ (DPOP); na presença da micotoxina em meio tamponante contendo PO e o substrato de ação enzimática guaiacol (DPOG) e na presença da micotoxina em meio tamponante contendo PO, o cofator de atividade enzimática H₂O₂ e o substrato guaiacol (DPOPG).

No estudo cinético foram avaliados diferentes tempos de incubação (15, 30, 45, 60 e 90 minutos, 3, 5, 10, 24, 32 e 48 h), para os sistemas D, DPOP, DPOG e DPOPG sob agitação constante de 150 rpm para as enzimas na forma purificada extraídas de FA e FS. Os ensaios foram realizados em triplicata, em vidro âmbar fixando o volume total de 13 mL, além das concentrações de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DON, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para peróxido de hidrogênio, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de guaiacol e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PO. A avaliação da ação degradativa da enzima comercial HRP, ocorreu sob condições diferentes das demais enzimas, visto que esta possui condições ótimas de ação estabelecidas pelo fabricante. A cinética ocorreu em 10 tempos de incubação (15, 30, 45, 60 e 90 min, 3, 5, 10, 24 e 48 h), com os mesmos sistemas testados para as POs de FA e FS. Estes ensaios foram realizados em triplicata, em vidro âmbar fixando o volume total de 15 mL, além das concentrações de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DON, $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para peróxido de hidrogênio, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de guaiacol e $32,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PO.

As concentrações estabelecidas para os compostos integrantes do sistema reacional, nos ensaios de degradação, foram baseadas na curva analítica de DON, utilizando para avaliação da enzima comercial a maior concentração de DON da curva e para as POs de FA e FS a concentração intermediária visto o grau de purificação; a concentração do substrato enzimático guaiacol foi estabelecida como a mesma concentração de DON, visto que os compostos poderiam estabelecer uma relação competitiva pelo sítio ativo da PO; a concentração de H_2O_2 utilizada teve como ponto de relação com a relação volume de guaiacol: H_2O_2 em meio reacional enzimático que é 1:2, mesma relação serviu de base para estabelecimento da concentração da enzima PO.

A cada intervalo de tempo, a amostragem foi realizada correspondendo a alíquotas de 1mL onde foi realizada a extração, concentração e quantificação da micotoxina. Para o acompanhamento da cinética de degradação, foi utilizado o LC-ESI-MS/MS.

4.7.4 Extração de Deoxinivalenol do sistema reacional

Para determinação da presença de DON nas alíquotas obtidas das diferentes condições estudadas foram avaliadas duas técnicas de extração de DON: partição

líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*).

a) partição líquido-líquido: para extração de DON por essa técnica foi realizada a adição de 200 μL de colorofórmio, seguida da agitação em vórtex durante 30 segundos e 3 min em banho ultrassônico de 25 kHz e retirada da fase orgânica. Esse processo foi repetido por 3 vezes em cada amostra para extração da micotoxina residual, chegando a um volume final de 600 μL , que foram secos sob corrente de nitrogênio.

b) DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva): uma alíquota de 1 mL foi adicionado 500 μL de solvente dispersor e 150 μL de solvente extrator, o sistema foi agitado em vórtex durante 1 min, e banho ultrassônico durante 5 min, seguido de centrifugação a 3220 x g durante 3 min para melhor separação das fases. Da fase com a presença do solvente extrator foram removidos 100 μL utilizando microseringa, e estes evaporados utilizando corrente de nitrogênio. Para realização da DLLME foram avaliados como solventes extratores: tetracloreto de carbono (CCl_4), diclorometano (CH_2Cl_2), clorofórmio (CH_3Cl) (ARROYO-MANZANARES, GÁMIZ-GRACIA e GARCÍA-CAMPAÑA, 2013) e tolueno, como solventes dispersores foram utilizados acetona (RIDGWAY, LALLJIE e SMITH, 2007), ACN, tetrahidrouano (THF) e metanol (CH_3OH) (ARROYO-MANZANARES, GÁMIZ-GRACIA e GARCÍA-CAMPAÑA, 2012).

As amostras secas sob corrente de nitrogênio foram armazenadas sob temperatura de 8 a 10 °C até o momento de análise.

4.8 RECUPERAÇÃO DE SOLVENTE ORGÂNICO

O sobrenadante (acetona + tampão fosfato) de centrifugação nos estudos dos itens 4.5.1, 4.5.3 e 4.6.5, foi separado e submetido à recuperação de acetona em destilador de solventes, Tecnal –TE-012.

4.9 TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS E LIMPEZA DE VIDRARIA

A limpeza do material utilizado nos diferentes experimentos e os resíduos de ensaios foram tratados através de imersão do material ou preparo de soluções contendo a concentração de 3% de hipoclorito de sódio. Este reagente garante a degradação da estrutura química e a ausência de recontaminação ambiental pelo descarte de material.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA considerando as médias de triplicatas dos ensaios por teste de Tuckey, utilizando o programa “Statistica” (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA), tendo atividade específica da PO (U mg^{-1}) atividade relativa (%), como resposta das variáveis em estudo. O nível de significância foi fixado em 95% para o modelo matemático e para a superfície resposta. A importância dos coeficientes de regressão, $p(t)$, foram determinados por meio do teste t de Student, a significância do modelo descrito pela equação foi determinada pelo teste de Fisher. A variância explicada pelo modelo foi dada pelo coeficiente de múltiplas determinações: R^2 .

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUBPRODUTOS

A composição proximal do FA e do FS, utilizados para obtenção da enzima PO expressos em massa seca, estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização química de FA e FS.

Amostra	Umidade (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Fibras (%)	Carboidratos*
FA	10,4 (1,2)**	14,6 (5,4)	10,4 (0,6)	20,8 (0,9)	3,5 (5,3)	40,3
FS	9,8 (1,5)	48,9 (1,4)	5,7 (3,3)	16,0 (10)	3,9 (4,2)	15,7

*Carboidratos estimados por diferença. **RSD (%) obtido no experimento.

Os resultados mostraram que o FA apresentou uma quantidade 4,8% maior de lipídios do que o FS. Cabe salientar o alto percentual de proteína de FS, o que faz desse subproduto uma potencial fonte da enzima PO. Os resultados encontrados na composição proximal de ambos os subprodutos estão dentro da faixa descrita na literatura (HUANG *et al.*, 2005; REDONDO-CUENCA *et al.*, 2006; KADER *et al.*, 2012; MOONGNARM, DAOMUKDA e KHUMPIKA, 2012).

5.2 CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA PEROXIDASE

Na Tabela 5 estão expressos os resultados encontrados no delineamento experimental DCCR 2³, utilizado para verificar a influência das variáveis tempo de extração (min), volume (mL) e pH do tampão fosfato utilizado como solvente extrator, buscando assim uma melhor condição para obtenção da enzima PO a partir de FA e FS com base em estudos preliminares. Os resultados mostram que no ponto central (ensaios 9, 10 e 11) se observa os maiores valores em termos de atividade específica para FA, 87 U mg⁻¹, e para FS, 100 U mg⁻¹.

Tabela 5. Matriz do planejamento experimental DCCR 2³, com variáveis e níveis avaliados em função da atividade específica (U mg⁻¹) de PO de FA e FS.

Ensaio	pH	Volume (mL)	Tempo (min)	PO (U mg ⁻¹)			
				Experimental		Predito	
				FA	FS	FA	FS
1	-1 (4)	-1 (30)	-1 (45)	38,40	83,55	44,04	84,85
2	-1 (4)	-1 (30)	+1 (75)	42,00	77,55	44,04	84,85
3	-1 (4)	+1 (70)	-1 (45)	44,28	81,79	26,76	84,85
4	-1 (4)	+1 (70)	+1 (75)	30,06	75,34	26,76	84,85
5	+1 (6)	-1 (30)	-1 (45)	38,91	68,85	44,04	74,45
6	+1 (6)	-1 (30)	+1 (75)	45,62	76,76	44,04	74,45
7	+1 (6)	+1 (70)	-1 (45)	44,47	75,19	26,76	74,45
8	+1 (6)	+1 (70)	+1 (75)	41,84	66,44	26,76	74,45
9	0 (5)	0 (50)	0 (60)	87,67	96,11	86,50 (1,3)*	106,07 (9,3)
10	0 (5)	0 (50)	0 (60)	83,01	102,88	86,50 (4,0)	106,07 (3,0)
11	0 (5)	0 (50)	0 (60)	91,41	101,74	86,50 (5,7)	106,07 (4,1)
12	0 (5)	0 (50)	-1,68 (34,8)	24,91	112,40	32,44	106,07
13	0 (5)	0 (50)	+1,68 (85,2)	24,61	126,56	32,44	106,07
14	-1,68 (3,3)	0 (50)	0 (60)	20,36	93,87	27,05	85,16
15	0 (5)	-1,68 (16,4)	0 (60)	82,13	68,55	70,42	61,18
16	0 (5)	+1,68 (83,6)	0 (60)	14,44	64,76	41,40	61,18
17	+1,68 (6,7)	0 (50)	0 (60)	18,34	70,05	27,06	67,73

*Variabilidade entre os resultados experimentais e preditos para validação do modelo.

A análise estatística dos resultados da Tabela 6 foi realizada resultando em um modelo empírico codificado da atividade específica da PO em função do tempo de extração, volume e pH do solvente extrator. Na avaliação da otimização da obtenção da PO de FA os parâmetros volume como termo linear, pH, volume e tempo em termos quadráticos foram encontrados como estatisticamente significativos ($p < 0,05$), mostrando que com um aumento do pH ocasiona uma diminuição de 42 U mg⁻¹ na atividade específica da PO, bem como com o aumento do tempo e volume ocorre uma diminuição de 38 e 22 U mg⁻¹, respectivamente. Assim, para FS os parâmetros pH linear, pH e volume quadráticos foram encontrados como estatisticamente significativos. A avaliação dos efeitos das variáveis sobre a atividade demonstrou que com o aumento de pH ocorreu uma diminuição de até 9 U mg⁻¹ na atividade e que com o aumento do volume do solvente extrator foi observado uma diminuição de 14 U mg⁻¹.

Tabela 6. Efeitos sobre a atividade específica ($U\ mg^{-1}$) no DCCR 2³ utilizado na extração da PO.

Enzima	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	P
FS	Média	101,080	101,080	2,089	48,380	0,000
	pH (X ₁)(L)	-5,201	-10,403	1,962	-5,301	0,033
	pH (X ₁)(Q)	-9,354	-18,708	2,159	-8,662	0,013
	Volume (X ₂)(L)	-1,048	-2,097	1,962	-1,068	0,397
	Volume (X₂)(Q)	-14,766	-29,532	2,159	-13,673	0,005
	Tempo (X ₃)(L)	0,770	1,541	1,962	0,785	0,514
	Tempo (X ₃)(Q)	3,911	7,823	2,159	3,622	0,068
	X ₁ X ₂	-0,001	-0,001	2,563	-0,000	0,999
	X ₁ X ₃	1,451	2,903	2,563	1,132	0,374
	X ₂ X ₃	-2,138	-4,277	2,563	-1,668	0,237
FA	Média	86,509	86,509	2,424	35,676	0,000
	pH (X ₁)(L)	0,930	1,861	2,277	0,817	0,499
	pH (X ₁)(Q)	-21,087	-42,174	2,506	-16,824	0,003
	Volume (X ₂)(L)	-8,649	-17,298	2,277	-7,595	0,016
	Volume (X₂)(Q)	-10,857	-21,715	2,506	-8,662	0,013
	Tempo (X ₃)(L)	-0,515	-1,031	2,277	-0,452	0,695
	Tempo (X₃)(Q)	-19,174	-38,348	2,506	-15,298	0,004
	X ₁ X ₂	0,982	1,964	2,975	0,660	0,576
	X ₁ X ₃	1,838	3,676	2,975	1,235	0,342
	X ₂ X ₃	-3,396	-6,792	2,975	-2,282	0,149

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t- t de Student, p- nível de significância.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente por ANOVA, utilizando um intervalo de confiança de 95%. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a adequacidade do modelo gerado pelas variáveis significativas. Neste trabalho a análise foi realizada pelo teste estatístico de Fisher para a variância. O valor de F foi obtido da razão entre a média dos quadrados da regressão e a média dos quadrados do resíduo. Este teste indica o significado de cada um dos fatores controlados sobre o modelo testado. Em ambas as análises a ANOVA (Tabela 7) apresenta um coeficiente de correlação (R) elevado, para FA igual a 0,79 e para FS 0,80. O valor do teste $F_{\text{calculado}}$ para a atividade específica da enzima PO de FA foi de 16,85, sendo 5,1 vezes maior que o F_{tabelado} ($p= 0,00007$), enquanto que para FS o $F_{\text{calculado}}$ encontrado foi de 21,14, 6,2 vezes maior que o F_{tabelado} ($p = 0,00003$), portanto estes dados resultam em dois modelos preditivos e significativos. Os valores de R e F mostraram que os modelos das Equações 13 e 14 foram capazes de representar os dados experimentais das variáveis em análise tanto para FA como para FS,

respectivamente. Estes modelos deduzidos permitiram gerar superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 5 e 6.

Tabela 7. ANOVA para a resposta em atividade específica ($U\ mg^{-1}$) para o DCCR 2³ da extração da PO.

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	F _{calculado}
FA	Regressão	4	11508,14	2877,03	16,85
	Resíduo	12	2049,45	170,787	
	Falta de ajuste	10	2014,03		
	Erro puro	2	35,42		
	Total	16	10190,23		
	R ²	0,79		F _{tabelado} = 3,26	
FS	Regressão	3	4864,83	1621,61	21,14
	Resíduo	13	997,21	76,71	
	Falta de ajuste	11	970,92		
	Erro puro	2	26,29		
	Total	16	5114,30		
	R ²	0,80		F _{tabelado} = 3,41	

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados

$$FA (U\ mg^{-1}) = 86,50 - 21,08pH^2 - 8,64V - 10,85V^2 - 19,17t^2 \quad \text{Equação 13}$$

$$FS (U\ mg^{-1}) = 106,07 - 5,20pH - 10,50pH^2 - 15,92V^2 \quad \text{Equação 14}$$

Na Figura 5, a região de maior atividade específica ($U\ mg^{-1}$) da enzima PO de FA está correspondendo ao ponto central avaliado no planejamento. As condições otimizadas mostraram que o volume de tampão fosfato utilizado como solvente extrator foi de 50 mL quando em pH 5 quando utilizado como tempo de extração 60 min. Assim, valores de extremos de pH, volume e tempo avaliados nesse estudo tendem a reduzir a extração de PO. Segundo Srinivas, Barhate e Raghavarao (2002) a PO não é estável em pH abaixo de 4,0, o que também foi verificado nesse trabalho onde a menor recuperação ocorreu na extração realizada a pH 6,0 (SILVA, MARTINS e MILAGRES, 2008).

O pH 5,0 para extração é também relatado com frequência para extração de POs de várias espécies. A presença de proteases e amilases atuantes respectivamente em pH 4 e 6 pode estar relacionada com este comportamento das POs, visto que ambas podem afetar a eficiência delas (SILVA, MARTINS e MILAGRES, 2008).

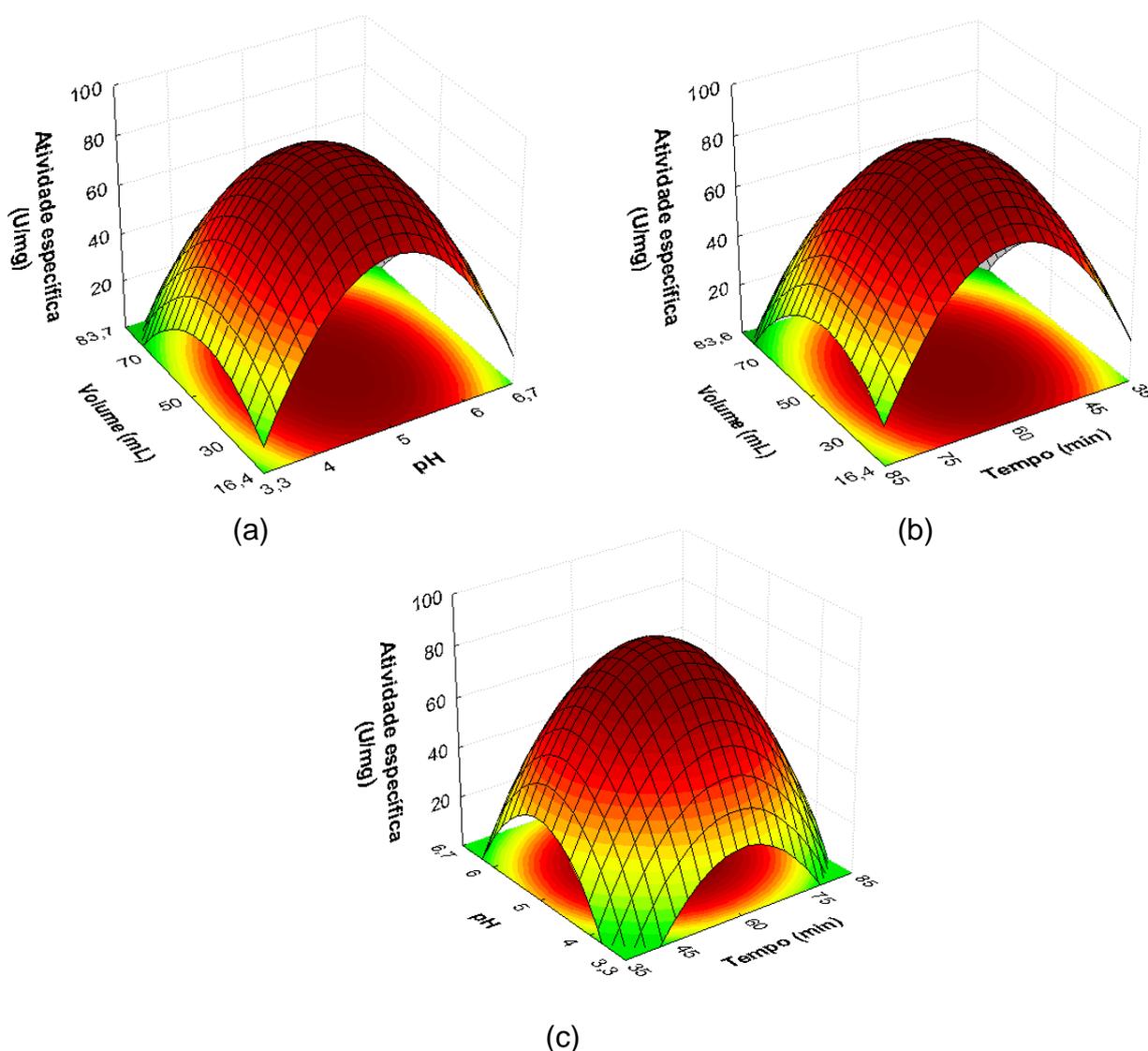


Figura 5. Superfícies de resposta geradas através do planejamento experimental DCCR 2³, para extração da enzima PO de FA.

As mesmas condições definidas pela otimização da extração de PO de FA foram definidas para PO de FS (Figura 6). Os resultados indicam uma maior atividade específica da enzima obtida de FS (U mg^{-1}), chegando a atingir uma atividade duas vezes maior que a detectada para FA. A máxima atividade de PO foi alcançada para um volume de solvente extrator variando entre 40 e 60 mL e um pH entre 4 e 5,5. Esta região permite uma grande flexibilidade para a aplicação da presente enzima, uma vez que as variações ao redor do ponto ótimo não afetam a sua atividade, possibilitando sua aplicação em processos de descontaminação ambiental, como na degradação de corantes têxteis, pesticidas, herbicidas e outros (PATAPAS *et al*, 2007; LI *et al*, 2011; MARCHIS, *et al*, 2011).

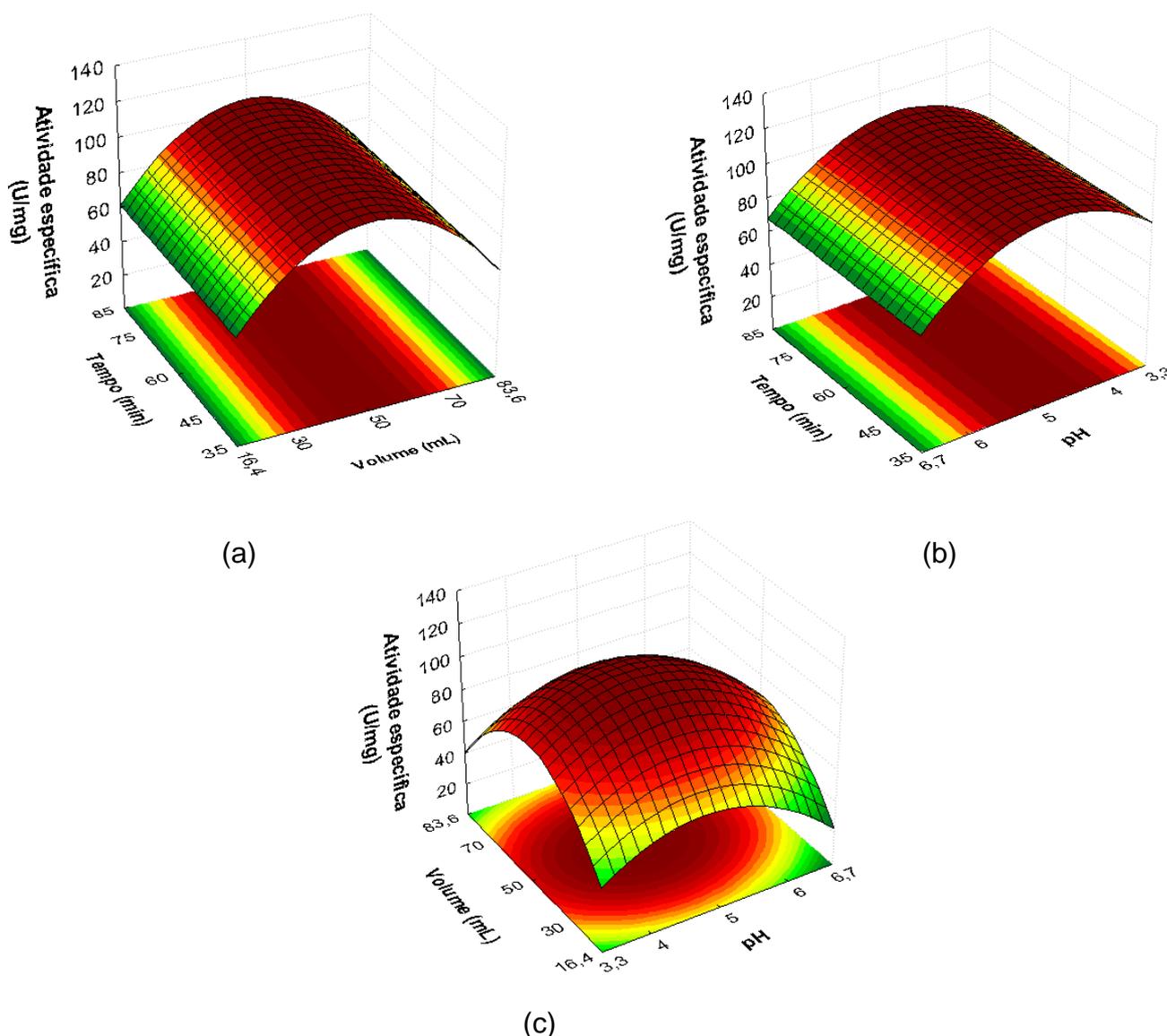


Figura 6. Superfícies de resposta geradas através do planejamento experimental DCCR 2^3 , para extração da enzima PO de FS.

Através da superfície de resposta gerada no modelo da Figura 6, pode-se obter as melhores condições de extração da PO de FS que resultam em maior valor de atividade específica. É possível observar que a maior atividade específica (U mg^{-1}), foi obtida tendo como tempo de agitação 60 min, volume de solvente extrator (tampão fosfato) 50 mL em pH do tampão utilizado como solvente extrator 4,7. Essas condições foram obtidas através da derivada da Equação 14. A partir dessas foi realizado novo experimento a fim de validar o processo de extração, cuja atividade de 100 U mg^{-1} , demonstrando que é possível identificar uma condição ideal de ativação, ao mesmo

tempo garantindo as condições desejadas para obtenção do produto final (RODRIGUES E LEMMA, 2009). Estes dados confirmam assim os resultados experimentais das condições otimizadas com uma variação média de 3%.

Durante a extração é muito importante a avaliação do pH e da força iônica do tampão, para assim conhecer a composição do meio utilizado na extração (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008). Para verificar a influência da força iônica do tampão fosfato utilizado como solvente extrator na atividade específica da enzima PO durante o processo de obtenção enzimática, os dados obtidos dos diferentes experimentos foram analisados por teste de Tuckey e estão expressos na Figura 8, em termos de atividade relativa. Segundo os resultados da Figura 7 (a), se observa uma maior atividade relativa da enzima PO extraída de FA a uma força iônica de $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, na Figura 7 (b) $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ é a força iônica que exerce maior efeito sobre a atividade da enzima PO obtida de FS.

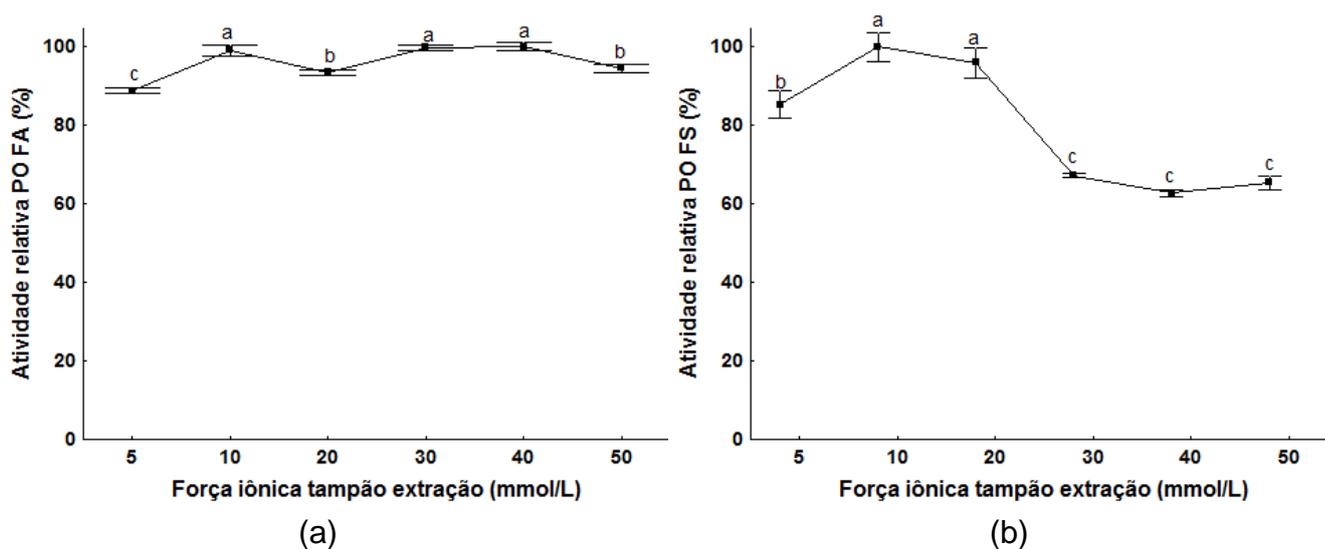


Figura 7. Influência da força iônica (mmol L^{-1}) do tampão fosfato pH 5,5 na extração da enzima PO para FA (a) e pH 5 na extração de FS (b).

A Figura 8 apresenta o efeito dos diferentes sistemas de extração de PO apresentados como atividade relativa, mostrando que quanto mais eficiente a condição extratora, menor foi a atividade específica da PO. O maior efeito das condições testadas foi verificado com o emprego de blender para descompartmentalização dos tecidos, o que reduziu a atividade em até 60% quando comparado a agitação orbital, para as duas fontes. Para FA avaliando estas mesmas

condições, a diminuição da atividade fica em torno de 50%. Esse efeito pode ser explicado pela força do atrito que ocasiona desnaturação da cadeia proteica desprotegida da parede e membrana celular (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

A ação do ultrassom na extração enzimática é utilizada industrialmente em processos de extração, desgaseificação, filtração e oxidação. Ondas ultrassônicas de alta intensidade provocam alterações no sistema como: elevação das temperaturas, pressões e forças de cisalhamento, o que acaba por desnaturar as enzimas (JAMBRACK *et al.*, 2009). Assim como o ultrassom, o blender oferece forças de cisalhamento muito intensas, o que nesse caso pode ter ocasionado a desnaturação das enzimas e assim uma diminuição no rendimento da extração de estruturas ativas. Com isso, a melhor forma de extração para as enzimas obtidas dos dois subprodutos foi por agitação orbital a 100 rpm.

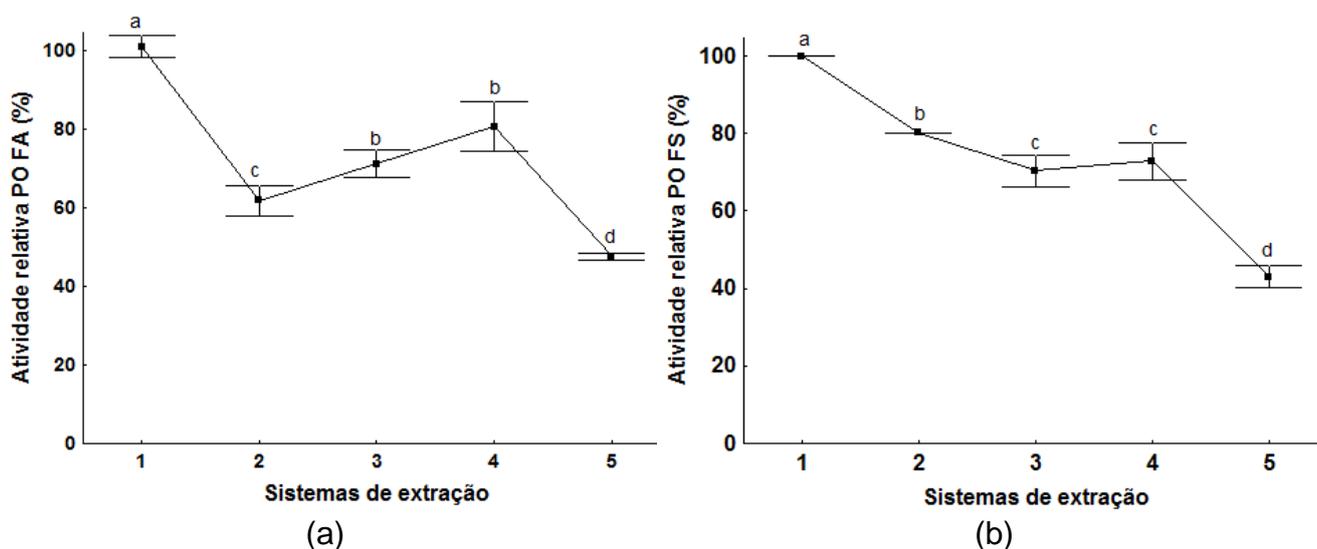


Figura 8. Sistemas de agitação utilizados para extração das POs (a) FA e (b) FS. Onde: agitação orbital (1) 100 rpm, agitação ultrassônica (2) 40 kHz, (3) 37 kHz, (4) 25 kHz e (5) em blender.

5.2.1 Moduladores de atividade enzimática

Nesse estudo se objetivou analisar a tolerância enzimática aos compostos analisados, correlacionando os mesmos com a estrutura e função da enzima, tendo em vista a potencial aplicação em processos químicos industriais (DOUKYU e OGINO,

2010). Os resultados obtidos são expressos em termos de atividade residual (%), conforme Tabela 8.

Tabela 8. Efeito de moduladores na atividade da PO de FA e FS em termos de atividade relativa (%) e RSD (%).

Sais	FA		FS	
	0,1 M	0,2 M	0,1 M	0,2 M
KCl	13,66* (0,3)**	-24,66 (1,1)	-21,08 (3,0)	-14,77 (0,7)
CuSO ₄	-57,26 (0,2)	-87,17 (1,9)	-14,07 (0,5)	-62,27 (1,1)
MnSO ₄	-75,13 (0,5)	-49,41 (0,3)	-81,32 (0,4)	-81,85 (0,0)
MgCl ₂	10,58 (0,7)	22,97 (0,5)	-32,01 (0,4)	-16,74 (1,1)
NaCl	-9,52 (0,5)	26,24 (0,6)	-42,09 (1,8)	9,05 (0,1)
BaCl ₂	-33,81 (1,7)	-3,95 (0,7)	5,92 (4,6)	-34,13 (0,2)
CaCO ₃	-28,83 (2,4)	36,50 (0,2)	-15,44 (0,1)	39,60 (0,2)
FeSO ₄	-93,60 (4,4)	-57,58 (2,1)	-48,39 (4,1)	-67,14 (1,3)
	0,01 M	0,02 M	0,01 M	0,02 M
EDTA	-38,66 (0,5)	-61,27 (2,0)	10,94 (0,7)	-10,68 (0,7)
Solventes	5%	10%	5%	10%
Benzeno	13,66 (0,6)	-50,31 (0,8)	-12,29 (0,4)	-10,00 (1,3)
Metanol	43,66 (0,4)	69,64 (0,5)	-4,59 (0,5)	36,21 (1,2)
Acetona	4,68 (0,5)	-34,75 (0,9)	9,19 (0,2)	21,09 (0,8)
Clorofórmio	-1,43 (0,2)	22,55 (0,9)	22,56 (1,3)	-13,18 (0,7)
Acetonitrila	-7,40 (0,4)	7,63 (0,6)	-4,78 (0,4)	30,20 (3,2)
Detergentes	0,1%	0,5%	0,1%	0,5%
Tween 80	-67,93 (2,1)	-38,68 (2,0)	-0,86 (0,8)	-2,66 (0,4)
SDS	-61,71 (3,0)	-97,49 (0,0)	-24,82 (1,0)	-32,28 (1,3)
Controle	100 (0,2)	100 (0,3)	100 (0,3)	100 (0,8)

A atividade sem a adição de moduladores foi estabelecida como 100%.

*Os dados apresentados são valores médios de triplicatas.**RSD (%).

Sais inorgânicos fornecem um conjunto diverso de pequenas moléculas que se ligam a estrutura das macromoléculas de água, e influenciam na estabilidade e atividade das biomoléculas (SERDAKOWSKI e DORDICK, 2007). Com a adição de íons, oriundos dos sais BaCl₂ e CaCO₃ na maior concentração testada, as atividades da PO de FA e FS foram ligeiramente aumentadas. Efeito positivo também foi observado para KCl e NaCl, no entanto na menor concentração. Segundo Devaiah e Shetty (2009) e Ajila e Rao (2009), os níveis de cálcio em torno da PO são importantes para a atividade da enzima na manutenção da integridade da conformação do sítio ativo.

Quando a concentração de cálcio é baixa, a estrutura terciária da PO se desconfigura em certa medida que a porção heme pode ser facilmente perdida. O SO₂,

por sua vez, apresentou ação inibitória para as enzimas avaliadas, explicado por Vámos-Vigyázó (1981), por estes eliminarem o H_2O_2 , bloqueando a atividade enzimática e mantendo o substrato doador na forma reduzida. O $MgCl_2$ causou um aumento de aproximadamente 23% na atividade da PO de FA. Márquez *et al.* (2008) relataram que alguns íons metálicos apresentaram efeito inibitório, Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} , por exemplo, o que significa que esse efeito depende da estrutura química dos íons metálicos utilizados.

A natureza do solvente orgânico usado pode provocar alterações nas propriedades do meio de reação, por afetar a flexibilidade conformacional deformando a enzima, e altera a solubilidade e a polarização do substrato. Solventes orgânicos podem desnaturar a enzima provavelmente pela ruptura do núcleo hidrofóbico (MANDRICH *et al.*, 2012; SERDAKOWSKI e DORDICK, 2007). Os resultados indicam o benzeno como potencial inibidor da atividade catalítica da PO avaliadas. A acetona e o MeOH apresentam-se como ativadores sendo que o MeOH tem destaque por demonstrar uma ativação de aproximadamente 70% na atividade da PO de FA.

O efeito de detergentes sobre a atividade da PO também foi avaliado. Sua adição em ambas às concentrações na extração resultou em uma perda considerável da atividade, chegando a uma inibição de praticamente 100%. Nos processos de enovelamento, inibidores de agregação, em particular detergentes, muitas vezes inibem as interações intra e extramoleculares das proteínas, por esses agentes ligarem-se fortemente a superfícies hidrofóbicas de intermediários de enovelamento (YAMAMOTO, YAMAGUCHI e NAGAMUNE, 2011).

5.3 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Nesse trabalho, a enzima PO foi obtida de FA e FS e posteriormente purificada utilizando dois métodos de purificação, sendo um deles cromatografia líquida de exclusão molecular e outro por partição trifásica (TPP). Os dois métodos foram estudados para comparar a eficiência deles quanto à preservação da atividade enzimática.

5.3.1 Cromatografia de exclusão molecular

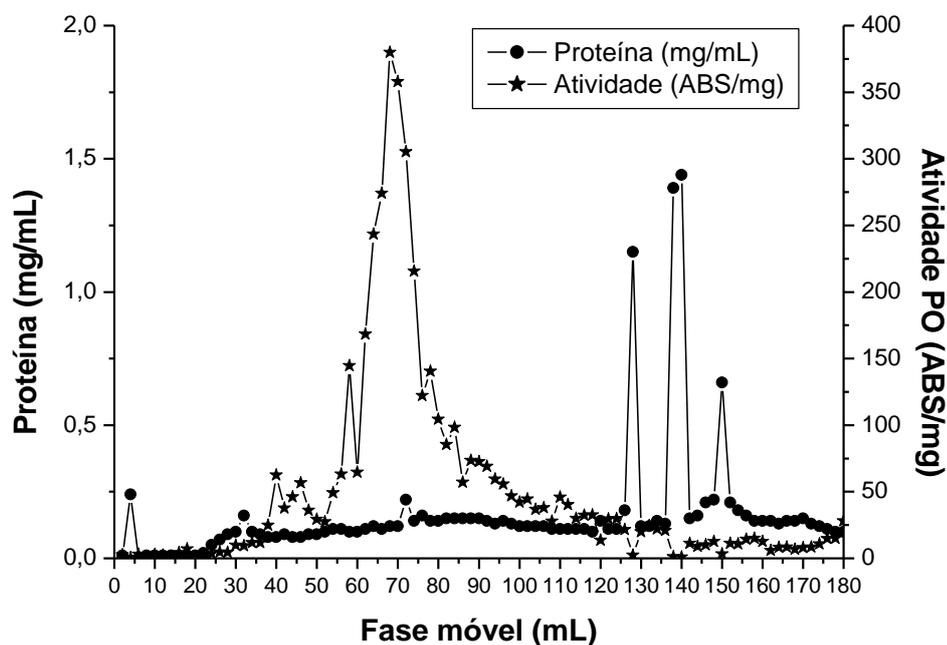
O extrato bruto obtido de ambas as enzimas foi submetido à precipitação com acetona, segundo método proposto por Boer *et al.* (2006), foi adaptado às condições do estudo e do laboratório à temperatura ambiente (25 °C).

Durante a eluição cromatográfica se busca a fração proteica com elevada atividade enzimática, cuja concentração de proteínas seja a menor possível. Na Figura 9 (a) pode-se observar que em um intervalo entre as alíquotas 26 e 44 (56 a 88 mL de fase móvel) encontra-se a maior atividade da PO de FA, assim como entre as alíquotas 25 e 45 (50 a 90 mL de fase móvel) encontra-se a maior atividade da PO de FS, Figura 9 (b). Nos intervalos de maior atividade enzimática, as alíquotas foram recolhidas e reunidas, e nestas a atuação foi determinada por recuperação (REC) e o fator de purificação (FP) (Tabela 9).

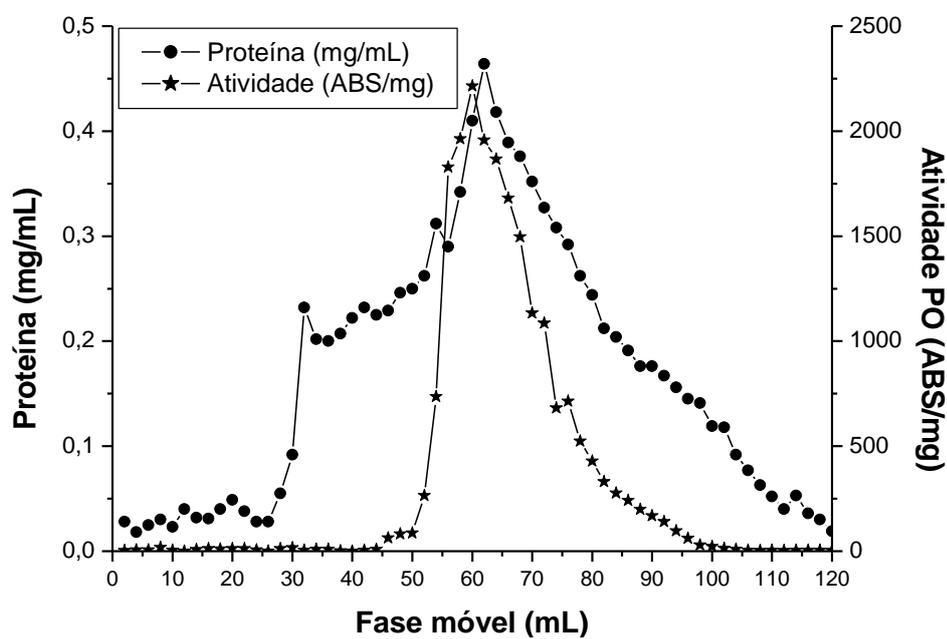
Tabela 9. Purificação de PO obtida de FA e FS.

Fonte	Etapa de purificação	Atividade total (U _t)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	REC (%)	FP
FA	Extrato bruto	51103,00	1475,00	34,65	100	1,00
	Precipitação acetona	14331,70	593,10	24,16	28	0,70
	Sephadex G-100	10446,15	146,15	71,48	20	2,06
FS	Extrato bruto	137731,00	760,00	181,23	100	1,00
	Precipitação acetona	116424,00	198,80	585,63	84	3,23
	Sephadex G-100	27474,34	115,18	238,53	20	1,32

O processo de purificação para a PO de FA não se mostrou eficiente pois o FP na etapa de concentração por adição de acetona foi menor que 1, valor mínimo necessário para que uma etapa de purificação possa ser considerada eficiente. Porém, durante purificação, pode-se observar claramente um pico de máxima atividade da enzima PO o que demonstra a necessidade de aplicar outra estratégia para concentração das proteínas. A exemplo de Ajila e Rao (2009), que empregaram cromatografia DEAE-Sephacel, antecedendo a exclusão molecular, obtendo um FP de 44 e uma REC de 44%.



(a)



(b)

Figura 9. Perfil de eluição obtido a partir de cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, das POs de FA (a) e FS (b).

Um comportamento cromatográfico muito semelhante ao encontrado para PO de FS foi encontrado para a PO obtida de óleo de palma por Deepa e Arumughan (2002),

quando utilizaram três etapas para purificação sendo a última o emprego de cromatografia de exclusão molecular com uma coluna de Sephadex G-100.

Os resultados para as purificações de ambos os extratos, em termos de REC, sugerem que o Sephadex G-100 removeu alguns componentes de baixa massa molecular necessários para a atividade enzimática, assim como mostrado por Mdluli (2005) que encontrou um percentual de recuperação de 25%, para PO de *Sclerocarya birrea* (fruta africana), após 3 etapas de purificação. Manu e Rao (2009) após 4 etapas de purificação alcançaram uma recuperação de 17% de PO obtida de farelo de trigo.

5.3.2 Partição trifásica (TPP)

O método de purificação por partição trifásica foi também estudado para avaliar a possibilidade de aumentar a recuperação enzimática, o FP e também para diminuir o tempo e os custos. Para isto, o extrato enzimático bruto foi submetido à precipitação seletiva das proteínas (em um primeiro estágio) promovida pela adição de sulfato de amônio que permite a estabilização das proteínas por favorecer as interações hidrofóbicas. Em seguida foi adicionado solvente (acetona) para retirar pigmentos, lipídeos e inibidores enzimáticos do extrato, fazendo com que duas fases se formem e a enzima em estudo se concentre em uma interface. A adição da acetona desidrata a fase aquosa aumentando a concentração de sal a tal ponto que a proteína de interesse migre da solução.

No método original foi utilizado t-butanol para desidratar a fase de fundo, mas neste trabalho optou-se por acetona por sua fácil recuperação ao final do processo, e contribui da mesma maneira para a separação proteica que o t-butanol. Os resultados da avaliação do efeito dos parâmetros saturação de sal e proporção de extrato bruto:acetona durante a purificação estão na Tabela 10.

Para purificar a enzima PO geralmente são usadas várias etapas como no estudo de purificação da PO de farelo de trigo por Manu e Rao (2009) que iniciou pela precipitação em diferentes saturações de sulfato de amônio, eluição em coluna dietilaminoetil (DEAE)-celulose, diálise e nova eluição em coluna de carboximetil (CM)-celulose, além da utilização de cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100 para as alíquotas que permaneciam com atividade de PO, portanto 5 etapas. A TPP é um método rápido, barato e eficiente de purificação enzimática, que por suas poucas

etapas diminui o risco de desnaturar o diluira a enzima. Neste caso cabe salientar que ele não tem sido aplicado para PO de FA.

Tabela 10. Efeito da saturação de sulfato de amônio e razão extrato bruto:acetona na purificação da enzima PO obtida de FA e FS.

Saturação de sal (%)	FA		FS	
	FP	REC (%)	FP	REC (%)
20	1,49 (3,1)	48 (2,1)	38,42 (9,6)	96 (0,7)
30	1,79 (9,3)	46 (0,9)	23,62 (2,4)	96 (0,1)
40	1,58 (5,5)	56 (5,3)	13,92 (0,5)	79 (0,3)
50	1,76 (2,9)	67 (6,6)	12,37 (6,2)	101 (1,1)
60	1,15 (6,1)	38 (8,0)	12,22 (6,2)	88 (0,5)
Extrato bruto:acetona	FP	REC (%)	FP	REC (%)
1:0,5	0,43 (4,6)	3 (9,1)	10,49 (4,5)	54 (0,1)
1:1	4,31 (1,1)	38 (6,4)	5,17 (10,3)	35 (0,1)
1:1,5	2,82 (8,3)	49 (0,5)	13,37 (4,6)	50 (0,6)
1:2	5,69 (8,5)	50 (5,6)	8,41 (9,2)	48 (0,2)

Os dados apresentados são valores médios de RSD (%) de triplicatas.

A otimização da saturação do extrato bruto foi conduzida em 2 mL de extrato bruto ao qual era adicionado o gradiente salino para obter o precipitado interfacial onde a enzima seria concentrada. Os resultados (Tabela 10) demonstram a melhor REC da enzima PO de FA a 67% com uma saturação de 50%, e o maior FP, 1,76 como esperado. Os resultados obtidos para a otimização da razão extrato bruto:acetona, demonstram que a proporção 1:2 foi a melhor condição, apresentando os maiores FP e REC, 5,7 e 50%, respectivamente.

Para a PO de FS com 20% de saturação do extrato enzimático foi obtido o maior FP. Porém, 20% de saturação foi insuficiente para formação de um precipitado interfacial consistente, muito embora o objetivo da técnica seja a redução da concentração de proteínas no meio, também ocorreram perdas com relação a recuperação enzimática. Sendo assim, este trabalho utilizou para saturação do meio 30% de sulfato de amônio para purificação de PO de FS. O resultado da otimização da quantidade relativa de acetona, os melhores resultados obtidos estão na razão 1:1,5 extrato bruto:acetona a 30% de saturação com sulfato de amônio, com um FP de 13,37 e REC de 50%.

Singh e Singh (2003) e Narayan, Madhusudhan e Raghavarao (2008) encontraram os melhores resultados, nestas mesmas condições, para purificar a PO de nabo e *Ipomoea palmata*, respectivamente.

Os autores Ozer *et al.* (2012), descrevem em seu estudo a avaliação da melhor faixa de pH ajustadas pela adição de HCl e NaOH. Neste trabalho optou-se por não realizar este estudo tendo em vista que o pH obtido após a adição do sal e da acetona foi 6, que para PO de FS é aquele onde a enzima é mais estável. Para a PO de FA cujo pH de estabilidade é 5, foi avaliada a influência do pH com a adição de HCl até a solução alcançar o pH desejado. Condição que promoveu a diminuição do FP e da REC da PO, o FP de FA de 5,69 diminuiu para 0,13 (1,3), e a REC de 50% para 1% (1,3). Portanto para estas fontes enzimáticas é necessário ajuste do pH nestas etapas.

Para o método de TPP, os passos das purificações estão descritos na Tabela 11. Comparando os dois métodos estudados (Tabela 9 e 11), pode-se considerar que as recuperações por purificação por Sephadex G-100 que obtiveram um máximo de 20% estão abaixo das recuperações encontradas por TPP, 50%, efeito também observado para FP.

Em vista desses resultados, é indicado para trabalhos futuros a realização de uma avaliação mais aprofundada do método de purificação por TPP para a PO, avaliando também o emprego de t-butanol como solvente.

Tabela 11. Etapas de purificação por TPP da PO obtida de FA e FS.

Fonte	Etapa de Purificação	Atividade total (U _t)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	REC (%)	FP
FA	Extrato bruto	785,51	38,60	20,35	100	1,00
	TPP – precipitado interfacial	392,80	3,39	115,79	50	5,69
	TPP – fase aquosa	0,22	2,03	0,11	0,02	0,003
FS	Extrato bruto	2296,01	38,66	59,39	100	1,00
	TPP – precipitado interfacial	1148,25	1,44	794,04	50	13,61
	TPP – fase aquosa	0,052	1,63	0,32	0,004	0,001

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

5.4.1 Tempo ótimo de reação

No caso da PO de FA o tempo ótimo de reação encontrado foi de 5 min para os extratos bruto e purificado por TPP, para a PO de FS os tempos ótimos de reação foram em 10 e 5 min de reação, respectivamente para os extratos bruto e purificado, demonstrada na Figura 10.

Na literatura, tempos reduzidos de reação equivalentes aos determinados nesse trabalho são relatados por: Dalal e Gupta (2010) que definiram como condição de reação um tempo de reação de 10 min, para uma PO extraída de *Brassica rapa*, e ação da enzima PO de batata doce foi medida após 1 min de reação por Zeraik, Souza e Fatibello-Filho (2008); Srinivas, Rashmi e Raghavarao (1999), utilizaram um tempo de reação de 3 min para a enzima PO obtida de tamareira, tempo esse também utilizado por Al-Senaidy e Ismael (2011) para PO de *Phoenix dactylifera*.

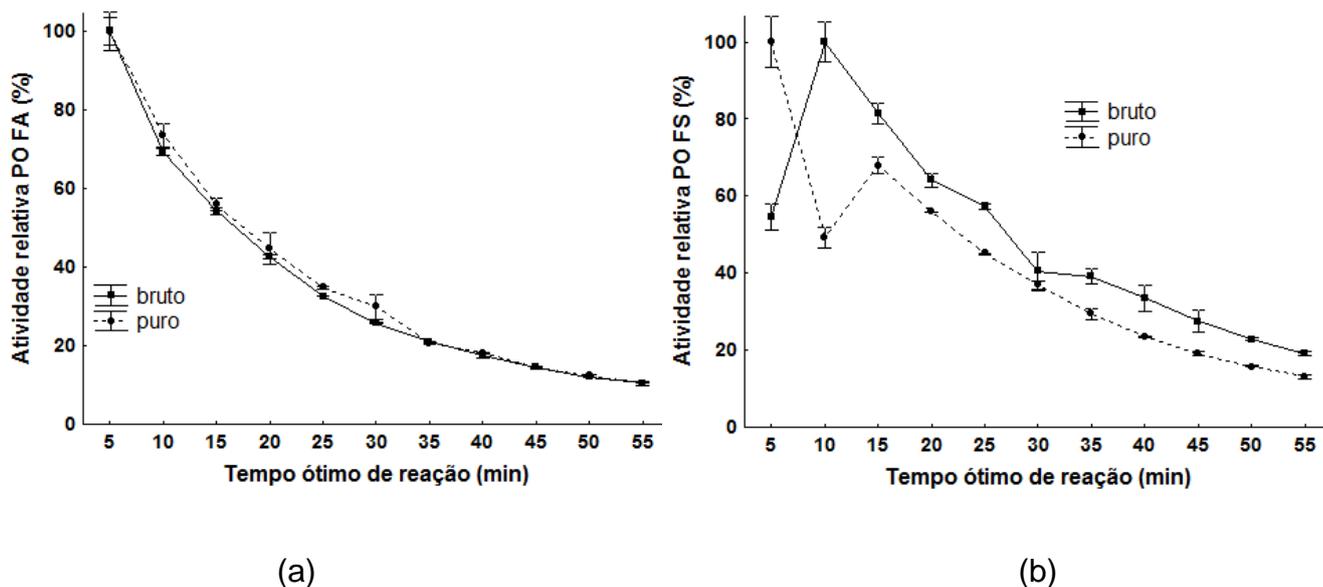


Figura 10. Perfil do efeito do tempo (min) na reação da atividade da enzima PO de FA (a) e PO de FS (b), em pH 6 a 30 °C.

5.4.2 Temperatura ótima da enzima

Este estudo foi realizado após a avaliação do tempo ótimo de reação, pois a temperatura ótima de reação é fortemente dependente do tempo de reação. A

temperatura pode acarretar efeitos antagônicos na atividade enzimática, bem como aumentando a reatividade do complexo ES (enzima + substrato), aumentando a velocidade de inativação através de alterações na forma tridimensional do sítio ativo da enzima (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

Com isso temperaturas que se encontram abaixo ou acima do ótimo de ação enzimática acabam por desnaturar a enzima ou diminuir a velocidade de reação. A PO de FA demonstrou o perfil apresentado na Figura 11 (a), onde a temperatura ótima de atividade foi de 25 °C para enzima no extrato bruto e 10 °C para PO no extrato purificado por TPP. De acordo com Cai *et al.* (2012), a temperatura de reação em 25 °C é encontrada em muitas fontes de PO, e é interessante para aplicação da enzima em processos industriais e biomédicos. A PO de FS, mostrou que na temperatura ótima, 35 e 30 °C para os extratos bruto e purificado respectivamente, ocorria a diminuição da atividade, prevalecendo à desnaturação, que ocorre pelo desdobramento da estrutura quaternária e terciária, conforme demonstra Figura 11 (b).

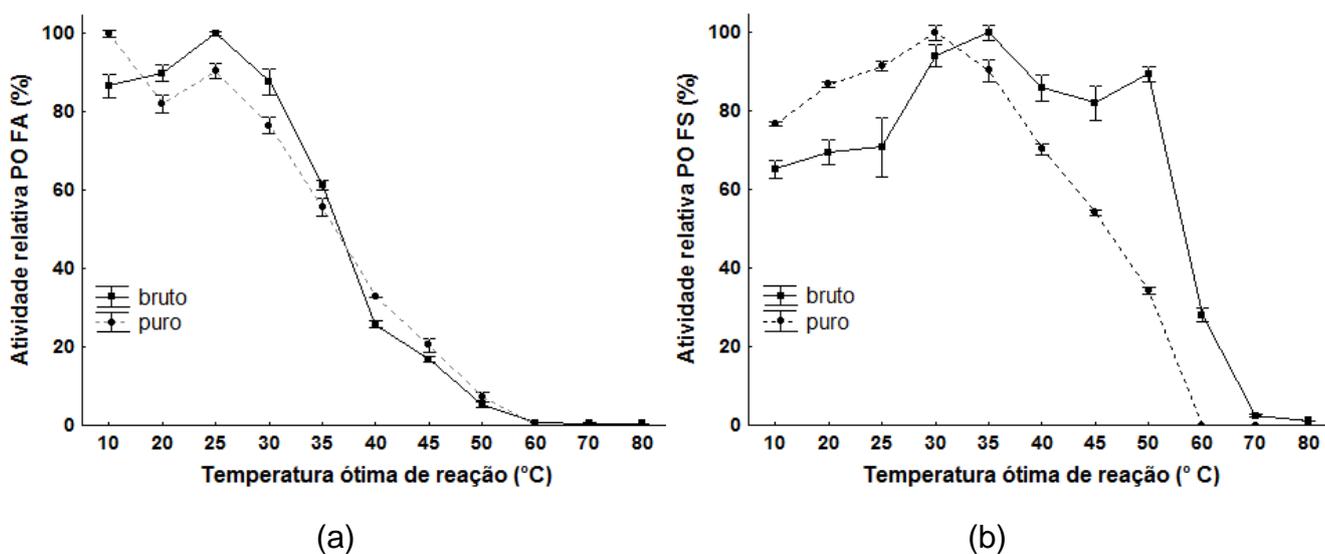


Figura 11. Perfil do efeito da temperatura (°C) na reação da enzima PO de FA (a) e PO de FS (b), em pH 6.

5.4.3 pH ótimo de reação

O pH ótimo de reação definido tanto na forma bruta como na forma purificada por TPP, para FA foi o pH 5,5, e para FS de 5, resultados estes apresentados na Figura 12 (a) e (b), respectivamente. A literatura, menciona que a PO de fontes vegetais apresentam maior atividade em condições de pH ácido, como neste trabalho (CAI *et al.*, 2011, REGALADO, GARCÍA-ALMENDÁREZ e DUARTE-VÁZQUEZ, 2004; CARDINALI *et al.*, 2011). Segundo Mohamed *et al.* (2011), a faixa de pH ácida como definida neste trabalho potencializa a PO, como candidata para aplicação em processos de descontaminação ambiental, no entanto para Ajila e Rao (2009), a faixa de atuação está dentro da abrangência encontrada para HRP (4,6 a 5,8).

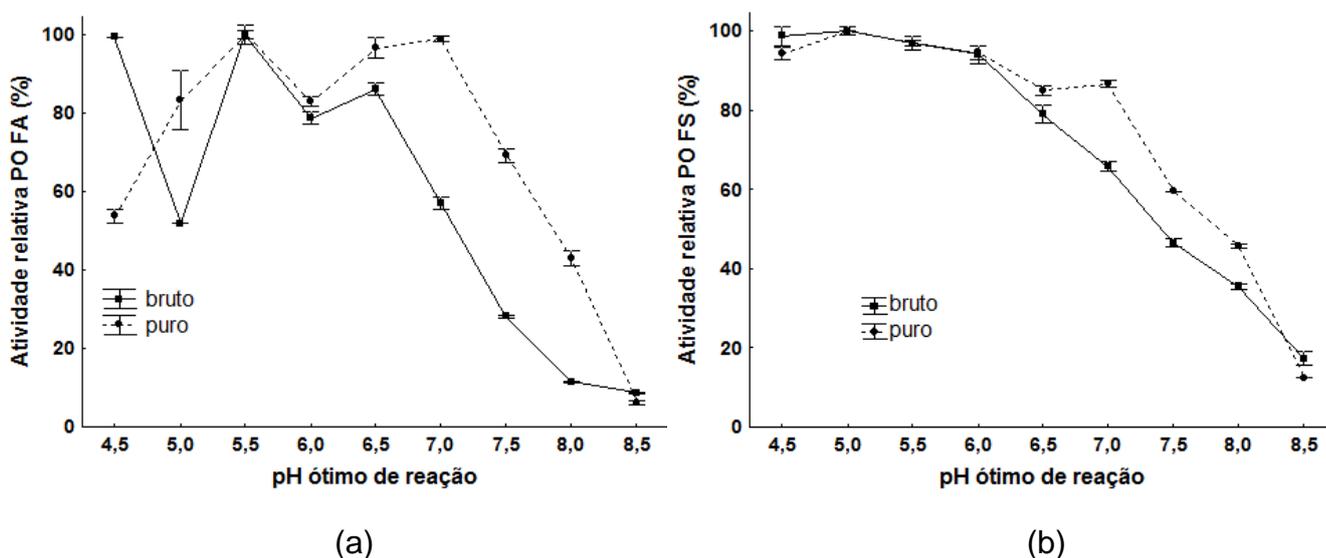


Figura 12. Perfil do efeito do pH do tampão fosfato utilizado na reação da enzima PO FA (a) e PO FS e (b).

5.4.4 Força iônica do tampão de reação

Assim como o pH do tampão utilizado na reação enzimática, a sua força iônica exerce grande efeito sobre a atividade enzimática. A força iônica encontrada para ambas enzimas foi a mesma, 5 mmol L^{-1} , tanto na forma bruta como purificada por TPP, conforme demonstra a Figura 13 (a) e (b).

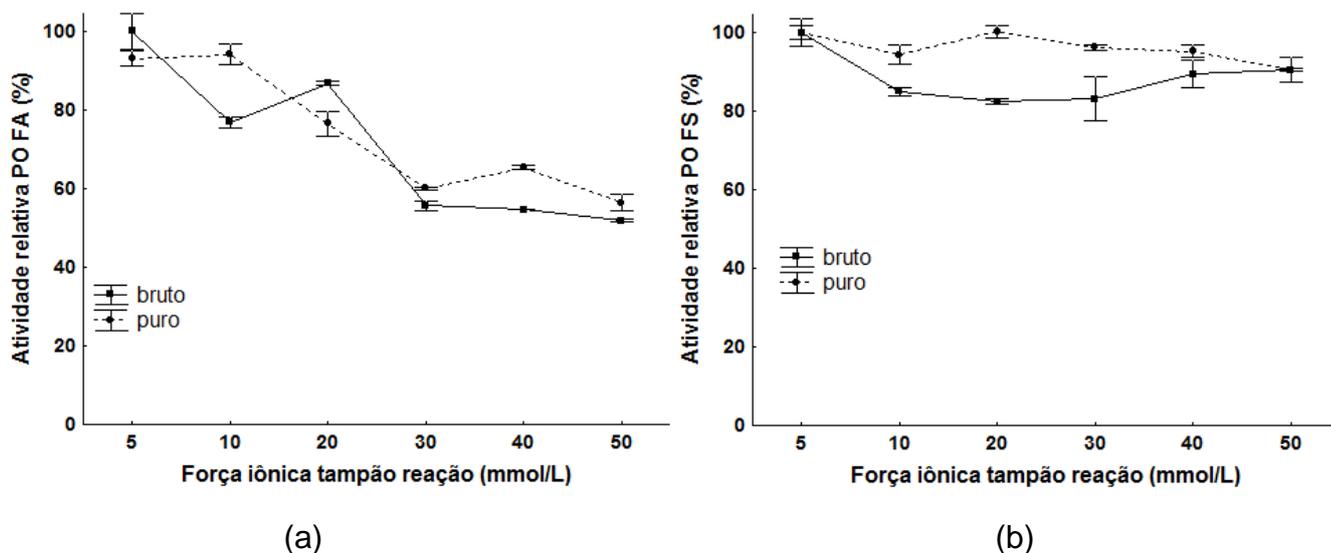


Figura 13. Efeito da força iônica (mmol L^{-1}) do tampão fosfato de reação da enzima PO de FA (a) e PO de FS.

5.4.5 Parâmetros cinéticos

Para cada enzima há um substrato natural específico, que apresenta maior afinidade (menor K_M). Estão disponíveis para avaliação da atividade enzimática substratos sintéticos baseados na especificidade das enzimas (COELHO, SALDADO e RIBEIRO, 2008), que no caso da PO pode ser guaacol que é oxidado por ela a tetraguaiacol em presença de H_2O_2 (Figura 14).

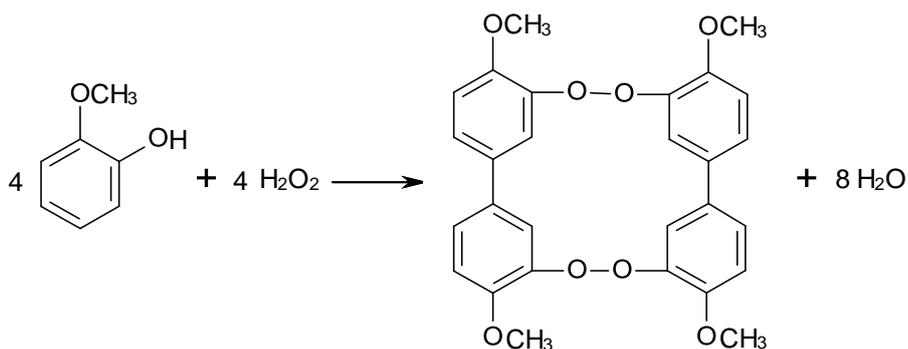


Figura 14. Reação de formação do composto oxidado tetraguaiacol.

A determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{\text{máx}}$ foi realizada para a PO de FA e FS, ambas nas formas bruta e purificada, nas condições ótimas de reação. Os resultados foram obtidos através da linearização dos resultados pelo método gráfico de

Lineweaver-Burk, que emprega o inverso da concentração inicial de substrato *versus* o inverso da atividade enzimática, conforme Apêndice 1.

Os valores encontrados para K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da PO em estudo, estão na Tabela 12, sendo que o K_M na forma bruta não diferiu significativamente da purificada. A $V_{m\acute{a}x}$ encontrada para PO de FA foi aproximadamente 3,6 vezes maior que para FS, este resultado demonstra que a PO de FA possui uma maior velocidade ao consumir seu substrato, aumentando assim a velocidade com que ocorre a reação.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos da PO de FA e FS.

PO	FA		FS	
	Bruto	Puro	Bruto	Puro
K_M (mmol L ⁻¹)	0,15	0,06	0,17	0,05
$V_{m\acute{a}x}$ (U mg ⁻¹)	769,23	666,66	196,07	181,81

Estes resultados demonstram que as enzimas obtidas dos subprodutos nesse estudo, tem alta possibilidade de emprego em processos de descontaminação ambiental, visto que o K_M encontrado nesse estudo é inferior ao encontrado na literatura, que varia entre 0,28 e 18,5 mmol L⁻¹ (SUZUKI *et al.*, 2006; SRINIVAS, BARHATE e RAGHARAVAO, 2002). Singh *et al.* (2012), relatam que a PO extraída de arroz apresentou K_M de 5,58, este mesmo valor foi encontrado por Ichi *et al.*(2008) com a enzima extraída de *Allium sativum* (bulbo de alho). Araújo *et al.* (2004), avaliaram a extração de POs de três fontes, *Daucuscarota*, *Ipomoea batatas* e *Solanum aviculare*, estas apresentaram K_M de 1,2; 1,7 e 1,9 mmol L⁻¹, respectivamente.

5.4.6 Estabilidade da enzima

A estabilidade estrutural da enzima responde a fatores tais como forças físicas resultantes de interações que ocorrem dependendo da disposição e orientação dos grupos funcionais da molécula. Distante das faixas adequadas de pH e temperatura a enzima tende a perder sua atividade catalítica e suas funções, tornando-se inativa. Dados referentes à estabilidade enzimática são de extrema importância para o processo de purificação, visto que estes acabam por aumentar a eficiência do método utilizado, bem como para a aplicação industrial da enzima.

O pH afeta o estado de ionização das cadeias de aminoácidos ou a ionização do substrato. Sendo o pH de estabilidade enzimática para o extrato bruto da PO de FA foi

5 com uma diminuição da atividade de cerca de 40% após os 39 dias de estudo, conforme Figura 15 (a). Para FS a maior estabilidade foi em pH 6 demonstrando uma diminuição da atividade em torno de 35% após os 42 dias de estudo conforme a Figura 15 (b), a PO de FS demonstrou não ser resistente a incubação a pH ácido como 5 e 5,5, sendo que a atividade apresentou uma redução maior que 90% após 30 dias de estudo.

Ito *et al.* (1991), ao avaliarem a estabilidade da enzima PO extraída de arroz, também observaram que a mesma possuía maior estabilidade em pH 5. O mesmo valor de pH de estabilidade, 6, encontrado para PO de FS foi encontrada por Singh e Singh (2003) em PO extraída de nabo, e também Fodil *et al.* (2011) em PO obtida de *Streptomyces sp.* AM2.

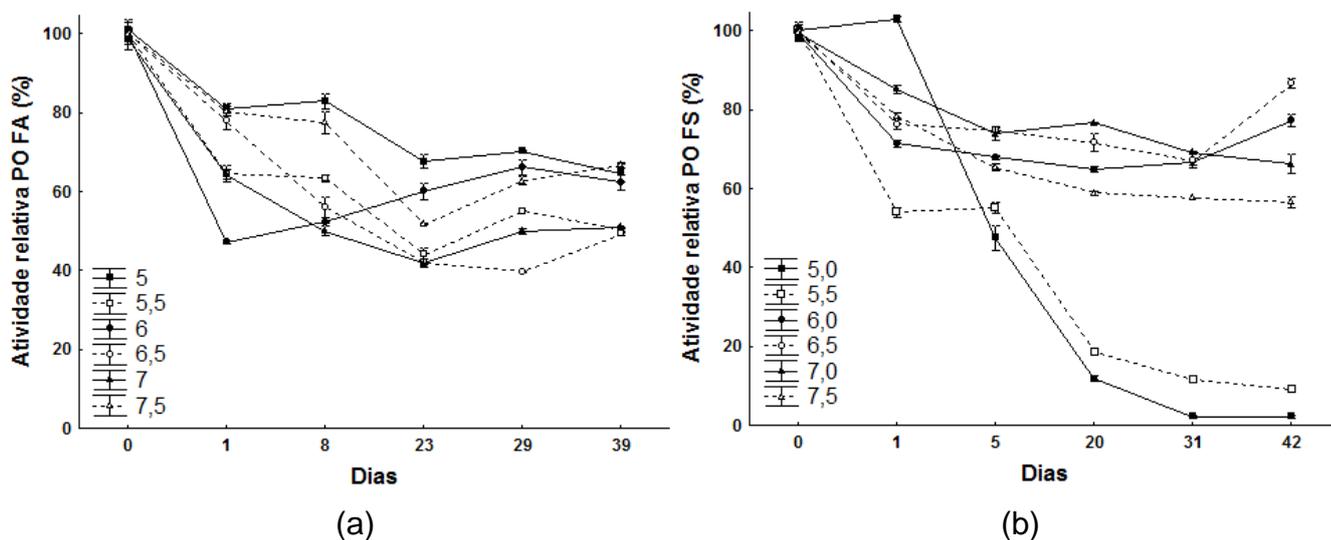


Figura 15. Estabilidade em pH da enzima PO de FA (a) e PO de FS (b) incubadas em diferentes pH a temperatura de refrigeração (10 °C).

A temperatura de armazenamento da enzima tem destaque em vista que este é um fator determinante para a manutenção de sua atividade catalítica, sendo um potencial agente desnaturante (FRANÇA-SANTOS *et al.*, 2009).

A velocidade de desnaturação usualmente é considerada como sendo de primeira ordem em relação à concentração de enzima, conforme a lei de Arrhenius (SAID e PIETRO, 2004). Com isso, para cada temperatura avaliada foi construído o gráfico de $\ln/[A]$ (V/V_0) em função do tempo, para obtenção do K_d , estes gráficos encontram-se no

Apêndice 2. Os valores dos coeficientes angulares encontrados correspondem ao valor da constante de desnaturação térmica (K_d).

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 13, 14, 15 e 16), foi observado que a atividade enzimática da PO obtida de FA e FS nas formas bruta e purificada tornou-se mais estável quando armazenada a baixas temperaturas. Os extratos foram armazenados em pH 6, visto que ambas enzimas apresentam estabilidade frente a este pH. Na temperatura de 0 °C, a PO de FA e FS em extrato bruto apresentaram um tempo de meia-vida em meio reacional de 12 e 144 dias, respectivamente. O menor tempo de meia-vida foi da PO obtida de FA, podendo estar relacionado à presença de proteases no extrato bruto, atuando na hidrólise e degradando-as. No extrato purificado da PO de FS, foi observado um tempo de meia-vida de 72 dias na mesma temperatura, que ao contrário do encontrado para PO de FA, aumentou sua estabilidade após purificação, apresentando um tempo de meia-vida de 48 dias. Estes dados comprovam a necessidade de purificação de PO de extratos proteicos quando obtido de FA, com um aumento do tempo de meia-vida em 4 vezes.

Tabela 13. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FA na forma bruta.

Temperatura (°C)	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da PO bruta de FA							
	K_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	D (min)	z (°C)	Ed (Kcal mol^{-1})	ΔG (KJ mol^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS (KJ mol^{-1})
0	0,002	288,81	959,41			98,99	73,40	-0,094
10	0,003	231,04	767,53			102,18	73,32	-0,102
25	0,006	119,50	397,00			106,08	73,19	-0,110
40	0,029	23,90	79,40			107,36	73,07	-0,110
50	0,119	5,84	19,43			107,09	72,98	-0,106
60	0,396	1,75	5,81			107,15	72,90	-0,103
70	0,999	0,69	2,30			107,81	72,82	-0,102
80	3,700	0,18	0,62			107,19	72,73	-0,098
100	10,443	0,06	0,22			110,21	72,57	-0,101
110	12,285	0,05	0,18			112,73	72,48	-0,105
120	18,036	0,03	0,12			114,50	72,40	-0,107
				0,037	75,66			

Tabela 14. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FA na forma purificada.

Temperatura (°C)	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da PO purificada de FA							
	Kd (min ⁻¹)	t1/2 (h)	D (min)	z (°C)	Ed (Kcal mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (KJ mol ⁻¹)
0	0,0006	1155,25	3837,67			102,14	81,55	-0,075
10	0,002	346,57	1151,30			103,13	81,47	-0,077
25	0,048	14,44	47,97			102,87	81,30	-0,071
40	0,1302	5,32	17,69			106,84	81,13	-0,080
50	0,3839	1,81	6,00			107,23	81,05	-0,079
60	2,4172	0,29	0,95			105,29	80,97	-0,071
70	6,8061	0,10	0,34			105,40	80,88	-0,069
80	13,854	0,05	0,17			106,32	80,80	-0,070
100	14,211	0,05	0,16			109,25	80,72	-0,076
110	17,397	0,04	0,13			111,62	80,63	-0,081
120	25,052	0,03	0,09			113,43	80,55	-0,084
				0,042	83,72			

Tabela 15. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FS na forma bruta.

Temperatura (°C)	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da PO bruta de FS							
	Kd (min ⁻¹)	t1/2 (h)	D (min)	z (°C)	Ed (Kcal mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (KJ mol ⁻¹)
0	0,0002	3465,7	11513,00			104,63	77,79	-382,78
10	0,001	693,14	2302,60			105,14	77,70	-369,73
25	0,0019	364,81	1211,89			108,84	77,58	-364,81
40	0,0032	216,60	719,56			113,09	77,46	-360,90
50	0,0189	36,67	121,83			112,02	77,37	-346,40
60	0,2431	2,85	9,47			108,49	77,29	-325,43
70	0,4984	1,39	4,62			109,79	77,21	-319,71
80	0,4978	1,39	4,62			113,07	77,12	-319,97
100	2,8836	0,24	0,79			114,20	76,96	-305,83
110	3,7191	0,18	0,61			116,53	76,87	-303,94
120	4,0763	0,17	0,56			119,36	76,79	-303,40
				0,040	80,06			

Tabela 16. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de estabilidade térmica da PO de FS na forma purificada.

Temperatura (°C)	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da PO purificada de FS							
	Kd (min ⁻¹)	t1/2 (h)	D (min)	z (°C)	Ed (Kcal mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (KJ mol ⁻¹)
0	0,0004	1732,86	5756,50			104,63	81,45	-382,78
10	0,0016	433,21	1439,12			108,46	81,37	-382,79
30	0,0017	407,73	1354,47			116,12	81,20	-382,81
40	0,0036	192,54	639,61			119,95	81,12	-382,81
50	0,0042	165,03	548,23			123,79	81,03	-382,82
60	0,0191	36,29	120,55			127,62	80,95	-382,83
80	0,0979	7,08	23,51			135,28	80,78	-382,84
90	1,9016	0,36	1,21			139,11	80,70	-382,85
100	4,6919	0,14	0,49			142,94	80,62	-382,86
110	19,336	0,03	0,11			146,77	80,53	-382,86
120	31,681	0,02	0,07			150,60	80,45	-382,87
				0,045	83,72			

Para obtenção da energia de desativação da reação de desnaturação (E_d), foi realizada a linearização da equação de Arrhenius, conforme Apêndice 3, onde o coeficiente angular corresponde a E_d/R .

Altas temperaturas aumentam a velocidade de inativação da enzima e diminuem seu tempo de meia-vida, assim como o valor de D (BALSAN *et al.*, 2012). O valor de D representa a resistência a uma determinada temperatura, enquanto o valor de z representa a dependência da mudança de temperatura para a desnaturação do fator termodegradável (HEIDTMANN *et al.*, 2012). Com os valores D determinados pode-se verificar a maior estabilidade da PO a 0 °C, ou seja, a temperaturas mais baixas, como no caso da PO na forma bruta de FS que apresentou um D de 11513,00 min. O baixo valor de z de 0,04 °C, indica que uma pequena variação na temperatura pode afetar fortemente a estabilidade enzimática, já que uma pequena variação no valor de z, resulta em uma alteração no valor de D em um ciclo logarítmico.

As energias de desativação de reação encontradas para a PO de FA nas formas bruta e purificada foram 75,66 e 83,72 Kcal mol⁻¹, respectivamente, enquanto que para PO de FS estas foram de 80,06 e 83,72 Kcal mol⁻¹, para as formas bruta e purificada. A PO a partir de FS apresentou maior E_d para ambas as formas estudadas em relação à PO de FA. Portanto, uma elevação na temperatura causa uma maior velocidade de

desnaturação para a PO de FS e na PO na forma purificada de FA o que é confirmado em comparação ao tempo de meia-vida encontrado para as enzimas em estudo.

Para melhor compreensão do mecanismo de desnaturação da PO obtida de FA e FS nas formas brutas e purificadas, foram avaliados os parâmetros termodinâmicos. Segundo Ortega *et al.* (2004), parâmetros como ΔH^* e ΔS^* , demonstram o número de ligações não covalentes quebradas e as mudanças na desordem enzima/solvente associada com a formação do estado de transição. De acordo com as Tabelas 13, 14, 15 e 16, os valores de ΔS^* encontrados são negativos, o que sugere que a desordem foi significativa não havendo nenhuma alteração na estrutura terciária das enzimas (USTOK *et al.*, 2010). Os valores de ΔH^* encontrados variaram entre 72,40 e 81,55 KJ mol⁻¹ para a PO de FA e entre 76,79 e 81,45 KJ mol⁻¹ para a obtida de FS. Isto indica uma baixa desnaturação térmica das enzimas, porém também apresenta uma maior estabilidade às temperaturas, principalmente apresentada na PO de FS na forma bruta.

Em termos de estabilidade térmica o parâmetro de maior confiabilidade, para avaliação é a energia livre de Gibbs (ΔG^*) (SAQIB *et al.*, 2010). A obtenção de um valor negativo ou pequeno indica que a reação favorece a desnaturação térmica. Os valores encontrados neste trabalho variam entre 98,99 e 114,50 KJ mol⁻¹ para a PO de FA e entre 104,63 a 150,60 KJ mol⁻¹ para a PO de FS em ambas as formas avaliadas, o que confirma a alta estabilidade dessa enzima.

5.4.7 Determinação da massa molecular

A determinação da massa molecular das POs de FA e FS empregando SDS-PAGE, mostrou mais de uma banda de massa molecular que indica de subunidades enzimáticas, formadas por desnaturação ou a presença de isoenzimas no extrato enzimático. A massa molecular da PO comercial HRP, 44 kDa, encontrada comercialmente na forma liofilizada também foi utilizada como forma de comparação da massa molecular. As presenças, de demais bandas eletroforéticas, evidenciam a necessidade da avaliação de um método de purificação que tornem a PO mais pura, para atender algum outro tipo de aplicação dele.

As massas moleculares da enzima de FA e FS foram identificadas por medidas manuais para o cálculo do fator de retenção entre migração total das proteínas pela

distância percorrida pela enzima no gel (Rf), com estes valores foram construídas curvas analíticas, conforme mostrado na Figura 16.

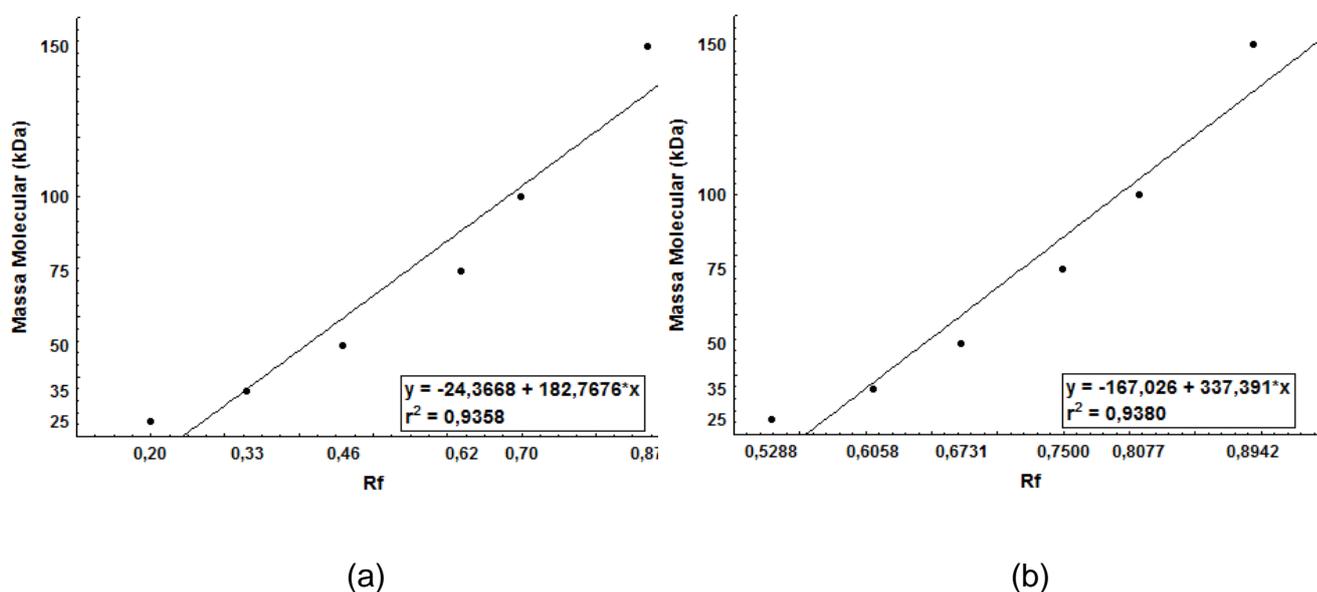


Figura 16. Curvas de correlação entre a Massa Molecular (kDa) e o fator de retenção no gel SDS-PAGE, para padrão de marcador molecular para FA (a) e FS (b).

Com isso, foi possível estimar a massa molecular nas faixas de migração encontradas nos géis, as curvas apresentaram linearidade dentro da faixa propostas pelo INMETRO, sendo aceito um valor de r^2 acima de 0,90 (RIBANI, 2004). A massa molecular encontrada para a PO de FA foi de 41 kDa e para a PO de FS foi de 34 kDa, estas massas moleculares estão dentro da faixa de massas das peroxidases de plantas que varia entre 30 e 60 kDa (CIJZEN, HUYSTEE e BUZZELL, 1993). A banda correspondente a migração da enzima PO nos géis foi estabelecida tomando em conta a recuperação e o fator de purificação enzimática e dados da literatura que apontam a massa molecular das fontes enzimáticas (ITO *et al.*, 1991; CIJZEN, HUYSTEE e BUZZELL, 1993; SOUZA, 2001).

Embora essas massas moleculares tenham sido determinadas como sendo a enzima PO, se observa na Figura 17 a presença de isoenzimas ou contaminantes com massas moleculares de 9 e 97 kDa, assim como na Figura 18 que apresentam contaminantes em aproximadamente 11 e 86 kDa.

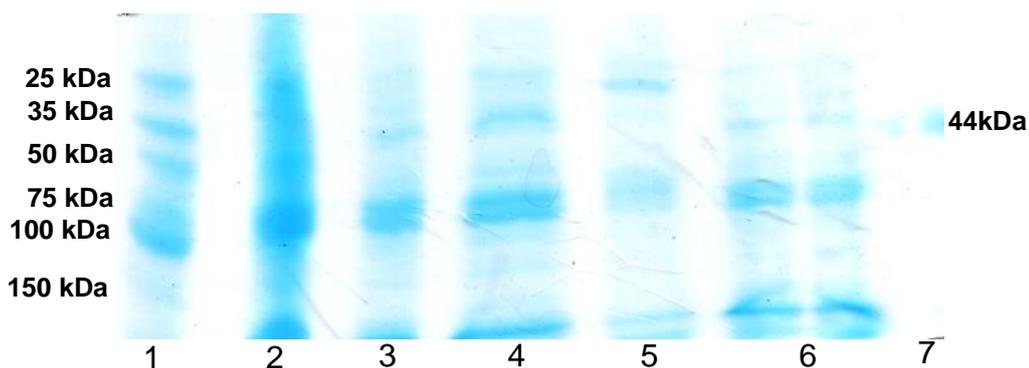


Figura 17. Perfil eletroforético do extrato proteico para PO de FA, realizado em amostras em condições de desnaturação e *in natura*. Onde: (1) padrão de massa molecular, (2) extrato bruto *in natura*, (3) extrato bruto desnaturado, (4) extrato bruto precipitado com acetona, (5) extrato purificado por Sephadex G-100, (6) extrato purificado por TPP e (7) padrão de HRP 44 kD.

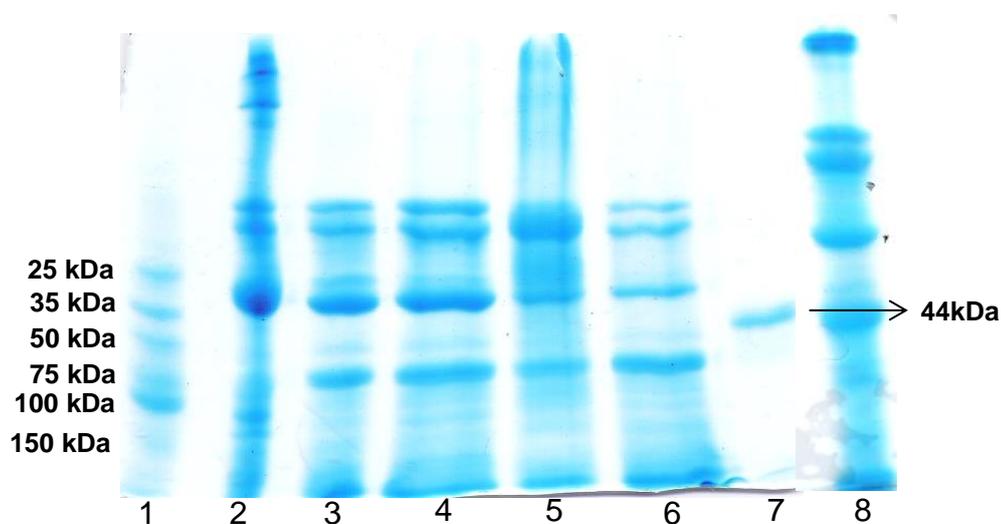


Figura 18. Perfil eletroforético do extrato proteico para PO de FS, realizado em amostras em condições de desnaturação e *in natura*. Onde: (1) padrão de massa molecular, (2) extrato bruto *in natura*, (3) extrato bruto desnaturado, (4) extrato bruto precipitado com acetona, (5) extrato purificado por Sephadex G-100, (6) extrato purificado por TPP, (7) padrão de HRP 44 kDa e (8) extrato purificado *in natura*.

Na Figura 18, além do perfil eletroforético, também está presente uma corrida eletroforética (8) que representa o extrato purificado por TPP *in natura*, mostrando a

presença de uma banda no início da migração proteica não observada após a etapa de desnaturação. A presença dessa banda somente é observada nos extratos *in natura*, assim como uma banda de 112 kDa.

5.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL

5.5.1 Condições cromatográficas otimizadas para separação e determinação de Deoxinivalenol e Deepoxi-Deoxinivalenol em HPLC-UV, HPLC-DAD e LC-MS/MS

Com o intuito inicial de avaliar a degradação de DON por ação da PO, por HPLC-UV, investigando a ação de cada componente do meio reacional enzimático (guaiacol e H_2O_2) no processo de degradação, foi desenvolvido um método analítico utilizando tampão fosfato como integrante da FM. Para melhorar a separação das micotoxinas DON e De-DON, foram estudadas diferentes proporções dos solventes da fase móvel (FM), descritos na Tabela 17, avaliando parâmetros como: fator de retenção e fator de separação, indicando assim a seletividade do método cromatográfico para os dois compostos que eluem na coluna em tempos de retenção diferentes.

A separação cromatográfica efetuada na coluna Ascentis C18 – 3 μ m, 150 x 4,6 mm, utilizando como solventes H_2O :ACN:tampão fosfato, com eluição no modo isocrático e um fluxo programado para 0,6 mL min^{-1} , utilizando uma mistura dos dois padrões nas concentrações de 1,5 e 1,75 μ g mL^{-1} , respectivamente para DON e De-DON, obteve como melhor resultado o teste 3.

Tabela 17. Testes realizados para melhor separação de DON e De-DON.

Coluna	Teste	Composição da FM H_2O :ACN:TF	Vazão da FM ($mL\ min^{-1}$)	t_R (min)		k		A
				DON	De-DON	DON	De-DON	DON/De-DON
Ascentis C-18	1	85:5:10	0,6	2,1	2,4	0,16	0,33	2,06
	2	80:10:10	0,6	3,1	5,6	0,55	1,80	3,20
	3	85:10:5	0,6	4,8	8,1	1,40	3,05	2,20
		H_2O :ACN:MeO						
Gemini C-18	4	30:70:0	0,5	5,3	5,5	0,12	0,17	1,41
	5	20:80:0	0,5	5,4	5,5	0,14	0,17	1,21
	6	20:75:5	0,5	5,4	5,6	0,22	0,27	1,22
	7	30:70:0	0,3	8,7	9,1	0,24	0,30	1,25
	8	30:70:0	0,2	13,1	13,6	0,19	0,23	1,21
	9	25:75:0	0,2	13,2	13,4	0,20	0,21	1,05

Este resultado se deve ao maior fator de retenção para o primeiro composto eluído (DON), permitindo uma melhor separação dos interferentes que na maioria dos sistemas eluem no início da corrida cromatográfica de 12 min, com um volume de injeção de 20 μ L. Na Figura 19 estão apresentados os cromatogramas dos diferentes testes (1), (2) e (3) realizados utilizando a coluna Ascentis C18 – 3 μ m, 150 mm x 4,6 mm.

Os parâmetros das curvas analíticas e dos parâmetros de validação estão apresentados na Tabela 18. As determinações em HPLC-DAD, não foram possíveis pois a repetibilidade dos tempos de retenção dos compostos DON e De-DON apresentaram um coeficiente de variação de 31,2% e 40,6%, respectivamente. A oscilação ocorreu em todos os intervalos em que foi interrompido a eluição da fase móvel de 8 a 12 h, conforme demonstrado na Figura 20 (1) e (2).

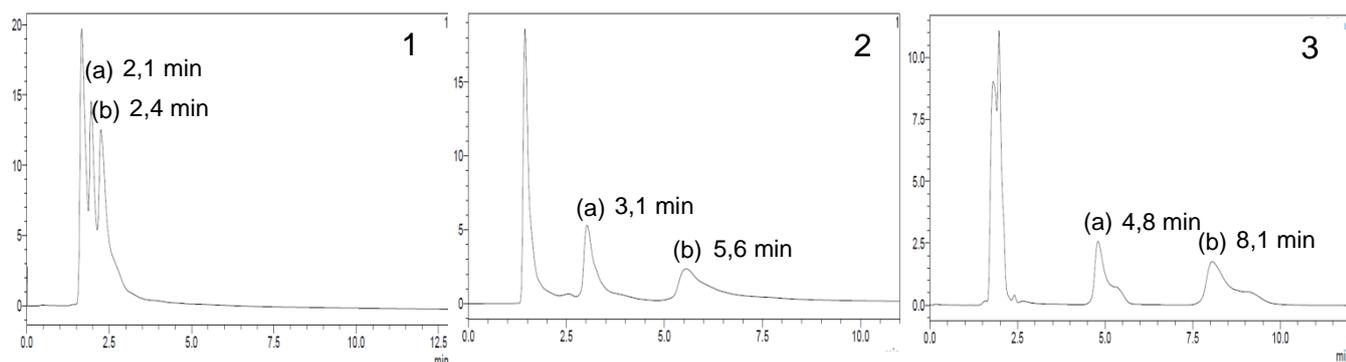


Figura 19. Cromatogramas de eluição de DON (a) e De-DON (b) em diferentes proporções de FM. FM: H₂O: ACN: tampão fosfato (1) 85:5:10, (2) 80:10:10 e (3) 85:10:5.

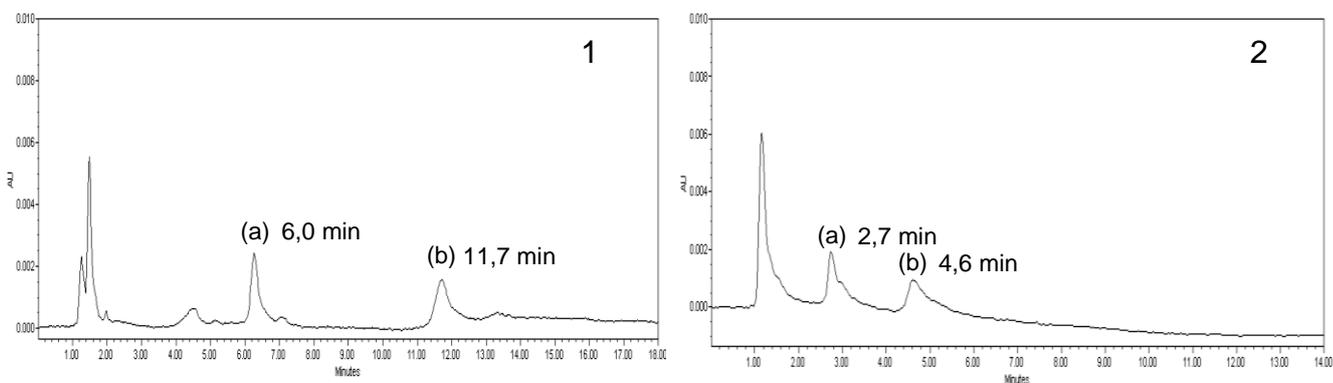


Figura 20: Perfil cromatográfico encontrado para DON (a) e De-DON (b) em diferentes dias de análise. Em (1) 8 h após separação e em (2) 12h.

O tampão fosfato na fase móvel, desestabilizou a interação entre os analitos e a fase estacionária pela alta concentração de íons e principalmente pela interação destes com a água presente na FM. Buscando a repetibilidade do tempo de retenção, foi necessária a avaliação de outras composições de FM e uma segunda coluna cromatográfica. As condições cromatográficas avaliadas nesse estudo, bem como os fatores de retenção e separação das micotoxinas, estão expressas na Tabela 17.

A condição cromatográfica do Teste 8 foi a que apresentou a melhor separação, sendo que nesta foi possível manter uma separação mínima das micotoxinas, mesmo com o aumento de suas concentrações (Figura 21 (1), (2), (3), (4), (5) e (6)), nas concentrações $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DON e $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de De-DON, estas com um tempo de retenção de 13,12 e 13,60 min, respectivamente, com um tempo de corrida de 16 min. A validação está descrita na Tabela 18. Embora o Teste 9 também tenha apresentado uma boa separação entre as micotoxinas houve um alargamento dos picos o que leva a uma diminuição da resolução.

Quanto aos parâmetros avaliados na separação cromatográfica, pode-se ressaltar que a determinação de k é importante, pois este é um parâmetro amplamente utilizado para descrever as velocidades de migração dos analitos nas colunas (COLLINS, BRAGA e BONATO *et al.*, 2006). Os valores ideais de k para os dois componentes da separação devem ser maiores que 1, envolvendo múltiplos componentes são aceitos valores maiores que 0,5 (COLLINS, BRAGA e BONATO *et al.*, 2006), cujo valor maior indica melhor a separação entre os analitos (COLLINS, BRAGA e BONATO *et al.*, 2006).

Os valores encontrados de k na coluna Ascentis C18 são satisfatórios, porém na coluna Gemini C18 estes se mostraram abaixo de 1 o que pode evidenciar a baixa eficiência da coluna para separação. Portanto, em função da análise dos dados, α maior que 1 para separação de DON e De-DON, foi mantido uso a coluna Gemini C-18.

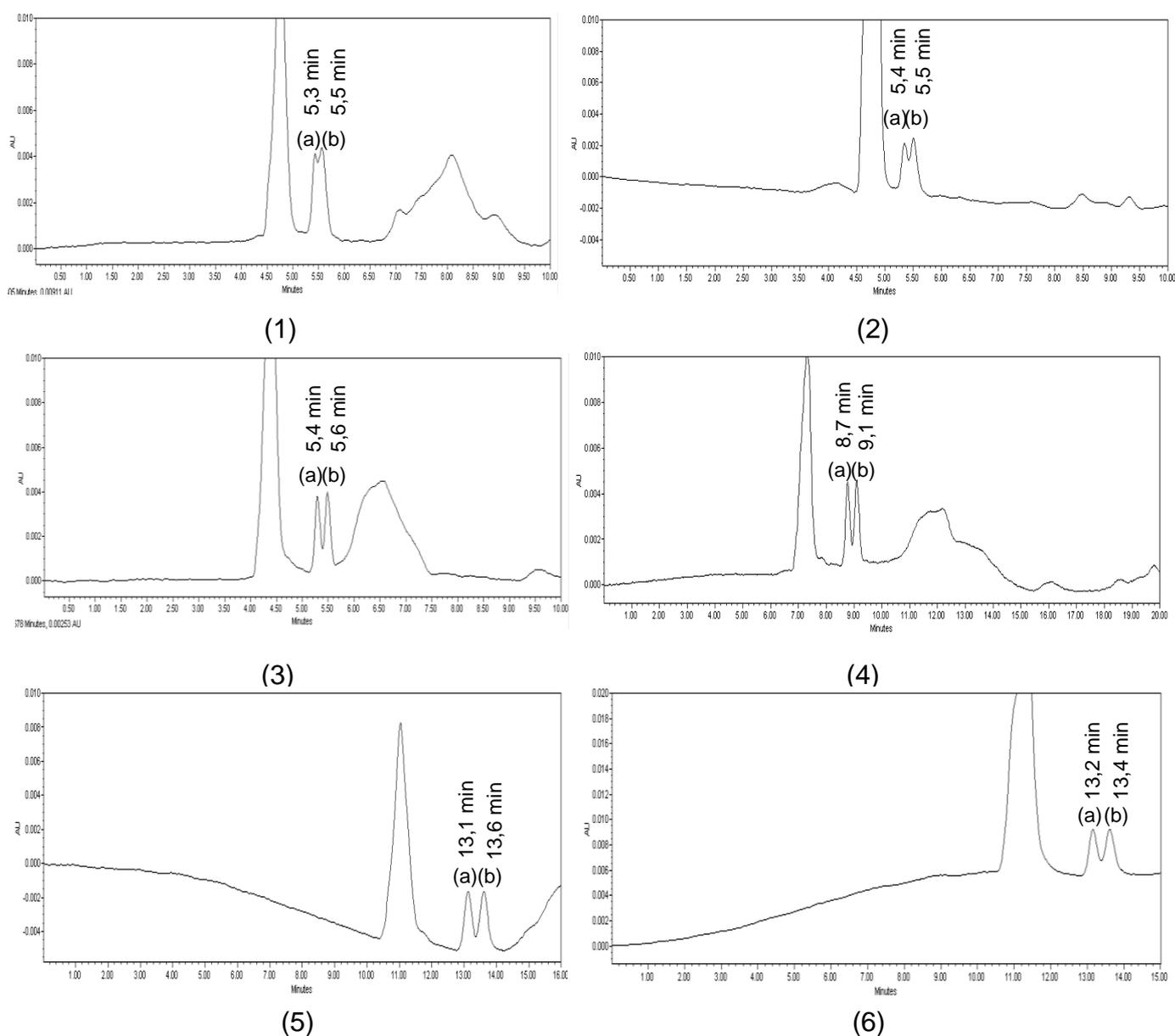


Figura 21. Cromatogramas de eluição de DON (a) e De-DON (b) em diferentes razões de FM em HPLC-DAD. Sendo H₂O:ACN em (1) 30:70 – 0,5 mL min⁻¹, (2) 80:20 – 0,5 mL min⁻¹, (4) 30:70 – 0,3 mL min⁻¹, (5) 30:70 – 0,2 mL min⁻¹, (6) 25:75 - 0,2 mL min⁻¹ e em (3) H₂O:ACN:MeOH 25:70:5 – 0,5 mL min⁻¹.

5.5.2 Validação do método analítico

As moléculas de DON e De-DON e sua solubilidade em solventes orgânicos e água faz da técnica de HPLC a mais apropriada para sua detecção. A linearidade dos métodos foi avaliada através da construção de curvas analíticas, utilizando-se de

padronização externa no solvente. A determinação do LD foi realizada através da variação do ruído do sistema analítico em estabilidade. O LQ é a menor concentração quantificada com exatidão e com fidelidade determinada, este também foi calculado com relação à variação do sinal ruído. A equação encontrada para as curvas analíticas de DON e De-DON, bem como o coeficiente de correlação, o LD e LQ encontram-se na Tabela 18.

Em relação a sensibilidade dos sistemas de HPLC-UV e HPLC-DAD utilizados nesse trabalho, observa-se pelos coeficientes angulares das curvas analíticas que o sistema HPLC-UV demonstra maior sensibilidade, 2,28 vezes, para DON e 1,22 vezes para De-DON, isto por apresentarem um maior ângulo de inclinação das retas, fornecendo um sinal analítico maior em relação com o aumento da concentração quando comparado ao HPLC-DAD. As curvas analíticas, utilizando diferentes colunas, teste 5 da Figura 21 e teste 3 da Figura 19, demonstraram que a coluna Gemini C18 mostrou uma maior sensibilidade, com um coeficiente angular 4,46 vezes maior comparado com a coluna Ascentis C18, evidenciando a eficiência da coluna durante a determinação no método analítico. A comparação entre as curvas analíticas encontradas nos dois sistemas para DON e De-DON em tampão fosfato em HPLC-UV e HPLC-DAD e DON em tampão fosfato e ACN em HPLC-DAD, nas duas colunas testadas estão dispostas no Apêndice 4 deste trabalho.

Tabela 18. Valores de diferentes parâmetros avaliados para validação de método analítico.

Método	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(r)	Curva analítica
DON em TF – HPLC-UV			0,40 – 4,06	0,998	$y = 36250x - 1099,4$
DON em TF – HPLC-DAD			0,45 – 4,08	0,991	$y = 15845x - 78,22$
De-DON em TF – HPLC-UV			0,5 – 4,00	0,994	$y = 23196x + 209,74$
De-DON em TF – HPLC-DAD			0,5 – 4,00	0,997	$y = 18951x - 8065$
DON em ACN – HPLC-DAD	0,003	0,03	0,49 – 3,23	0,992	$y = 70691x - 6631,8$

ACN – acetonitrila; TF – tampão fosfato

Estes dados mostram que o método estudado é adequado para as quantificações e determinações das micotoxinas DON e De-DON, como a linearidade, em que foram utilizados valores superiores e inferiores da substância em análise, atendendo aos requisitos de precisão e exatidão. Os coeficientes de correlação maiores que 0,99 demonstram a estimativa da qualidade da curva, quanto mais

próximo de 1 este for, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. De acordo com a ANVISA o coeficiente de correlação deve ser igual a 0,99 e para o INMETRO é aceito um valor acima de 0,90 (RIBANI, 2004).

A seletividade do método foi estabelecida pela verificação da pureza dos picos cromatográficos, com o emprego da cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos acoplado.

A recuperação nesse trabalho avaliada foi definida como a concentração da substância de interesse, adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI, 2004). O método de partição líquido-líquido utilizando como solvente extrator clorofórmio, apresentou recuperações percentuais de 118%, 90% e 85%, com coeficientes de variação de análise de 4,4; 3,5 e 2,6%, respectivamente. Estes valores foram obtidos para as recuperações em três diferentes concentrações 1,49; 2 e 3,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DON em meio tamponante.

Essas concentrações foram escolhidas, por 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ser a concentração utilizada nos ensaios de cinética de degradação por ser um dos pontos centrais da curva analítica. Estes dados forneceram ao método um intervalo de aplicação, uma vez que o procedimento revela-se satisfatório do ponto de vista da exatidão. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI, 2004). Sendo assim as recuperações encontradas nesse trabalho estão dentro da faixa aceitável.

Para a técnica de DLLME nenhum dos testes realizados apresentou recuperação de DON. A escolha dos solventes foi baseada com dados da literatura para micotoxinas em geral, visto que para DON não há relatos de estudos utilizando DLLME (ARROYO-MANZANARES, GÁMIZ-GRACIA e GARCÍA-CAMPAÑA, 2012).

5.5.3 Estudo da cinética de degradação de DON

A Tabela 19 apresenta os resultados encontrados durante avaliação da degradação de DON em meio tamponante. Nesta se observa que o ensaio realizado utilizando a enzima comercial HRP, obteve após 30 min de reação uma redução de 40% na concentração de DON nos meios DPOPG e DPOP, estes mesmos

experimentos, após 1 h de reação, mantiveram a redução da concentração chegando a 55%. Os mesmos resultados não foram observados para o sistema DPOG, assim, há a possibilidade do maior percentual de redução da concentração de DON estar relacionado com a presença de peróxido de hidrogênio no meio reacional, sendo este um cofator de atividade enzimática, sua presença no meio é de fundamental importância para a catálise enzimática.

Esta possibilidade foi confirmada por Li *et al.* (2011) que afirmam que a adição de peróxido de hidrogênio melhorou a degradação, segundo os autores sua presença como oxidante fornece maior eficiência ao processo de remoção de contaminantes. Kinsley e Nicell (2000) e Silva *et al.* (2013), também evidenciam o uso do peróxido em no meio reacional avaliado.

Porém, na terceira hora de reação a concentração de DON voltou aos níveis iniciais, mantendo-se com pequena variação até o final da análise. Estes dados expressam que DON pode estar sendo adsorvido pela enzima PO. Como, a PO e DON se encontram em baixas concentrações $32,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, a interação enzima/substrato entre ambos não se torna efetiva, fazendo com que DON seja novamente liberado no meio reacional.

Outro fator que pode ser evidenciado é a influência do guaiacol na quantificação de DON a 219 nm, já observada por varredura em espectrofotômetro em ensaios preliminares. Ainda, também há a possibilidade de ação enzimática oxidando o grupo epóxido, formando um grupo cetônico, tendo a mesma massa molecular e assim sendo detectado por LC-ESI-MS/MS como DON.

Em contrapartida, o emprego das enzimas POs obtidas, purificadas e caracterizadas neste estudo a partir de FA e FS, apresentou um perfil diferente da enzima comercial HRP. Durante esses ensaios de degradação, se observa muita variabilidade nos resultados e praticamente nenhuma ação na degradação de DON. Estes podem ser explicados pela baixa pureza apresentada pelas enzimas e pelas condições do meio reacional, não terem sido otimizadas para o substrato guaiacol. Assim, estudos envolvendo avaliação do meio reacional para estas duas enzimas e DON se fazem necessários, estes podendo ser definidos por estudo cinético.

Tabela 19. Resultados encontrados durante avaliação da cinética de degradação de DON em diferentes sistemas reacionais.

Tempo (h)	D	Concentração relativa de DON (%)								
		HRP			PO de FA			PO de FS		
		DPOPG	DPOP	DPOG	DPOPG	DPOP	DPOG	DPOPG	DPOP	DPOG
0,25	100	109,40 (11,3)	141,50 (0,2)	112,45 (0,0)	104,20 (6,5)	103,20 (0,3)	98,50 (1,4)	103,80 (0,6)	98,20 (0,7)	114,73 (1,7)
0,5	100	98,54 (1,2)	101,71 (1,3)	87,10 (4,2)	97,80 (0,2)	101,0 (2,4)	98,27 (1,5)	128,20 (0,2)	108,40 (1,0)	107,00 (1,0)
0,75	100	56,48 (0,2)	60,60 (3,7)	92,92 (0,6)	92,50 (2,7)	109,90 (1,6)	125,86 (0,0)	103,40 (2,4)	106,20 (0,9)	100,87 (0,2)
1	100	49,88 (2,0)	43,93 (4,6)	111,75 (0,7)	100,00 (1,7)	97,40 (0,6)	80,38 (0,6)	103,50 (1,0)	100,20 (1,2)	107,11 (0,6)
1,5	100	53,90 (1,5)	49,70 (4,4)	58,81 (2,4)	105,10 (1,9)	105,80 (1,6)	111,08 (0,5)	105,50 (1,5)	106,80 (0,3)	113,68 (3,0)
3	100	109,30 (4,0)	106,30 (6,6)	103,99 (4,1)	94,90 (0,6)	93,20 (0,3)	94,91 (0,8)	111,90 (0,4)	115,30 (1,3)	126,57 (2,0)
5	100	94,70 (1,9)	82,20 (3,6)	99,47 (1,4)	94,60 (4,4)	79,70 (0,8)	95,24 (2,2)	102,50 (0,7)	94,90 (0,9)	86,62 (2,2)
10	100	112,70 (0,5)	97,90 (4,4)	108,52 (3,3)	99,50 (1,1)	103,20 (0,3)	101,43 (2,8)	105,60 (0,6)	101,90 (0,6)	108,60 (0,9)
24	100	101,70 (6,6)	94,40 (2,4)	92,84 (4,5)	97,60 (0,2)	92,90 (1,6)	120,24 (0,8)	125,50 (1,1)	119,50 (0,8)	131,85 (0,7)
32	100				94,80 (0,9)	92,30 (0,4)	93,12 (1,1)	88,40 (0,4)	94,30 (1,2)	95,49 (0,9)
48	100	109,40 (1,5)	101,90 (0,4)	109,82 (1,6)	99,20 (0,6)	92,10 (0,8)	91,44 (1,4)	101,50 (4,0)	96,50 (1,5)	102,21 (0,8)

O sistema DPOG não apresentou um perfil definido sobre sua atuação em nenhum dos meios reacionais testados para a degradação de DON. Como já mencionado, aparentemente o guaiacol presente no meio reacional durante a degradação, se apresenta como um interferente potencial.

Estes resultados evidenciam a necessidade de avaliação da degradação de DON em maiores concentrações da PO, o que possibilitaria a maior interação entre DON e PO levando a uma metabolização da micotoxina. A presença de De-DON não foi observada em nenhum dos ensaios de degradação realizados, com isso se acentua a possibilidade da enzima estar adsorvendo a micotoxina ou agindo na degradação através de reações oxidativas.

6. CONCLUSÕES

A extração da enzima PO dos subprodutos FA e FS, empregando superfície de resposta, demonstraram como melhor condição de extração de 5g de FA com um volume de 50 mL de solvente extrator tampão fosfato $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5 com a adição de MgCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, agitados orbitalmente durante 60 min, obtendo atividade específica de $91,41 \text{ U mg}^{-1}$. Para FS a maior atividade específica encontrada foi de $100,14 \text{ U mg}^{-1}$, obtida com um tempo de extração de 60 min, também utilizando 100 rpm como agitação orbital, com o emprego de 5g em 50 mL de tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,7 com a adição de CaCO_3 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como solvente extrator.

A utilização do método de purificação TPP apresentou fator de purificação e a recuperação maiores comparados com os obtidos pelo método cromatográfico de exclusão molecular para ambas as POs do estudo. Esta técnica se apresenta promissora para processos ambientais e aplicação industrial, com baixos custos e tempo de aplicação. Em contrapartida, para maior purificação das enzimas objetivando a degradação de DON, se faz necessária a avaliação de um processo mais eficiente.

A cinética enzimática demonstra que as POs de FA e FS na forma purificada apresentam uma maior afinidade pelo substrato. A avaliação de estabilidade enzimática demonstrou que a enzima PO de FA apresentou maior estabilidade frente ao pH em estudo, com uma maior estabilidade em pH ácido. Em termos de estabilidade térmica a PO de FS apresentou maior estabilidade, com uma manutenção de 50% da atividade em 144 dias. A estabilidade térmica da PO de FS é consideravelmente maior quando comparada com a PO de FA, de 48 dias.

As POs de FA e FS apresentaram uma massa molecular de 41 e 34 kDa, respectivamente. Essas mostraram ao final do processo de obtenção, purificação e caracterização uma atividade específica de $115,79 \text{ U mg}^{-1}$ para PO de FA e $794,04 \text{ U mg}^{-1}$ para PO de FS e $4363,35 \text{ U g}^{-1}$ e $17453,38 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente.

As condições cromatográficas otimizadas por HPLC-DAD, permitiram a realização da separação e de uma análise quantitativa e qualitativa das micotoxinas em estudo, com um tempo de análise de 16 min, com uma vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, com

uma razão de solventes de 30:70 H₂O:ACN. As curvas analíticas apresentaram valores de R maiores que 0,99 para as faixas lineares que variaram de 0,4 – 4,08 µg mL⁻¹ para DON e 0,5 – 4 µg mL⁻¹ para De-DON. Os valores das recuperações de DON foram em média de 101% com coeficientes de variação, também com média, de 3,5%. O LD encontrado para DON foi de 0,003, enquanto que o LQ foi de 0,03.

As enzimas POs de FA e FS purificadas nesse trabalho por TPP, nas condições testadas, não apresentaram ação degradativa sobre a micotoxina DON, em contrapartida os resultados encontrados durante aplicação da enzima comercial HRP, evidenciam que a enzima PO possui potencial degradativo sobre DON, necessitando apenas estudos cinéticos de interação PO + DON e definição das condições para aplicação na biorremediação ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, D., HOUSE, J.D., NYACHOTI, M. Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat. **Mycopathologia**, v. 160, 297–301, 2005.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A by Fungi Isolated from Grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- AJILA, C.M.; RAO, U.J.S.P. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 36-44, 2009.
- AL-SENAIDY, A.; ISMAEL, M. A. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 293-298, 2011.
- AMÉZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326-333, 2009.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 de julho de 2013.
- ARAUJO, B. S.; OLIVEIRA, J. M. DE; MACHADO, S. S.; PLETSCHE, M. Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. **Plant Science**, v. 167, p. 1151–1157, 2004.
- ARROYO-MANZANARES, N.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 135, p. 368–372, 2012.
- ARROYO-MANZANARES, N.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on

- QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p. 11– 19, 2013.
- ARUNACHALAM, C.; DOOHAN, F. M. Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. **Toxicology Letters**, v. 217, p. 149– 158, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC**: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; ADAMS, C. D.; TYAGI, R. D. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and ph effects. **Water research**, v. 40, p. 2847 – 2856, 2006.
- BALSAN, G.; ASTOLFI, V.; BENAZZI, T.; MEIRELES, M. A. A.; MAUGERI, F.; LUCCIO, M. D.; PRA, V. D.; MOSSI, A. J.; TREICHEL H.; MAZUTTI, M. A. Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustrial substrates. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 35, p. 1229–1237, 2012.
- BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 223-228, 1999.
- BHAVSAR, K.; KUMAR, V. R.; KHIRE, J. N. Downstream processing of extracellular phytase from *Aspergillus niger*. Chromatography process vs. aqueous two phase extraction for its simultaneous partitioning and purification. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1066–1072, 2012.
- BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of Fusarium mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v.73, p.270-275, 1990.
- BENSASSI, F.; GOLLI-BENNOUR, E.; ABID-ESSEFI, S.; BOUAZIZ, C.; HAJLAOUI, M. R.; BACHA, H. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. **Toxicology**, v. 264, p. 104-109, 2009.
- BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M. DE; PERALTA, R. M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1203–1207, 2006.

- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, p. 506, 2008.
- BRASIL. INMETRO. **Instituto Nacional de Metrologia**. Portaria INMETRO / DOQ-CGCRE-008 de 03 – FEV/2010- Orientação sobre validação de Métodos analíticos. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em 28/01/2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 7**, de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 fevereiro 2011.
- BULLERMAN, L.B., BIANCHINI, A., Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 140–146, 2007.
- CAI, F.; YANG, X. O.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 1-37, 2012.
- CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenic rice proteins. **Journal of Cereal Science**. v. 50, p. 184-189, 2009.
- CARDINALI, A.; TURSI, N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M. G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; VENERE, D. D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 395-403, 2011.
- CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 107, p. 700–710, 2007.

- CAZZANIGA, D., BASILICO, J.C., GONZALEZ, R.J., TORRES, R.L., DE GREEF, D.M. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. **Letters Applied Microbiological**, v. 33, p. 144–147, 2001.
- CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Differential Induction of a Peroxidase Gene Family During Infection of Rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **The American Phytopathological Society**, v. 10, p. 861-871, 1997.
- CIGIĆ, I. K.; PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 62-115, 2009.
- CIJZEN, M.; HUUSTEE, R. V.; BUZZELL, R. Soybean seed coat peroxidase: a comparison of high-activity and low-activity genotypes. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1061-1066, 1993.
- COELHO, M. A.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**, Editora EPUB, Brasil, 2008.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Ed. Unicamp, Campinas, 2006.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB**: Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: set. 2013.
- DALAL, S.; GUPTA, M. N. Purification and Characterization of a Peroxidase Isozyme from Indian Turnip Roots. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 5545–5552, 2010.
- DANICKE, S., BRUSSOW, K. P., VALENTA, H., UEBERSCHAR, K. H., TIEMANN, U., & SCHOLLENBERGER, M. On the effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 932-943, 2005.
- DEEPA, S.S.; ARUMUGHAN, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. **Phytochemistry**, v. 61, p. 503-511, 2002.
- 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.

- DÖLL, S., SCHRICKX, J. A., DÄNICKE, S., FINK-GREMMELS, J. Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. **Toxicology Letters**, v.184, 97–106, 2009.
- DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 132-145, 2011.
- DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 270–282, 2010.
- ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H.; LUNDH, T. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 619-624, 2004.
- FARAHANY, E. M.; JINAP, S. Influence of noodle processing (industrial protocol) on deoxynivalenol. **Food Control**, v. 22, p. 1765-1769, 2011.
- FODIL, D., BADIS, A., JAOUADI, B., ZARAÏ, N., FERRADJI, F.Z., BOUTOUMI, H. Purification and characterization of two extracellular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids. *Inter. Biodeterioration Biodegradation*, v. 65, p. 470–478, 2011.
- FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M., Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas cosmosus* (abacaxi). **Scientia Plena**, v. 5, p. 1-6, 2009.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G.C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v.16, p.423-428, 2005.
- GARDA-BUFFON, J. **Biodegradação de deoxinivalenol por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp: Um estudo bioquímico de degradação e toxicidade.** Tese(Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2008.
- GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 2, p. 710-714, 2010.

- GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 3, p.198-20, 2011.
- HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**. v. 115, p. 1177-1186, 2009.
- HARRIS, D.C. **Explorando a Química analítica**. LTC, 2011.
- HATZIMANIKATIS, V.; LI, C.; IONITA, J. A.; BROADBELT, L. J. Metabolic networks: enzyme function and metabolite structure. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 300-306, 2004.
- HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, T. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 21, p.67-76, 2010.
- HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P. de; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 15, p. 41-49, 2012.
- HOOFT, J. M.; ELMOR, A. E. H. I.; ENCARNAÇÃO, P.; BUREAU, D. P. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON). **Aquaculture**, v. 311, p. 224-232, 2011.
- HUANG, S. C.; SHIAU, C. Y.; LIU, T. E.; CHU, C. L.; HWANG, D.F. Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. **Meat Science**, v. 70, p. 613–619, 2005.
- IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GCeMS. **Food Control**, v. 22, p. 1428-1434, 2011.
- ICHI, S. E.; ABDELGHANI, A.; HADJI, I.; HELALI, S.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M. N. A new peroxidase from garlic (*Allium sativum*) bulb: its use in H₂O₂ biosensing. **Biotechnoly Applied Biochemistry**, v. 70, p. 33–41, 2008.
- INDINANI, C.; FEIS, A.; HOWES, B. D.; MARZOCCHI, M. P.; SMULEVICH, G. Effect of low temperature on soybean peroxidase: spectroscopic characterization of the

- quantum-mechanically admixed spin state. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, p. 269–274, 2000.
- ITO, H.; HIRAOKA, N.; OHBAYASHI, A.; OHASHI, Y. Purification and Characterization of Rice Peroxidases. **Agrobiological Gene Analysis Research Association**, v. 55, p. 2445-2454, 1991.
- JAMBRAK, A. R.; LELAS, V.; MASON, T. J.; KRESIC, G.; BADANJAK, M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 386-393, 2009.
- JELEN', H. H.; WASOWICZ, E. Determination of trichothecenes in wheat grain without sample cleanup using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1215, p. 203–207, 2008.
- JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342-362, 2007.
- JUAN, C.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2389–2397, 2012.
- KADER, A.; BULBUL, M.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; NGUYEN, B. T.; KOMILUS, C. F. Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 109–116, 2012.
- KALOGERAKIS, N.; PSILLAKIS, E. Special issue: recent advances in bioremediation. **Environment International**, v. 31, p. 147, 2005.
- KARIM, Z.; HUSAIN, Q. Guaiacol-mediated oxidative degradation and polymerization of bisphenol A catalyzed by bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 185–189, 2009.
- KARLOVSKY, P. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 491-504, 2011.
- KHAN, S. H.; BUTT, M. S.; SHARIF, M. K.; SAMEEN, A.; MUMTAZ, S.; SULTAN, M. T. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by

- microwave, dry heat, and parboiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2416–2420, 2011.
- KINSLEY, C.; NICELL, J. A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 139-146, 2000.
- KLINGLMAYR, C., NOBAUER, K., RAZZAZI-FAZELI, E., & CICHNA-MARKL, M. Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences**, v. 878, p. 187-193, 2009.
- KOLF-CLAUW, M., CATELLOTE, J., JOLY, B., BOURGES-ABELLA, N., RAYMOND-LETRON, I., PINTON, P., OSWALD, I.P., Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1580–1584, 2009.
- KRSKA, R., & MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 145-148, 2007.
- KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETERSON, H.; EGMOND, H. P. V.; SCHOTHORST, R. C.; MACDONALD, S.; CHAN, D. Determination of molar absorptivity coefficients of major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1215-1226, 2007.
- KUMAR, R.; SINGH, K. A.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1350–1357, 2011.
- LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna**. Átomo 2009.
- LATTANZIO, V. M. T.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A.; CHULZE, S. N.; TORRES, A. M.; VISCONTI, A. LC–MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 707-715, 2011.
- LAVERY, C. B.; INNIS, M. C. M.; MACDONALD, M. J.; WILLIAMS, J. B.; SPENCER, C. A.; BURKE, A. A.; IRWIN, D. J. G.; D'CUNHA, G. B. Purification of

- Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 8471–8476, 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 3.ed, 2002.
- LI, H.; LI, Y.; CAO, H.; LI, X.; ZHANG, Y. Degradation of pentachlorophenol by a novel peroxidase-catalyzed process in the presence of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. **Chemosphere**, v. 83, p. 124–130, 2011.
- LIU,Z-Y.; YU, C-H.; WANB, L.; SUN, Z-L. Fragmentation study of five trichothecenes using electrospray hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry with accurate mass measurements. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, p. 133– 140, 2012.
- 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**. In: LUH, B.S. **Rice: utilization**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, cap. 14, p. 313-363, 1991.
- MA, Y. Y.; GUO, H. W. Mini-review of studies on the carcinogenicity of deoxynivalenol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 1-9, 2008.
- 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, p. 735-739, 2006.
- MAGAN, N., ALDRED, D. Prevention strategies for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 165–171, 2004.
- MANDRICH, L.; SANTI, C. DE; PASCALE, D. DE; MANCO, G. Effect of low organic solvents concentration on the stability and catalytic activity of HSL-like carboxylesterases: Analysis from psychrophiles to(hyper)thermophiles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 82, p. 46– 52, 2012.
- MANU,B. T.; RAO, U. J. S. P. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 114, p. 66–71, 2009.

- MARCHIS , T.; AVETTA, P.; BIANCO-PREVOT , P.; FABBRI , D.; VISCARDI, G.; LAURENTI, E. Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 321–327, 2011.
- MARQUEZ, O., WALISZEWSKI, K. N., OLIARTA, R. M., & PARDIO, V. T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **LWT - Food Science Technology**, v. 41, p.1372–1379, 2008.
- MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 58-65, 2010.
- MAY, S. W. Applications of oxidoreductases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 370-375, 1999.
- MDLULI, K. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**, v. 92, p. 311-323, 2005.
- MENEELY, J. P., RICCI, F., VAN EGMOND, H. P., ELLIOTT, C. T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 192–203, 2011.
- MOHAMED, S. A.; OBULNAJA, K. O.; ADS, A. S.; KHAN, J. A.; KUMOSANI, T. A. Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. **Food Chemistry**, v. 128, p. 725–730, 2011.
- 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. 7-8, 2012.
- MOTAMED, S.;GHAEMMAGHAMI, F.; ALEMZADEH, I. Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase: Purification and Characterization.**Industrial Engineering Chemical Research**, v. 48, p. 10614–10618, 2009.
- NAGY, C. M.; FEJER, S. N.; BEREK, L.; MOLNAR, J.; VISKOLCZ, B. Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations—a density functional study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 726, p. 55-59, 2005.

- NARAYAN, A. V.; MADHUSUDHAN, M.C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction and purification of *Ipomoea* peroxidase employing three phase partitioning, **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 151, p. 263-272, 2008.
- NICELL, J. A.; WRIGHT, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 302-310, 1997.
- NISSUM, M.; SCHIÖDT, C. B., WELINDER, K. G. Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2.4-12.0, and veratryl alcohol at pH 2.4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1545, p. 339-348, 2001.
- ORTEGA, N., DE DIEGO, S., PEREZ-MATEOS, M., & BUSTO M.D. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209–217, 2004.
- 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.
- PARK, B.J., TAKATORI, K., SUGITA-KONISHI, Y., KIM, I., LEE, M., HAN, D., CHUNG, K., HYUN, S., PARK, J. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 5733-5737, 2007.
- PARKER, D. B.; CAI, L.; KIM, K.; HALES, K. E.; SPIEHS, M. J.; WOODBURY, B. L.; ATKIN, A. L.; NICKERSON, K. W.; PATEFIELD, K. D. Reducing odorous VOC emissions from swine manure using soybean peroxidase and peroxides. **Bioresource Technology**, v.124, p. 95–104, 2012.
- PATAPAS, J.; AL-ANSARI, M. M.; TAYLOR, K. E.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N. Removal of dinitrotoluenes from water via reduction with iron and peroxidase-catalyzed oxidative polymerization: A comparison between *Arthromyces ramosus* peroxidase and soybean peroxidase. **Chemosphere**, v. 67, p. 1485–1491, 2007.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.
- PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R. ; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C. ; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for

- extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 311–316, 2004.
- PERDANA, J.; FOX, M. B.; SCHUTYSER, M. A. I.; BOOM, R. M. Enzyme inactivation kinetics: Coupled effects of temperature and moisture content. **Food Chemistry**, v. 133, p. 116–123, 2012.
- PEREIRA, L. J. A. **Estratégias para o controlo de ocratoxina A em alimentos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2008.
- PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, Benefícios à saúde e aplicações. **B.CEPPA**, v. 26, p. 29-40, 2008.
- PESTKA, J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v.137,p. 283-298, 2007.
- PORZIO, M. A.; PEARSON, A. M. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 490, p. 27-34, 1977.
- PRONYK, C., CENKOWSKI, S., & ABRAMSON, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, p. 789-796, 2006.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, M. D.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 1216–1222, 2006.
- REGALADO, C.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 243–256, 2004.
- REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 48–64, 2007.

- 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, p. 771-780, 2004.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª. Ed. – Campinas, SP, 2009.
- RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJLSLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**, v.99, p. 712–719, 2012.
- RUIZ, M.J.; FRANZOVA, P.; JUAN-GARCÍA, A.; FONT, G. Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells in vitro. **Toxicon**, v.58, p. 315-326, 2011
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 416, 2004.
- SALEM, N.M., AHMAD, R. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. **Food Control**, v. 21, p. 1099–1103, 2010.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- SAQIB, A.A.N., HASSAN, M., KHAN, N.F., & BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigates* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641-646, 2010.
- SEKIYAMA, B. L.; FERRARI, G.; JUNIOR, M. M. Processos de descontaminação de rações contendo micotoxinas. **Revista Analytica**, v. 26, p. 64-67, 2007.
- SERDAKOWSKI, A. L.; DORDICK, J. S. Enzyme activation for organic solvents made easy. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 48-54, 2007.
- SHERIF, O. S., SALAMA, E.E., ABDEL-WAHHAB, M.A. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. **Institutional Journal Hygiene Environmental Health**, v. 212, p. 347–368, 2009.

- SILVA, E. M.; MARTINS, S. F.; MILAGRES, A. M. F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2471–2475, 2008.
- SILVA, F. R. G. B. DA; SOUZA, M. DE; COSTA, A. M. DE S.; DA; JORGE, L. M. DE M.; PARAÍSO, P. R. Experimental and numerical analysis of soybean meal drying in fluidized bed. **Powder Technology**, v. 229, p. 61-70, 2013.
- SINGH, N.; SINGH, J. A Method for Large Scale Purification of Turnip Peroxidase and Its Characterization. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 33, p. 125–135, 2003.
- SINGH, P.; PRAKASH, R.; SHAH, K. Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: Prospects for enzyme based applications. **Talanta**, v. 97, p. 204–210, 2012.
- SKRBIC, B., ZIVANCEV, J., DURISIC-MLADENOVIC, N., GODULA, M. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. **Food Control**, v. 25, p. 389-396, 2012.
- SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, N.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, p. 94–99, 2010.
- SOUSA, K. A. **Extração e Purificação de Peroxidase de Soja (*Glycine max*) por Adsorção de Afinidade a Metal Imobilizado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.
- SRINIVAS, N.D.; RASHMI, K.R.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 43-48, 1999.
- SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea* peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 1–6, 2002.
- SUZUKI, T.; HONDA, Y.; MUKASA, Y.; KIM, S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. **Phytochemistry**, v. 67, p. 219–224, 2006.
- TAFAZOLI, S.; O'BRIEN, P. J. Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. **Drug discovery today**, v. 10, p. 617-625, 2005.

- TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K. N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. **Plant Science**, v. 136, p. 131-137, 1998.
- TÜRKER, L.; GÜMÜS, S. A theoretical study on vomitoxin and its tautomers. **Journal of Hazardous Materials**. v. 163, p. 285–294, 2009.
- USTOK, F.I., TARI, C., & HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1114-1120, 2010.
- VÁMOS-VIVGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Criticals Reviews in Food Science and Nutrition**, V. 15, p. 49-127, 1981.
- VARGA, J; PÉTERI, Z; TÁBORIA, K; TÉRENB, J; VÁGVÖLGYIA, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**. v. 99, p. 321-328, 2005.
- VEGA, M.;CASTILLO, D. Determination of deoxynivalenol in wheat by validated GC/ECD method: comparison with HPTLC/ FLD.**Electronic Journal of Food and Plants Chemistry**, v. 1, p. 16-20, 2006.
- VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v.65, p. 249-259, 2004.
- VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Cloning, expression and applicability of thermo-alkali-stable xylanase of *Geobacillus thermoleovorans* in generating xylooligosaccharides from agro-residues. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 333-338, 2012.
- VISCONTI, A.; HAIDUKOWSKI, E. M.; PASCALE, M.; SILVESTRI, M. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 181–189, 2004.
- WAGNER,M.; NICELL, J. A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Water Research**, v. 36, p. 4041–4052, 2002.
- WARTH, B., SULYOK, M., BERTHILLER, F., SCHUHMACHER, R., FRUHMANN, P., HAMETNER, C., ADAM, G., FROHLICH, J., & KRŠKA, R. Direct quantification of deoxynivalenol glucuronid in human urine as biomarker of exposure to the

- Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 211, p. 195-200, 2011.
- WEBER, K E OSBORN, M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal and Biological Chemistry**, v. 244, p. 4406-4412, 1969.
- YAMAMOTO, E.; YAMAGUCHI, S.; NAGAMUNE, T. Synergistic effects of detergents and organic solvents on protein refolding: Control of aggregation and folding rates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, p. 10–15, 2011.
- ZAIN, M.E.. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129–144, 2011.
- ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S. DE; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734, 2008.
- ZHAO, Y.; TANIGUCHI, K.; OBITSU, T. Effects of different processing procedures for rice bran on dietary nutrient digestion in each segment of the digestive tract of steers. **Animal Feed Science Technology**, v. 59, p. 265-277, 1996.
- ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M. MOLTO´, 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.
- ZOU, Z., HE, Z., LI, H., HAN, P., TANG, J., XI, C., LI, Y., ZHANG, L., & LI, X. Development and application of a method for the analysis of two trichothecenes: deoxynivalenol and T-2 toxin in meat in China by HPLC-MS/MS. **Meat Science**, v. 90, p. 613-617, 2012.

Apêndice 1. Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk da PO de FA extrato bruto (a), extrato puro (b) e para PO de FS extrato bruto (c) e extrato puro (d).

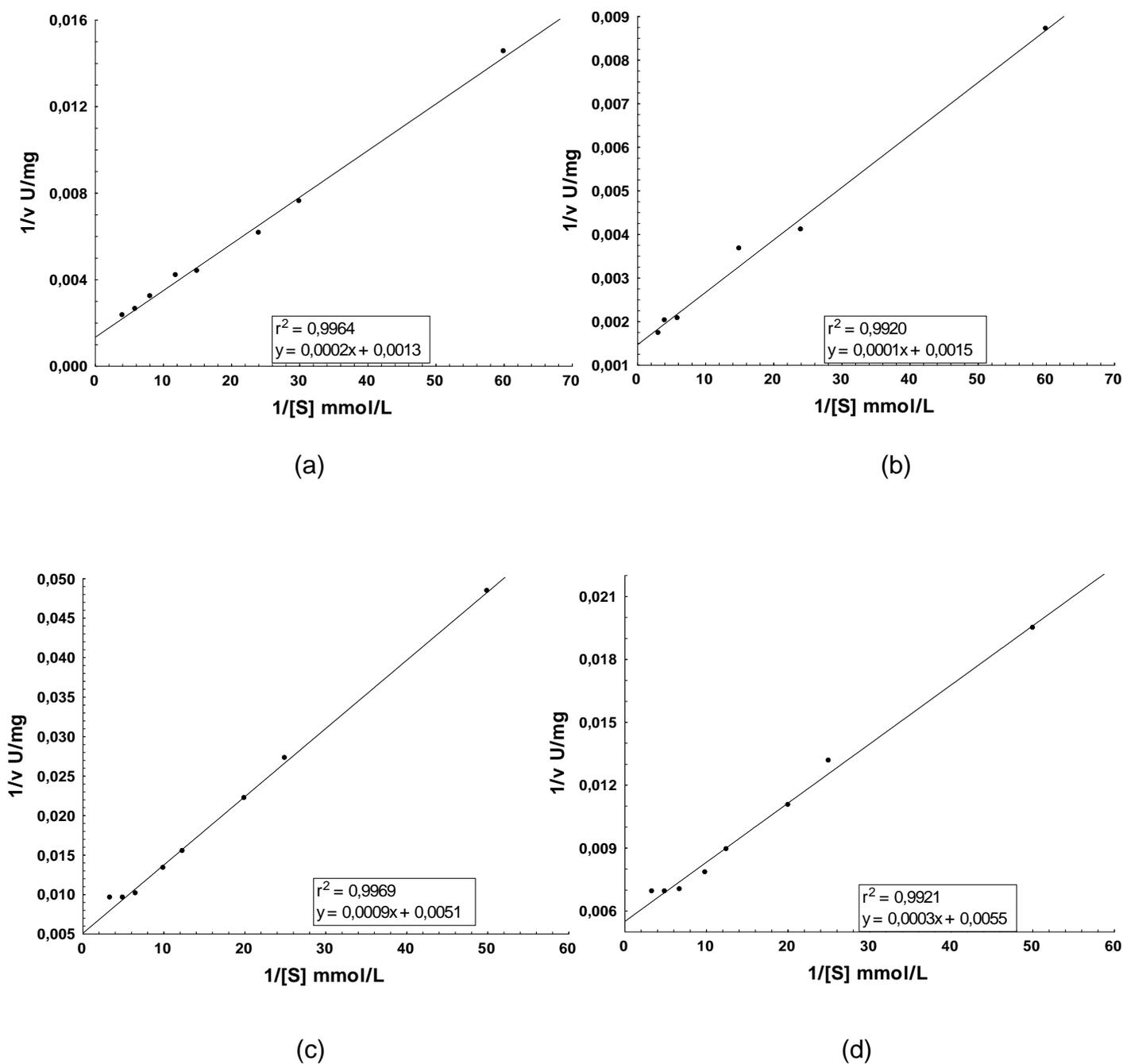


Figura 22. Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk da PO para farelo de arroz nas formas bruta (a) e pura (b) e para PO de FS nas formas bruta (c) e pura (d).

Apêndice 2. Gráficos de $\ln/[A]$ (V/V_0) em função do tempo, para obtenção do K_d , os valores dos coeficientes angulares encontrados correspondem ao valor da constante de dissociação (K_d).

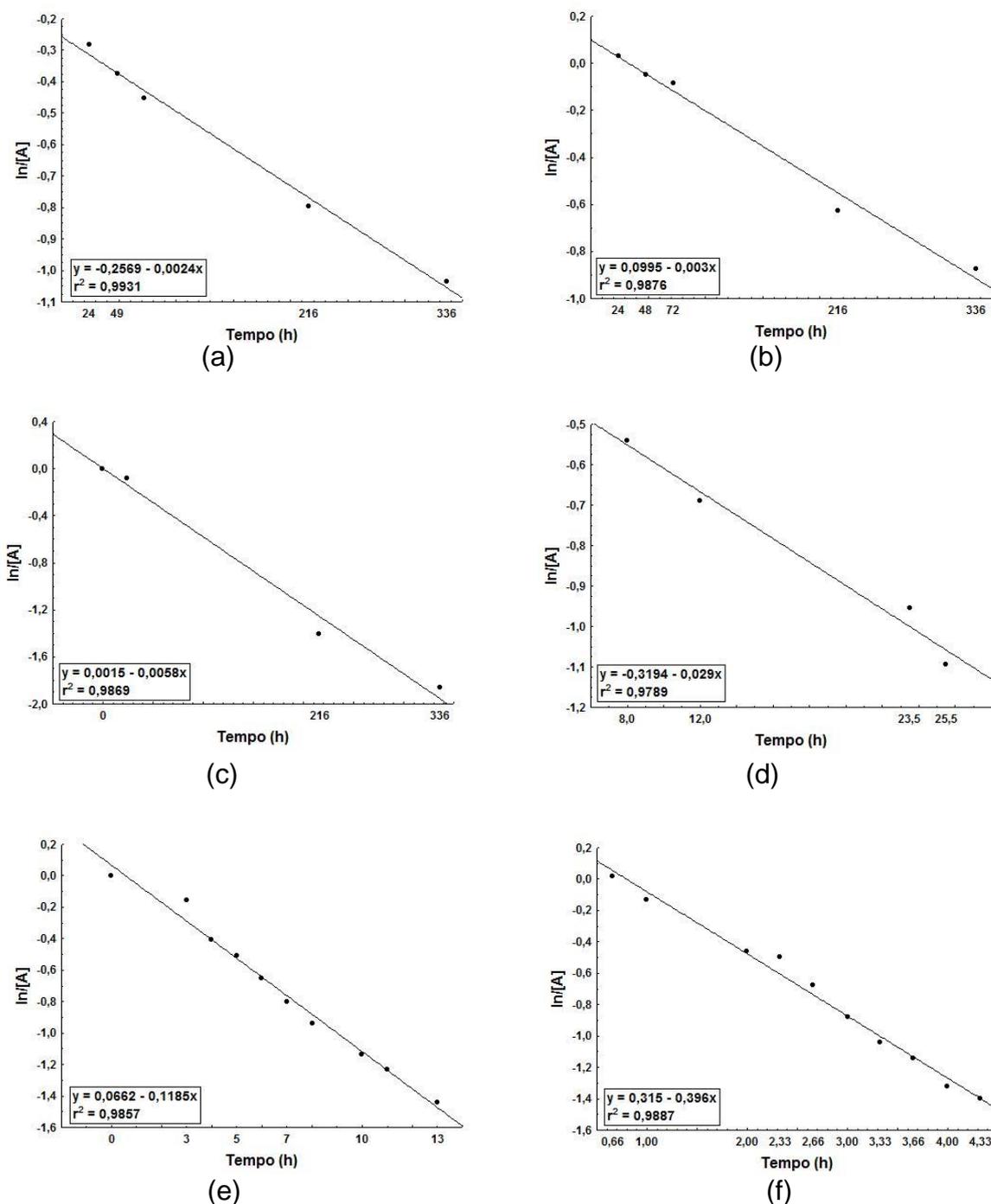


Figura 23. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 25 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FA bruta.

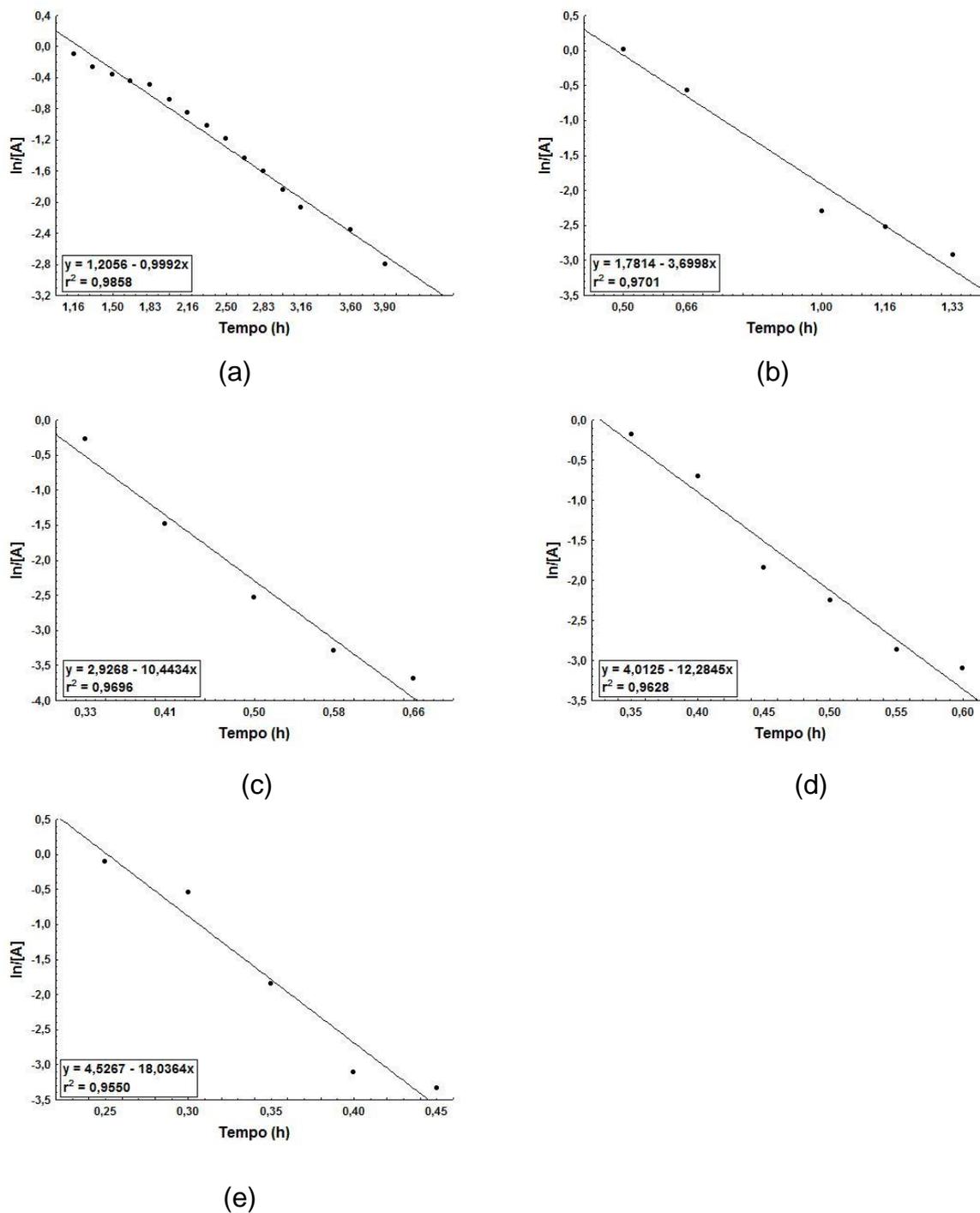


Figura 24. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 70 °C (a), 80 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FA bruta.

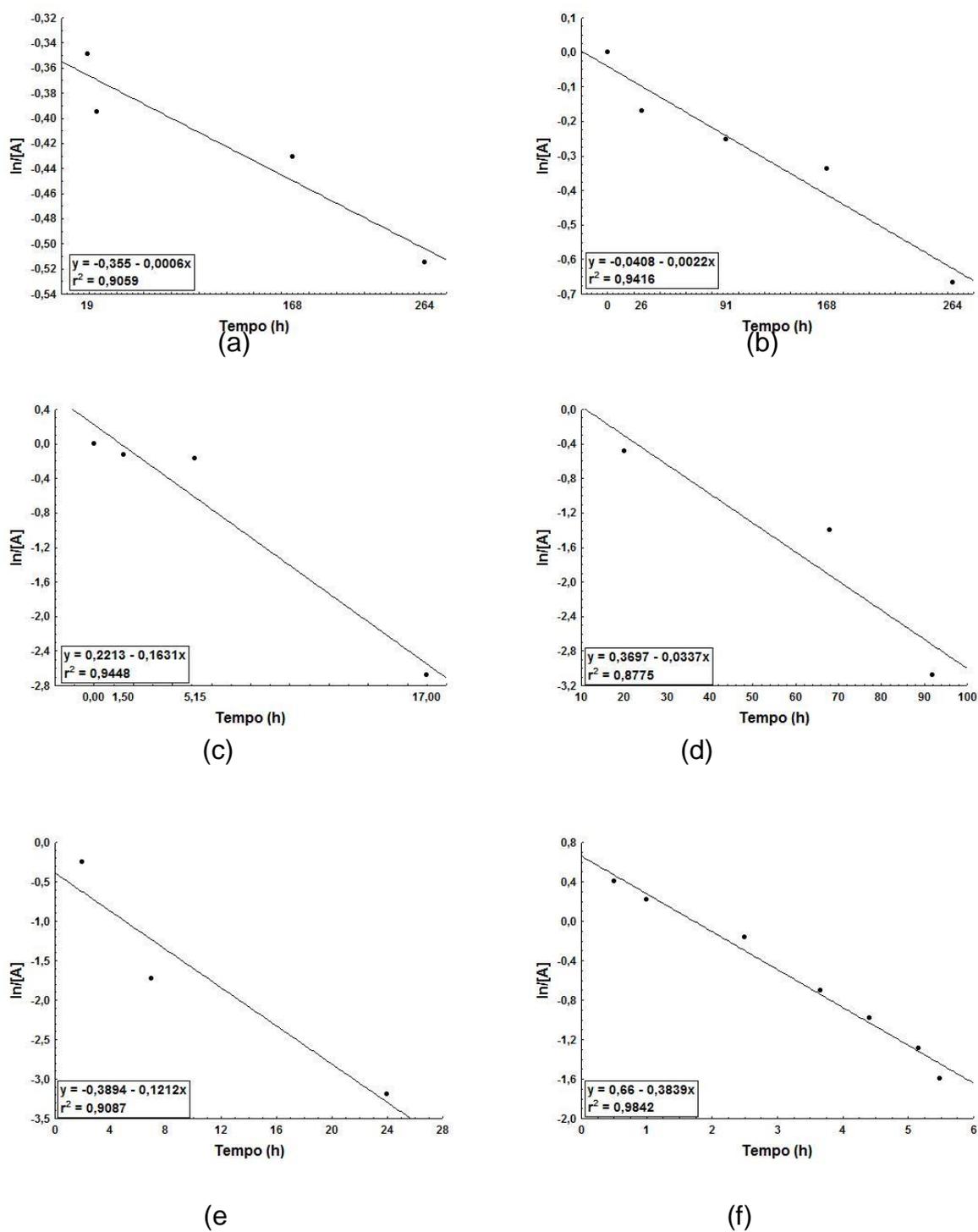


Figura 25. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 25 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FA purificada.

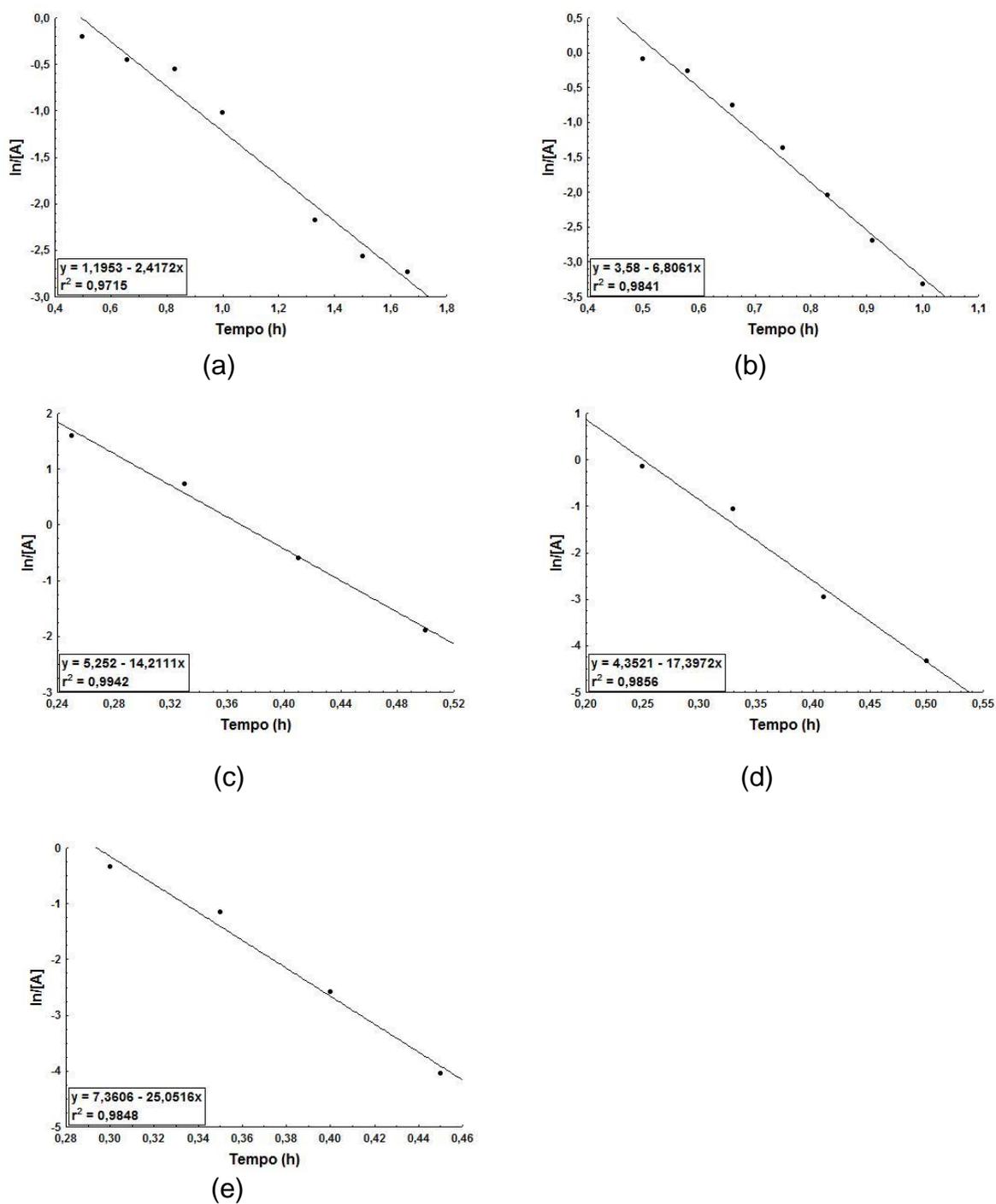


Figura 26. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 70 °C (a), 80 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FA purificada.

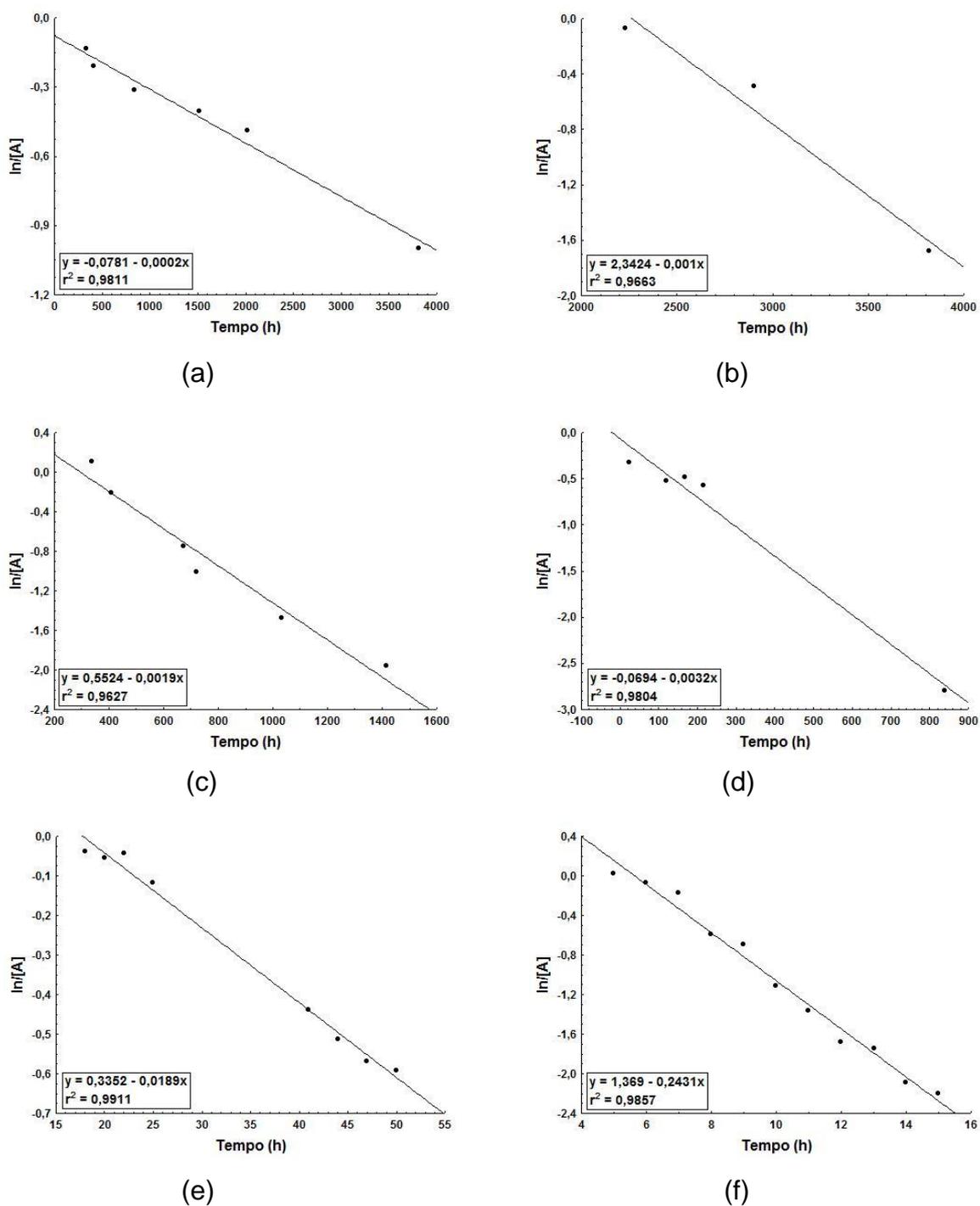


Figura 27. Dados de $\ln/[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 25 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FS bruta.

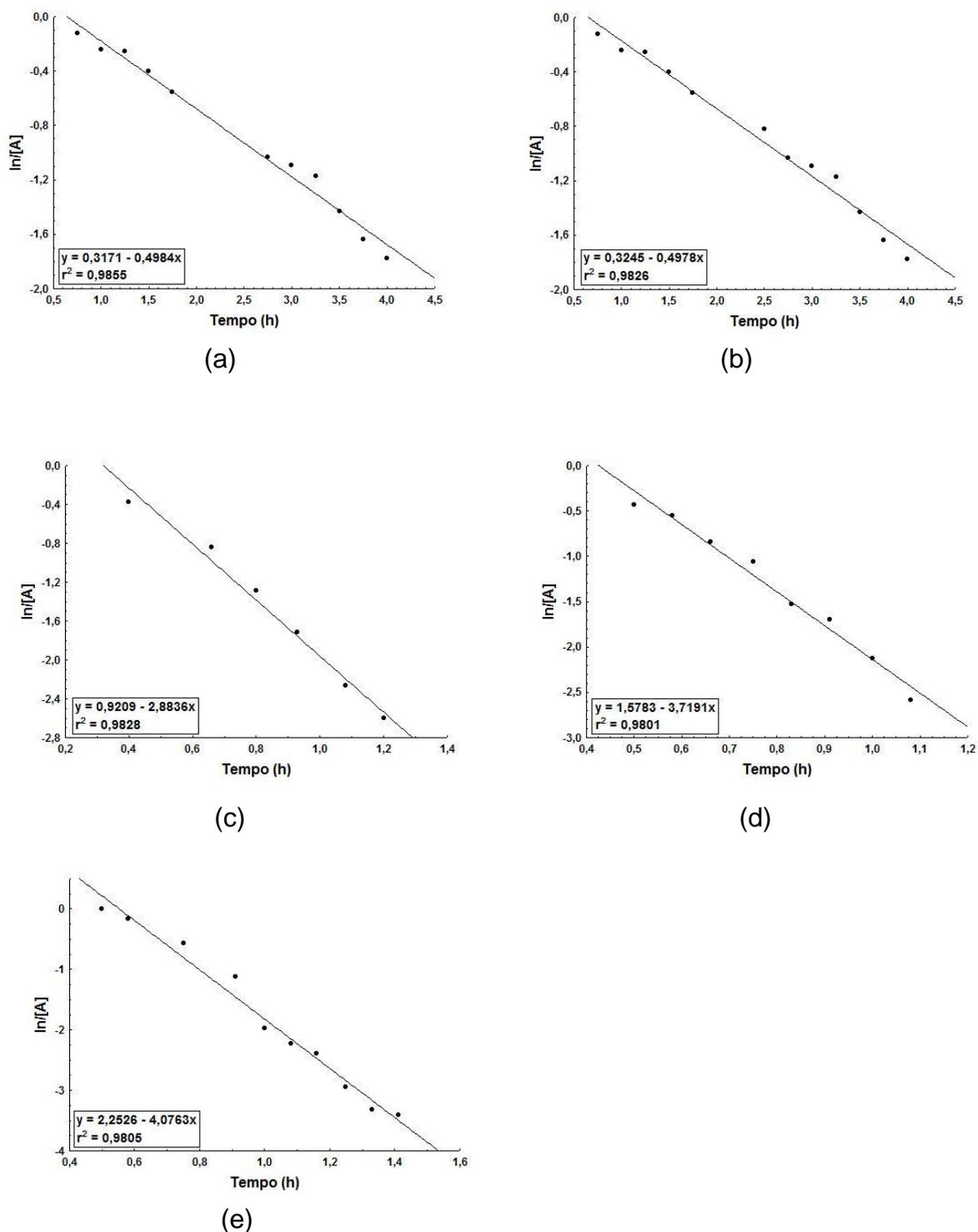
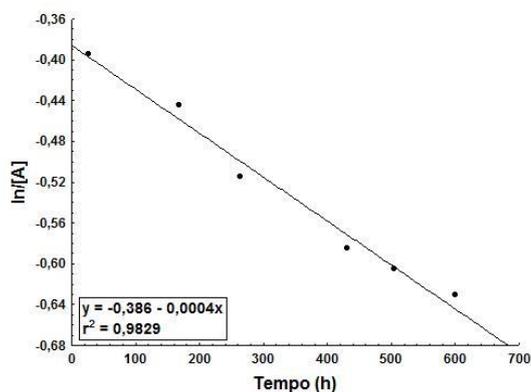
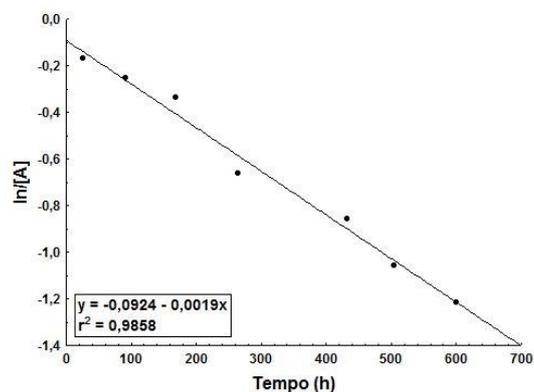


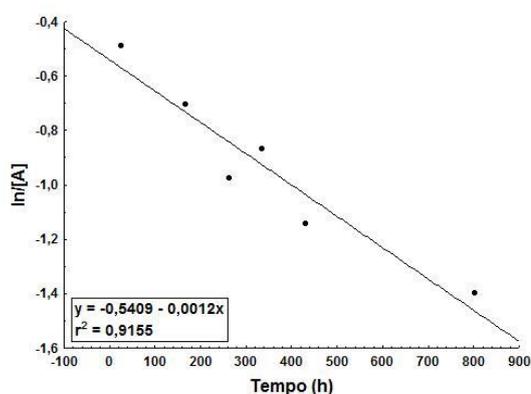
Figura 28. Dados de $\ln[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a $70\text{ }^\circ\text{C}$ (a), $80\text{ }^\circ\text{C}$ (b), $100\text{ }^\circ\text{C}$ (c), $110\text{ }^\circ\text{C}$ (d) e $120\text{ }^\circ\text{C}$ (e) de PO de FS bruta.



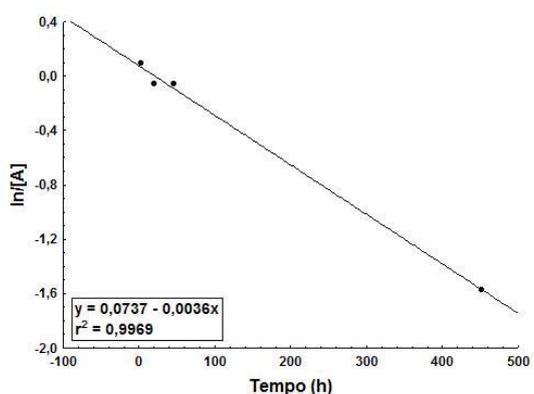
(a)



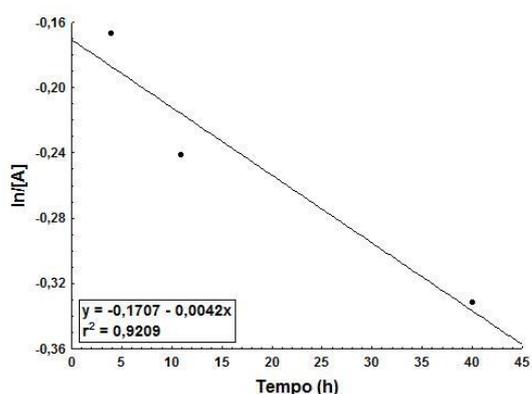
(b)



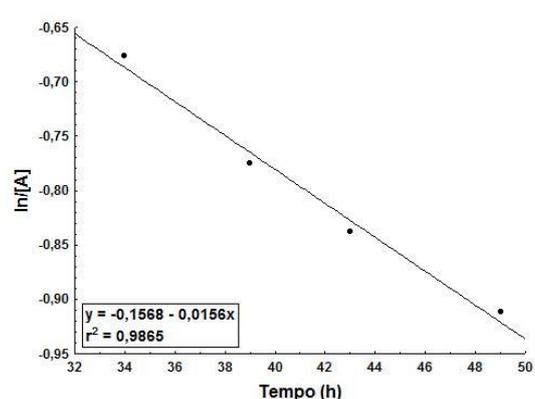
(c)



(d)

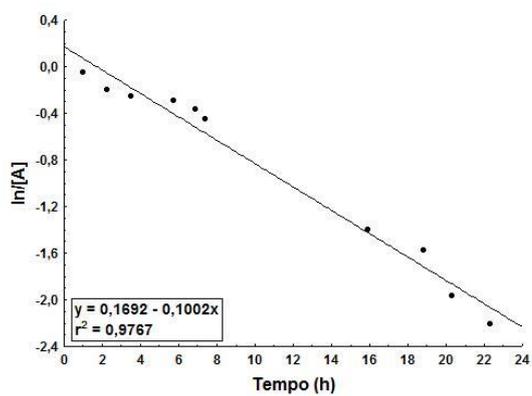


(e)

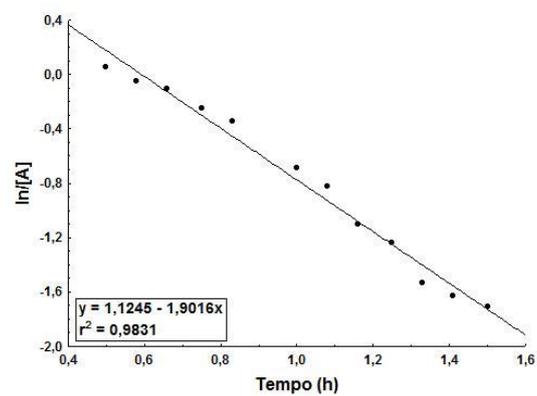


(f)

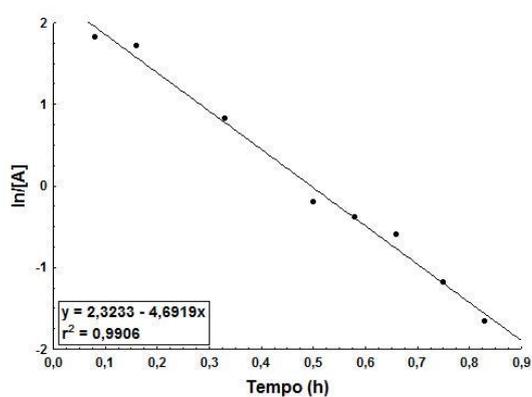
Figura 29. Dados de $\ln[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 0 °C (a), 10 °C (b), 30 °C (c), 40 °C (d), 50 °C (e) e 60 °C (f) de PO de FS purificada.



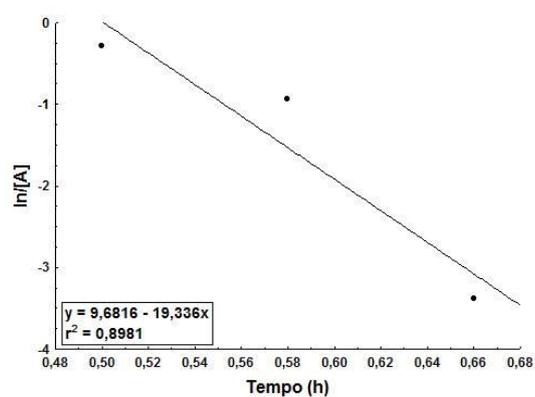
(a)



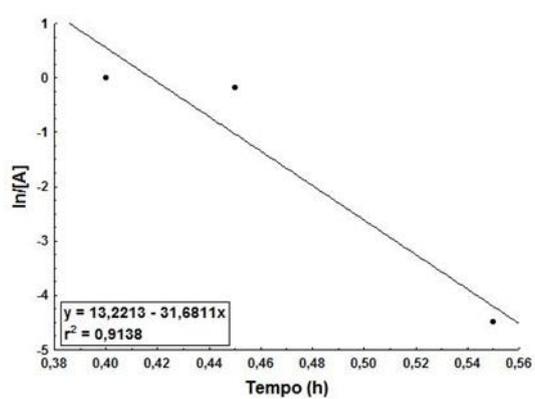
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 30. Dados de $\ln[A]$ em função do tempo para cálculo do K_d a 80 °C (a), 90 °C (b), 100 °C (c), 110 °C (d) e 120 °C (e) de PO de FS purificada.

Apêndice 3. Obtenção da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d), realizada pela linearização da equação de Arrhenius, onde o coeficiente angular corresponde a E_d/R .

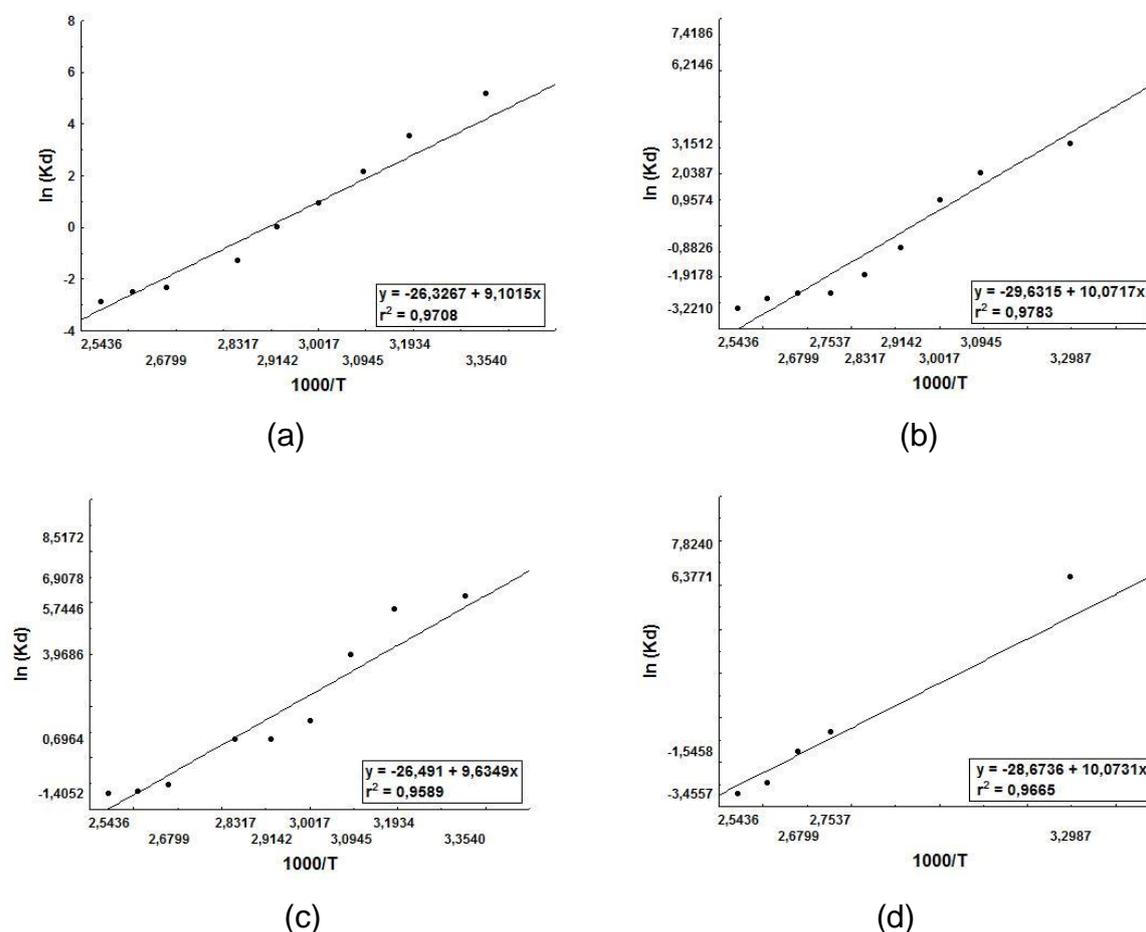


Figura 31. Constantes de desnaturação térmica $\ln(K_d)$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) da PO de FA bruta (a), purificada (b) e PO de FS bruta (c) e purificada (d).

Apêndice 4. Comparação entre as curvas analíticas encontradas nos dois sistemas para DON e De-DON em tampão fosfato em HPLC-UV e HPLC-DAD e DON em tampão fosfato e ACN em HPLC-DAD.

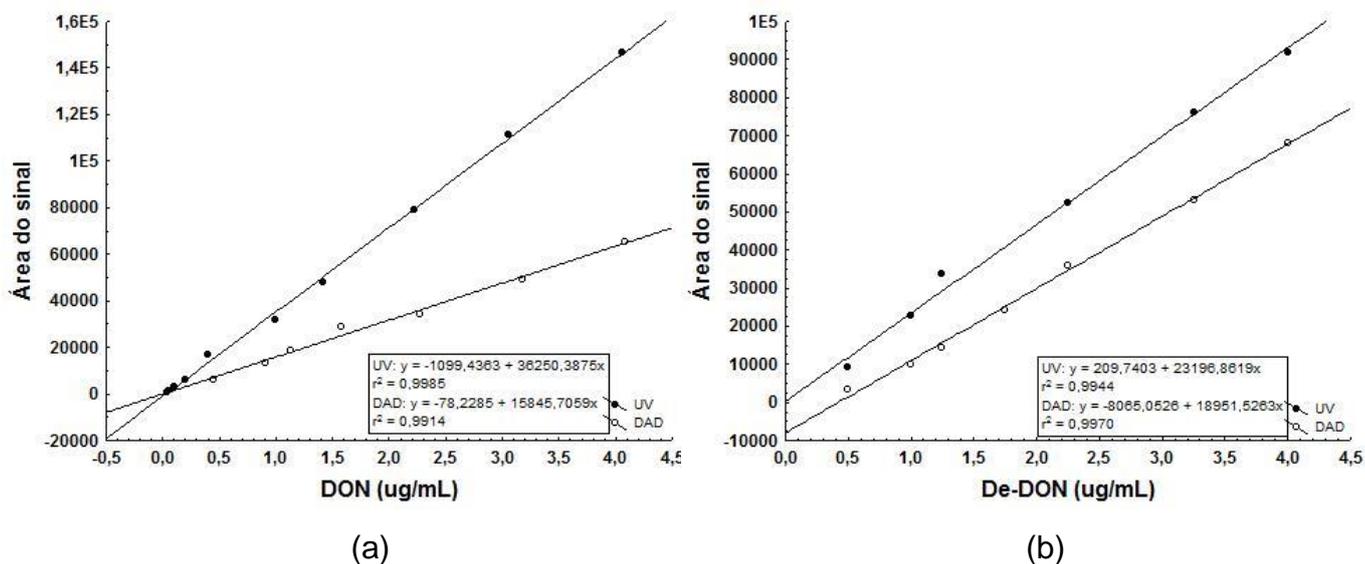


Figura 32. Comparação entre as curvas analíticas encontradas nos dois sistemas para DON (a) e De-DON (b) em tampão fosfato em HPLC-UV e HPLC-DAD.

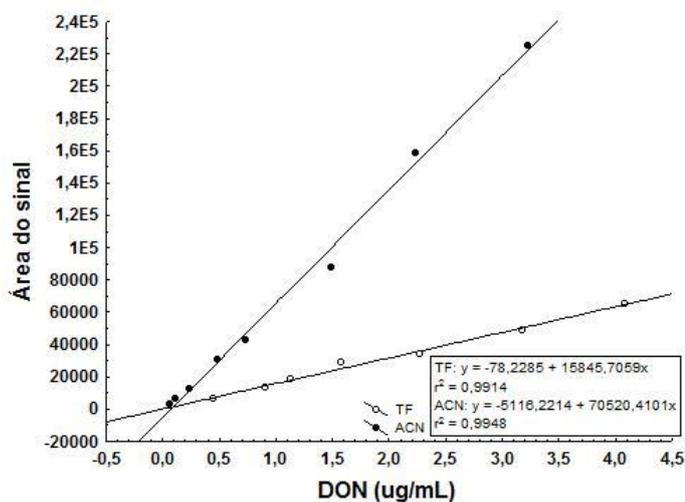


Figura 33. Comparação entre as curvas analíticas encontradas para DON em tampão fosfato e ACN em HPLC-DAD, nas duas colunas testadas.