



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

**BIODEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp: UM
ESTUDO BIOQUÍMICO DE DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE**

**JAQUELINE GARDA BUFFON
ORIENTADORA: ELIANA BADIALE FURLONG**

RIO GRANDE, ABRIL DE 2008.

JAQUELINE GARDA BUFFON

**BIODEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp.: UM
ESTUDO BIOQUÍMICO DE DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE**

**Tese de doutorado apresentada
para o Programa de Pós-graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos para
a obtenção do título de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos**

Orientador: Eliana Badiale-Furlong

RIO GRANDE

2008

AGRADECIMENTO

Os agradecimentos vão a todos que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho destacando pessoas que colaboraram intensamente como:

Minha eterna orientadora Eliana, na verdade muito mais que isto, amiga e companheira, pela dedicação, liberdade, disposição e paciência, além é claro do espírito científico passado incansavelmente, uma cientista notável.

A minha família, Jair e Luis Felipe, que sempre estavam ao meu lado de uma forma ou de outra, dando força, compreensão e amor, construindo a base para a execução e continuidade deste trabalho.

As colegas de laboratório, a Maria de Jesus e todas as meninas com quem trabalhei, suportando juntas as dificuldades diárias.

Aos bolsistas, Roger, Juliana, Kerlei, Fran e a incansável Larine que contribuíram, e muito, para que este trabalho chegasse ao fim e, assim, a um novo começo.

A Prof. Gilma e demais componentes do Lab. De Bioensaio in vitro pela disponibilidade, compreensão e auxílio fundamental na execução de parte do trabalho.

A todos do Lab. De Engenharia Bioquímica e Prof. Jorge, Lab. de Bioquímica Marinha e Prof. Luis Fernando, pelo companherismo e colaboração principalmente na disponibilização de espaço e equipamentos.

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

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

RESUMO

A contaminação aleatória de alimentos por micotoxinas afeta as condições de sanidade das dietas de humanos e animais. Dentre as toxinas fúngicas, deoxinivalenol (DON) se destaca pela freqüente contaminação de produtos agrícolas e alimentos e pela sua resistência a degradação pelo emprego de métodos tradicionais de processamento, o que motiva políticas de controle e a busca por técnicas de descontaminação. A descontaminação biológica empregando processos fermentativos tem sido apontada como uma alternativa promissora, pois permite degradar micotoxinas através do sistema enzimático microbiano e melhorar características funcionais e sensoriais de matérias-primas e insumos alimentícios. Este trabalho teve por objetivo estudar condições e mecanismos de biodegradação de deoxinivalenol empregando *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. em sistemas fermentativos submersos. Para tanto, foi necessário adequar metodologia para reação de derivação na determinação cromatográfica de DON; estudar o potencial e condições de degradação via fermentação submersa por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.; e avaliar a atividade de oxidoreduases e a citotoxicidade dos extratos fermentados. A otimização da metodologia estabeleceu a melhor condição para a reação de derivação com 200 µL de anidrido trifluoroacético e 18 mg de bicarbonato de sódio, durante 6 minutos a 74 °C na faixa entre 7 e 21 µg de DON. A quantificação de DON residual no meio fermentado mostrou que as espécies fúngicas *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae* possuem a capacidade de degradar DON demonstrando índices médios de 87,4 e 62,4% respectivamente, principalmente quando o meio submerso foi água estéril e fermentação realizada durante 48 horas. A velocidade máxima de degradação neste intervalo foi de 10,8 e 12,4 ppb/h, observando também um aumento na atividade específica da enzima peroxidase. Os extratos dos fermentados com *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. apresentaram efeito de inibição de proliferação celular (IC₅₀) quando concentrados 10 vezes em 48 e 72 horas respectivamente. Os meios fermentados com *Rhizopus* sp. apresentaram menor efeito (1,5 vezes) quando comparado com *Aspergillus oryzae*.

Palavras-chave: Deoxinivalenol, descontaminação, fermentação submersa.

ABSTRACT

Random food contamination by mycotoxins affects sanitary conditions in both human and animal diets. From among all fungal toxins, deoxynivalenol (DON) is the most frequently found toxin in the contamination of agricultural foods and products, and it is prominent for its resistance to degradation when traditional processing methods are used. This has in turn encouraged a search for both control policies and decontamination techniques. Biological decontamination with the use of fermentation processes has been suggested as a promising alternative, because it allows degradation of mycotoxins by means of the microbial-enzymatic system, which improves the functional and sensorial characteristics of raw materials and alimentary insumes. This present research is aimed at studying deoxynivalenol biodegradation conditions and mechanisms by using *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus sp.* in submerged fermentation systems. To realize this, it has been required the adjusting of methodology for derivatization reaction to DON determination by gas chromatography; to studying degradation potential and conditions through submerged fermentation by *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus sp.* was also necessary; as well as evaluating the oxydoreductases activity and the cytotoxicity of fermented extracts. The methodology optimization has established the best condition for the derivatization reaction with 200 μ L of TFAA and 18 mg of sodium bicarbonate during 6 minutes at 74 °C in the range from 7 to 21 μ g of DON. Quantification of residual DON in a fermented environment has demonstrated that fungal species *Rhizopus sp.* and *Aspergillus oryzae* have the ability to degrade DON, indicating average rates of 87,4 and 62,4% respectively, especially when the submerged environment has consisted of sterile water and the fermentation has taken place for 48 hours. The maximum degradation velocity in this interval was 10,8 and 12,4 ppb/h, with an increase in the specific activity of the peroxidase enzyme having been observed. The extracts of those fermented with *A. oryzae* and *Rhizopus sp.* have indicated effects on inhibition of proliferation (IC_{50}) when concentrated 10 times in 48 and 72 hours respectively. The environments fermented with *Rhizopus sp.* have shown less effect (1,5 times) when compared to *Aspergillus oryzae*.

Keywords: Deoxynivalenol, decontamination, submerged fermentation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Micotoxinas	22
3.2 Deoxinivalenol	24
3.2.1 Ocorrência de deoxinivalenol.....	25
3.2.2 Metodologia analítica para determinação de deoxinivalenol	28
3.3 Degradação de micotoxinas	33
3.4 Biodegradação	38
3.4.1 Biodegradação de micotoxinas.....	39
3.5 Avaliação Biológica.....	47
4 REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DERIVAÇÃO DE DEOXINIVALENOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	71
RESUMO	72
1 INTRODUÇÃO.....	73
2 PARTE EXPERIMENTAL	75
2.1 Reagentes	75
2.2 Padrão de deoxinivalenol.....	75
2.3 Padronização de metodologia para derivação	75
2.4 Quantificação por cromatografia gasosa.....	77
2.5 Confirmação do tempo de retenção, limite de quantificação, detecção e linearidade	78
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	78

4 CONCLUSÃO	83
5 REFERÊNCIAS	84
CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR <i>Aspergillus oryzae</i> E <i>Rhizopus</i> sp. EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	87
RESUMO	88
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1 Micotoxina.....	90
2.2 Espécies fúngicas	90
2.3 Cinética de degradação	91
2.3.1 Fermentação submersa	91
2.3.2 Quantificação de DON residual	91
2.3.3 Velocidade de degradação.....	92
2.4 Tratamento estatístico.....	92
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	92
4 CONCLUSÃO	96
5 REFERÊNCIAS	96
DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR <i>Aspergillus oryzae</i> E <i>Rhizopus</i> sp. EM SISTEMA SUBMERSO DE FERMENTAÇÃO.....	99
RESUMO	100
1 INTRODUÇÃO.....	101
2 MATERIAIS E MÉTODOS	102
2.1 Micotoxina.....	102
2.2 Espécies fúngicas	102
2.3 Estudo de degradação de DON	103
2.4 Planejamento experimental.....	103
2.4 Determinação de DON residual	104
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
4 CONCLUSÃO	111
5 REFERÊNCIAS	111

DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) E A ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM SISTEMA FERMENTATIVO SUBMERSO.....	115
RESUMO.....	115
1 INTRODUÇÃO.....	116
2 MATERIAIS E MÉTODOS	117
2.1 Micotoxina.....	117
2.2 Experimento 1: Avaliação da atividade da enzima peroxidase (PO) durante fermentação submersa	117
2.3 Experimento 2: extração de enzimas PO do meio fermentado.....	118
2.4 Tratamento estatístico.....	119
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	120
4 CONCLUSÃO	124
5 REFERÊNCIAS	124
CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS BIODEGRADADOS POR <i>Aspergillus oryzae</i> E <i>Rhizopus</i> sp.....	128
RESUMO.....	128
1 INTRODUÇÃO.....	129
2 MATERIAIS E MÉTODOS	130
2.1 Solução de DON.....	130
2.2 Preparo das células eritroleucêmicas e ensaio citotóxico.....	131
2.3 Respostas de células eritroleucêmicas a citotoxicidade de DON	131
2.3.1 Triagem da capacidade citotóxica para DON	131
2.3.2 Obtenção de extratos fermentados	131
2.3.3 Triagem de citotoxicidade de extratos fermentados contaminados	132
2.4 Estimativas de citotoxicidade e estatísticas.....	133
3 RESULTADOS	134
3.1 Capacidade citotóxica das células eritroleucêmicas.....	134
3.2 Citotoxicidade de extratos fermentados biodegradados	137
4 CONCLUSÃO	141
5 REFERÊNCIAS	141

CAPÍTULO IV	146
5 CONCLUSÃO GERAL.....	147
6 REFERÊNCIAS.....	148
ANEXO 1.....	165

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Micotoxinas seus efeitos em humanos e animais.....	22
Tabela 2. Classificação de tricotecenos segundo a presença de grupos funcionais substituintes.....	24
Tabela 4. Métodos químicos de detoxificação de micotoxinas.....	35
Tabela 5. Detoxificação de ocratoxina A por aquecimento.....	36
Tabela 6. Detoxificação de aflatoxinas por diferentes métodos.....	37
Tabela 7. Efeito do processo de panificação na contaminação de DON.	44
Tabela 8. Efeitos do processo fermentativo nos níveis de contaminação de micotoxinas.	45

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DERIVAÇÃO DE DEOXINIVALENOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Tabela 2. Valores de área relativa para o planejamento fatorial 2 ² com pontos axiais e 3 pontos centrais (b).....	76
Tabela 3. Planejamento fatorial 2 ² com pontos axiais e 2 centrais (c).....	77
Tabela 4. Efeitos e coeficientes para variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico.	79
Tabela 5. Dados da anova para planejamento experimental avaliando tempo, temperatura e catalisador.	82

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp. EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Tabela 1. Conteúdo residual de DON e percentual de degradação durante fermentação submersa.....	93
---	----

DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp. EM SISTEMA SUBMERSO DE FERMENTAÇÃO

Tabela 1. Planejamento fatorial fracionário 3 ⁽³⁾ para cada cepa fúngica.....	104
Tabela 2. Planejamento experimental 2 ⁽²⁾ para cada cepa fúngica.....	104
Tabela 3. Massa de DON residual e percentual de degradação após processo fermentativo (planejamento fatorial fracionário 3 ⁽³⁾)	107
Tabela 4. Efeitos e coeficientes para variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico (3 ⁽³⁾).	107
Tabela 5. Massa de DON e percentual de degradação segundo planejamento experimental 2 ²	108
Tabela 6. Valores de efeitos, coeficientes para fermentação com <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Rhizopus</i> sp.....	109

DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) E A ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM SISTEMA FERMENTATIVO SUBMERSO

Tabela 1. Massa residual, percentual de degradação e velocidade de degradação de DON durante fermentação submersa.	121
Tabela 2. Atividade específica da enzima PO (U) durante fermentação submersa com <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Rhizopus</i> sp.	122
Tabela 3. Teor protéico e atividade enzimática durante extração proteica.	124

CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS BIODEGRADADOS POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp.

Tabela 1. Anova para os tratamentos em relação a concentração celular (x.10 ⁴ células/ml), valores médios dos tratamentos e diferença entre médias.....	135
Tabela 2. Valores de percentual de inibição da proliferação celular (% ic), velocidade específica de crescimento e tempo estimado para duplicação celular para k-562 para os tratamentos.....	136

Tabela 3. Anova para os testes de viabilidade celular (% de células viáveis), valores médios dos tratamentos e diferença entre médias. 136

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Estrutura química dos tricotecenos. 23

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DERIVAÇÃO DE DEOXINIVALENOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 1. Superfície de resposta para temperatura e tempo. 81

Figura 2. Superfície de resposta para agente derivatizante e catalisador. 81

Figura 3. Cromatograma de deoxinivalenol com adição de padrão interno. 83

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp. EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Figura 1. Cromatograma de meio fermentado contaminado com DON. 92

Figura 2. cinética de degradação de DON durante 240 horas de fermentação submersa pelas espécies fúngicas *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. 93

DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp. EM SISTEMA SUBMERSO DE FERMENTAÇÃO

Figura 1. Cromatograma de meio fermentado contaminado com DON. 106

Figura 2. Recuperação de DON em meio fermentado com (a) *Aspergillus oryzae* e (b) *Rhizopus* sp. 110

DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) E A ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM SISTEMA FERMENTATIVO SUBMERSO

Figura 1. Cromatograma de meio fermentado contaminado com DON. 120

Figura 2. Velocidade de degradação de DON e atividade de enzimas oxidativas 123

CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS BIODEGRADADOS POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus sp.*

Figura 1. Ensaio citotóxico para os diferentes tratamentos	133
Figura 2. Curva de crescimento celular da cultura k-562 durante ensaio de 72 horas	135
Figura 3. Cromatograma do extrato fermentado contaminado com DON.....	137
Figura 4. Curva de crescimento celular (k-562) durante 72 horas	139

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

LQ: Limite de Quantificação
LD: Limite de Detecção
CG – MS: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CG – FID: Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
HPLC: Cromatografia Líquida de alta pressão
HPLC – UV: Cromatografia Líquida com detector de fluorescência
HPLC – MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas sequencial
HPLC – MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
CCD: Cromatografia de Camada Delgada
CFS: Cromatografia de Fluido Supercrítico
IAC: Coluna de imunoafinidade
TFAA: Anidrido trifluoroacético
HFBI: Heptafluorobutilimidazol
PFBI: Pentafluorobutilimidazol
TMS: Trimetilsilil
BSA: Bis-trimetilsililacetamida
HMDS: Hexametildisilazano
TMSIM: Trimetilsilimidazol
ZEA: Zearalenona
DON: Deoxinivalenol
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
AFLA: Aflatoxina
OTA: Ocratoxina A
AcDON: Acetildeoxinivalenol
DOM-1: deoxinivalenol deepoxidado
 β -ZEL: β -zearalenol
DAS: Diacetoxiscirpenol
GRAS: Generally Recognized as Safe
PBS: Tampao fosfato salino
DMSO: Dimetilsulfóxido
U: Unidade enzimática
DB-17: 50%-fenil metilpolisiloxano
DL 50 – dose letal para 50% da população

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho propôs estudar a degradação de deoxinivalenol (DON) empregando processos biotecnológicos. A proposta considerou o fato de que estão disponíveis informações na literatura mundial sobre a contaminação aleatória de alimentos por fungos e micotoxinas que alteram as condições de sanidade das dietas de humanos e animais de criação. Dentre as toxinas fúngicas, deoxinivalenol (DON) se destaca pela freqüente contaminação de produtos agrícolas e alimentos e, em geral a presença deste composto não pode ser facilmente correlacionada com variáveis bióticas e abióticas identificadas na produção, processamento e armazenamento dos alimentos (TANAKA, 2001; HARDIE, EVANS, WILD, 2001; RICHARD, 2007).

A contaminação por esta toxina em produtos agroindustriais e principalmente seus resíduos além de apresentarem risco à saúde, causam perdas econômicas por tornar os produtos inadequados para consumo. Neste caso, os resíduos do beneficiamento de grãos, onde ficam os maiores teores da micotoxina, são um problema para as empresas, pois dificultam o emprego como fonte de outros insumos alimentícios para humanos ou animais e ainda promovem a recontaminação do ambiente por seu descarte (BATA & LASZTITY, 1999).

Os sintomas de intoxicação por DON podem ser agudos e crônicos dependendo da quantidade presente em alimentos e são relatados como distúrbios gastrointestinais, alterações no sistema imunológico, hematotoxicidade decorrente da inibição da síntese protéica, RNA e DNA (MURTHY et al., 1985; BAARS et al. 1999; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999; YOSHISAWA, 2001; SUDAKIN, 2003; DANICKE et al., 2004; KRABBE, 2005). Trabalhos experimentais submetendo animais a baixos níveis de exposição a micotoxina mostram que os efeitos danosos são irreversíveis (SUDAKIN, 2003; LARSEN et al., 2004). Os principais resultados toxicológicos, no entanto não permitem atribuir conclusivamente carcinogenicidade, toxicidade aos processos reprodutivos ou teratogenicidade a DON (MEKI et al., 2001).

Medidas preventivas estão sendo adotadas em diferentes segmentos da cadeia produtiva de alimentos em vários países (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2006). No entanto, a versatilidade de desenvolvimento fúngico é difícil de ser controlada o que faz com que técnicas e políticas de controle e de descontaminação venham sendo grandemente incentivadas por órgãos responsáveis pelo abastecimento de alimentos e pela saúde pública. Algumas operações unitárias podem diminuir os níveis de toxinas, mas não eliminam o problema do consumo crônico, decorrente de hábitos alimentares característicos de diferentes regiões do mundo. A descontaminação biológica empregando processos fermentativos parece ser uma alternativa promissora, pois permite seleção de

microrganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) para degradar micotoxinas e estabelecer simultaneamente condições fermentativas que podem até melhorar características funcionais dos alimentos (PASTER et al. 1992; VARGA et al. 2000).

O deoxinivalenol (DON) se destaca não só pela sua alta incidência em produtos agrícolas e alimentos, como também pela sua resistência a degradação pelo emprego de métodos tradicionais de processamento, especialmente físicos e químicos. Para esta toxina, os métodos físicos têm sua importância na redução superficial da contaminação, não sendo efetivos principalmente quando se considera o problema de consumo crônico. No caso de emprego de métodos químicos para descontaminação tem-se que o produto final pode ter sua qualidade alterada seja nas características químicas, físicas, sensoriais e/ou funcionais, não sendo recomendado para produção em larga escala. Os métodos microbiológicos, quando testado para outras toxinas, apresentam alguns resultados positivos tanto na redução da contaminação como na qualidade final do material descontaminado, tendo como vantagem a menor perda da qualidade e em certas situações ocorre a melhora das propriedades funcionais (CACCIAMANI et al., 2007). Em contrapartida, alguns microrganismos como bactérias e leveduras se caracterizam por não serem adequados a produtos com baixa atividade de água.

O uso de fungos para a descontaminação de micotoxinas parece ser uma alternativa promissora, principalmente para a toxina em estudo que dificilmente é metabolizada ou destruída através de processos físicos ou químicos, adotados industrial e/ou domesticamente. No Laboratório de Micotoxinas da FURG têm sido estudados processos fermentativos para descontaminação desde 1999, sendo o atual foco de estudo, motivado pela observação de descontaminação efetiva (até 80% para algumas micotoxinas), aprofundar o conhecimento sobre as condições e os mecanismos pelos quais, os fungos do tipo GRAS, atuam como agentes biológicos de descontaminação (CACCIAMANI et al., 2007; GARDA et al., 2005). Estes dados são concordantes com informações de literatura que atribuem a alguns microrganismos a produção de enzimas que podem alterar a estrutura das micotoxinas e proteínas que conjugam-se a estas tornando-as menos ativas como agentes patogênicos (PASTER et al., 1992; WESTBY, REILLY, BAINBRIDGE, 1997).

Para o emprego dos substratos farelos de cereais, abundantes e freqüentemente contaminados, disponíveis na região sul do Brasil (NUNES, et al., 2003), seria necessário o estabelecimento das condições de fermentação que promovam biodegradação, conhecer a via de degradação para assim futuramente potencializá-la, e verificar a toxicidade dos resíduos para gerar insumos inócuos. O emprego destes em formulações alimentícias pode ser uma forma de aumentar o valor nutritivo de alimentos, não só pela biodegradação de toxinas como também pelo maior aporte de nutrientes que podem ser disponibilizados durante os processos fermentativos. O emprego de farelos cereais fermentados descontaminados

também abre a perspectiva de se agregar valor a insumos e minimizar os riscos de contaminação ambiental pelo maior aproveitamento dos subprodutos e resíduos da agroindústria.

Estes aspectos nortearam a formulação da hipótese deste trabalho: os microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. metabolizam o deoxinivalenol, diminuindo a toxicidade de sistemas contaminados. Para demonstrá-la, a estratégia adotada foi estudar condições e mecanismos de biodegradação de deoxinivalenol empregando *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. em sistemas fermentativos submersos sob diferentes condições e acompanhar a toxicidade dos produtos fermentados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar condições e mecanismos de biodegradação de deoxinivalenol empregando *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. em sistemas fermentativos submersos.

2.2 Objetivos específicos

Otimizar metodologia para determinação de DON em meio fermentado.

Identificar a capacidade das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. em degradar DON em sistema submerso.

Estudar o mecanismo empregado por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. para diminuir os níveis de DON durante processo fermentativo.

Avaliar a citotoxicidade residual de DON após fermentação com os microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micotoxinas

Os fungos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários denominados de micotoxinas. Estes compostos compreendem diversas estruturas, inclusive algumas relativamente simples (UENO, 1980, 1983; FONSECA, 1996; RICHARD, 2007), que ocorrem em micélios de fungos filamentosos, normalmente após uma fase de crescimento balanceado seguido por condições de estresse (FONSECA, 1996; MELLO & MACDONALD, 1997). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Fusarium* estão entre os gêneros fúngicos que ocorrem em alimentos e possuem espécies toxigênicas (SCHRODTER, 2004; ATROSHI et al., 2002).

A detecção de alimentos contaminados por fungos toxigênicos não significa que micotoxinas estejam presentes, mas indica a possibilidade de produção em resposta as condições do ambiente. Por outro lado, a ausência destes fungos no alimento não corresponde a ausência das micotoxinas que persistem por um longo período em situações diversas mesmo que os microrganismos tenham perdido sua viabilidade (UENO, 1986).

As toxinas fúngicas comumente detectadas são aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), tricotecenos (deoxinivalenol-DON e toxina T-2), zearalenona, fumonisinas e certos alcalóides. Os tricotecenos são considerados um dos mais importantes grupos de micotoxinas, sendo descrito na literatura mais de 100 estruturas detectadas contaminando naturalmente cerca de 25% dos produtos agrícolas produzidos no mundo (ATROSHI et al., 2002; TANAKA, 2001; MEKY, HARDIE, EVANS, WILD, 2001; RICHARD, 2007). Na Tabela 1 estão apresentados alguns dos efeitos do consumo de alimentos contaminados em animais e humanos.

Tabela 1. Micotoxinas e seus efeitos em humanos e animais.

Micotoxina	Micotoxicose em humanos	Micotoxicose em animais
Aflatoxinas	Hepatotoxicose, carcinogênese hepática, baixa conversão alimentar, redução da lipase pancreática	Aflatoxicose, hepatocarcinogênese, síndrome de Rey, degeneração gordurosa nas vísceras
Ocratoxina A	Nefrotóxica, Nefropatia dos Balkans, hepatotóxica, desidratação	Tumor renal
Zearalenona	Efeitos estrogênicos, infertilidade	Aborto, câncer cervical
Tricotecenos	Perda do apetite, vômito, diarreia, perda de peso, dermonecrose.	Aleucia tóxica alimentar (ATA), doença akakabi-bio, estaquiobotriotoxicose

Os tricotecenos são compostos sesquiterpenóides tetracíclicos caracterizados por apresentar um grupo epóxido (12-13 epoxitricotec-9-eno) no centro da sua molécula (ATROSHI et al., 2002; NAGY et al., 2005) e uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 conforme Figura 1. Estas estruturas estão classificadas em grupos de acordo com funcionalidade presente nas diferentes posições da estrutura básica, subdivididos em quatro grupos principais: A, B, C e D apresentados na Tabela 2 e esboçados na Figura 1.

No grupo A estão os tricotecenos cuja posição 8 tem como substituintes grupos acilados ou hidroxilas, incluindo assim toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol e diacetoxiscirpenol (DAS). O grupo B é constituído por compostos onde na posição 8 está um grupamento cetônico, incluindo o deoxinivalenol (DON, vomitoxina), nivalenol e fusarenon-x. Os constituintes do grupo C possuem dois grupamentos epóxidos, como a crotocina. O grupo D é constituído pelos macrocíclicos, onde estão a roridina, a verrucarina e a satratoxina (UENO, 1980; SWANSON & CORLEY, 1989; MELLO & MACDONALD, 1997).

A identificação de novas estruturas gerou a proposição para um grupo E onde estariam os compostos tricotecadieno e a verrucarina K, que não contém o anel epóxi no C-12,13; e um grupo F para os tricotecenos abertos macrocíclicos como o tricodieno e tricodermadienediol entre outros, que podem ser intermediários nas vias biossintéticas dos tricotecenos macrocíclicos (DALL'ASTA et al., 2004).

Os átomos de carbono destes compostos ligados a um grupo hidroxila, acetil ou cetônico podem sofrer reações químicas características destes grupamentos. Estas reações são principalmente realizadas para estudo da estrutura química e verificação da sua presença em alimentos e rações (UENO, 1980; SNYDER, 1986; BADIALE - FURLONG, 1992).

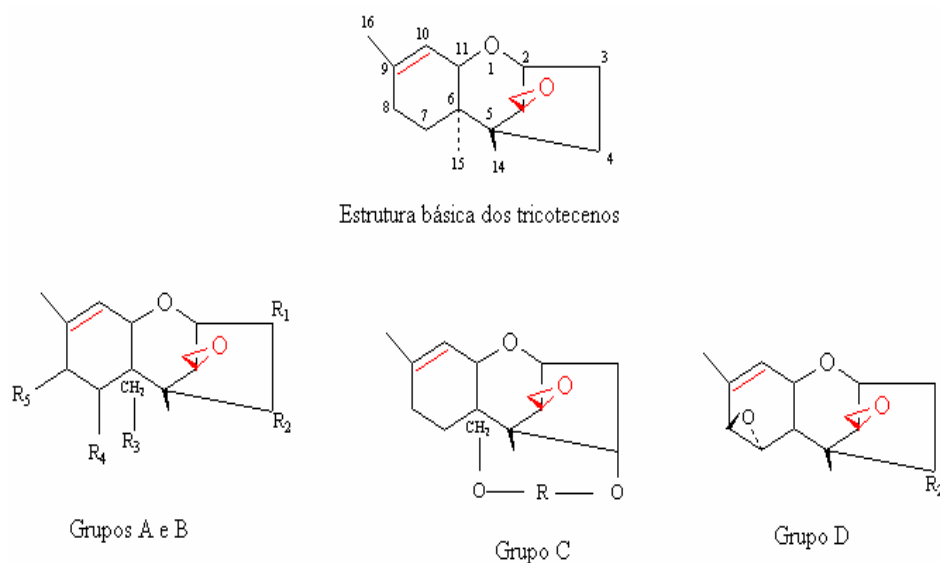


Figura 1. Estrutura química dos tricotecenos.

Fonte: Sydenham & Thiel, 1996.

Tabela 2. Classificação de tricotecenos segundo a presença de grupos funcionais substituintes.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Grupo A					
Verrucarol (VER)	- H	-OH	-OH	-H	-H
Scirpentriol (SCT)	-OH	-OH	-OH	-H	-H
Diacetoxiscirpenol (DAS)	-OH	-Oac	-Oac	-H	-H
T-2 tetrol (T24)	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Toxina HT-2 (HT-2)	-OH	-OH	-Oac	-H	-O-ival
Toxina T-2 (T-2)	-OH	-Oac	-Oac	-H	-O-ival
Grupo B					
Nivalenol (NIV)	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
Fusarenona-X (F-X)	-OH	-Oac	-OH	-OH	=O
Deoxinivalenol (DON)	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3-acetil-DON (3AD)	-Oac	-H	-OH	-OH	=O
15-acetil DON (FAD)	-OH	-H	O-ac	-OH	=O
Grupo C					
Crotocol	R ₂ = -OH				
Crotocina (CRO)	R ₂ = -OCOCH=CHCH ₃				
Verrucarina A (VER A)	$ \begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} = \text{CCHOHCHMeCH}_2\text{CH}_2\text{OCCH} = \text{CHCH} = \text{CHC} \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} = \text{CCHOHCHMeCH}_2\text{CH}_2\text{OCCH} = \text{CHCH} = \text{CHC} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{MeCHOH} \end{array} $				

Fonte: Sweeney e Dobson, 1998.

3.2 Deoxinivalenol

O deoxinivalenol (vomitoxina, DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado tanto em alimentos como em rações. Sua molécula se caracteriza por apresentar um sesquiterpenóide tetracíclico com sete centros estéereos pertencente ao grupo B dos tricotecenos. O seu número de registro é 51481-10-8 e sua fórmula empírica é C₁₅H₂₀O₆, nomeado como 12,13-epoxi-3,4,15-trihidroxitricotec-9-en-8-one, (3 α ,7 α)-(9Cl) (ATROSHI et al., 2002; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2006).

A síntese de DON e outros tricotecenos do grupo A e B parece ser característica do gênero *Fusarium*, um dos mais abundantes gêneros possuidores de espécies toxigênicas encontrados em produtos alimentícios principalmente grãos de cereais (MELLO &

MACDONALD, 1997; RICHARD, 2007). Além do *Fusarium*, outros gêneros como *Mirothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimosporium* e *Stachybotrys* podem produzir esta micotoxina geralmente nas fases de pré ou pós colheita e em condições de temperatura variável entre 0 a 35°C e umidade relativa entre 80 e 90% (BADIALE-FURLONG, SOARES e LASCA, 1995a; WAGACHA e MUTHOMI, 2007).

A via biossintética de DON é a do ácido mevalônico (C₆), unidade chave na biossíntese destes terpenóides. O ácido mevalônico deriva da condensação de três moléculas de acetil-CoA, com perda de uma molécula de água e outra de dióxido de carbono, e provém de unidades de isopreno. Assim, a via de biossíntese de isoprenóide é designada como rota mevalonato (SWEENEY & DOBSON, 1998; YOSHIZAWA, 2001).

O DON é formado através da ciclização do intermediário farnesil pirofosfato - FPP (três unidades isopreno) para tricodieno por uma ciclase, síntase tricodieno, com subseqüentes reações de oxidações, isomerizações, ciclizações e esterificação (SWEENEY & DOBSON, 1998; MOSS e THRANE, 2004). Este composto formado apresenta como característica fundamental a estabilidade, que pode ser verificada durante muitos anos quando estocado a temperatura ambiente ou mesmo aquecido a 135°C (PRONYK, CENKOWSKI, ABRAMSON, 2006; CENKOWSKI et al., 2007).

Em geral, o DON também é resistente à degradação por outros fatores ambientais. É um composto não volátil e pode ser desativado pela destruição do anel epóxido sob condições drásticas ácidas ou alcalinas, na presença de hidretos de alumínio e lítio ou peróxidos e hidratação em autoclave. A enzima epóxido hidrase também é capaz de abrir o anel e produzir glicóis. Todas estas situações causam variações das propriedades físico-químicas, dificultando a detecção deste composto e emprego da matéria-prima descontaminada (UENO, 1983; PRONYK, CENKOWSKI, ABRAMSON, 2006).

O DON, bem como outros tricotecenos, pode ter sua estrutura química alterada pela metabolização por bactérias ou fungos podendo inclusive ser detoxificado (SUDAKIN, 2003).

3.2.1 Ocorrência de deoxinivalenol

A ocorrência natural de micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* é freqüentemente associada a cereais cultivados em países de clima temperado, devido as variáveis abióticas propícias para o desenvolvimento fúngico. Entretanto, nos anos 90, SCOTT (1990) reuniu dados, a partir da literatura já existente, indicando intensa contaminação micotoxicológica em grãos de cereais produzidas por fungos deste gênero em países tropicais. Posteriormente, outros autores demonstraram a ocorrência de tricotecenos

em cereais cultivados em regiões de clima temperado e também tropical (BADIALE-FURLONG, 1995a e 1995b; MELLO & MACDONALD, 1997; PITTED, 1998; MILANEZ, VALENTE-SOARES, BAPTISTA, 2006; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2006).

A contaminação de grãos de cereais é inevitável uma vez que muitas espécies toxigênicas de *Fusarium* são também fitopatogênicas e ocasionam doenças de difícil controle em cultivo de cereais. A inesperada falta de eficácia de pesticidas em geral e em particular de fungicidas para controle de doenças em cereais e conseqüente contaminação de grãos com micotoxinas tem sido o foco de muitos estudos (UENO, 1986; SCOOT, 1992; MELLO et al., 1999, KABAL, DOBSON, VAR, 2006).

Uma característica comum das espécies de *Fusarium* é a sua capacidade de produzir tricotecenos em co-ocorrência com outras micotoxinas, ocasionando importante efeito sinérgico no desencadeamento de sintomatologias das micotoxicoses ocasionadas por consumo de alimentos e rações contaminadas (UENO, 1986; SCOOT, 1992; MELLO et al., 1999; MURPHY et al., 2006).

Apesar do grande número de micotoxinas identificadas quimicamente, muitas outras continuam sendo descritas. Maior gravidade decorre do fato de que um mesmo fungo tem capacidade de produzir uma gama de toxinas, que podem eventualmente não ser detectadas, mas causar sintomas de micotoxicose. Além disto, a sua ação tóxica é afetar órgãos alvos, situação que pode ser agravada pela co-ocorrência afetando vários órgãos, dificultando a associação com o agente causal e a definição da solução.

PLACINTA et al. (1999) descreveram casos em que grãos de cereais e ração animal podem estar sujeitos à contaminação múltipla com tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, as principais micotoxinas do gênero *Fusarium* (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2006) Entre os tricotecenos, o DON e o nivalenol (NIV) co-ocorrem em grãos de cereais regularmente em níveis não aceitáveis (acima de 5 ppm) pelas legislações de alguns países como Polônia, Alemanha, Japão, Nova Zelândia e América (PITTED, 1998). Esta co-ocorrência de DON com outros tricotecenos constitui em um sério problema, agravado pela dificuldade de quantificação da extensão da interação com relação a saúde e desempenho animal (UENO, 1986; SCOOT, 1992; MELLO et al., 1999).

Relatos sobre a presença de DON em produtos alimentícios e suas implicações em diferentes regiões do mundo são apresentados na Tabela 3, onde pode-se observar que, apesar da conscientização sobre os efeitos e riscos desta toxina, os níveis de exposição não vêm sendo reduzidos variando os níveis detectados entre 20 e 8600 ppb, principalmente em cereais e seus subprodutos (MELLO & MACDONALD, 1997; ADEJUMO, HETTWER, KARLOVSKY, 2007; RICHARD, 2007).

Tabela 3. Indicadores sobre a incidência de DON em amostras mundialmente comercializadas.

Amostra	Ocorrência (n° de amostra / % de contaminadas)	Quantificação (ppb)	Recuperação/LD (%/ppb)	Método de quantificação	Referência
Pão	101/92	134	71-103/7	CG-MS	SCHOLLENBERGER et al. (2005)
Farelo de trigo (Alemanha)	5 /100	319-389	- /7	CG-MS	SCHOLLENBERGER et al. (2005) – b
Aveia (Alemanha)	3/67	18-25	92/7	CG-MS	SCHOLLENBERGER et al. (2005) – b
Farelo de aveia (Alemanha)	7/43	14-97	- /7	CG-MS	SCHOLLENBERGER et al. (2005) – b
Farinha de milho (Brasil)	11/9	167	83-113/20	CG-MS	MILANEZ et al. (2006)
Trigo (Inglaterra, Alemanha, França, Canadá, Holanda)	22/86	76-1654	96/25	CG-FID	SCHOTHORST e JEKEL (2001)
Cerveja (Holanda, Alemanha, Bélgica)	51/2	41	92/8	CG-FID	SCHOTHORST e JEKEL (2003)
Cerveja (Brasil)	72/5,3	21	83/21	CG-FID	GARDA et al. (2004)
Milho (Itália)	25/44	20->500	- /18,5	ELISA	CAVALIERI et al. (2005)
Milho (Itália)	25/12	20-2060	89/2	HPLC-MS/MS	CAVALIERI et al. (2005)
Trigo (Argentina)	145/48	Até 8000	100/50	CCD	LORI et al.(2003)
Farinha de trigo (Alemanha)	60/97	15-137	- /12	CG-MS	SCHOLLENBERGER et al. (2002)
Cereais (Rússia)	2166/ 69	50 – 8600	90	CCD e HPLC	TUTELYAN (2004)
Arroz branco (Brasil)	33/3	70	90/54	CG	OLIVEIRA, M.S. et al., 2004
Cevada (Uruguai)	292/até 100	500-10.000	-	Imunoafinidade- fluorescência	PAN et al, 2007
Cerveja (Turquia)	50/0	-	83,2	HPLC - UV	OMURTAG, BEYOGLU, 2007
Milho	40/22,2	9,6 – 745,1	-	HPLC-MS	ADEJUMO, HETTWER, KARLOVSKY, 2007

LD - limite de detecção; LQ – limite de quantificação; CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas; CG-FID-Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama; ELISA; HPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas sequencial; CCD-Cromatografia de Camada Delgada.

3.2.2 Metodologia analítica para determinação de deoxinivalenol

A avaliação do risco de consumo de alimentos contaminados por DON só pode ser estimada a partir de dados confiáveis que reflitam a verdadeira concentração desta toxina em diferentes alimentos ou insumos destes ingeridos diariamente. Conseqüentemente são necessários métodos analíticos exatos que sejam práticos e rápidos, de baixo custo e descarte mínimo de material tóxico, como solventes e resíduos da própria toxina analisada.

Desde a demonstração da toxicidade das micotoxinas, o incentivo ao desenvolvimento de técnicas cromatográficas aplicadas na detecção, análise e caracterização tem se destacando. O uso de técnicas cromatográficas permitem a separação de diferentes metabólitos fúngicos e sua determinação simultânea. Informações sobre técnicas e metodologias têm sido revisadas por diversos autores tais como BETINA (1985), SCOTT (1991), SCOTT, KANHERE e WEBER (1993), SCOTT e LAWRENCE (1997), LANGSETH E RUNGBERGET (1998), PLACINTA et al.(1999), KOTAL et al. (1999), KOCH (2004).

Os procedimentos gerais para análise química de micotoxinas são semelhantes às marchas analíticas clássicas que prevêm amostragem, extração, limpeza, concentração, separação de formas químicas, detecção, confirmação de identidade e quantificação.

A confiabilidade dos resultados analíticos depende fundamentalmente da representatividade da amostragem e dos procedimentos de preparo de amostra analítica. A amostragem deve estar baseada na contaminação crítica da micotoxina, definição de lotes aceitáveis e rejeitáveis, homogeneidade e riscos ao consumidor e produtor (COLE e COS, 1986; FONSECA, 1996; TANAKA, 2001; MATEO et al., 2001; KOCH, 2004).

A amostragem requer grande quantidade de material inicial, correto manuseio, armazenagem, preparação e subamostragem. A granulometria de amostras primárias também pode dificultar o desenvolvimento de uma metodologia adequada (MATEO et al., 2001). A utilização de sistema automático de amostragem tem sido recomendado com a finalidade de reduzir a variação ocasionada por falta de representatividade. A quantidade de amostra analítica empregada para determinar DON, segundo a literatura, varia entre 10 e 50 g, de acordo com aspectos qualitativos e quantitativos complexos relacionados à amostragem específica e a metodologia empregada (LANGSETH e RUNGBERGET; 1998; KOCH, 2004; RAMIREZ et al., 2006).

Devido às particularidades físico-químicas do DON, o processo analítico para detecção desta toxina é mais complexo em relação às demais micotoxinas que apresentam fluorescência natural. A faixa de polaridade do composto dificulta a sua extração da matriz,

necessitando o emprego de solventes, que arrastam também uma série de compostos interferentes, exigindo uma cuidadosa etapa de limpeza.

Os solventes empregados na fase de extração para DON são de caráter polar, como mistura de solventes orgânicos com água. Originalmente foram empregados procedimentos utilizando metanol:água (SCOTT, 1991; SCOTT, WEBER, KANHARE, 1997; SYDENHAM e THIEL, 1996; SOARES e RODRIGUES-AMAYA, 1989; BADIALE-FURLONG e SOARES, 1995a). Atualmente o sistema mais empregado é o que contém acetonitrila em diferentes proporções com água. A utilização de água no meio favorece a penetração hidrofílica nos tecidos, resultando em maior eficiência na extração. Variações nas proporções dependem fundamentalmente da polaridade das mitoxinas em estudo a serem extraídas variando de 75:25 de acetonitrila:água a 84:16 (v/v) (EGMOND e PAULSCH, 1986; RADOVÁ et al., 1998; TANAKA et al., 2000; MATEO et al., 2001; LABUDA et al., 2005; IOOS et al., 2005; DEMEKE et al., 2005; PARK et al., 2005; CAVALIERE et al., 2005; MILANEZ et al., 2006).

A limpeza do extrato influencia diretamente na detecção e quantificação da toxina, podendo ser realizada empregando várias etapas como clarificação, desengorduramento ou métodos com colunas cromatográficas. A clarificação é feita por adição de agentes precipitantes para proteínas e outras macromoléculas, sendo o sulfato de amônio um dos mais empregados. Amostras gordurosas requerem uma etapa de desengorduramento geralmente utilizando a partição líquido-líquido (TANAKA et al., 2000). O emprego de minicolunas de limpeza para DON é comum e os adsorventes geralmente utilizados são sílica gel, florissil, carvão ativo, carbono, celite e alumina, individualmente ou em misturas (SCOTT, 1982; BADIALE-FURLONG e SOARES, 1995a; DEMEKE et al., 2005; RAMIREZ et al., 2006). Colunas pré-empacotadas (sep-pak) como C18 SPE, Romer Columns, MycoSep #225 podem ser adquiridas comercialmente apresentando melhor desempenho quanto a recuperação principalmente para tricotecnos de baixa polaridade. Dentre estas, MycoSep #225 apresenta os melhores resultados de limpeza de extrato, recuperação, significativa redução de tempo de análise, bem como redução de descarte de solvente (UENO, 1983; SCOTT, 1993; RADOVÁ et al., 1998; ARIM e SARDJONO, 1999; TANAKA, 2001; MATEO et al., 2001; KOCH, 2004; LABUDA et al., 2005; MILANEZ et al., 2006).

Os chamados métodos rápidos têm utilizado coluna imunoquímica, composta por enzima ligada a um adsorvente (ELISA) e coluna de imunoafinidade (IAC). Estes são mais simples e econômicos quando comparados com os cromatográficos, porém apresentam uma menor exatidão e confiança (SCHNEIDER et al., 2004). Algumas vantagens destes métodos são a alta especificidade, simplicidade, rapidez e menor utilização de solventes tóxicos (EGMOND e PAULSCH, 1986; GILBERT, 1993; SCOTT, KANHERE e WEBER, 1993; NAKAJIMA, 2001; OMURTAG e BEYOGLU, 2007; BERTHILLER et al., 2007). Em

contrapartida, o alto custo limita a aplicação, requerendo também avaliação contínua dos indicativos de mérito da quantificação.

Para DON, a produção de anticorpos monoclonais vem sendo descrita a mais de 15 anos e estes podem ser úteis para detecção na forma ligada, interagindo com a toxina DON após acetilação na solução extratora (SCHNEIDER et al., 2004).

As técnicas de imunoensaio, como ELISA, apresentam a vantagem de não necessitarem de etapas sofisticadas de limpeza e extração e o tempo requerido para equilíbrio da reação entre antígeno e anticorpo ser pequeno, 30 minutos ou 1 a 2 horas dependendo da finalidade, com perda da sensibilidade quando reduzidos há poucos minutos. A determinação imunológica ainda é influenciada por alterações na temperatura ambiente, viscosidade do extrato da amostra, pH e força iônica, ocorrendo falsos-positivos ocasionados por interações cruzadas (ELLIS et al., 1991; SCHNEIDER et al., 2004; CAVALIERE et al., 2005).

O avanço das técnicas citológicas têm gerado interesse no desenvolvimento de sistemas celulares para testes toxicológicos que apresentam vantagens como baixo custo, rapidez na identificação da dose-resposta, pequena quantidade de amostra analítica, alta capacidade de triagem e podendo ser, em alguns casos, utilizadas para análise quantitativa com correlações confiáveis (UHLIG et al., 2005). Isto se deve ao limite de detecção, aproximadamente 150 ppb variando principalmente conforme linhagem celular, semelhantes aos métodos quantitativos utilizando TLC, resultando em um teste eficiente para triagem de DON em amostras (KRSKA, WELZIG, BOUDRA, 2007). Dentre muitas culturas celulares testadas, BHK-21, XP RO12, K-562, CHO-K 1, apresentaram alta sensibilidade a extratos contaminados com DON (CETIN e BULLERMANN, 2005). Para estas culturas, há a necessidade de investigar linhagem celular capaz de identificar a presença de micotoxina em baixos limites e a possibilidade de estabelecer as conseqüências metabólicas dos seus efeitos.

As propriedades do DON, de não absorver nas faixas do ultravioleta e visível e não fluorescer tornam necessário o emprego de reações de derivação que possibilitem determiná-lo por fluorescência ou outro procedimento espectrofotométrico (SNYDER, 1986). Também para técnicas de cromatografia gasosa (CG), a derivação prévia é fundamental. Seu emprego advém da necessidade de reduzir a polaridade dos grupamentos livres, aumentar a pressão de vapor dos compostos, possibilitar a separação de substâncias muito semelhantes entre si no estado natural e introduzir grupos que tornam o composto adequado ao sistema de detecção empregado (BADIALE-FURLONG, 1992; KOTAL et al., 1999; MILANEZ, VALENTE-SOARES e BAPTISTA, 2006).

As reações mais utilizadas são do tipo de silanização, fluoroacetilação e fluoroalquilação, onde o hidrogênio de certos grupos funcionais é substituído por radicais do

tipo dimetilsilil, trimetilsilil, butirilsilil e flúor (SCOTT, 1982; BADIALE-FURLONG, 1992; MATEO et al., 2001). Há diversos sistemas para derivação como anidrido trifluoroacético (TFAA), heptafluorobutilimidazol (HFBI), pentafluorobutilimidazol (PFBI), trimetilsilil (TMS), bis-trimetilsililacetamida (BSA), hexametildisilazano (HMDS) e trimetilsilimidazol (TMSIM), sendo que melhores resultados foram conseguidos com HFBI e TFAA, ao utilizar como catalisador a piridina ou bicarbonato (GILBERT, STARTIN, CREWS, 1985; KIENTZ e VERWEIJ, 1986; SCOTT, 1991; BADIALE-FURLONG e SOARES, 1995b; GARDA et al., 2005).

Apesar dos derivados heptafluorobutilil (HFB) serem os mais utilizados, o tipo de reagente derivatizante (HFBI e HFBA) são limitados pelo tipo de toxina a ser determinada e principalmente do detector utilizado. Estes derivatizantes apresentam a desvantagem da necessidade de remoção completa após reação dos interferentes para que não dificultem a interpretação de cromatogramas e, quando é utilizada a espectrometria de massa, os pesos moleculares dos derivados de heptafluorobutililados podem exceder a faixa de capacidade de massa do detector (BADIALE-FURLONG, 1992). Em contrapartida, na reação de fluoroacetilação, o uso do reagente TFAA apresenta a vantagem de ser facilmente removido e com adição de um aceptor ácido é obtida uma melhor resolução cromatográfica, independente de detector (MATEO et al., 2001; GARDA et al. 2005).

O tipo e a capacidade da coluna que efetua a separação no cromatógrafo gasoso são fatores determinantes na qualidade dos resultados obtidos para o tricoteceno em estudo. As fases estacionárias que podem ser utilizadas para a separação de DON incluem uma ampla faixa em termos de polaridade: metil silicone; 50% fenilmetil silicone; 7% ou 14% cianopropifenil metil silicone; 50% fenilmetil silicone; 50% trifluoropropil metil silicone e 25% cianopropilfenil metil silicone (RADOVÁ et al., 1998).

As determinações baseadas em CG, com detector de captura de elétrons, ou espectrômetro de massas são métodos mais recomendados, apresentando maior sensibilidade e especificidade, sendo possível detectar diferentes tricotecenos ou outros compostos tóxicos no mesmo extrato (Tabela 3). Segundo KOCH (2004), 75% da literatura publicada entre os anos de 1995 e 2004 utilizou esta técnica. Entretanto, métodos baseados em CG requerem alta eficiência e seletividade no procedimento de preparo da amostra (GILBERT, 1993; RADOVÁ et al., 1998; SCHOLLENBERGER et al., 1998).

Outra técnica cromatográfica que vem se destacando para detecção de DON é a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (UV), fluorescência (FL) ou massas com derivação pré ou pós-coluna envolvendo degradação alcalina pela utilização dos reagentes. Porém, para DON, a derivação tem sido descrita como incompleta e irreprodutível (KOCH, 2004; DALL'ASTA et al., 2004; RAMIREZ et al., 2006; OMURTAG e BEYOGLU, 2007). Também se tem utilizado cromatografia em camada

delgada (CCD) e cromatografia com fluído supercrítico (CFS), (SCHOLLENBERGER et al., 1998; BARAJ, 2000; SOKOLOVIC e SIMPRAGA, 2005; FURLONG e BARAJ, 2003).

Uma vez que os métodos cromatográficos não são por si só conclusivos, outros testes de confirmação são recomendados, principalmente quando se emprega CCD. Dentre estes testes estão mencionados empregos de solventes e reveladores distintos, além de reações químicas de derivação (MAROCHI, 1988; BADIALE-FURLONG e SOARES, 1995a,b; TANAKA, 2001; FURLONG e BARAJ, 2003). Para cromatografia gasosa, a avaliação do tempo de retenção através de reações de redução e acetilação que alteram as propriedades cromatográficas, o uso de diferentes fases estacionárias e detectores têm auxiliado no processo de confirmação. Para a cromatografia líquida tem se utilizado diferentes fases móveis, colunas, detectores e ainda reações de derivação pré e pós-coluna (BADIALE-FURLONG, 1992; TANAKA, 2001; BERTHILLER et al., 2007; TANAKA et al., 2007; CAVALIERE et al., 2005).

Resultados promissores estão sendo obtidos com novas metodologias como a técnica de reação em cadeia da polimerase para a análise do conteúdo de DNA de *Fusarium* ssp., produtores de tricotecenos. Fredlund et al. (2008) observaram uma alta correlação ($r=0,95$) entre concentração de DON e conteúdo de DNA do fungo em 300 amostras de grãos, concluindo que o método é eficiente e extremamente rápido (32 amostras analisadas em 45 minutos), sendo uma boa alternativa para a estimativa da concentração de DON em grãos. Tais procedimentos permitem estudar a regulação espacial e temporal da rota biossintética de tricotecenos e a interpretar os efeitos ambientais (NICHOLSON et al., 2003). Outra vantagem é a obtenção de metodologias rápidas que possibilitem o controle regulatório da formação das toxinas, a expressão genética, o processo de tradução de sinal e mecanismos de produção envolvidos na contaminação fúngica patogena (YU et al., 2004)

Os trabalhos envolvendo levantamento, monitoramento de contaminação por micotoxinas e correlação com outras propriedades dos grãos são dificultados pelo custo e, às vezes, pela sofisticação dos métodos de análise, limitando o seu uso em países onde não há grande desenvolvimento e disponibilidade de instrumentação analítica. Isto faz com que seja necessário um grande volume de informações e para preencher tal lacuna é importante desenvolver e adaptar procedimentos coerentes com a realidade atual dos laboratórios regionais, em termos de equipamentos, disponibilidade de verbas, mapeamento da incidência local de fungos toxigênicos e avaliação dos níveis de micotoxinas presentes. Fazendo uso destas informações, pode-se estabelecer de maneira objetiva sua relação com as condições de cultivo ou com a composição intrínseca dos grãos estudados, conferindo uma maior possibilidade de interferir com a segurança alimentar, associada à estabilidade e produtividade de lavouras, com o favorecimento da expansão de área cultivada. Isto pode

creditar ao país classificar-se melhor no “ranking” de exportadores de cereais e grãos no mundo.

3.3 Degradação de micotoxinas

É difícil impedir a formação de micotoxinas no campo ou na estocagem, entretanto, o monitoramento poderia diminuir as possibilidades de tornar estes compostos uma significativa fonte de aumento de riscos a saúde, pois o conhecimento da contaminação permitiria a adoção de medidas estratégicas para contornar o problema (GARDA e BADIALE-FURLOONG, 2003; KABAK, DOBSON e VAR, 2006; WAGACHA e MUTHOMI, 2007).

Estratégias adotadas na pré ou pós-colheita seriam apropriadas e dependeriam principalmente das condições climáticas de cada safra em particular. Compreender os fatores ambientais que promovem a infecção, crescimento e produção de toxinas é um passo importante para um plano efetivo que vise minimizar a ocorrência de micotoxinas em alimentos e em rações (BADIALE-FURLONG E SOARES, 1995b; MURPHY et al., 2006; RICHARD, 2007).

A prevenção da produção de micotoxinas abrange a sua biossíntese e metabolismo, tanto no campo como no armazenamento. A degradação após a produção de micotoxinas refere-se ao tratamento pós-colheita para remover, destruir ou reduzir o efeito tóxico.

A presença de contaminação fúngica em grãos pode ocorrer sem sintomas macroscópicos, dificultando a eliminação do contaminante. Rotação de produtos agrícolas, controle de ervas daninhas, estação de precipitação, vento e insetos nocivos podem afetar totalmente uma quantidade e origem da espécie fúngica que mantém o ciclo de doença.

Vários procedimentos específicos de degradação têm sido estabelecidos visando: inativar, destruir ou remover a toxina; não produzir nem deixar residuais tóxicos em alimentos para animais; conservar valor nutritivo; não alterar significativamente as propriedades tecnológicas dos produtos e; destruir esporos de fungos (GARDA e BADIALE-FURLONG, 2003). Estes procedimentos de degradação se baseiam em métodos físicos, químicos e microbiológicos.

Os métodos físicos como métodos de separação (eletrônicos ou físicos), limpeza prévia, lavagem, moagem úmida e seca, extrusão, calor, irradiação podem contribuir para a eliminação e/ou redução de contaminação micotoxicológica (DICKENS e WHITAKER, 1975; SCOTT, 1984; LAUREN e RINGOSE, 1997; PATEY e GILBERT, 1989; HAZEL e PATEL, 2004). Estes procedimentos possuem sua relevância por serem os usuais na rotina de indústrias beneficiadoras de grãos. Exemplo de sucesso destes procedimentos esta na

indústria de amendoim que desde os anos 60 utiliza os métodos de separação, eletrônicos e controle de espécie de contaminação, com o fim de reduzir os níveis de aflatoxinas nos grãos destinados a consumo humano (DICKENS e WHTAKER, 1975; GARDA, BADIALE-FURLONG, 2003).

A operação de limpeza prévia a moagem também pode contribuir para eliminação da contaminação micotoxicológica, principalmente para tricotecenos. Grãos podem ter peso alterado quando infectados por *Fusarium* correspondente à infestação fúngica e biossíntese das respectivas toxinas. A utilização de mesas separadoras por gravidade física para estes grãos contaminados vem demonstrando uma redução acima de 74% para DON em amostras que continham altos níveis de contaminação. Entretanto, quando presente em baixos níveis, a redução gira em torno de 20% realizando limpeza rotineira (SCOTT, 1984; KABAK, DOBSON e VAR, 2006).

A operação de lavagem de grãos de cereais tem demonstrado bons resultados para redução de contaminação de micotoxinas *Fusarium*, em torno de 60% para DON, ZEA e fumonisinas. A adição de carbonato de sódio na água de lavagem intensifica a degradação das toxinas quase na sua totalidade. Para patulina, a redução foi em 54% quando remoção empregada em frutos de maçã utilizando esta operação unitária, além da redução da contaminação de resíduos químicos típicos da cultura (ABRAMSON, HOUSE e NYACHOTI, 2005; KABAK, DOBSON e VAR, 2006).

A moagem representa significativa redução na contaminação micotoxicológica. Segundo Lauren e Ringrose (1997), para tricotecenos através da moagem úmida, a maior percentagem foi transferida para a porção líquida e fração do glúten (toxina T-2 em torno de 66%), permanecendo traços no amido. Utilizando processo comercial, foi descrita uma transferência de 30% (PATEY e GILBERT, 1989). Na moagem seca, a presença de toxinas na farinha foi dependente do grau da contaminação fúngica e migração das toxinas produzidas para a parte interna do grão (HAZEL e PATEL, 2004). No processo tradicional de produção de farinha branca a partir de trigo duro, ocorre redução de 66% da contaminação inicial de ocratoxina A (KABAK, DOBSON e VAR, 2006).

No processo de extrusão, os resultados apresentam variações, dependendo do produto. Para milho extrusado e autoclavado, é relatada redução de 12% dos níveis de contaminação de DON (WOLF-HALL et al., 1999; JOUANY, 2007). Esta mesma toxina foi melhor descontaminada em presença de bissulfito de sódio (HAZEL e PATEL, 2004).

As toxinas DON, aflatoxinas, ocratoxina A são relativamente estáveis ao calor, havendo redução dos níveis quando altas temperaturas são utilizadas variando conforme toxina estudada (HAZEL e PATEL, 2004; PRONYK, CENKOWSKI e ABRASON, 2006; GARDA e BADIALE-FURLONG, 2003; YOSHIZAWA, 2001; BRETZ et al., 2005).

A citrinina é afetada pelo aquecimento, levando a ocorrência de compostos adicionais como citrinina H₁, mais tóxica que a original (FOULER et al., 1994). Com a utilização de outros métodos como o reaquecimento com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, estes compostos tóxicos formados, como também possíveis quantidades residuais de outras toxinas, podem ser destruídos completamente como demonstrado na Tabela 4 (FOULER et al., 1994).

Tabela 4. Métodos químicos de detoxificação de micotoxinas.

Toxina	Agente descontaminante	Efeito
Citrinina	Cisteína	Inativação
Citrinina	Aquecimento, 175 °C/condições secas	Destruição
Citrinina	Aquecimento, 35 °C/condições úmidas	Destruição
Citrinina	Ácido	Instabilidade
Citrinina	Solução de amônia 2% (6 dias/30 °C)	Destruição
Citrinina	Hidróxido de sódio 0,5% a 100 - 110 °C	Destruição
Citrinina	Peróxido de hidrogênio 0,05% a 100 °C	Destruição
Ocratoxina A	Peróxido de hidrogênio com aquecimento	Destruição
Ocratoxina A	Aquecimento	Redução
Ocratoxina A	Solução de amônia 2%	Redução
Ocratoxina A	Tratamento alcalino (concentrado)	Destruição
Zearalenona	Peróxido de hidrogênio	Destruição
DON	Peróxido de hidrogênio	Destruição
Toxina T-2	Vitamina E	Diminuição do efeito
Toxina T-2	Vitamina C	Não foi efetivo

Fonte: Garda e Badiale-Furlong, 2003.

Ocratoxina A é um composto instável ao aquecimento a altas temperaturas (acima de 150 °C) ou sob pressão. Segundo Cacciamani e colaboradores (2007), quando comparado tratamento térmico úmido e seco, o primeiro foi o mais efetivo na degradação desta toxina constatando teores inferiores ao limite de detecção em 64% dos experimentos conduzidos. A eficiência do método úmido também é reforçada por Milanez e Leitão (1996) quando em avaliação grãos de feijão, encontrando índices de degradação de 95%. Esta toxina possui uma molécula de amida ligada e um grupo lactona, os quais podem ser atacados durante o tratamento químico e físico. Outros dados sobre degradação de OTA estão descritos na Tabela 5.

A utilização de microondas induzido com sistema plasma argônio com o fim de degradar totalmente aflatoxina B₁, DON e nivalenol foi conseguido quando utilizado 5

segundos de tratamento. Durante os testes, a degradação de DON e nivalenol foi relativamente lenta quando comparado com aflatoxina B₁ (PARK et al., 2007).

Tabela 5. Detoxificação de ocratoxina A por aquecimento.

Produto	Tratamento	Redução (%)
Café	Forneamento	80-90
Feijão	Forneamento, 200 °C/5 minutos	100
Feijão	Forneamento, 200 °C/10 - 20 minutos	0-12
Produtos de cereais	Autoclavagem, 120 °C, 3 horas	70
Malte	Aquecimento	72-73

Fonte: Yoshizawa, 2001.

HAZEL e PATEL, verificaram que DON e 3AcDON foram estáveis ao processo de irradiação a 50 kGy., porém estes resultados diferiram de outros trabalhos que demonstraram que a gama-irradiação diminuiu a contaminação de DON e toxina T-2 em grãos e farinha de trigo (2004).

Os adsorventes tem se mostrado eficiente na remoção de micotoxinas quando em soluções aquosas. Os adsorventes mais recomendados e comuns são carvão ativo e bentonita, que tem demonstrado eficiência para patulina, presentes em sucos, e aflatoxina M₁, em leite. Na aplicação destes ligantes, o tamanho da partícula e o tratamento térmico são fatores que interferem significativamente o nível de degradação das toxinas (KABAK, DOBSON, VAR, 2006). Uma levedura (1,3-beta-D-glucana) glucana modificada demonstrou eficiência na adsorção de zearalenona e toxina T-2 correspondendo a valores de 183 mg/g e 10 mg/g respectivamente (FREIMUND, SAUTER E RYS, 2003).

A degradação por métodos químicos compreende os resultados de diminuição da concentração de micotoxinas alcançados através de reações químicas. Os primeiros estudos sobre estes métodos também ocorreram nos anos 60 pelo uso da amônia para degradação parcial ou total de aflatoxinas (PARK, 1993). Outros agentes químicos como permanganato de potássio com ácido sulfúrico ou com hidróxido de sódio, adsorventes químicos, uréia e urease, solventes, aditivos alcalinos, agentes oxidantes foram testados para a redução de aflatoxinas. Solução de amônia, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio degradaram citrinina. O peróxido de hidrogênio com aquecimento e tratamento alcalino destrói e a solução de amônia reduz a concentração de ocratoxina A (GARDA e BADIALE-FURLONG, 2003).

O processo de amoniação é rotineiramente usado na França, África do Sul, Senegal, Brasil e Sudão com o fim de diminuir os níveis de contaminação de aflatoxinas. Em alguns estados dos Estados Unidos como Arizona, Califórnia e Texas é permitido o uso de

amônia em sementes de algodão; e no Texas, Carolina do Norte, Geórgia, México e Alabama, a amônia tem seu uso aprovado em cereais (PARK, 1993).

Tabela 6. Detoxificação de aflatoxinas por diferentes métodos.

Princípio	Tratamento empregado	Resposta
Físico	Separação por densidade (amêndoa)	Redução
	Moagem úmida	Eliminação
	Tratamento térmico:ebulição	Redução
	Autoclavagem	Redução
	Torragem	Redução
	Assando	Redução
	Pasteurização	Estável
Químicos	Amônia	Redução
	Amônia + calor + pressão	Efetivo
	Suplemento dietético	Redução
	Adsorvente químicos	Redução
	KMnO ₄ /H ₂ SO ₄	Redução
	KMnO ₄ /NaOH 2 M	Redução
	Hipoclorito de sódio (5,25%)	Efetivo
	Hipoclorito de sódio e acetona	Efetivo com maior rapidez
	Monometilamina	Redução
	Uréia/urease	Redução
	Solventes	Redução
	Ácido fítico (0,12%)	Inibe produção
	Aditivos ácidos	Efetivo (origina outros compostos tóxicos)
	Aditivos alcalinos	Redução
	Aditivos alcalinos + lavagens com água	Efetivo
Sais sulfurosos	Redução	
NaCl ₂	Efetivo	
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Redução	
Agentes oxidante	Pequena redução	
Ortofenilfenato	Previne	

Fonte: Garda e Badiale-Furlong, 2003.

A detoxificação de produtos contaminados por aflatoxinas através da inativação por reações químicas, alta pressão, ou extração usando um solvente orgânico ou uma combinação destes tem sido continuamente avaliada. A degradação destas micotoxinas

também pode ocorrer durante o processamento usual de alimentos e também pelo uso de aditivos, os quais são compostos ditos relativamente seguros quando utilizados em níveis recomendados (FONSECA, 1994; CONZANE, STENZEL e KROH, 2002). Esta classe de micotoxinas tem sido a mais estudada pelos diferentes métodos de detoxificação como apresentado na Tabela 6. Isto decorre da sua ocorrência freqüente e disponibilidade de metodologia para acompanhar seus níveis.

É importante evidenciar que micotoxinas co-ocorrem juntamente com outros compostos em alimentos e rações podendo haver interações entre os mesmos e alterações na toxicidade, efeito que pode ser favorecido pelo aquecimento. Por outro lado, organismos vivos possuem seus próprios sistemas de detoxificação como o fígado, onde compostos lipofílicos são hidroxilados e/ou hidratados e então excretados conjugados com glicina, glutanina, taurina, cisteína e ácido glucurônico (FOULER et al., 1994).

3.4 Biodegradação

A remediação de locais contaminados com substâncias tóxicas é um dos focos de grande interesse do meio científico. A biorremediação é uma tecnologia desenvolvida que utiliza microrganismos como forma de degradar contaminantes a outros compostos com menor ou com perda de toxicidade. Processos de biorremediação são grandemente utilizados por contribuir para a prevenção do acúmulo de contaminantes. Algumas das tecnologias utilizadas têm sido aplicadas há muitos anos, outras estão sendo investigadas, principalmente aquelas que são incrementadas pela engenharia genética, estudando os microrganismos capazes, bem como mecanismo envolvido na inativação do contaminante (CHISTI, 2005).

Os métodos tradicionais de remediação são caros e demorados, o que leva a indicar a biorremediação como uma tecnologia alternativa, que apresenta, na maioria dos casos, completa degradação de compostos tóxicos. O estudo da capacidade biodegradadora nativa de microrganismos locais pode requerer muito tempo, podendo ocorrer neste intervalo processo de evolução natural como à mutação genética que caracteriza esta capacidade degradadora, tornando-a específica para a contaminação local de uma ou mais substâncias. Os dados também demonstram que as variações ambientais, o limite do potencial biodegradativo e a viabilidade natural dos microrganismos podem ser destacados como desvantagens desta técnica (SVEDRUZIC et al., 2005; KALOGERAKIS, 2005). Estas possibilidades geram diversas alternativas para recuperar locais contaminados pela sua diversidade nas características físicas e químicas, necessitando novos estudos e estratégias de degradação (KALOGERAKIS, 2005). Há três tipos de biorremediação empregados com mais freqüência pela indústria: atenuação natural, bioestimulação e

bioaugmentação. O método de biorremediação mais simples de implementar é atenuação natural e consiste em monitorar o local quanto ao nível de contaminação para assegurar que o processo de degradação esteja ativo (KAPLAN e KITTS, 2004). A bioestimulação requer ajustes no local contaminado propiciando condições ambientais favoráveis para que a comunidade microbiana degrade os contaminantes. Isto inclui a adição de nitrogênio, fósforo, traços de minerais e ajustes de pH para adequada e seletiva proliferação dos microrganismos (VENOSA et al., 1996; SALANITRO et al., 1997; OLANIRAN, PILLAY, PILLAY, 2006). Em alguns casos, onde a comunidade natural de organismos degradadores está presente em pequena quantidade ou mesmo ausente, a bioaugmentação ou adição destes organismos pode promover ou acelerar o processo degradativo (VAN LIMBERGAN et al., 1998; OLANIRAN, PILLAY, PILLAY, 2005).

Produtos agrícolas, grãos e seus resíduos, têm sido enfocados quanto à biodegradação de fungicidas, herbicidas, pesticidas, bem como na produção de biodiesel, compostos aromáticos, enzimas (JONER, CORGIÉ, AMELLAL, LEYVAL, 2002; ANG, ZHAO, OBBARD, 2005; PANDEY, SOCCOL, MITCHELL; 2000). Relacionado à degradação de micotoxinas, estudos enfocam a utilização e capacidade dos microrganismos em detoxificá-las quando aplicados em meio de cultura. No entanto, são raros os estudos utilizando o emprego de atenuação natural, bioestimulação ou bioaugmentação no local ou material contaminado, devido principalmente a quantidade da toxina presente e a dificuldade de metodologia para acompanhamento do processo degradativo (BATA e LASZATITY, 1999; LINE e BRACKET, 1995^{a,B}; WESTBY, REILLY e BAINBRIDGE, 1997; VARGA et al., 2005; VARGA, RIGÓ e TÉREN, 2000; ABRUNHOSA, SERRA e VENANCIO,2002) .

3.4.1 Biodegradação de micotoxinas

Nos séculos XIX e XX, certos gêneros fúngicos foram empregados em fermentações, tanto submersa como em estado sólido, reconhecendo suas capacidades de produção de compostos específicos. Dentre estes, alguns denominados metabólitos secundários, foram investigados pela habilidade de desencadear alguns sintomas tóxicos aos consumidores de produtos fermentados. A sintomatologia descrita sugeriu que estes compostos compreenderiam a classe de micotoxinas, principalmente quando utilizadas algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (RICHARD, 2007).

Apesar disto a fermentação em estado sólido e submersa empregando cepas fúngicas apropriadas tem sido descrita como promissora no desenvolvimento de vários bioprocessos, com vantagens potenciais tanto para a descontaminação como para a geração de produtos de alto valor agregado. As aplicações de fermentações enfatizam

várias áreas tais como a biorremediação e/ou biodegradação de compostos tóxicos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação de produtos agrícolas e seus resíduos quanto ao enriquecimento nutricional, desenvolvimento de produtos baseado no metabolismo secundário como antibióticos, drogas, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustível, compostos aromáticos entre outros (PANDEY et al., 2000).

A biodegradação de micotoxinas utilizando processos fermentativos tem sido descrita como uma alternativa para recuperar nutrientes de produtos agrícolas contaminados (WESTBY, REILLY e BAINBRIDGE, 1997).

Bactérias

As bactérias foram os primeiros microrganismos a serem investigados e nos anos secenta, Ciegler, Hao e Brackett *apud* Bata e Laszality (1999) estudaram 1000 espécies bacterianas e descreveram a capacidade de *Flavobacterium aurantiacum* B-184 em degradar irreversivelmente aflatoxinas em meio líquido. Segundo Line e Bracket (1995), o pH e a temperatura influenciaram diretamente na adsorção desta toxina pelas células. A alta quantidade de inóculo desta bactéria (10^{11} células/mL) removeram altos percentuais de aflatoxinas em soluções de variadas concentrações. Outro fator importante foi que, mesmo células inativadas por aquecimento, apresentaram capacidade de se ligar com as toxinas que foram facilmente recuperadas por lavagens com água. Outros estudos demonstraram que a bactéria foi capaz de remover aflatoxinas de leite, óleo vegetal, milho, amendoim e creme de amendoim, sugerindo que o microrganismo pode ter um potencial detoxificante biológico destes e outros alimentos ou insumos (CIEGLER, HAO e BRACKETT; 1989 *apud* BATA e LASZATITY, 1999). Entretanto, a aplicação dele é limitada pela sua pigmentação alaranjada, mas em contrapartida, é favorecida pela tendência a resistência ao consumo de produtos quimicamente tratados por alguns grupos da população.

A capacidade degradadora da bactéria *Flavobacterium aurantiacum* B-184, incentivou outras investigações que visaram demonstrar o mecanismo responsável pela diminuição da concentração das aflatoxinas, avaliando principalmente o potencial de degradação e adsorção. É evidente que os dois mecanismos podem aumentar a toxicidade do meio, pois a metabolização pode gerar compostos mais tóxicos e a adsorção ser reversível em condições de processamento ou durante o metabolismo digestivo (LINE, BRACKET, 1995a, 1995b; LINE, BRACKET e WILKINSON, 1994). Ficou demonstrado através de cinética, utilizando células viáveis, mortas e estruturas marcadas com ^{14}C , que a bactéria metabolizou e não adsorveu a aflatoxina B₁. Neste estudo não foram elucidados os compostos formados pela degradação, porém em outro realizado por Lillehoj (1967) *apud*

Bata e Laszality (1999) estes compostos quando em avaliação biológica, não causaram efeito agudo em patos.

O processo de metabolização foi reavaliado por Souza e Brackett (1998) que estudaram meio de cultura com esta bactéria e íons de cobre e zinco. Os íons inibiram a degradação de aflatoxina B₁, efeito atribuído a interferência com o sistema enzimático do processo de degradação. Segundo Bata e Laszality (1999), a degradação microbiana é provavelmente um fenômeno de mineralização e não um co-metabolismo. A habilidade deste microrganismo de detoxificar aflatoxina sem a necessidade de fonte de energia exógena, pode ser uma perspectiva de uso de microrganismo, ou um mesmo mecanismo em reações de fermentação.

As bactérias *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Phenylobacterium immobile*, algumas espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, bem como flora microbiana do trato gastrointestinal incluindo rúmem, intestino de ratos e de humanos, protozoários de ruminantes podem também converter a ocratoxina A em ocratoxina α , que apresenta menor toxicidade (VARGA et al., 2005; VARGA, RIGÓ e TÉREN, 2000; ABRUNHOSA, SERRA e VENANCIO, 2002).

Shima et al. (1997) isolaram bactéria do solo identificada com base na morfologia e estudos filogenéticos como *Agrobacterium rhizobium* cepa E3-39 que tinha capacidade de degradar DON a 3-ceto-4-deoxinivalenol, que apresenta toxicidade relativamente menor, e também 3-acetildeoxinivalenol. Esta bactéria não demonstrou capacidade de degradar nivalenol e fusarenona-X. Fucks e colaboradores (2002) demonstraram que a bactéria BBSH 797 também possui capacidade para transformar sete tricotecenos, onde os metabólitos identificados se mostraram como não tóxicos. O metabólito resultante de DON foi o deepoxidado DOM-1. Outra bactéria isolada do solo, NCB 1492, por Benedetti et al. (2006), demonstrou capacidade degradadora para fumonisina B₁ após 3 horas de incubação, resultando em 4 metabólitos identificados como heptadecanona (C₁₇H₃₄O), isononadeceno (C₁₉H₃₈), octadecenal (C₁₈H₃₄O) e eicosano (C₂₀H₄₂).

Niderkorn, Boudra e Morgavi (2006) investigaram a habilidade de 29 espécies de bactérias ácidas, lácticas e propiônicas de remover DON, zearalenona e Fumonisina B₁ e B₂ de meio de cultura contaminado, encontrando que a maior eficiência foi a da espécie láctica. A remoção foi superior a 55% para DON, 82% para Fumonisina B₁, 100% para Fumonisina B₂ e 88% para zearalenona, sendo o provável mecanismo a adsorção dos contaminantes, demonstrado pela ausência de derivados destas toxinas no meio. A adsorção também não foi influenciada pelo pH, exceto para fumonisinas que em pH neutro ocorreu uma diminuição da remoção. Processo análogo foi observado para a ação da microflora ruminal para Fumonisina B₁ após 12 h de incubação. Após processo fermentativo, também não foram detectados metabólitos característicos desta toxina, aminopoliol ou aminopentol

caracterizando a adsorção e os níveis da micotoxina diminuíram em 12 a 18% do inicial (CALONI et al., 2000).

Leveduras

A divulgação de dados demonstrando a grande contaminação micotoxicológica nos anos 80 enfatizou os processos de descontaminação de cereais por microrganismos, e dentre eles a avaliação da capacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para degradar micotoxinas durante fermentação alcoólica, por se tratar de um processo de amplo uso na indústria de alimentos.

Bennet e Richard em 1981 estudaram o efeito da fermentação alcoólica em milho contaminado com zearalenona. Os resultados alcançados foram promissores para o produto etanol produzido que não apresentou contaminação, mas os sólidos residuais e solúveis utilizados para alimentação animal permaneciam contaminados.

Estudos de Sawinki-Acsadi (1983) demonstraram que os índices de milho contaminado com toxina F-2 podem ser reduzidos em 10 vezes por ação da *Cândida intermédia*. A toxina presente estava quase que inteiramente na porção líquida do fermentado, não sendo detectada na porção sólida utilizada para ração animal.

O efeito de leveduras nos níveis de micotoxinas durante a fermentação alcoólica para obtenção de cervejas e vinhos tem sido relatado mundialmente principalmente por Scott (1992), Scott e Kanhere (1995), Scott e Lawrence (1997) Flesh e Voight-Scheruerman (1994 apud BATA e LÁSZTITY, 1999), Torres et al. (1998), Baxter, Slaiding e Kelly (2001) e Garda et al. (2005). Os dados publicados mostraram que ZEA, α - e β -zearalenol, aflatoxinas, fumonisina B₁ e B₂ (em baixa quantidade) e tricotecenos foram detectados em cervejas mundialmente comercializadas. Garda et al. (2004) relataram que cervejas comercializadas na região sul do Brasil apresentavam contaminação com ocratoxina A (1,4%), DON (5,56%) e toxina T-2 (4,17%) perfazendo um total de 11,1% de 72 amostras analisadas.

Scott (1996), em experimentos com toxinas de *Fusarium*, verificou que tricotecenos e zearalenona foram destruídos pelo processo cervejeiro. Para a toxina T-2 adicionada nos grãos de cevada em 10 μ g/g, a recuperação foi de 32-42% na primeira fermentação, 7-12% na segunda fermentação e traços detectados no malte. Para ocratoxina A presente no malte original, 13 a 32% foi transferido para a bebida (BAXTER, SLAIDING e KELLY, 2001).

Niessen e Donhauser (1993) verificaram que triturando grãos de malte e os fermentando a 50-72°C ocorria um aumento da quantidade de DON de 3 para 8%. Isto poderia ser atribuído à liberação de DON de conjugados protéicos. Neste trabalho ficou demonstrado que DON não foi removido dos grãos usados pelo processo cervejeiro, e não

houve perda substancial no tratamento térmico ou durante a fermentação, o que justificou a maior transferência para a cerveja final.

Experimentos realizados em malte contaminado mostraram que a umidificação de grão de cevada para produção de malte diminuía 89% do DON que durante a germinação, em torno de cinco dias, os níveis de contaminação aumentavam de 18 para 114% que foram diminuídos na etapa seguinte, a secagem. A zearalenona ao longo do processo atingia níveis em torno de 9 a 13% do inicial (SCOTT, 1996).

O mesmo efeito de redução dos níveis de tricotecenos foi verificado por Garda et al. (2005) empregando malte contaminado artificialmente com DON e toxina T-2. Após 120 horas de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, 47% da contaminação inicial de DON e 46% para toxina T-2 foram detectadas na porção líquida e sólida. Isto mostrava que tanto no líquido quanto no sólido, a composição foi praticamente a mesma. A migração da toxina do sólido para o líquido pode ter ocorrido pelo aquecimento úmido e a produção do álcool que diminuiu a polaridade do meio e possibilitou a solubilização das toxinas na porção líquida. A interação das mesmas toxinas com proteínas solúveis durante a maltagem foi descrita por Reinher e Furlong (2003) e Garda-Bufferon, Baraj e Badiale-Furlong (2008).

Também há relatos na literatura onde a fermentação alcoólica durante 7-9 dias não alteraram os níveis de DON. Por outro lado, o conteúdo inicial de zearalenona foi convertido a β -zearalenol (β -ZEL) (69%) e a α -zearalenol (8,1%) (SCOTT, 1992).

Scott e Kanhere (1995) verificaram em outro experimento com 8 dias de fermentação com ocratoxina A e fumonisinas B₁ e B₂, que a redução foi de 13%, 28 e 17% respectivamente. Na massa correspondente a levedura, a contaminação detectada foi de 21% da ocratoxina A inicialmente adicionada e as fumonisinas não foram detectadas. No relato de Boeira et al. (2002), altas concentrações de toxinas *Fusarium* (± 2 $\mu\text{g/mL}$) influenciaram o crescimento da levedura de forma discreta sem ocasionar alterações no desenvolvimento do processo cervejeiro. É importante ressaltar a ausência de registros na literatura sobre a investigação quanto aos efeitos das aflatoxinas no processo fermentativo, embora sua ocorrência em grãos cevada, sorgo e milho venha sendo detectada (SCOTT, 1996), o que sugeriu a suscetibilidade destas toxinas a altas temperaturas empregadas durante malteação e fermentação, principalmente durante a fervura do mosto.

A diminuição dos níveis de micotoxinas durante a fermentação pode ser ocasionada tanto pela adsorção das paredes da levedura como por ação de enzimas (FLESH E VOIGHT-SCHERUERMAN 1994 *apud* BATA e LÁSZTITY, 1999; SCOTT, 1992). O mecanismo de decomposição já foi atribuído a ação de uma enzima produzida por levedura *Sacharomyces cerevisiae*, a epihidroxilase. Segundo Bata e Lasztity (1999), enzimas tricotecinas produzidas por esta levedura podem afetar a estrutura química de DON, deepoxidando-o, provavelmente por ligases e ceto-enol tautomerases que foram afetadas

por bissulfito. Flannigan et al. (1985) atribuíram a eficiência da metabolização de zearalenona durante a fermentação alcoólica a espécie de levedura utilizada. Os produtos identificados foram β - e α -zearalenol na cerveja obtida. Whitehead e Flannigan (1989) demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* também apresenta capacidade de reduzir os níveis de DAS além de toxina T-2 e a *Candida lipolytica*, mostrou ser capaz de reduzir o nível de toxina T-2, em meio de crescimento, em até 12% da quantidade inicial em 23 dias.

Um experimento descrito por Westby, Reilly e Bainbridge (1997), realizado com trigo contaminado com DON para a fabricação de pães mostrou uma redução da contaminação, mas não foi identificado se a degradação ocorria durante a fermentação ou tratamento térmico durante forneamento. Outros informes sobre efeitos na panificação sobre os níveis de DON estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito do processo de panificação na contaminação de DON.

Níveis de contaminação de DON (ppb)	Tratamento	Condições de fermentação	% DON após processamento (Farinha = 100%)	Referência
2000 (contaminada artificialmente)	Receitas tradicionais	Temperatura ambiente, 75 minutos	115	El-Banna et al. (1983)
4100			102	Scott et. al. (1984)
1000-6800	Receitas tradicionais e aditivos (20 ppm de brometo de potássio)	Temperatura ambiente, 80 minutos	107	Scott et. al. (1984)
300/500/9100	Método aprovado pela AACC 1983		36-84	Abbas et. al. (1985)
220-3200	Receitas tradicionais e 50 ppm de ácido ascórbico	30 °C, 90-120 minutos	53-64 (220 ppb) 70-95 (350 ppb) 66-80 (880 ppb) 74-90 (880 ppb) 98-113 (2030 ppb) 125 (3200 ppb)	Seitz et. al. (1986)

Fungos

Como as bactérias e as leveduras, espécies fúngicas também possuem a capacidade degradadora de micotoxinas, reduzindo os efeitos tóxicos após processos fermentativos (KABAK, DOBSON e VAR, 2006). Na Tabela 8 estão apresentados experimentos que exemplificam esta afirmação.

Segundo Westby, Reilly e Bainbridge (1997), *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus oligosporus* possuem a capacidade de reduzir ciclopentanona a aflatoxicol A de forma reversível, mas em presença de ácidos orgânicos, a conversão é irreversível para aflatoxicol B, isômero, que é aproximadamente 18 vezes menos tóxico que aflatoxina B₁. Outros

autores encontraram resultados semelhantes empregando *Rhizopus* sp. (CACCIAMANI et al., 2007). Varga et al. (2005) encontraram resultados contrários e atribuíram a ineficiência do processo a reversibilidade da reação, tipo de cultura e condições fermentativas.

Tabela 8. Efeitos do processo fermentativo nos níveis de contaminação de micotoxinas.

Micotoxina	Produto	Fermentação	Contaminação	Redução (%)
Aflatoxina	Milho	Lática	Natural/ B ₁	0
Aflatoxina	Sorgo	Lática	Artificial/ B ₁	12-16
Aflatoxina	Trigo	Levedura	Natural/ M ₁	19
Aflatoxina	Leite	Lática	Artificial/ B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁	0
Aflatoxina	Leite Kefir e iogurt	Lática	Artificial/ B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁	Diminuiu e 0
Aflatoxina	Semente de melão	<i>Bacillus</i> spp.	Natural/ B ₁ , G ₁	100 após 4 dias
Aflatoxina	Torta de amendoim	<i>Neurospora sitophila</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	-	50 e 70 respectivamente
Aflatoxina	Milho/sorgo	Lática	Natural/ B ₁	Maior que 70
Alternariol e alternaniolmonometileter	Cultura pura isolada	Lática e bactéria	Artificial/ meio	Redução maior que 50 em todas cepas tesadas

Fonte: Westby, Reilly e Bainbridge (1997).

Além destas, um grande número de culturas fúngicas têm sido descritas por degradar aflatoxina B₁ como *Trichoderma* sp. 639, *Phoma* sp., *Rhizopus* sp. 668, *Rhizopus* sp. 720, *Sporotrichum* sp. ADA, *Sporotrichum* sp. SF e *Alternaria* a níveis que variam de 65 a 99%, em cinco dias, a temperatura de 28±2°C (KABAK, DOBSON, VAR, 2006).

A degradação de zearalenona, patulina e ocratoxina A foi praticamente total e as concentrações finais estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado para quantificação, quando empregado no processo fermentativo espécies fúngicas do gênero *Aspergillus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus* e *A. niger*, e *Pleurotus*. Estas espécies possuem enzimas que transformam a ocratoxina A em ocratoxina α de menor toxicidade (VARGA et al., 2005; VARGA, RIGÓ e TÉREN, 2000; ABRUNHOSA, SERRA e VENANCIO, 2002). Conídias das espécies de *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. japonicus* adicionadas em sucos de uva degradaram 28, 45 e 10% respectivamente os teores iniciais de ocratoxina A sem que fosse detectada no experimento a presença de ocratoxina α. No entanto, para as espécies *A. carbonarius* e *A. japonicus* foi observado aumento da concentração de OTA durante avaliação, indicando a reversibilidade do processo ou produção da toxina (BEJAQUI et al., 2005). O emprego de conídias escuras de *A. niger* em processos de descontaminação de ocratoxina A tem dificultado a aplicação industrial do tratamento pois é necessária uma etapa de eliminação da coloração escura (BEJAQUI et al., 2005 e 2006). A micotoxina

patulina também foi degradada a ascladiol por *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* (VARGA et al., 2005; Moss e Long, 2002).

Segundo Abrunhosa, Santos e Venâncio (2006) e Abrunhosa e Venâncio (2007), a degradação por *A. niger* ocorre pela capacidade hidrolítica de enzimas para ocratoxina A, que converte em 99,8% para ocratoxina α em pH 7,5. Proteases comerciais tais como pancreatina, Prolyve PAC testadas, apresentaram capacidade degradadora em um período de 25 horas reduzindo, respectivamente, 87%, 43% e 3%. As enzimas envolvidas na hidrólise pertenciam a classe das metaloproteínas.

A zearalenona foi completamente degradada por *Rhizopus*, isolados como *R. stolonifer*, *R. oryzae* e *R. microsporus* (VARGA et al., 2005). Outros estudos demonstraram grande variedade de microrganismos como capazes de converter a micotoxina α - e β -zearalenol. No entanto, a transformação não pode ser considerada detoxificação, pois a atividade estrogênica destes metabólitos formados é similar a do composto original (KARLOVSKY, 1999). O fungo *Gliocladium roseum* NRRL 1859 transformou ZEA em um composto clivado de menor toxicidade, 1-(3,5-dihidroxifenil)-10-hidroxi-1-undecen-6-one (EL-SHARKAWY e ABUL-HAJI, 1988). No microrganismo foi identificado a enzima lactonahidrolase e seu correspondente gene *zhd101*, responsável pela degradação de zearalenona. Fato este que impulsionou a pesquisa quanto à possibilidade de alteração genética de espécies GRAS com este gene. Foram testadas a clonagem para *Schizosaccharomyces pombe* e *Escherichia coli* e os resultados confirmaram o efeito (TAKAHASHI-ANDO et al., 2002). No entanto, o simples aumento da expressão deste gene *zhd101* formou metabólitos com perda total da toxicidade, que empregado geneticamente em arroz foi considerado um sistema eficiente e de baixo custo, reduzindo significativamente a quantidade de zearalenona presente em grãos geneticamente modificados (HIGANISHIYAMA et al., 2005). Juntamente com este gene, foi identificado o *Tri101* que inativa tricotecenos, caracterizando novas possibilidades de manipulação genética (TAKAHASHI-ANDO et al., 2005).

Outras perspectivas

A degradação de micotoxinas por microrganismos do rúmem de algumas espécies tem sido freqüentemente avaliada. A ZEA, ocratoxina A, toxina T-2, DON e diacetoxiscirpenol foram degradadas no rúmem de animais de criação. Young e colaboradores (2007) verificaram a capacidade de micróbios intestinais de frango em degradar tricotecenos por deepoxidação e desacetilação. Tais observações podem ser indicativos que há sistemas responsáveis por tal detoxificação e que estes podem ser

clonados para outros microrganismos responsáveis por outras fermentações (SMITH e HARRAN, 1993).

Outros microrganismos resistentes as micotoxinas devem ser investigados principalmente quanto a sua sensibilidade e seletividade. A resistência do microrganismo pode significar uma possibilidade de degradação quando investigada em diferentes condições de fermentação, adição ou não de substratos, aeração, íons entre outras variáveis.

O estudo do mecanismo envolvendo a resistência (seletividade através da membrana, decomposição por enzimas específicas, formação de complexos) pode ser útil na aplicabilidade de microrganismos em processos fermentativos. A definição do sistema enzimático envolvido permite também a utilização destes compostos específicos purificados em meios contaminados, simplificando o processo.

O controle dos produtos de degradação, o efeito de detoxificação e propriedades nutritivas e sensoriais são, em muitos casos, a parte decisiva da pesquisa para aplicação industrial. Portanto, a tecnologia pode ser desenvolvida de forma que seja economicamente viável para tratamento de cereais e seus resíduos.

Dentre todas as estratégias que estão sendo exploradas para a degradação e conseqüentemente a descontaminação, a mais promissora é a engenharia genética. Esta possibilita desde desenvolvimento de espécies menos suscetíveis a variáveis abióticas desencadeantes da produção de toxinas, a modificações que permitem a inclusão de enzimas na rota metabólica para que, caso haja contaminação, o próprio sistema enzimático degrade estes compostos na sua via metabólica. O biocontrole usando agentes não tóxicos biocompetitivos também são estratégias potenciais.

3.5 Avaliação Biológica

Historicamente, as micotoxinas, metabólitos secundários fúngicos, possuem estruturas que podem causar efeitos adversos associados com a ingestão de alimentos contaminados, ocasionando desde efeitos vasoativo, neurotóxicos, imunossupressores a carcinogênicos (BALÁZS e SCHEPERS, 2007). Muitos efeitos biológicos destes compostos tem sido aplicados em benefício a saúde humana, como no desenvolvimento de produtos farmacêuticos incluindo antibióticos (penicilina), imunossupressores (cicloporina A) e medicações para redução de colesterol (lovastatina). Aproximadamente 400 destes metabólitos são considerados tóxicos (ATROSHI et al., 2002; RICHARD, 2007) e as manifestações da toxicidade variam conforme o tipo de fungo que sintetiza estes metabólitos secundários, da dose, do organismo afetado, sexo, idade e espécie de animal.

A exposição indireta de humanos à micotoxinas, causando micotoxicoses, é conhecida por ocorrer quando os resíduos tóxicos dessas toxinas, ou ainda seus derivados, persistem em produtos de origem animal ou vegetal, e estes consumidos tanto em curto como longo períodos podendo ter efeito acumulativo e associado (UENO, 1986; MELLO & MACDONALD, 1997). A maioria dos estudos investigados se baseiam na exposição diária a micotoxinas e poucos são os resultados de investigações de outras formas de exposição que podem também representar riscos a saúde humana.

A principal fonte de risco a humanos decorre do consumo de alimentos contaminados de forma direta, cereais, ou indireta, de origem animal. Estas toxinas, quando fornecidas a animais podem ser transferidas ao homem através do consumo de produtos como leite, carne e ovos. Muitos países já estabeleceram como rotina, a análise de resíduos de micotoxinas em produtos específicos de origem animal, especialmente no leite, uma vez que a suscetibilidade dos efeitos tóxicos está relacionada com a idade. Não bastasse, o leite é caracterizado por apresentar os maiores percentuais de transferência de micotoxinas. Erroneamente, os alimentos mais contaminados são destinados aos bovinos principalmente, por apresentarem um tamanho corporal maior e um sistema digestivo distinto, portanto mais resistentes (SASSAHARA et al., 2005; MEKI et al., 2001).

Dentre as micotoxinas que vem sendo estudadas quanto aos seus efeitos biológicos, destaca-se DON, caracterizado como risco pela sua alta incidência. O seu efeito tóxico se deve principalmente pela presença do anel epóxido de sua estrutura, pois após sua destruição ocorre perda total da toxicidade. Também há evidências da existência de algum efeito decorrente dos grupamentos R e da ligação dupla entre o carbono 9 e 10 (SNYDER, 1986). Reações químicas como oxidação, redução, hidrogenação catalítica, reação ácido-base e reações de fechamento dos anéis podem ocorrer eliminando a toxicidade do composto por destruir, em alguns casos, a função 12-13 epóxi (SNYDER, 1986).

Os sintomas de intoxicação por DON variam podendo ser agudos e crônicos, dependendo da quantidade presente em alimentos contaminados, estando descritos principalmente distúrbios gastrointestinais, danos no sistema imunológico, hematotoxicidade, inibição da síntese protéica, RNA e DNA (BAARS et al. 1999; MURTHY et al., 1985; SUDAKIN, 2003; YOSHISAWA, 2001; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999, 2006; KRABBE, 2005; DANICKE et al., 2004). Os estudos com baixos níveis de exposição mostram que estes danos são irreversíveis em situações de exposição crônica (SHLATTER, 2004; LARSEN et al., 2004; SUDAKIN, 2003; RICHARD, 2007). Entretanto, permanecem em dúvida os principais resultados toxicológicos quanto carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e teratogênica (MEKI et al., 2001).

Alguns autores propõem que os danos em nível bioquímico decorrem da inibição da síntese protéica, de DNA e RNA impedindo a união de subunidades ribossomal 60S, onde atuam um sobre o outro com enzimas peptidiltransferase. Esta interação conduz a diferentes variações da inibição da formação da ligação peptídica. O grupo epóxido C_{12,13} é responsável pela inibição da síntese protéica. Certas substituições do anel na posição C₃ e C₄ originam outros efeitos adicionais. DON ainda é dado como inibidor do início da síntese protéica como também os passos de alongação e terminação da cadeia (MURTHY et al., 1985; SUDAKIN, 2003; MURPHY et al., 2006).

Na célula eucariótica, a síntese de polipeptídios começa com um resíduo de metionina, doado por um transportador especial metionil-tRNA, local onde ocorre a inibição pelo DON ou falha de poliribossomos, que inibe a formação da ligação peptídica com a metionina iniciadora da cadeia proteica ou dos três aminoácidos finais da cadeia (KIESSLING, 1986). Um estudo realizado por Wollenhaupt e outros pesquisadores (2006), investigando efeitos de DON em nível celular em sistema *in vivo* e *in vitro*, reforçaram a idéia de que, *in vitro*, o DON influencia fortemente a expressão gênica, mas não foram comprovadas as alterações nos processos que envolvem a iniciação da translação de mRNA. *In vivo* também não foi comprovado evento molecular.

Há possibilidade de reação entre DON e proteínas, ocasionada pela interação com grupos sulfidrilas, como já foi demonstrado para vários tricotecenos (fusarenon x, neosolaniol, toxina T-2 e DON). Estas interações afetaram a ação enzimática de lactato desidrogenase e amilases (UENO; 1986; KIESSLING, 1986).

A toxicidade aguda/subaguda é caracterizada por vômito, retardo gástrico, rejeição da dieta, perda de peso e diarreia, caracterizada por uma DL 50 oral de 78 e 46 mg/kg de peso corporal para algumas espécies de camundongos. A dose mínima para vômitos em suínos foi 0,05-0,2 mg/kg de peso corporal, quando oferecido oralmente (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999; DANICKE et al., 2004; KRABBE, 2005). A intoxicação aguda se caracteriza por ocorrência de necrose em vários tecidos tais como trato intestinal, medula óssea e tecido linfático (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999 e 2006).

Após exposição oral crônica, para algumas espécies como rato e suínos foi observado baixo consumo da dieta, reduzido ganho de peso e troca de níveis de alguns parâmetros quantificados em sangue para avaliação dos riscos imunotóxicos e hematotóxicos (Baars et al. 1999). Doses de 2-4 mg/kg em ração (equivalente a 0,08-0,16 mg/kg de peso corporal) reduziu o ganho de peso, causou aumento de peso do fígado, diminuição da concentração de proteína serica e presença de fósforo e cálcio no soro, diminuição temporária do volume da célula. Efeitos como qualidade da carcaça, IgA, outros parâmetros sanguíneos, alterações patológicas em rim, pâncreas, paredes do íleo Peyers, nódulos no mesentério linfóide foram verificados, mas não foram estatisticamente

significativos. Cabe salientar que neste estudo com suínos, a ração estava naturalmente contaminada, sendo impossível excluir a presença de outras toxinas que podem ter contribuído nos efeitos observados. (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999; LARSEN et al., 2004).

Experimentos *in vivo* com suínos e bovinos consumindo ração contaminada, mostraram que após administração oral de DON, a eliminação ocorria entre 3 e 5 horas. O caminho metabólico inclui a oxidação, de-epoxidação, hidrólise e conjugação glucuronida. Estudo *in vitro* de sangue humano sugere que carboxilesterases podem ser importantes na hidrólise de tricotecenos para metabólitos de maior polaridade e menor toxicidade (YANGEN e BIALER, 1993; ROTTER et al., 1996; CODDINGTON et al., 1989; JOHNSEN et al., 1988; SUDAKIN, 2003). A biodegradação oral de DON e outros tricotecenos é geralmente baixa como um resultado da instabilidade fisiológica e primeira etapa do metabolismo (YAGEN e BIALER, 1993 *apud* SUDANKIN, 2003).

Microrganismos intestinais presentes podem ser uma forma adicional de detoxificação em algumas espécies de animais. A transformação microbiológica de DON pode ocorrer principalmente no ceco, cólon e reto, sendo o único metabólito detectado o de-epóxi-DON. Esta transformação de DON, redução do grupo epóxido C_{12,13}, se caracteriza por uma significativa perda da toxicidade, podendo ocorrer no trato gastrointestinal de ratos, gado bovino e suínos (UENO, 1986; MELLO et al., 1999; SWASON et al., 1989; YOUNG et al., 2007). Os ruminantes têm demonstrado tolerância à ação de DON e outros tricotecenos, enquanto que animais monogástricos são altamente sensíveis a estas toxinas (UENO, 1986; LANGSET & RUNDBERGET, 1998; KABAK, DOBSON e VAR, 2006). Em ratos, a transformação metabólica de DON demonstrou que parte da toxina foi excretada pela urina na forma não metabolizada e outra na forma deoxigenada. Um fato importante foi a não ocorrência de acumulação específica desta toxina em tecidos de animais, e os resíduos acil são atacados por várias esterases produzindo assim um grande número de metabólitos hidrolisados (UENO, 1986; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2001).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que pequenas doses de tricotecenos podem resultar em estimulação imune, enquanto altas doses podem resultar em supressão imunológica. A principal via é imuno disfunção e hematotoxicidade em humanos, incluindo aumento da suscetibilidade de doenças infecciosas e efeitos adversos como consequência (LARSEN et al., 2004; SUDAKIN, 2003). Em cavalos, gado bovino, aves domésticas, gatos, camundongo e suínos, a injeção subaguda e subcrônica de DON causaram uma diminuição das células de circulação do sangue, freqüentemente associadas com falhas na medula óssea (SUDAKIN, 2003; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999). A origem dos efeitos hematológicos, observados pelas intoxicações causados por toxinas produzidas por *Fusarium*, tem sido explicada através de testes *in vitro*. As etapas iniciais dos processos

hematopoéticos são o principal alvo de tricotecenos. Quando comparado a mielotoxicidade, DON possui menor efeito que a toxina T-2 (PARENT-MASSIN, 2004; LARSEN et al., 2004). Efeito tóxico tem sido verificado também em células circulatórias. As toxicoses mais comuns são as manifestações de perturbação hematológica principalmente trombocitopenia e leucopenia (baixa produção de glóbulos brancos), podendo também influenciar na coagulação, causada principalmente por outro tricoteceno, a toxina T-2 (PARENT-MASSIN, 2004; LARSEN et al., 2004).

Quanto à contaminação em dietas, a indução dependente da dose na expressão de mRNA para qualquer citocina proinflamatória (TNF-alfa, IL-6, e IL-1 beta) foi descrita em modelo murine após doses orais de DON, variando de 1 a 25 mg/kg (ZHOU et al. 1999; NAGATA et al., 2001). Nenhum efeito imunológico foi observado quando uma dieta de 100 µg/kg de peso corporal, por dia, foi administrada durante dois anos de dieta para camundongos (IVERSON et al., 1995).

O Scientific Committee on Food (2001) recomendou estudos adicionais para confirmar a ausência de efeito neurotóxico de tricotecenos administrando baixas dose e identificação do alvo específico destas toxinas no sistema nervoso central, sistema serotoninérgico (LARSEN et al., 2004; SUDAKIN, 2003; TRITSCHER e PAGE, 2004; DANICKE et al., 2004; SHLATTER, 2004).

Estudos de toxicoses em humanos através de consumo de alimentos contaminados por DON e outros tricotecenos, também demonstraram a ocorrência de perturbação hematológica (trombocitopenia e leucopenia). Os pacientes rapidamente tiveram problemas no processo de coagulação, e resistência comprometida quanto a infecções. Conseqüentemente, eles estavam sujeitos a septicemia e hemorragia maciça (LARSEN et al., 2004; SUDAKIN, 2003).

Avaliações toxicinéticas têm sido realizadas em animais de laboratório e domésticos, resultando em variações nos parâmetros farmacocinético e suscetibilidade aos tricotecenos, conforme a espécies. Efeitos toxicocinéticos em humanos são poucos e ainda não se dispõe de dados para usar as rotas metabólicas de eliminação como indicativos de risco agudo ou crônico. Esta falta de informação e a ocorrência casual de toxicoses humanas incentivam pesquisas que investiguem a influência destas toxinas em sistemas diversos (BEREK et al., 2001).

O interesse no desenvolvimento de sistemas celulares para testes toxicológicos tem aumentado nos últimos anos por apresentar vantagens de custo, rapidez dose-resposta, amostra analítica, alta capacidade de triagem e podem ser, em alguns casos, utilizadas como análise quantitativa (UHLIG et al., 2005) além de utilizar, nos testes, células humanas para predição de resultados e avaliação de efeitos tóxicos em nível celular.

Os efeitos citotóxicos de tricotecenos em células megacariócitas progenitoras, assim como células progenitoras de glóbulos vermelhos e brancos de humanos, tem sido avaliado *in vitro* (FROQUET et al., 2001; LAUTRITE et al., 1997; RIO et al., 1997). Em cultura de linfócitos humanos foi verificado o incremento da produção de imunoglobina mesmo sob emprego de baixas doses de tricotecenos, em altas doses não foi observado diminuição da produção (THUVANDER et al., 1999). Também foram observados efeitos antagônicos na proliferação linfocitária e produção imunológica sob exposição concomitante de tricotecenos tipo A e B, sendo DON o tricoteceno de maior efeito, não diagnosticados efeitos sinérgicos (TRITSCHER e PAGE, 2004; MEKY et al., 2001).

DON e nivalenol foram citados por ligar-se ao local peptidiltransferase ribossomal, diminuindo a proliferação celular pela inibição protéica quando administrados em linhagens celulares de origem humana e animal. As fumonisinas perturbaram o metabolismo de esfingolipídios, alterando a membrana celular e causando citotoxicidade, enquanto que fumonisina B₁ alterou a peroxidação lipídica, podendo afetar a integridade de DNA (MINERVINI, FORNELLI, FLYNN, 2004; MOBIO et al., 2000; MIURA et al., 2002). A toxina T-2 causou dano na membrana celular de 8 linhagens celulares de origem humana, alterando a via de peroxidação lipídica, sendo o efeito diminuído em presença de antioxidantes como vitamina C, E e selênio (SHOKRI et al., 2000).

A integridade do DNA através da indução oxidativa, citotoxicidade e apoptose foi avaliada para OTA utilizando duas linhagens celulares, células mamárias (V79 fibroblastos) e primárias (CV-1 células de rim de macacos), e verificada a ocorrência de indução de dano oxidativo do DNA, morte celular e poder nefro-carcinogênico da OTA (KAMP et al., 2005).

Danos oxidativos também foram diagnosticados como possível rota toxicológica para ZEA. Em cultura celular de carcinoma hepático humano (Hep G2) em presença desta micotoxina, ZEA inibiu a proliferação celular e a síntese protéica, entretanto outras investigações são necessárias para confirmar a indução do estresse oxidativo (HASSEN et al., 2005).

Para células eritroleucemicas (K-562), que pode ser um conveniente modelo de precursores linfócitos humanos, através da análise do ciclo celular, fumonisina B₁, DON e nivalenol estão em ordem crescente de toxicidade relacionada à indução de apoptose, atuando como mecanismo citostático na diminuição da proliferação celular sem danos na membrana plasmática e indução programada de morte celular (WU et al., 2007).

Tem sido demonstrado em teste *in vitro*, que DON inibe a proliferação celular de linfócito humano em 50% (IC₅₀) e causa apoptose em células imaturas em doses na faixa de 0,34–3,38 µM após 18 horas de exposição (MEKY et al., 2001; UZARSKY, ISLAM e PESTKA, 2003)

Tammer e colaboradores (2007), avaliando o efeito da co-ocorrência de micotoxinas (patulina, citrinina, gliotoxina, OTA) em células sanguíneas mononucleares humanas, estabeleceram que os efeitos combinados a que humanos estão expostos, expresso principalmente na inibição das funções imunes, foi mais tóxico quando testada em conjunto do que isoladamente. Isto reforça a importância de metodologias adequadas para análise simultânea de micotoxinas.

Testes citotóxicos, *in vitro*, envolvendo células humanas permitem extrapolar sintomatologias causadas por micotoxinas. Entretanto, numerosos bioensaios têm sido desenvolvidos para triar extratos contaminados por micotoxinas. Dentre eles, a utilização de métodos de avaliação de citotoxicidade por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromida), MTS (sal de tetrazólio amarelo) e exclusão por azul de Trypan demonstram, além da avaliação toxicológica do extrato, outros efeitos à linhagem celular pela contaminação presente. Estes ensaios são rápidos, versáteis, quantitativos e reproduzíveis (CETIN e BULLERMAN, 2005), porém há ainda a necessidade de investigação da capacidade de linhagens celulares em triar uma ou mais micotoxinas presentes em um mesmo extrato.

Segundo Wu et al. (2007) em estudo comparativo de imunotoxicidade com DON, os testes de citotoxicidade não apresentaram diferença significativa entre eles verificando dose-resposta, diagnosticando-os como ensaios para avaliar toxicidade de extratos e triagem de amostras suspeitas de contaminação.

A avaliação da toxicidade se dá pela concentração e/ou proliferação celular e sua viabilidade durante o período de avaliação. O período para obtenção de uma resposta ou efeito tóxico correspondente a concentração da micotoxina testada vem sendo de 76 horas de cultura celular por Berek et al. (2001), Cetin e Bullerman (2005), Bony et al. (2007). A linhagem celular k-562 e toxina DON foi avaliada por Wu e colaboradores (2007) que obtiveram dose-resposta em 48 horas de cultura, sem, no entanto, definirem o limite de concentração para efeito citotóxico. Período de 48 horas de avaliação foi também empregado para definir dose-resposta para OTA, verificando diminuição drástica da viabilidade celular e apoptose (Kamp et al., 2005).

A variedade de culturas celulares mamárias e também de rim de filhotes de hamster (BHK-21), rim canino de Mardin Darby (MDCK), rim suíno (SK) e Caco-2, intestino de rato foram utilizadas para detectar micotoxinas produzidas por *Fusarium* em extratos contaminados, porém nenhuma linhagem apresentou alta sensibilidade à triagem. Segundo Cetin e Bullerman (2005) e Wu et al. (2007), CHO-K1, C5-O, HepG2 e K-562 são células altamente sensíveis para testes preliminares de triagem de extratos de alimentos e rações contaminadas.

Outros casos de exposição têm sido relatados através do consumo de alimentos e rações contaminadas. Entretanto, a informação da quantidade de DON, e de outras micotoxinas, e a quantidade consumida de alimento são escassas, dificultando estimar os riscos e os efeitos causados, gerando a necessidade e continuidade de estudos que disponibilizem informações precisas quanto à conseqüência da exposição a esta classe de toxinas em humanos e animais.

4 REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, D., HOUSE, J.D., NYACHOTI, M. Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat. **Mycopathologia**, v. 160, p. 297-301, 2005.
- ABRUNHOSA, L., SANTOS, L., VENANCIO, A. Degradation of Ochratoxin A by Proteases and by a Crude Enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 231-242, 2006.
- ABRUNHOSA, L., VENANCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett**, v. 29, p. 1909-1914, 2007.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENANCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- ADEJUMO, T.O., HETTWER, U., KARLOVSKY, P. Occurrence of Fusarium species and trichothecenes in Nigerian maize. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n. 3, p. 350-357, 2007.
- ANG, E. L., ZHAO, H., OBBARD, J.P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 487-496, 2005.
- ARIM, L., SARDJONO, R.H. Optimization and validation of a minicolumn method for determining aflatoxins in copra meal. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 4, p. 877-882, 1999.
- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WEASTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.
- BAARS, A.J.; VAN APELDOORN, M.; WOUTERS, M. Deoxynivalenol. In: Pieters MN, Fiolet DCM. **Derivation of concentration limits in wheat and wheat containing products. Appendix 1 Toxicology**. Milieu, Bilthoven, The Netherlands, Rijks Instituut voor Volksgezondheid, 1999.

- BADIALE-FURLONG, E., SOARES, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of the AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995a.
- BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L.M.V. Variáveis bióticas e abióticas e a incidência de tricotecenos em trigo. **Revista Vetor**, v. 5, p. 21-31, 1995b.
- BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L.M.V.; LASCA, C.C. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995a.
- BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L.M.V.; LASCA, C.C. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995b.
- BADIALE-FURLONG, Eliana. **Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), FEA-UNICAMP, 1992.
- BALÁZS, E., SCHEPERS, J.S. The Mycotoxin Threat to Food Safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 1-2, 20 October, 2007.
- BARAJ, E. **Interferência dos tricotecenos no processo fermentativo**. *Dissertação –* Mestrado de Engenharia de Alimentos/FURG, 2000.
- BATA, A.; LASZATITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.
- BAXTER, E.D., SLAIDING, I.R., KELLY, B. Behavior of ochratoxin A in brewing. **Journal of the American Society of Brewing Chemist**, v. 59, n. 3, p. 98-100, 2001.
- BEJAQUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbial Lett.**, v. 255, p. 203-208, 2006.
- BEJAQUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A. Conidia of Black Aspergilli as New Biological Adsorbents for Ochratoxin A in Grape Juices and Musts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 8224-8229, 2005.
- BENEDETTI, R., NAZZI, F., LOCCI, R., FIRRAO, G. Degradation of fumonisin B1 by a bacterial strain isolates from soil. **Biodegradation**, v. 17, p. 31-38, 2006.
- BENNETT, G.A., RICHARD, J.L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, May, p. 235-238, 1981.
- BEREK, L.; PETRI, I.B.; MESTERHÁZY, Á.; TÉREN, J.; MOLNÁR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 25-30, 2001.

- BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 33–37, 2007.
- BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 334, p. 211-276, 1985.
- BOEIRA, L.S., BRYCE, J.H., STEWART, G.G., FLANNIGAN, B. Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeast growth to *Fusarium* mycotoxins zearalenone, deoxinivalenol and fumonisin B₁. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 69-81, 2002.
- BONY, S., OLIVIER-LOISEAU, L., CARCELEN, M., DEVAUX, A. Genotoxic potential associated with low levels of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 3, p. 457-465, April 2007.
- BRETZ, M., BEYER, M., CRAMER, B., KNECHT, A., HUMPF, H. Thermal Degradation of the *Fusarium* Mycotoxins Deoxynivalenol. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 6445-6451, 2006.
- BRETZ, M., KNECHT, A., GOCKLER, S., HUMPF, H. Structural elucidation and analysis of thermal degradation products of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 4, p. 309-316, 2005.
- CACCIAMANI, J.M., PERES, G.L., GARDA-BUFFON, J., BADIÁLE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **B. CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.
- CALONI, F., SPOTTI, M., CAMP, H.O., GREMMELS, F., POMPA, G. *In Vitro* Metabolism of Fumonisin B₁ by Ruminant Microflora. **Veterinary Research Communications**, v. 224, p. 379-387, 2000.
- CAVALIERE, C.; D'ASCENZO, G.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANÁ, A. Determination of type B trichothecene and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p.559-568, 2005.
- CENKOWSKI, S., PRONYK, C., ZMIDZINSKA, D., MUIR, W.E. Decontamination of food products with superheated steam. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 1, p. 68-75, 2007
- CETIN, Y.; BULLERMAN, L.B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755-764, 2005.
- CHISTI, Y. Bioremediation-keeping the Earth clean. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 371-372, 2005.
- CODDINGTON, K.A.; SAWSON, S.P.; HASSAN, BUCK, W.B. Enterohepatic circulation of T-2 toxin metabolites in the rat. **Drug Metab. Dispos.** 17, 600-605, 1989.

- COLE, J., R., COS, R.H. The trichothecenes. **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. Academic Press, 1986.
- CONZANE, R.S., STENZEL, W.R., KROH, L.W. Reducing the aflatoxin content in peanuts. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 98, n. 9, p. 321-325, 2002.
- DALL'ASTA, C., GALAVERNA, G., BIANCARDI, A., GASPARINA, M., SFORZA, S., DOSSENA, A., MARCHELLI, R. Simultaneous liquid chromatography–fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v.1047, p. 241–247, 2004.
- DANICKE, S.; VALENTA, H.; DOLL, S.; GANTER, M.; FLACHOWSKY, G. On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 14, n. 1-4, p. 141-157, 2004.
- DEMEKE, T.; CLEAR, R.M.; PATRICK, S.K.; GABA, D. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 271-284, 2005.
- DICKENS, J.W., WHITAKER, T.B. Efficacy of electronic color sorting and hand picking to remove aflatoxin contaminated kernels from contaminated lots of shelled peanuts. **Peanut Science**, v. 2, p. 45-50, 1975.
- EGMOND, H.P.; PAULSCH, W. Determination of mycotoxins. **Pure & Appl. Chem.**, v. 58, n. 2, p. 315-326, 1986.
- ELLIS, W.O., SMITH, J. P., SIMPSON, B. K., OLDHAM, J. H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 403-439, 1991.
- FLANNIGAN, B.; DAY, S.W.; DOUGLAS, P.E.; McFARLANE, G.B. *Fusarium* mycotoxins and the malting of barley. In: J. Lacey (Ed.), **Trichothecenes and other mycotoxins**, p. 171-184. New York, 1985.
- FONSECA, H. Aflatoxin removal from peanut meals with commercial aqueous ethyl alcohol. **Ver. Microbiol.**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 101-6, 1994.
- FONSECA, H. In : **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. Rio de Janeiro: editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 261p.
- FOULER, S. G.; TRIVEDI, A. B.; KITABATAKE, N. Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 631-637 1994.
- FREDLUND, E.; GIDLUND, A.; OLSEN, M.; BÖRJESSON, T.; SPLIID, N.H.H.; SIMONSSON, M. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. **Journal of Microbiological Methods**, in press, 2008.

- FREIMUND, S., SAUTER, M., RYS, P. Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides*. **Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 38, n. 3, p. 243-255, 2003.
- FROQUET, R. SIRIBIL, Y.; PARENT-MASSIN, D. Trichothecene toxicity on human megakaryocyte progenitors (CFU-MK). **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 20, p. 84-89, 2001.
- FUCHS, E., BINDER, E.M., HEIDLER, D., FRSKA, R. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. **Food additives and Contaminants**, v. 19, n.4, p. 379-386, 2002.
- FURLONG, E. B.; BARAJ, E. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos: deoxinivalenol e toxina T2. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, Inst. Adolfo Lutz - São Paulo, v. 62, n. 2, p. 18-26, 2003.
- GARDA, J., BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- GARDA, J.; BADIALE-FURLONG, E. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. **Revista Veter**, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2003.
- 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., BARAJ, E., BADIALE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, aceito, no prelo, 2008.
- GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 37-48, 1993.
- GILBERT, J.; STARTIN, J.R.; CREWS, C. Optimization of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 319, p. 376-381, 1985.
- HASSEN, W.; GOLLI, E.E.; BAUDRIMONT, I.; MOBIO, T.; LADJIMI, M.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Cytotoxicity and Hsp 70 induction in Hep G2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. **Toxicology**, v. 207, n. 2, 14, p. 293-301, February 2005.
- HAZEL, C.M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecenes levels. **Toxicology Letters**, p. 51-59, 2004.
- IOOS, R.; BELHADJ, A.; MENEZ, M.; FAURE, A. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 894-902, 2005.

- IVERSON, F.; ARMOSTRONG, C.; NERA, E.; TRUELOVE, J.; FERNEI, S.; SCOTT, P.; STAPLEY, R.; HAYWARD, S.; GUNNER, S. Chronic feeding study of deoxinivalenol in B6C3F1 male and female mice. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v. 15, p. 283-306, 1995.
- JOHNSEN, H.; ODDEN, E.; JOHSEN, B.A.; FONNUM, F. Metabolism of T-2 toxin by blood cell carboxylesterases. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 3193-3197, 1988.
- JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 342-362, 2007.
- KABAK, B., DOBSON, A.D.W., VAR, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593-619, 2006.
- KABAL, B., DOBSON, A.D.W., VAR, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593-619, 2006.
- KALOGERAKIS, N. Special issue: recent advances in bioremediation. **Environmental International**, v. 31, p. 47, 2005.
- KAMP, H.G., EISENBRAND, G., SCHLATTER, J., WURTH, K., JANZOSKI, C. Ochratoxin A-induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, p. 413-425, 2005.
- KAPLAN, C.W.; KITTS, C.L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1777-1786, 2004.
- KARLOVSKY, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. **Natural Toxins**, v. 7, p. 1-23, 1999.
- KIENTZ, C.E. e VERWEIJ, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silic capillary columns. **Journal of Chromatography**, v. 355, p. 229-240, 1986.
- KIESSLING, K.H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v.58, n. 2, p. 327-338, 1986.
- KOCH, P. State of the art of trichothecenes analysis. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 109-112, 2004.
- KOTAL, F.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; POUŠTKA, J.; RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 219-225, 1999.
- KRABBE, E. L. **MONITORAMENTO E CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-PRIMAS E RAÇÕES**. Nutrição de Não - Ruminantes, BASF SA – Marketing Regional – Química Fina, São Bernardo do Campo – SP, 2005.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241–264, 2007.

- LABUDA, R.; PARICH, A.; BERTHILLER, F.; TANCINOVA, D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 19-25, 2005.
- LANGSET,W.; RUNDBERGET,T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 103-121,1998.
- LARSEN, J.C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 1-22, 2004.
- LAUREN, D.R.; RINGOSE, M.A. Determination of the fate of three Fusarium mycotoxins through wet milling of maize using and improved HPLCX analytical technique. **Food Addit. Cont.**, v. 14, n. 5, p. 435-443, 1997.
- LAUTRITE, S.; RIO, B.; PARENT-MASSIN, D. In vitro effects of Diacexyscirpenol (DAS) in human and rat granulomonocytic progenitors. **Mycopathologia**, v. 140, p. 59-64, 1997.
- LINE, L.E.; BRACKET, R.E. Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal Food Protection**, v. 58, p. 91-94, 1995b.
- LINE, L.E.; BRACKET, R.E. Role of toxin concentration and second carbon source in microbial transformation of aflatoxin B₁. **Journal Food Protection**, v. 58, p. 1042-1044, 1995a.
- LINE,L.E.; BRACKET, R.E.; WILKINSON, R.E. Evidence for degradation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal Food Protection**, v. 57, p. 788-791,1994.
- LORI, G.A., SISTERNA, M.N., HAIDUKOWSKI, M., RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiol. Res.**, v. 158, p. 29-35, 2003.
- MAROCHI, M. A. **Uma metodologia para triagem, quantificação e confirmação de tricotecenos e zearalenona utilizando cromatografia de camada delgada**. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos/FEA, Universidade Estadual de Campinas, 1988.
- MATEO, J.J., LLORENS, A., MATEO, R., JIMENEZ, M. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 99–112, 2001.
- MEKY, F.A.; HARDIE, L.J; EVANS, S.W.; WILD, C.D. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 827-836, 2001.
- MELLO, J. P. F, PLACINTA, C. M., MACDONALD, M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.
- MELLO, J. P. F., & MACDONALD, A.M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

- MILANEZ, T.V.; LEITAO, F.F. The effect of cooking on ochratoxin A content of beans, variety 'carioca'. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 1, p. 89-93, 1996.
- MILANEZ, T.V.; VALENTE-SOARES, L.M.; BAPTISTA, G.G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**, v. 17, n. 4, p. 293-298, 2006.
- MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.N. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol and fumonisin B₁ in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.
- MIURA, K., AMINOVA, L., MURAYAMA, Y. Fusarenon-X induced apoptosis in HL-60 cells depends on caspase activation and cytochrome c release. **Toxicology**, v. 172, n. 2, p. 103-112, 2002.
- MOBIO, A.T.; ANANE, R.; BAUDRIMONT, I.; CARRATÚ, M.R.; SHIER, T.W.; DANO, S.D.; UENO, Y.; CREPPY, E.E. Epigenetic Properties of Fumonisin B₁: Cell Cycle Arrest and DNA Base Modification in C6 Glioma Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, n. 1, p. 91-96, 2000.
- MOSS, M.O.; LONG, M.T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 387-399, 2002.
- MOSS, M.O.; THRANE, U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 23-28, 2004.
- MURPHY, P.A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- MURTHY, M.R.; RADOUCO-THOMAS, S.; BHARUCHA, A.D.; LEVESQUE, G.; PANDIAN, S.; RADOUCO-THOMAS, C. Effects of trichothecenes (T-2 toxin) on protein synthesis in vitro by brain polysomes and messenger RNA. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 9, p. 251-258, 1985.
- NAGATA, T.; SUZUKI, H.; ISHIGAMI, N.; SHINOZUKA, J.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 53, p. 309-315, 2001.
- NAGY, C.M.; FEJER, S.; BEREK, L.; MOLNAR, J.; VISKOLCZ, B. Hydrogen bondings in deoxinivalenol (DON) conformations – a density functional study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 726, p. 55-59, 2005.
- NAKAJIMA, M. **Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil**. Training Course, 283p., 2001, Japão.
- NICHOLSON, P.; CHANDLER, E. DRAEGER, R.C.; GOSMAN, N.E.; SIMPSON, D.; THOMSETT, M.; WILSON, A.H. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of

- Fusarium head blight of cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 691-703, 2003.
- NIDERKORN, V., BOUDRA, H., MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.
- NIESSEN, L., & DONHAUSER, S. Occurrence and Significance of Mycotoxins. K. **Scudamore Ed.** Central Science Laboratory, Slough, UK, p. 203-207, 1993.
- NUNES, I.L.; MAGANIN, G.; BERTOLIN, T.E.; BADIALE-FURLONG, E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Cienc. e Tec. Aliment.**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
- OLANIRAN, A.O.; PILLAY, D.; PILLAY, B. Biostimulation And bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. **Chemosphere**, v. 63, n. 4, p. 600-608, April 2006.
- OLIVEIRA, M.S., GARDA, J.; FARIA, R. ; SILVEIRA, S. T. ; DORS, G. C.; MARTINS, R. M. ; SCHWANKE, F. ; GOLDBECK, L. ; BERND, L. ; CACCIAMANI, J. ; BADIALE-FURLONG, E. Situação Micotoxicologica de Alimentos de Consumo Freqüente na Região Sul do Rio Grande Sul. In: XIX CBCTA, 07 a 10 de setembro, 2004, Recife/PE.
- OMURTAG, G.Z., BEYOGLU, D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. **Food Control**, v. 18, n.e 2, p. 163-166, february 2007.
- PAN, D., BONSIGNORE, F., RIVAS, F., PERERA, G., BETTUCCI, L. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 149-152, 2007.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PARENT-MASSIN, D. Haematotoxicity of trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 75-81, 2004.
- 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.
- PARK, D. L. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 49-60, 1993.
- PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 305-314, 2005.

- PASTER, N.; MENASHEROV, M.; LACEY, J.; FANELLI, C. Synergism between methods for inhibiting the spoilage of damp maize during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2, n. 2, p. 163-170, 1992.
- PATEY, A.; GILBERT, J. Fate of *Fusarium* mycotoxins in cereals during food processing and methods for their detoxification. In: Chelkowskj, J. (Ed.), **Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity**, Elsevier, Amsterdam, pp. 399-420, 1989.
- PITTED, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – na updated review. **Symposium International**, p. 79-492, 1998.
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. A REVIEW OF WORLDWIDE contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p. 21-37, 1999.
- PRONYK,C.; CENKOWSKI, S.; ABRANSOM, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, n. 10, p. 789-796, 2006.
- RADOVÁ, Z.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. **Journal of Chromatography**, v. 829, p. 259-267, 1998.
- RAMIREZ, M.L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 291-296, 2006.
- REINEHR, C. O; BADIALE-FURLONG, E. FURLONG, E. B.. Profile of the alcohols produced in fermentations with malt contaminated with tricothechenes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 12-18, 2003.
- RICHARD, J.J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoese-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.
- RIO, B.; LAUTRAITE, S.; PARENT-MASSIN, D. In vitro toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. **Human. Exp. Toxicol.**, v. 16, p. 673-679, 1997.
- ROTTER, B.A.; PRELUSKY, D.B.; PESTKA, J.J. Toxicology of deoxinivalenol (vomitoxin). **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 48, p. 1-34, 1996.
- SALANITRO, J.P.; BORN, P.B.; HUESEMANN, M.H.; MOORE, K.O.; RHODES, L.A.; JACKSON, L.M.R.; VIPOND, T.E.; WESTERN, M.M.; WISNIEWSKI, H.L. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, p. 1769-1776, 1997.
- SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 43, p. 981, 2005.

- SAWINKI-ACSADI, J. Utilization of corn containing T-2 toxin by microbiological treatment'. **Acta Alimentaria**, v. 12, p. 249-263, 1983.
- SCHNEIDER, E., CURTUI, V., SEIDLER, C., DIETRICH, R., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 113–121, 2004.
- SCHOLLEMBERGER, M.; LAUBER, U.; TERRY-JARA, H.; SUCHY, S.; DROCHNER, W.; MÜLLER, H.M. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography**, v. 815, p. 123-132, 1998.
- SCHOLLEMBERGER, B- M., MULLER, H.M., RUFLE, M., SUCHY, S., PLANCK, DROCHNER, W. Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 317– 32, 2005 b.
- SCHOLLEMBERGER, M., JARA, H.T., SUCHY, S., DROCHNER, W., MULLER, H..M. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 85– 89, 2002.
- SCHOLLEMBERGER, M.; DROCHNER, W.; RÜFLE, M.; SUCHY, S.; TERRY-JARA, H.; MÜLLER, H.M. Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 69–78, 2005 a.
- SCHOTHORST, R.C., JEKEL, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionization detection. **Food Chemistry**, v. 73, p. 111-117, 2001.
- SCHOTHORST, R.C., JEKEL, A.A. Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. **Food Chemistry**, v. 82, p. 475–479, 2003.
- SCHRODTER,R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (2006) http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (2001) http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (expressed on 2 December 1999), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCOOT, P.M. Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. **Mycotoxin Research**, v. 8, p. 58-66, 1992.

- SCOTT, P. M. Assessment of Quantitative methods for determination of trichothecenes in grains products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n.4, p. 876-883, 1982.
- SCOTT, P. M. Effects of Food Processing on Mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 6, p.489-499, 1984.
- SCOTT, P. M. Gas chromatography of mycotoxins. **Chromatography of Mycotoxins: techniques and Applications**. Ed. V. Betina, Elsevier, Amsterdam, 1991.
- SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 4, 875-882, 1996.
- SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 4, 875-882, 1996.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., WEBER, D. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography - mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n.4, p. 381-389, 1993.
- SCOTT, P. M., WEBER, D., KANHERE, S. R. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 765, n. 2, p.255-263, 1997.
- SCOTT, P.M. Trichothecenes in grains. **Cereal Foods World**, v. 5, n.7, p. 661-666, 1990.
- SCOTT, P.M; KANHERE, S.R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 4, p. 591-598, 1995.
- SCOTT, P.M; LAWRENCE, G. Determination of Aflatoxins in Beer. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 6, p. 1229-1234, 1997.
- SHIMA,J.; TAKASE, S.; TAKAHASHI, Y.; IWAI,I.; FUJINOMOTO, H.; YAMAZAKI, K.; OCHI, K. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by enrichment culture. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3825-3830, 1997.
- SHLATTER, J. Toxicity data relevant for hazard characterization. **Toxicology Letters**, 153, 83-89, 2004.
- SHOKRI, F. HEIDARI, M., GHARAGOZLOO, S., GHAZI-KHANSARI, M. In vitro inhibitory effects of antioxidants on cytotoxicity of T-2 toxin. **Toxicology**, 146, 171-176, 2000.
- SIETZ, L.M.; YAMAZAKI, W. T.; CLEMENTS, R. L.; MOHR, H.; ANDREWS, L. Distribution of deoxynivalenol in soft wheat mill streams. **Cereal Chem.**, v. 62, p. 467-469, 1986.
- SMITH, J.E.; HARRAN, G. Microbial degradation of mycotoxins **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, n. 1-3, p. 205-211, 1993.
- SNYDER, A. P. Qualitative, Quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **Journal of Food Protection**. v. 49, n.7, 544-569, july, 1986.
- SOARES, L.M.V; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-

- layer chromatographic method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
- SOKOLOVIC, M., SIMPRAGA, B. Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. **Food Control**, v. 17, p. 733-740, 2005.
- SOUZA, D.H.; BRACKETT, R.E. The role of trace metal ions in aflatoxin BI degradation by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal Food Protection**, v. 61, p. 1666-1669, 1998.
- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- Summary and Conclusion. P.1-33. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**, Fiftysixth Meeting, Geneva, p. 6-15, February, 2001.
- SVEDRUZIC, D.; JONSSON, S.; TOYOTA, C.G.; REINHARDT, L.A.; RICAGNO, S., LINDQVIST, Y.; RICHARDS, N.G.J. The enzyme of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, p. 176-192, 2005.
- SWANSON, S. P., & CORLEY, R. A. The distribution, metabolism, and excretion of trichothecenes mycotoxins. In: *BEASLEY, V., R. Trichothecenes Mycotoxicoses. Pathophysiologic Effects*, v. 1, Florida, 1989.
- SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, 141-158, 1998.
- SYDENHAM, E., THIEL, P.G. Physicochemical data from some selected *Fusarium* toxins. **Journal A.O.A.C. International**, v. 79, n. 6, p. 1365-1379, 1996.
- TAKAHASHI-ANDO, N., KIMURA, M., KAKEYA, H., OSADA, H., YAMAGUCHI, I. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. **Biochem. J.**, 365, 1-6, 2002.
- TAKAHASHI-ANDO, N., TOKAI, T., HAMAMOTO, H., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeast through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. **Applied Microbial Biotechnol**, 67, 838-844, 2005.
- TAMMER, B.; LEHMANN, I.; NIEBER, K.; ALTENBURGER, R. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. **Toxicology Letters**, v.170, p. 124-133, 2007.
- TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 59-66, 2007.
- TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 882, 2000

- TANAKA, T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course**, p.283, 2001, Japão.
- THUVANDER, A.; WIKMAN, C.; GADHASSON, I. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. **Food and Chemical toxicology**, v. 37, p. 639-648, 1999.
- TORRES, M.R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked-immunosorbent-assay method. **J. Food Microbiology**, v. 39, p. 139-143, 1998.
- TRITSCHER, A.M., PAGE, S.W. The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 155-163, 2004.
- TUTELYAN, V.A. Deoxynivalenol in cereals in Russia. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 173-179, 2004.
- UENO, Y. Trichothecene as environmental toxicants. In: **Reviews in Environmental Toxicology 2**. Ernest Hodgson (ed). Elsevier, Amsterdam, N.York, Oxford, 1986.
- UENO, Y. Trichothecene mycotoxins. **Mycologia, chemistry and toxicology**. In: H. H. Draper Ed., v. 3, p. 301-353, New York, 1980.
- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed). Developments in Food Science. Elsevier, Tokyo, v. 4, 1983.
- UHLIG, S.; GUTLEB, A.C.; THRANE, U.; FLAOYEN, A. Identification of cytotoxic principles from *Fusarium avenaceum* using bioassay-guided fractionation. **Toxicon**, v. 46, p. 150-159, 2005.
- UZARSKI, R.L., ISLAM, Z., PESTKA, J.J. Potentiation of trichothecene-induced leukocyte cytotoxicity and apoptosis by TNF- α and Fas activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 146, n. 2, p. 105-119, 2003.
- VAN LIMBERGEN; H. TOP, E.M.; VERSTRAETE, W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 16-23, 1998.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.
- VENOSA, A.D.; SUIDAN, M.T.; WRENN, B.A.; STROHMEIER, K.L.; HAINES, J.R.; EBERHART RT, B.L.; KING, D.; HOLDER, E. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. **Environmental Science Technol.**, v. 30, p. 1764-1775, 1996.

- WAGACHA, J.M., MUTHOMI, J.W. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 877-885, 2007.
- WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. **Food Control**, v. 8, n. 5/6, p. 329-339, 1997.
- WHITEHEAD, M.P., FLANNIGAN, B. The *Fusarium* mycotoxin deoxinivalenol and yeast growth and fermentation. **J. Inst. Brew.**, v. 95, p. 411-413, November-December, 1989.
- WOLF-HALL, C.E., HANNA, M.A., BULLERMAN, L.B. Stability of deoxinivalenol in heat treated foods. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 962-964, 1999.
- WOLLENHAUPT, K., DÄNICKE, S., BRÜSSOW, K.-P., TIEMANN, U. In vitro and in vivo effects of deoxynivalenol (DNV) on regulators of cap dependent translation control in porcine endometrium. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 60-73, 2006.
- WU, X.; MURPHY, P.; CUNNICK, J.; HENDRICH, S. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1846-1855, 2007.
- YANGEN, B.; BIALER, M. Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes. **Drug Metab. Rev.**, v. 25, p. 281-323, 1993.
- YOSHISAWA, T. **Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil**. Training Course, p. 283, 2001, Japão.
- YOUNG, J.C.; ZHOU, T.; YU, H.; ZHU, H.; GONG, J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 136-143, 2007.
- YU, J.; WHITELAW, C.A.; NIERMAN, W.C.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative role in aflatoxin contamination of crops. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 333-340, 2004.
- ZHOU, H.R.; HARKEMA, J.R., YAN, D.; PESTKA, J.J. Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxinivalenol). **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 57, p. 115-136, 1999.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DERIVAÇÃO DE
DEOXINIVALENOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL¹**

Jaqueline Garda, Eliana Badiale-Furlong

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Laboratório de Micotoxinas
Departamento de Química
Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 – Centro
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

¹ Publicado na Revista Química Nova em março de 2008 (anexo 1).

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DERIVAÇÃO DE DEOXINIVALENOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar a reação de derivação para determinar DON por cromatografia gasosa empregando planejamento experimental. Os fatores avaliados foram: temperatura, tempo de reação, catalisador e concentração de anidrido trifluoroacético (TFAA). A área relativa dos picos foi utilizada para avaliação dos efeitos. A melhor condição obtida para a derivação de DON foi a combinação do emprego de 200 μL de TFAA e 18 mg de bicarbonato de sódio, durante 6 minutos a 74 °C em uma faixa de 7 a 21 μg de DON. Nestas condições, o limite de detecção foi de 1,4 μg de DON.

Palavras-chave: deoxinivalenol, derivação, metodologia.

1 INTRODUÇÃO

A molécula de deoxinivalenol (DON) possui uma estrutura de um sesquiterpenóide tetracíclico com sete centros estéreos. Sua fórmula empírica é $C_{15}H_{20}O_6$, nomeado como 12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxí-, tricotec-9-en-8-one, (3 α ,7 α)-(9Cl). Esta estrutura é produzida por diversas espécies fúngicas do gênero *Fusarium*, um contaminante natural de cereais e seus resíduos, e até em vegetais intactos (MEKY et al., 2001; ATROSHI et al., 2002; SUDANKIN, 2003).

Além do gênero *Fusarium*, outros como *Mirothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimsporium* e *Stachybotrys* podem ser produtores desta micotoxina, podendo ocorrer em pré ou pós-colheita, em temperatura entre 0 a 35°C e umidade relativa entre 80 e 90% (SUDAKIN, 2003; SWEENWY, DOBSON, 1998).

Este composto se caracteriza pela estabilidade, que pode ser verificada durante muitos anos quando estocado a temperatura ambiente mesmo aquecido a 135°C não sofre degradação e, portanto, também em condições ambientais usuais de processamento e preparo de alimentos (YOSHIZAWA, 2001; MOSS, THRANE, 2004). O DON, como outros tricotecenos, não é volátil e pode ser desativado sob condições drásticas ácidas ou alcalinas, em presença de hidretos de alumínio, lítio ou peróxidos e hidratação em autoclave, onde o anel epóxido pode sofrer abertura. A enzima epóxido hidrase também é capaz de abrir o anel e produzir glicóis (MOSS, THRANE, 2004; PRONYK, CENKOWSKI, ABRANSON, 2006). Fungos e bactérias podem também alterar a estrutura deste tricoteceno, detoxificando-o (UENO, 1983).

Desde a demonstração da toxicidade dos tricotecenos, o desenvolvimento de métodos aplicados na detecção, análise e caracterização cromatográfica vem sendo grandemente incentivada pela possibilidade de separar diferentes metabólitos simultaneamente em suas matrizes de origem. Várias metodologias para determinação de tricotecenos tem sido revisada por autores, tais como Betina (1985), Scott (1991, 1993), Langseth e Rungberget (1998), Placinta D`Mello e Macdonald(1999), Kotal et al.(1999), Koch (2004), Murphy et al. (2006).

A avaliação destes informes demonstra que as etapas analíticas para determinação de micotoxinas consistem na amostragem, extração, limpeza, concentração, separação dos componentes do extrato, detecção, confirmação de identidade e quantificação. Não diferindo, portanto, das marchas analíticas para outros tipos de contaminantes incidentais. A detecção desta toxina é dificultada pela baixa absorvidade no ultravioleta e fluorescência, o que torna a cromatografia gasosa uma das técnicas preferenciais para a sua determinação (MURPHY et al., 2006; BADIALE-FURLONG, SOARES, 1995).

A derivação, ponto crítico na determinação de DON, antecede a determinação cromatográfica para reduzir a polaridade dos grupamentos livres, aumentar a pressão de vapor dos compostos, possibilitar a separação de substâncias muito semelhantes entre si no estado natural e introduzir grupos que tornam o composto adequado ao sistema de detecção empregado (KOTAL et al., 1999; BADIALE-FURLONG, SOARES, 1995; MILANEZ, VALENTE-SOARES, BAPTISTA, 2004).

A derivação do grupo hidroxila do DON é fundamental, pois a sua volatilidade pode ser aumentada substituindo o hidrogênio de grupos funcionais, por radicais do tipo dimetilsilil, trimetilsilil, butirilsilil e flúor (SCOTT, 1982). Estão descritos diferentes sistemas para derivação empregando anidrido trifluoroacético, heptafluorobutirilimidazol, pentafluorobutilimidazol, trimetilsilil, bis-trimetilsililacetamida, hexametildisilazano e trimetilsilimidazol, sendo que melhores resultados foram conseguidos com heptafluorobutil e anidrido trifluoroacético, utilizando como catalisador a piridina ou bicarbonato (SCOTT, 1991; BADIALE-FURLONG, SOARES, 1995; GILBERT, STARTIN, CREWS, 1984; GARDA et al., 2005).

No entanto, a maioria dos derivatizantes não estão disponíveis no comércio nacional, o que dificulta o estabelecimento de rotinas analíticas acessíveis para a maioria dos laboratórios envolvidos com a análise desta micotoxina. Além disso, halogenados dificultam a detecção em detectores de ionização de chama e os sililizantes são altamente corrosivos. O emprego destes reagentes em termos de quantidades, relação com catalisadores e tempo/temperatura de reação são pouco estudados. Faltam, portanto, dados sobre os efeitos destas variáveis nos resultados quali e quantitativos da micotoxina que torne o emprego destes reagentes comparáveis aos recomendados por órgãos oficiais. Estas dificuldades podem ser visualizadas na avaliação das poucas informações disponíveis no país sobre a ocorrência de DON em alimentos destinados ao consumo humano, a não existência de barreiras legais a comercialização de produtos contaminados ou medidas preventivas a contaminação.

As informações disponíveis na literatura permitem estimar que 25% dos produtos agrícolas cultivados mundialmente estejam contaminados com DON, o que torna imprescindível dispor de dados específicos e confiáveis para estimar o risco ao consumo de alimentos ou insumos contaminados por esta toxina ingeridos diariamente. A partir deste conhecimento, podem ser adotadas medidas preventivas eficientes para minimizar danos à saúde de humanos e animais de criação (MEKY, 2001).

Este trabalho pretende contribuir com a disponibilização de metodologia otimizada de derivação para a determinação de deoxinivalenol em fase gasosa para instrumentos acoplados com detector do tipo universal.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

O padrão de DON e padrão interno, metil éster de ácido aracdônico (90% de pureza) utilizado a uma concentração de 0,1 mg/mL foram adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA). O anidrido trifluoroacético (TFAA) com 99% de pureza e densidade de 1,51 g/mL foi da marca Merck (Alemanha).

Outros reagentes e solventes utilizados durante os testes foram de grau p.a.

2.2 Padrão de deoxinivalenol

Para o preparo da solução estoque de DON, a toxina foi dissolvida em benzeno: acetonitrila (95:5, v/v) resultando em uma concentração de 100 µg/mL, conforme Shepeherd e Gilbert (1988). A solução de trabalho consistiu na diluição da solução estoque para concentração de 50 µg/mL. A determinação da concentração foi estimada pela relação p/v utilizado na preparação da solução e confirmada pelo procedimento descrito por Bennett & Shotwell (1990) utilizando a absorvidade molar do padrão 219 para DON em espectrofotômetro modelo Cary 100 da Varian (EUA).

2.3 Padronização de metodologia para derivação

A partir de condições já estudadas por Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004), Milanez, Valente-Soares e Baptista(2004) foram estudadas as variáveis: tempo de reação (30, 45 e 60 minutos), temperatura (40, 60 e 80 °C) e catalisador (bicarbonato de sódio e piridina), através de planejamento fatorial 2^3 , ou seja, três variáveis ou fatores testados em dois níveis (-1 e +1) e 6 pontos centrais (0), gerando 14 experimentos (Tabela 1) (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; RODRIGUES, IEMMA, 2005). Para estabelecer a melhor condição de tempo e temperatura, utilizou-se planejamento fatorial completo 2^2 , duas variáveis em dois níveis (-1 e +1), com pontos axiais (-1,414 e +1,414) e 3 centrais (0) (Tabela 2).

Tabela 1. Valores de área relativa para o planejamento fatorial 2^3 e 6 pontos centrais (a).

Experimento	Variáveis			Área DON/área ácido aracdônico
	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Catalisador	
1	-1(30)	-1(40)	1(Piridina)	0,00
2	1(60)	-1(40)	-1(NaHCO ₃)	0,38
3	-1(30)	1(80)	-1(NaHCO ₃)	0,34
4	1(60)	1(80)	1(Piridina)	0,04
5	-1(30)	-1(40)	-1(NaHCO ₃)	0,03
6	1(60)	1(80)	-1(NaHCO ₃)	0,26
7	-1(30)	1(80)	1(Piridina)	0,24
8	1(60)	-1(40)	1(Piridina)	0,00
9	0(45)	0(60)	0(NaHCO ₃)	0,00
10	0(45)	0(60)	0(NaHCO ₃)	0,00
11	0(45)	0(60)	0(NaHCO ₃)	0,00
12	0(45)	0(60)	0(Piridina)	0,15
13	0(45)	0(60)	0(Piridina)	0,16
14	0(45)	0(60)	0(Piridina)	0,12

Tabela 2. Valores de área relativa para o planejamento fatorial 2^2 com pontos axiais e 3 pontos centrais (b).

Experimento	Variáveis		Área DON/área ácido aracdônico
	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	
1	-1(80)	-1(10)	0,206
2	1(105)	-1(10)	0,081
3	-1(80)	1(30)	0,296
4	1(105)	1(30)	0,073
5	-1,414(74)	0(20)	0,065
6	1,414(116)	0(20)	0,040
7	0(95)	-1,414(6)	0,314
8	0(95)	1,414(34)	0,048
9	0(95)	0(20)	0,145
10	0(95)	0(20)	0,158
11	0(95)	0(20)	0,200

Obtido o melhor catalisador, os valores ótimos para tempo de reação e temperatura, foi estudado a quantidade de TFAA, agente derivatizante, e quantidade de catalisador bicarbonato de sódio através do planejamento completo 2^2 com pontos axiais e dois centrais (Tabela 3).

Tabela 3. Planejamento fatorial 2² com pontos axiais e 2 centrais (c).

Experimento	Variáveis		
	TFAA (μL)	NaHCO ₃ (mg)	Área DON/área ácido aracdônico
1	-1(100)	-1(30)	0,022
2	1(300)	-1(30)	0,000
3	-1(100)	1(90)	0,000
4	1(300)	1(90)	0,031
5	-1,414(59)	0(60)	0,000
6	1,414(341)	0(60)	0,103
7	0(200)	-1,414(18)	0,166
8	0(200)	1,414(102)	0,018
9	0(200)	0(60)	0,043
10	0(200)	0(60)	0,056

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Statistica 6.0, considerando a área relativa da toxina (área DON/área ácido aracdônico) como resposta das variáveis em estudo.

2.4 Quantificação por cromatografia gasosa (CG)

Após a realização das derivações sob as diferentes condições em questão, o derivatizado foi seco sob nitrogênio, seguido de adição de 700 μL de tolueno e 2mL de água destilada, agitando a mistura em banho ultrasônico. O sistema foi congelado para melhor separação das fases, sendo retirados 500 μL da fração de solvente, que foi seca sob nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em hexano e adicionado padrão interno metil éster ácido aracdônico (1 μg), sendo injetado 1 μL em CG.

A quantificação foi realizada em CG Varian 3400 equipado com injetor *split/splitless* e Detector de Ionização de Chama, coluna DB-17 (J&W Scientific - EUA) de 30 m, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de filme de 50%-fenil metilpolisiloxano. O equipamento foi monitorado pelo software Star Chromatography Workstation, versão 4.1, marca Varian.

As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura do injetor 250 °C, abertura da válvula a 0,75 minutos, fluxo de limpeza do injetor de 75 mL/minuto, detector 300 °C, atenuação de 16×10^{12} . A programação para a coluna cromatográfica foi de 100 °C durante 1 minuto aumentando 50 °C/minuto até 200 °C, permanecendo 2 minutos, em

seguida aumentando 4 °C/minuto até 250 °C, permanecendo 11,5 minutos, completando 29 minutos de corrida cromatográfica.

2.5 Confirmação do tempo de retenção, limite de quantificação, detecção e linearidade

Para a confirmação da presença da toxina no sistema foi realizada uma reação de redução de DON com 200 µL de solução de boridreto de sódio (2 mg/mL), deixando reagir à temperatura ambiente por 24 horas. Esta solução foi neutralizada com ácido clorídrico 2 M, seguida da evaporação (MURPHY et al., 2006) e derivação com TFAA em meio alcalino.

Os limites de detecção e linearidade da concentração x área relativa de pico foram determinadas pela injeção de soluções padrões. O limite de detecção foi estabelecido pela injeção de concentrações de padrões que gerassem um sinal no detector três vezes superior ao desvio padrão das áreas relativas no tempo de retenção da toxina quando se injetava um branco de derivação (CAULCUTT, BODDY, 1983; OLIVEIRA, SOARES, SAWAZAKI, 2001).

A linearidade foi determinada a partir da injeção de soluções padrões de DON com concentrações variando entre 1,4 a 21 µg, com emprego de padrão interno estimando a área relativa como resposta a variação de concentração de padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através das condições cromatográficas citadas, o tempo de retenção de deoxinivalenol foi de 7,4 minutos confirmada por comparação com a alteração do tempo de retenção do padrão de DON reduzido.

O planejamento experimental foi utilizado para possibilitar a inferência estatística e fornecer informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis das variáveis em estudo, evidenciando a qualidade da repetibilidade, minimizando custos ao não se repetir todos os experimentos, demanda e desgaste de equipamento e tempo, menor exposição do analista e menor volume de descarte. Esta ferramenta melhorou a qualidade da informação através dos resultados, permitindo otimizar e construir o modelo preditivo dentro da faixa ótima para a reação de derivação, através da avaliação do erro experimental estimando a reprodutibilidade dos resultados alcançados (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; RODRIGUES, IEMMA, 2005).

A primeira etapa de estudo do efeito das variáveis tempo, temperatura e eficiência do catalisador, tem seus resultados apresentados na Tabelas 1 como área relativa DON/ácido aracdônico. Este foi escolhido como padrão interno por sua estabilidade frente a

condições cromatográficas, tempo de retenção e disponibilidade no mercado nacional e custo acessível.

A análise estatística mostrou que ocorreu um efeito significativo antagônico (Tabela 4) para catalisador ($p=0,024$) e para a interação entre tempo e temperatura ($p=0,039$).

Tabela 4. Efeitos e coeficientes para variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico.

Planejamento	Variável	Efeito	Desvio padrão	Nível de significância (p)	Coeficientes
(a)	Média/interação	0,12868	0,021198	0,002154	0,122868
	Catalisador	-0,179964	0,056085	0,023762	-0,089982
	Tempo x Temperatura	-0,155949	0,056085	0,038876	0,077975
(b)	Média/interação	0,1850	0,0122	0,0044	0,1850
	temperatura (Q)	-0,1028	0,0235	0,0483	-0,0514
	Tempo (L)	-0,1185	0,0206	0,0290	-0,0592
	Temperatura x Tempo	0,1739	0,0292	0,0270	0,0869
(c)	Média/interação	0,0439	0,0029	0,0421	0,0439
	TFAA (L)	0,0387	0,0065	0,1060	0,0193
	NaHCO ₃ (L)	-0,0501	0,0065	0,0822	-0,0250
	* TFAA x NaHCO ₃	0,0265	0,0092	0,2125	0,0132

*Não utilizado para cálculos de ANOVA.

(a) Para tempo, temperatura e catalisador utilizando planejamento fatorial 2^3 e 6 pontos centrais.

(b) Para temperatura e tempo utilizando planejamento fatorial 2^2 com pontos axiais e 3 pontos centrais.

(c) Para quantidade de TFAA e NaHCO₃ utilizando planejamento fatorial 2^2 com pontos axiais e 2 pontos centrais.

Quando o catalisador piridina foi utilizado, a área relativa do pico detectado foi menor comparada à área relativa obtida com bicarbonato de sódio (-0,18). Este resultado concorda com outros descritos na literatura como Nunes, Maganin, Bertolin e Badiale-Furlong (2003), Oliveira, Soares e Sawazaki (2001), Milanez, Valente-Soares e Baptista (2004). No entanto, Gilbert, Startin e Crews (1985), Scott (1991), Kientz e Verweij (1986) encontraram resultados contrários utilizando detector de captura de elétrons e/ou de massas.

Considerando a interação tempo e temperatura variáveis significativas para a eficiência da reação, foi realizado um planejamento completo com pontos axiais e centrais para obtenção do ponto ótimo de reação (Tabela 2 e 4). Este permitiu otimizar e construir modelo preditivo dentro da faixa ótima para a reação de derivação e conforme o previsto, efeito significativo ocorreu para as duas variáveis e a interação.

As variáveis estudadas isoladamente mostraram que quanto maior o intervalo de tempo e temperatura testados, menores foram às áreas relativas do pico detectada. Isto pode indicar que estão sendo formados outros compostos decorrentes da fragmentação do derivatizado tanto pelo longo período de exposição ao meio quanto pela alta temperatura. A interação destas duas variáveis apresentou o efeito significativo previsto, demonstrando que em menores tempos e temperaturas de reação, maiores foram as áreas detectadas. Estes resultados foram significativos e preditivos para a ação combinada destes parâmetros nas áreas relativas detectadas (Tabela 5), originando a Equação 1 e Figura 1.

$$\text{Área relativa detectada} = 0,1850 - 0,0514 \times \text{temperatura}_{\text{COD}}^2 - 0,0592 \times \text{tempo}_{\text{COD}} + 0,0869 \times \text{temperatura} \times \text{tempo}_{\text{COD}} \quad \text{Equação (1)}$$

Nas condições ótimas para tempo e temperatura, o estudo da quantidade de agente derivatizante, anidrido trifluoroacético (TFAA) a ser adicionado, e a quantidade de catalisador, bicarbonato de sódio (NaHCO_3) como determinado anteriormente, permitiu verificar que para o derivatizante, o intervalo significativo foi de 100 a 300 μL ($p=0,11$), e o aumento da adição deste agente foi acompanhado por uma maior (0,0387) área relativa detectada.

Para bicarbonato de sódio, a adição de maior quantidade na proporção de 30 para 90mg causou um efeito significativo ($p=0,0029$). Este aumento resultou em uma diminuição da área relativa do pico. Isto foi verificado por Scott (1991) e Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004), demonstrando que a utilização em excesso de bicarbonato como meio de reação poderia causar diminuição no seu rendimento possivelmente pela reversão da reação de derivação.

Estes resultados significativos correspondem a equação preditiva (Equação 2) e Figura 2 para os parâmetros de agente derivatizante TFAA e catalisador bicarbonato de sódio quanto a área relativa.

$$\text{Área relativa detectada} = 0,0439 + 0,0193 \times \text{TFAA}_{\text{COD}} - 0,0250 \times \text{NaHCO}_{3\text{COD}} \quad \text{Equação (2)}$$

Os dados confirmam a utilização de 30 mg de bicarbonato de sódio e 300 μL de TFAA anteriormente utilizados por Nunes, Maganin, Bertolin e Badiale-Furlong (2003), Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004), Milanez, Valente-Soares e Baptista (2006), Oliveira, Soares e Sawazaki (2001).

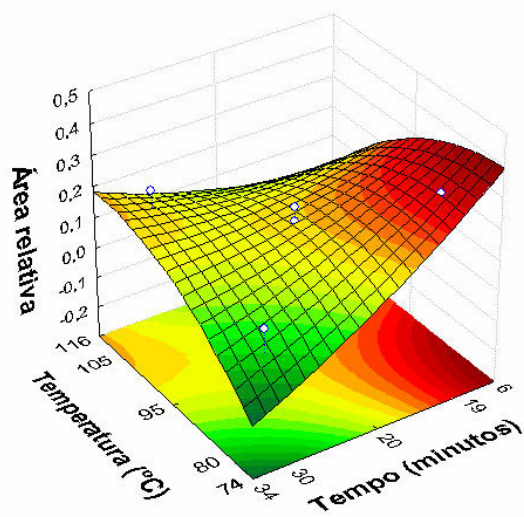


Figura 1. Superfície de resposta para temperatura e tempo.

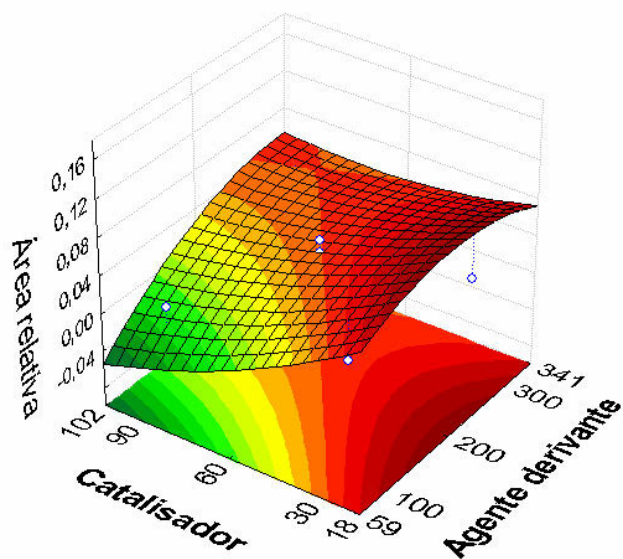


Figura 2. Superfície de resposta para agente derivatizante e catalisador.

Tabela 5. Dados da ANOVA para planejamento experimental avaliando tempo, temperatura e catalisador.

Planejamento	Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F	F _{tab} (95%)
(a)	Regressão	0,113414	2	0,056707	5,109	3,98
	Resíduo	0,122085	11	0,0111		
	Falta de ajuste	0,090629	6			
	Erro puro	0,031456	5			
	Total	0,235499	13			
(b)	Regressão	0,0746	3	0,0249	8,89	4,35
	Resíduo	0,0197	7	0,0028		
	Falta de ajuste	0,0180	5			
	Erro puro	0,0017	2			
	Total	0,0943	10			
(c)	Regressão	0,0079	2	0,00395	0,223	49,50 _(90%)
	Resíduo	0,0177	1	0,0177		
	Falta de ajuste	0,0176	6			
	Erro puro	0,0001	1			
	Total	0,0256	9			

(a) Para tempo, temperatura e catalisador utilizando planejamento fatorial 2^3 e 6 pontos centrais.

(b) Para temperatura e tempo utilizando planejamento fatorial 2^2 com pontos axiais e 3 pontos centrais.

(c) Para quantidade de TFAA e NaHCO_3 utilizando planejamento fatorial 2^2 com pontos axiais e 2 pontos centrais.

O emprego do intervalo ótimo para a reação de derivação, no entanto, utiliza a interação entre os componentes da reação, que para agente derivatizante e catalisador ($p=0,2125$) ocasiona um aumento na área relativa quando comparada com variáveis isoladas, indicando que 18mg de bicarbonato de sódio e 200 μL de TFAA seriam as melhores condições reacionais similares as utilizados por Milanez, Valente-Soares e Baptista³¹. O que é bastante interessante, pois menor é o gasto de material, menor a geração de resíduos para descarte e menores são os sinais espúrios no cromatograma (Figura 3).

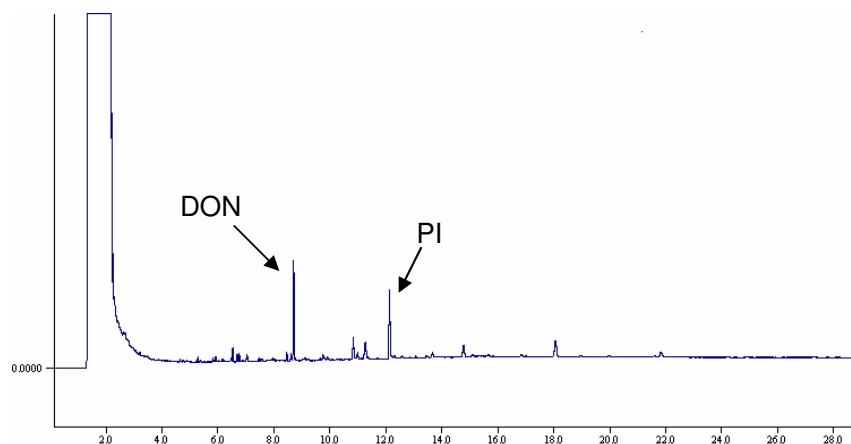


Figura 3. Cromatograma de deoxinivalenol com adição de padrão interno.

Confirmação do tempo de retenção, limite de quantificação, detecção e linearidade

A reação de redução para confirmar a presença de DON mostrou que o padrão reduzido apresentava respostas semelhantes às condições de derivação otimizadas, apresentando apenas um aumento no tempo de retenção relativo.

A linearidade da curva padrão foi realizada nas condições ótimas de derivação: adição de 18 mg de bicarbonato de sódio, 200 μL de TFAA, reação a 74 $^{\circ}\text{C}$ durante 6 minutos. A linearidade da curva foi significativa a partir de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ou 7 μg de deoxinivalenol, correspondendo os pontos de 7,10, 13, 15, 18, 21 μg , preparados em triplicatas em ordem randômica tendo um $R^2 = 0,9852^{32}$.

O limite de detecção determinado pelas sucessivas diluições foi de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ gerando um sinal do detector três vezes superior ao desvio padrão das áreas relativas no tempo de retenção das toxinas quando se injetou branco de derivação. Esta concentração correspondeu a 1,4 μg de deoxinivalenol derivado, valor que permite detectar DON contaminando amostras em concentrações 10 vezes inferiores aos estabelecidos pelas legislações de vários países.

5 CONCLUSÃO

Empregando três etapas de planejamento experimental para a reação de derivação pela acetilação, foi possível determinar as condições ótimas de reação para emprego das variáveis tempo, temperatura, agente derivatizante e catalisador com resultados significativos e preditivos para área relativa detectada. As condições otimizadas ocorriam

quando foram derivados de 1,4 a 21 µg de DON com adição de 18 mg de bicarbonato de sódio e 200 µL de TFAA, reagindo durante 6 minutos a 74 °C.

5 REFERÊNCIAS

- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WEASTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.
- BADIALE-FURLONG, E., SOARES, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of the AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995.
- BENNET, G. A., SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 270-275, 1990.
- BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 334, p. 211-276, 1985.
- CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical Chemists**, Chapman and Hall (ed.): London, 1983.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G.C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.
- GILBERT, J.; STARTIN, J.R.; CREWS, C. Optimization of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 319, p. 376-381, 1985.
- KIENTZ, C.E. e VERWEIJ, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silic capillary coluns. **Journal of Chromatography**, v. 355, p. 229-240, 1986.
- KOCH, P. State of the art of trichothecenes analysis. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 109-112, 2004.
- KOTAL, F.; HOLADOVÁ,K.;HAJSLOVÁ,J.; POUSTKA,J.; RADOVÁ,Z. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 219-225, 1999.
- LANGSET,W.; RUNDBERGET,T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 103-121,1998.
- MEKY, F.A.; HARDIE, L.J; EVANS, S.W.; WILD, C.D. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 827-836, 2001.

- MILANEZ, T.V.; VALENTE-SOARES, L.M.; BAPTISTA, G.G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**, v. 17, n. 4, p. 293-298, 2006.
- MILANEZ, T.V., VALENTE-SOARES, L.M., BAPTISTA, G.G. Avaliação intralaboratorial e otimização de método para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia a gás-espectrometria de massas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 15-23, 2004.
- MOSS, M.O.; LONG, M.T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 387-399, 2002.
- MURPHY, P.A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- NETO, B.B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2º ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
- NUNES, I.L.; MAGANIN, G.; BERTOLIN, T.E.; BADIALE-FURLONG, E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Cienc. e Tec. Aliment.**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
- OLIVEIRA, A. Q., SOARES, L. M. V., SAWAZAKI, E. DEOXYNIVALENOL, DIACETOXYSCIRPENOL, AND T2 TOXIN IN POPCORN HYBRIDS PLANTED IN THE STATE OF SÃO PAULO AND IN POPCORN COMMERCIALIZED IN THE CITY OF CAMPINAS, SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 3, p. 330-333, 2001.
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. A REVIEW OF WORLDWIDE contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p. 21-37, 1999.
- PRONYK, C.; CENKOWSKI, S.; ABRANSOM, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, n. 10, p. 789-796, 2006.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, 1º ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- SCOTT, P. M. Gas chromatography of mycotoxins. **Chromatography of Mycotoxins: techniques and Applications**. Ed. V. Betina, Elsevier: Amsterdam, 1991.
- SCOTT, P. M. Assessment of Quantitative methods for determination of trichothecenes in grains products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n.4, p. 876-883, 1982.
- SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxinivalenol standard reference solution. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 305-308, 1988.

- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, 141-158, 1998.
- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed). *Developments in Food Science*. Elsevier: Tokyo, 1983, v. 4.
- YOSHISAWA, T. **Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil**. Training Course, p. 283, 2001, Japão.

**CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXYNIVALENOL (DON) POR *Aspergillus*
oryzae E *Rhizopus* sp. EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Jaqueline Garda, Eliana Badiale-Furlong

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Laboratório de Micotoxinas
Departamento de Química
Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 – Centro
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE DEOXYNIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp. EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. em utilizar DON como fonte de carbono, através do estudo cinético do processo de degradação da micotoxina, em fermentação submersa. O meio submerso utilizado foi água destilada estéril contaminada com 63 µg de DON, inoculado com 4×10^6 esporos/mL das espécies fúngicas. A amostragem foi realizada a cada 48 horas de processo determinando a massa residual de DON e estimando o percentual e velocidade de degradação. A extração da massa residual de DON no meio durante 240 horas de fermentação foi por partição líquido-líquido e quantificação por cromatografia gasosa através de derivação com anidrido trifluoroacético. Foram estimados: tempo requerido para degradação (96 e 240 horas); velocidade média de degradação (0,12 e 0,19 µg/h); velocidade máxima de degradação (0,62 e 0,54 µg/h), respectivamente para *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. Os resultados mostraram que o *Rhizopus* sp. ocasionou a maior diminuição (90%) e o *Aspergillus oryzae* diminuiu mais rapidamente (74%) os níveis iniciais de DON em processo de fermentação submersa.

Palavras-chave: deoxinivalenol, degradação, fermentação submersa.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários denominados micotoxinas, constituídas por diversas estruturas, inclusive algumas relativamente simples (UENO, 1980, 1983; FONSECA, 1996, RICHARD, 2007), que ocorrem em micélios de fungos filamentosos, normalmente após uma fase de crescimento balanceado seguido por condições de estresse (FONSECA, 1996; MELLO & MACDONALD, 1997). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Fusarium* estão entre os gêneros fúngicos que possuem espécies toxigênicas que mais freqüentemente aparecem contaminando matérias-primas, alimentos e rações (SCHRODTER, 2004; ATROSHI et al, 2002).

A ocorrência de alimentos contaminados por fungos toxigênicos não significa que micotoxinas estejam presentes, mas indicam a possibilidade de produção em resposta as condições do ambiente. Por outro lado, a ausência destes fungos no alimento não corresponde à ausência destes compostos tóxicos, pois as micotoxinas persistem por um longo período em situações diversas mesmo que os microrganismos tenham perdido sua viabilidade (UENO, 1986).

As toxinas fúngicas comumente detectadas são aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), tricotecenos (deoxinivalenol-DON e toxina T-2), zearalenona, fumonisinas e certos alcalóides. Os tricotecenos são considerados um dos mais importantes grupos de micotoxinas, sendo descritos na literatura mais de 100 estruturas detectadas naturalmente contaminando cerca de 25% dos produtos agrícolas produzidos no mundo (ATROSHI et al, 2002; TANAKA, 2001; MEKY, HARDIE, EVANS, WILD, 2001, RICHARD, 2007).

O deoxinivalenol (vomitoxina, DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado tanto em alimentos como em rações. Sua molécula é um sesquiterpenóide tetracíclico com sete centros estéreis pertencente ao grupo B dos tricotecenos. O seu número de registro é 51481-10-8 e sua fórmula empírica é $C_{15}H_{20}O_6$, nomeado como 12,13-epoxi-3,4,15-trihidroxitricotec-9-en-8-one, (3 α ,7 α)-(9Cl) (Figura 1) (ATROSHI et al., 2002; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2006).

Em geral, o DON também é resistente à degradação por fatores ambientais e de processamento de alimentos. É um composto não volátil e pode ser desativado pela destruição do anel epóxido sob condições drásticas ácidas ou alcalinas, na presença de hidretos de alumínio e lítio ou peróxidos e hidratação em autoclave. Os tratamentos físicos e químicos que causam variações das propriedades físico-químicas do composto e da matriz em que se encontra, dificulta a detecção e emprego do material descontaminado (UENO, 1983; PRONYK, CENKOWSKI, ABRANSOM, 2006).

O DON pode ter sua estrutura química alterada pela metabolização por microrganismos podendo inclusive ser detoxificado (SUDAKIN, 2003). Na literatura, não há

registros sobre degradação de DON por espécies fúngicas, no entanto bactérias ácidas, lácticas, propiônicas, *Agrobacterium rhizobium* cepa E3-39, BBSH 797, NCB 1492 além de leveduras demonstraram este potencial. Em alguns casos, ocorre a degradação total resultando em eficiente processo de descontaminação de matrizes contaminadas.

Algumas espécies do gênero *Rhizopus* e *Aspergillus* vêm sendo citadas como capazes de degradar outras micotoxinas, tais como ocratoxina A, zearalenona, patulina e aflatoxinas, e podem ser promissoras para DON desde que se encontrem as condições adequadas de aplicação de seu potencial em processos fermentativos (WESTBY, REILLY e BAINBRIDGE, 1997, CACCIAMANI et al, 2007, VARGA et al, 2005, KABAK, DOBSON, VAR, 2006, , VARGA, RIGÓ e TÉREN, 2000, ABRUNHOSA, SERRA e VENANCIO, 2002, BEJAQUI et al, 2005, ABRUNHOSA, SANTOS e VENANCIO, 2006, ABRUNHOSA e VENÂNCIO, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. em utilizar DON como fonte de carbono, através do estudo cinético do processo de degradação da micotoxina, em fermentação submersa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micotoxina

O padrão de DON foi adquirido da Sigma Chemical Company (EUA). Para o preparo da solução estoque de DON, a toxina foi dissolvida em benzeno: acetonitrila (95:5) resultando em uma concentração de 100 µg/mL, conforme Shepeherd e Gilbert (1988). A solução de trabalho consistiu na diluição correspondendo a uma concentração de 50 µg/mL, estimada pela relação p/v utilizado na preparação da solução e confirmada pelo procedimento descrito por Bennett & Shotwell (1990) utilizando a absorvidade molar do padrão.

2.2 Espécies fúngicas

As espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* CCT 3940 e *Rhizopus* sp. foram doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande e foram mantidas e crescidas em ágar batata dextrose por um período de 7 dias. Passado o período, a superfície do ágar foi lavada com solução estéril de Tween 80 a 0,1% para retirada de esporos e a sua concentração estimada por contagem microscópica direta utilizando câmara de Neubauer.

2.3 Cinética de degradação

2.3.1 Fermentação submersa

O meio de cultura foi preparado contendo 50 mL de água e 50 µg de DON, inoculados separadamente, $4 \cdot 10^6$ esporos/mL da espécie fúngica *Aspergillus oryzae* e $4 \cdot 10^6$ esporos/mL de *Rhizopus* sp., acondicionados em frasco de 150 mL, em triplicatas para cada microrganismo. Paralelamente, foram preparados meios não contaminados e inoculados (controle 1) e meios contaminados sem inóculo (controle 2) usando triplicatas em todos os casos

Os frascos contendo o meio fermentativo permaneceram 240 horas a temperatura de 30 °C sob agitação orbital a 0,005 G. A retirada de 5 mL de meio fermentado correspondendo a amostra analítica foi realizada a cada 48 horas de fermentação para quantificação de DON residual, sendo o procedimento realizado em ambiente inócuo utilizando material estéril e válvula de sucção.

2.3.2 Quantificação de DON residual

A quantificação do nível residual da micotoxina presente em 5 mL de meio fermentado foi realizada por partição líquido-líquido utilizando cloreto de metileno na proporção 5:3 (meio:solvente) segundo Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004). Para a derivação utilizando o reagente anidrido trifluoroacético e quantificação por cromatografia gasosa foi utilizada o método descrito por Garda e Badiale-Furlong (2008).

O cromatógrafo gasoso utilizado foi da marca Varian modelo 3400 equipado com injetor *split/splitless* e detector de ionização de chama, coluna DB-17 (J&W Scientific) de 30 metros, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme de 50%-fenil metilpolisiloxano. O equipamento foi monitorado pelo software Star Chromatography Workstation, versão 4.1, marca Varian. As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura do injetor 250 °C, abertura da válvula a 0,75 minutos, fluxo de limpeza do injetor de 75 mL/minuto, detector 300 °C, atenuação de 16×10^{12} . A programação para a coluna cromatográfica foi de 100 °C durante 1 minuto aumentando 50 °C/minuto até 200 °C, permanecendo 2 minutos, em seguida aumentando 4 °C/minuto até 250 °C, permanecendo 11,5 minutos, completando 29 minutos de corrida cromatográfica.

2.3.3 Velocidade de degradação

A velocidade de degradação foi estimada a partir da massa degradada de DON de acordo com tempo de avaliação (48 horas) expresso pela Equação 2.

$$v = \text{DON } (\mu\text{g}) / \text{tempo (h)} \quad (1)$$

2.4 Tratamento estatístico

A significância das diferenças para os dados de degradação (%) (Equação 2) e velocidade específica (Equação 1) foi determinada através da análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas como significativas quando $p < 0,05$.

$$\% \text{ de degradação} = (50 \mu\text{g de DON} - \text{quantidade detectada em } 50 \text{ mL de meio}) \times 2 \quad (2)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tempo de retenção relativo de DON no sistema cromatográfico empregado para a determinação nos meios fermentados foi de 0,62 conforme apresentado na Figura 1. A performance do método teve como indicativo de mérito o limite de detecção de 0,28 $\mu\text{g/mL}$ de meio fermentado e recuperação de 96%, apresentando um coeficiente de variação de 8% entre os diferentes níveis testados.

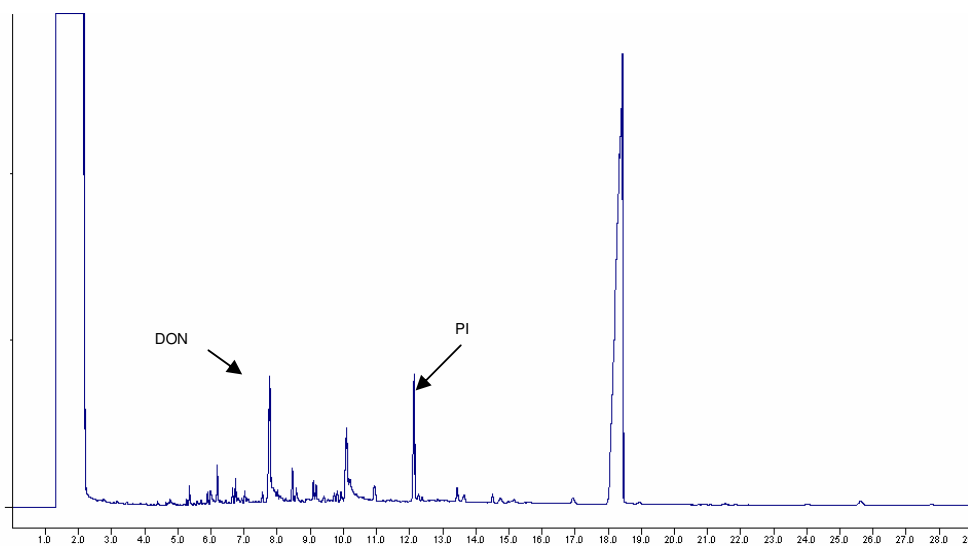


Figura 1. Cromatograma de meio fermentado contaminado com DON.

A degradação de DON por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. foi calculada a partir da massa de DON remanescente no meio fermentado durante 240 horas. Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados da massa de DON (μg) residual contidas nos 50mL de meio fermentado como média dos três experimentos realizados, graficados na Figura 2.

Tabela 1. Conteúdo residual de DON e percentual de degradação durante fermentação submersa.

Tempo (h)	<i>Aspergillus oryzae</i>			<i>Rhizopus</i>	
	Controle 2 (μg DON)	DON (μg (SD)) *	Degradação (%)	DON (μg (SD))	Degradação (%)
0	49,8	44,4 (2,0)	11,1 ^a	49,7 (0,37)	0,7 ¹
48	49,8	15,6 (6,1)	69 ^b	24,4 (3,4)	51,3 ²
96	49,2	13,2(4,0)	73,6 ^{c, d}	10,1 (0,8)	79,7 ⁴
144	45,2	12,8 (0, 9)	74,4 ^d	12 (1,9)	76 ²
192	42,5	14,1 (2,11)	71,8 ^c	11,8 (0,9)	76,4 ³
240	41,58	16,3 (3,4)	67,4 ^b	5,0 (0,5)	89,9 ⁵

* SD - Desvio padrão.

letras, números Teste de Tukey – diferenças significativas.

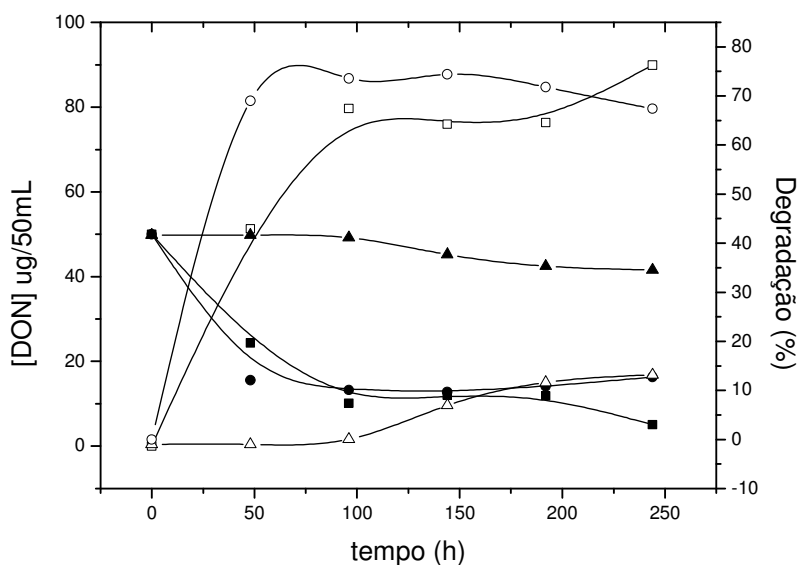


Figura 2. Cinética de degradação de DON durante 240 horas de fermentação submersa pelas espécies fúngicas *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. (\square) % de degradação em extrato fermentado com *Rhizopus* sp.; (\circ) % de degradação em extrato fermentado com *A. oryzae*; (\blacksquare) concentração de DON em extrato fermentado com *Rhizopus* sp.; (\bullet) concentração de DON em extrato fermentado com *A. oryzae*;

(Δ) % de degradação em experimento sem inóculo – branco; (▲) concentração de DON em experimento sem inóculo – branco.

O acompanhamento do percentual de degradação de DON possibilitou verificar o tempo necessário para ocorrer a maior diminuição da contaminação, ocorrido em de 96 horas quando utilizado *A. oryzae* com um percentual de aproximadamente 74%. No tempo de 144 horas de fermentação ocorreu uma degradação de 74,4%, que não diferiu significativamente do percentual de degradação de menor tempo de fermentação de 96 horas. Este aspecto é importante quando se considera o custo de manutenção das condições fermentativas por longos períodos além do risco de contaminação. Para o gênero *Aspergillus*, segundo Varga, Rigo e Téren (2000), o tempo de 96 horas também foi eficiente para a degradação de ocratoxina A. No entanto, para DON, Young e colaboradores (2007) deepoxidaram esta micotoxina em 72 horas de processo utilizando micróbios intestinais de frangos em sistema anaeróbio. Neste trabalho, a espécie fúngica *Rhizopus* sp. teve a maior degradação em 244 horas correspondendo a 90%. Outro fator importante a ser observado, foi a degradação inicial, tempo 0 horas, de 11,1% em decorrência da contaminação realizada com 24 horas de antecedência a adição do inóculo e/ou permanência do meio nas condições fermentativas empregadas durante este período.

A velocidade média na cinética de degradação foi de 0,12 e 0,19 μ g de DON/h para *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. respectivamente, sugerindo que o *Rhizopus* sp. foi o microrganismo que possui a maior velocidade média para degradar a toxina quando considerado 240 horas de fermentação. No entanto, quando considerado o intervalo de tempo de 48 horas de fermentação submersa onde ocorreram as maiores velocidades para ambas espécies fúngicas, *Aspergillus oryzae* degradou DON com maior velocidade (0,62 μ g de DON/h) quando comparado com *Rhizopus* sp. (0,54 μ g de DON/h). As estimativas de velocidade de degradação estão apresentadas na Tabela 2.

Cabe salientar que embora o *Rhizopus* sp. atinja ao final do processo percentual de degradação maior, *Aspergillus oryzae* degradou DON com maior velocidade. Este comportamento sugere que o mecanismo de degradação do *Rhizopus* sp. sofreu uma saturação logo nas 48 horas de processo. Assim a comparação da velocidade média no tempo estudado de processo não é o melhor indicativo de adequacidade de microrganismo para descontaminação. Quando se pretende atingir níveis de descontaminação superiores a 50% os dois microrganismos se equivalem às 48 horas de processo. Em situações onde se pretende uma descontaminação rápida da matéria-prima, *Aspergillus oryzae* é o microrganismo sugerido por apresentar maiores velocidades e percentuais de degradação também utilizando 48 horas de processo. Contrariamente, *Rhizopus* sp. é indicado quando

se pretende maiores índices de descontaminação podendo ocorrer em longo prazo, aplicabilidade evidenciada quando a estocagem for requerida.

Tabela 2. Velocidade específica de degradação de DON em intervalos de tempo durante fermentação submersa.

Tempo (h)	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Rhizopus</i>	
	Degradação (%)	Velocidade ($\mu\text{g/h}$)*	Degradação (%)	Velocidade ($\mu\text{g DON/h}$)
0	11,14	0 ^c	0,7	0 ¹
48	69 ^a	0,62 ^d	51	0,54 ⁴
96	73,6 ^{b,c}	0,05 ^e	80	0,3 ³
144	74,4 ^c	0,01 ^d	76 ¹	-0,04 ¹
192	71,8 ^b	-0,03 ^b	76 ¹	0,004 ¹
240	67,4 ^a	-0,05 ^a	90	0,14 ²
Média		0,12		0,19

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente entre si ao nível de 95% ($p < 0,05$) segundo Teste de Tukey.

* $\mu\text{g/h}$ – massa de DON degradada relacionado ao tempo para cada avaliação de processo fermentativo (48 horas para cada estimativa).

A presença de interferentes, possivelmente produzidos durante a fermentação quando utilizado inóculo de *A. oryzae*, para os experimentos do grupo controle detectados no tempo de retenção de DON, resultou em uma concentração de 0,26 μg em 50 mL de meio fermentado com um desvio padrão de 0,069. Possivelmente estes compostos sejam também do metabolismo secundário do microrganismo utilizado, causando efeito não significativo para estudo da cinética de degradação. Para *Rhizopus* sp., os valores foram de 0,29 com um desvio de 0,023, observado o mesmo efeito.

A cinética de degradação reforça a hipótese de mecanismo de degradação ocorrido durante processo fermentativo, verificado pela diminuição do percentual de degradação durante o intervalo de tempo avaliado. Isto sugere como principal via a adsorção da toxina até o intervalo de 144 horas (74% de degradação), já que após este tempo de fermentação, condições presentes no meio revertem o processo de adsorção, liberando novamente porções de micotoxina resultando em um menor índice em 240 horas, 67% de degradação de DON.

O acompanhamento de fermentações submersas para verificar a degradação da toxina DON exigindo quantificações analíticas pode ocorrer de forma reduzida quando empregados as duas espécies fúngicas estudadas. Os dados obtidos durante a execução da cinética de degradação possibilitam verificar que os tempos de coleta de amostragem

analítica dos extratos fermentados foram significativos ($p < 0,05$) a 0, 48, 96 e 240 horas quando inoculado com *A. oryzae* e 0, 48, 96, 144 e 240 horas para *Rhizopus* sp. A redução do número de quantificações quanto a experimentos em triplicata seria de seis quando em experimento o microrganismo *A. oryzae*, e de três quando *Rhizopus* sp., resultando em redução do tempo de análise, desgaste de equipamento e menor descarte de material tóxico.

Desta forma, a cinética de degradação permitiu verificar a maior degradação efetiva de DON, com redução do tempo de fermentação, custo e material utilizado para quantificação da toxina estudada.

4 CONCLUSÃO

As espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. submetidas a processo de fermentação submersa mostraram que o tempo requerido para atingir a maior degradação foi 96 e 240 horas; velocidade média de degradação, 0,12 e 0,19 μ g/h; velocidade máxima de degradação 0,62 e 0,54 μ g/h respectivamente.

Estes dados demonstraram que a espécie fúngica *Rhizopus* sp. foi a de maior capacidade em utilizar DON como fonte de carbono e *Aspergillus oryzae* na utilização em maior velocidade.

5 REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L., VENANCIO, A. Isolation and purification of na enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 1909-1914, 2007.
- ABRUNHOSA, L., SANTOS, L., VENANCIO, A. Degradation of Ochratoxin A by Proteases and by a Crude Enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 231-242, 2006.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENANCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WEA\STERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.
- BEJAQUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A. Conidia of Black Aspergilli as New Biological Adsorbents for Ochratoxin A in Grape Juices and Musts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 8224-8229, 2005.
- BENNET, G. A., SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 270-275, 1990.

- CACCIAMANI, J.M., PERES, G.L., GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **B. CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.
- FONSECA, H. In : **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. Rio de Janeiro: editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 261p.
- GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para determinação de deoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- KABAK, B., DOBSON, A.D.W., VAR, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593-619, 2006.
- MEKY, F.A.; HARDIE, L.J.; EVANS, S.W.; WILD, C.D. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 827-836, 2001.
- MELLO, J. P. F., & MACDONALD, A.M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science technology**, v. 69, 155-166, 1997.
- PRONYK, C.; CENKOWSKI, S.; ABRANSOM, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, n. 10, p. 789-796, 2006.
- RICHARD, J.J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.
- SCHRODTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxynivalenol (DON) (2006), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solution. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 305-308, 1988.
- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- TANAKA, T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course**, p.283, 2001, Japão.
- UENO, Y. Trichothecene mycotoxins. **Mycologia, chemistry and toxicology**. In: H. H. Draper *Ed.*, v. 3, p. 301-353, New York, 1980.

- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed). *Developments in Food Science*. Elsevier, Tokyo, v. 4, 1983.
- UENO, Y. Trichothecene as environmental toxicants. In: **Reviews in Environmental Toxicology 2**. Ernest Hodgson (ed). *Elsevier*, Amsterdam, N.York, Oxford, 1986.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.
- WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. **Food Control**, v. 8, n. 5/6, p. 329-339, 1997.
- YOUNG, J.C.; ZHOU, T.; YU, H.; ZHU, H.; GONG, J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 136-143, 2007.

**DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E
Rhizopus sp. EM SISTEMA SUBMERSO DE FERMENTAÇÃO**

Jaqueline Garda, Eliana Badiale-Furlong

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Laboratório de Micotoxinas
Departamento de Química
Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 – Centro
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

DEGRADAÇÃO DE DEOXINIVALENOL (DON) POR *Aspergillus oryzae* E *Rhizopus* sp. EM SISTEMA SUBMERSO DE FERMENTAÇÃO

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. quanto à possibilidade de degradar DON. As variáveis meio de cultura (três composições), nível de contaminação (0; 0,63 e 1,26 µg/mL,) e viabilidade celular (ausência de esporos, células viáveis e não-viáveis) foram estudadas em planejamento experimental fatorial fracionário $3^{(3-1)}$. A confirmação da ação biodegradadora das espécies fúngicas foi realizada por planejamento experimental 2^2 , viabilidade celular de esporos (presença de esporos viáveis e não viáveis) e meio submerso (duas composições). Os inóculos das duas espécies fúngicas foram adicionados na concentração de 4×10^6 esporo/mL de meio submerso. A degradação de DON foi estimada pela massa residual detectada após 240 horas de processo utilizando quantificação por cromatografia gasosa. A fermentação submersa realizada com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. foi uma forma promissora de degradar DON. O *Rhizopus* sp. diminuiu em 87,4% a contaminação e *Aspergillus oryzae* em 62,4%. A maior degradação de DON em fermentação submersa ocorreu quando meio de fermentação utilizado foi água estéril, independentemente do nível de contaminação. As respostas aos efeitos esporos viáveis e não viáveis sugerem que *Rhizopus* sp. degradou a micotoxina principalmente por metabolização e *Aspergillus oryzae* por adsorção da micotoxina.

Palavras-chave: deoxinivalenol, degradacao, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* sp.

1 INTRODUÇÃO

A literatura mundial apresenta informações sobre a contaminação aleatória de alimentos por fungos e micotoxinas que alteram as condições de sanidade das dietas de humanos e animais de criação (UENO, 1980, 1983; FONSECA, 1996, RICHARD, 2007). Em geral a presença deste composto não pode ser facilmente correlacionada com variáveis bióticas e abióticas identificadas na produção, processamento e armazenamento dos alimentos (TANAKA, 2001). Dentre as toxinas fúngicas, o deoxinivalenol (DON) se destaca pela freqüente contaminação de produtos agrícolas e alimentos, e pela sua resistência a degradação, pelo emprego de métodos físicos e químicos tradicionais de processamento.

Os sintomas de intoxicação por DON podem ser agudos e crônicos dependendo da quantidade presente em alimentos contaminados. Os primeiros são relatados como distúrbios gastrointestinais e o crônico e subcrônico como alterações no sistema imunológico, hematotoxicidade decorrente da inibição da síntese protéica, do RNA e do DNA (BAARS et al. 1999; MURTHY et al., 1985, SUDAKIN, 2003; YOSHISAWA, 2001; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999; KRABBE, 2005; DANICKE et al., 2004).

Processos para descontaminação em matérias-primas e alimentos insumos vêm sendo descritos principalmente para aquelas micotoxinas de estrutura mais complexa, alta incidência e toxicidade como DON. Todos visam destruir, modificar ou adsorver a toxina, reduzindo ou eliminando os seus efeitos tóxicos (GARDA e BADIALE-FURLONH, 2003). Dentre os procedimentos empregados para degradação de DON, os métodos físicos têm demonstrado sua importância para a redução superficial da contaminação quando se trata de grãos, mas não são suficientes quando se avalia o problema de consumo em outras matérias-prima ou alimentos preparados que aportam a micotoxina em níveis de desencadear sintomas crônicos. Com o emprego de métodos químicos tem-se que o produto final pode ter sua qualidade alterada seja nas características químicas, físicas, sensoriais e/ou funcionais, não sendo recomendado para produção em larga escala. Os métodos microbiológicos, quando testado para outras toxinas, apresentaram alguns resultados positivos tanto na redução da contaminação como na qualidade final do material descontaminado, tendo como vantagem a menor perda da qualidade e, em certas condições, melhora das propriedades funcionais (SILVEIRA e FURLONG, 2007).

Nos estudos de degradação microbiológica tem sido demonstrado que o emprego de bactérias e leveduras vem apresentando bons resultados, porém estes microrganismos não são muito adequados para processos envolvendo produtos com baixa atividade de água, além de faltar informações sobre a qualidade dos produtos fermentados com substratos contaminados. O uso de fungos para a degradação de micotoxinas parece ser uma alternativa promissora, principalmente para a toxina em estudo que dificilmente é

metabolizada ou destruída através de processos físicos ou químicos, adotados industrial e/ou domesticamente.

A fermentação fúngica possui o potencial de alterar as propriedades funcionais de matérias-primas, destacando a melhora destas propriedades quando utilizados resíduos da indústria de cereais (SILVEIRA e FURLONG, 2007; CACCIAMANI et al., 2007). Estas propriedades são descritas para as espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. entre muitas outras, avaliadas como biodegradadoras de compostos tóxicos, seguras a saúde humana e comumente utilizadas em bioprocessos na produção de alimentos, fármacos, outros compostos químicos sem a geração de metabólitos demonstradamente tóxicos durante a fermentação (DVORAKOVA et al, 2001; CHIA-HUNG LIN, YI-TIEN WEI, CHENG-CHUN CHOU, 2006; SUNTORNSUK, POCHANAVANICH, SUNTORNSUK, 2004, CACCIAMANI et al, 2007).

Partindo destas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. quanto à possibilidade de degradar DON. Para isto foram empregadas combinações de diferentes condições, tais como, tipo de meio de cultura, nível de contaminação e esporos viáveis e não viáveis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micotoxina

O padrão de DON foi adquirido da Sigma Chemical Company (EUA). Para o preparo da solução estoque de DON, a toxina foi dissolvida em benzeno: acetonitrila (95:5) resultando em uma concentração de 100 µg/mL, conforme Shepeherd e Gilbert (1988). A solução de trabalho foi preparada diluindo solução estoque a uma concentração de 50 µg/mL, estimada pela relação p/v e confirmada pelo procedimento descrito por Bennett & Shotwell (1990) utilizando a absorvidade molar do padrão a 219 nm.

2.2 Espécies fúngicas

As espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* CCT 3940 e *Rhizopus* sp. foram doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. As espécies fúngicas foram mantidas e crescidas em ágar batata dextose por um período de 7 dias. Passado o período, a superfície do ágar foi lavada com solução estéril de Tween 80 a 0,1% para retirada de esporos e a sua concentração estimada por contagem microscópica direta utilizando câmara de Neubauer.

2.3 Estudo de degradação de DON

Foram preparadas três composições de meio correspondendo a um volume final de 50 mL para cada experimento. O meio 1 foi composto por 10% glicose, 0,8% extrato de levedura, 1,0% NaNO₃, 0,03% MgSO₄ · 7H₂O, 0,4% K₂HPO₄, 0,9% KH₂PO₄, 0,6% NaCl; o meio 2 foi composto por 1% glicose, 0,2% extrato de levedura; e no meio 3 não houve adição de nutrientes, somente água destilada. Cada quantidade foi acondicionada em frasco de 125 mL e esterilizada correspondendo aos diferentes experimentos apresentados na Tabela 1.

A contaminação dos meios esterilizados com DON variou de 0 a 63 µg (0 a 1,26 µg/mL) com 24 horas de antecedência da adição do inóculo, também descrito na Tabela 1. Os inóculos das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. continham 4.10⁶ esporos/mL de meio sendo um grupo com esporos inativados em autoclave por 20 minutos a 120 °C e 1 kgf/cm². Para cada microrganismo foram realizados 15 experimentos que permaneceram 240 horas a 30 °C sob agitação orbital 0,005 G, quantificado ao final do processo a toxina residual.

Para confirmação da ação biodegradadora das espécies fúngicas foi realizado outro planejamento com 10 experimentos empregando esporos viáveis e não viáveis (autoclavados) e os meios submersos, meio 2 e meio 3 (água estéril). Nestes a contaminação foi de 63 µg a cada 50 mL de meio preparado e esterilizado. O preparo do material, inóculo e condições fermentativas seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Experimentos contendo meio 3, água estéril, e a micotoxina DON, foram executados em triplicata, para avaliar a recuperação da toxina após 240 horas de fermentação.

2.4 Planejamento experimental

As variáveis descritas acima, meio de cultura (3 composições descritas item 2.3), nível de contaminação (0; 0,63 e 1,26 µg/mL,) viabilidade celular (ausência de esporos, células viáveis e não-viáveis) foram estudadas em três níveis utilizando planejamento experimental fatorial fracionário 3⁽³⁾, totalizando 9 experimentos. A análise estatística dos resultados foi realizada empregando o software Statistica versão 6.0.

A confirmação da ação biodegradadora das espécies fúngicas foi realizada por um segundo planejamento experimental 2², duas variáveis em dois níveis, viabilidade celular de

esporos (presença de esporos viáveis e não viáveis - autoclavados) e meio submerso (meio 2 e meio 3) conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 1. Planejamento fatorial fracionário 3⁽³⁾ para cada cepa fúngica.

Experimento	Meio	Contaminação (µg/50mL)	Viabilidade Fúngica
1	-1 (Meio 1)*	-1 (0)	-1 (ausência)
2	-1 (Meio 1)	0 (31,5)	1 (esporos não-viáveis)****
3	-1 (Meio 1)	1 (63)	0 (esporos viáveis)
4	0 (Meio 2)**	-1 (0)	1 (esporos não-viáveis)
5	0 (Meio 2)	0 (31,5)	0 (esporos viáveis)
6	0 (Meio 2)	1 (63)	-1 (ausência)
7	1 (Meio 3)***	-1 (0)	0 (esporos viáveis)
8	1 (Meio 3)	0 (31,5)	-1 (ausência)
9	1 (Meio 3)	1 (63)	1 (esporos não-viáveis)

*Meio 1 (10% glicose, 0,8% extrato de levedura, 1,0% NaNO₃, 0,03% MgSO₄ · 7H₂O, 0,4% K₂HPO₄, 0,9% KH₂PO₄, 0,6% NaCl).

**Meio 2 (1% glicose, 0,2% extrato de levedura).

*** Meio 3 (água destilada).

**** Esporos não-viáveis-autoclavados durante 20 minutos.

Tabela 2. Planejamento experimental 2⁽²⁾ para cada cepa fúngica.

Experimento	Viabilidade fúngica	Meio
1	-1 (esporos viáveis)	-1 (Meio 2)*
2	-1 (esporos viáveis)	1 (Meio 3)*
3	1 (esporos não-viáveis)*	-1 (Meio 2)
4	1 (esporos não-viáveis)	1 (Meio 3)

*Meio 2 (1% glicose, 0,2% extrato de levedura); meio 3 (água destilada). Esporos não-viáveis-autoclavados durante 20 minutos.

2.4 Determinação de DON residual

A quantificação do nível residual da micotoxina presente no meio fermentado após 240 horas foi realizada segundo Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004) consistindo em extração do meio filtrado por partição líquido-líquido com cloreto de metileno na proporção 5:3 (meio:solvente), derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e bicarbonato de sódio, quantificado por cromatografia gasosa segundo Garda e Badiale-Furlong (2008).

O cromatógrafo gasoso utilizado foi Varian 3400 equipado com injetor *split/splitless* e Detector de Ionização de Chama, coluna DB-17 (J&W Scientific) de 30 m, com 0,25 mm

de diâmetro interno e 0,25 µm de filme de 50%-fenil metilpolisiloxano. O equipamento foi monitorado pelo software Star Chromatography Workstation, versão 4.1, marca Varian.

As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura do injetor 250 °C, abertura da válvula a 0,75 minutos, fluxo de limpeza do injetor de 75 mL/minuto, detector 300 °C, atenuação de 16×10^{12} . A programação para a coluna cromatográfica foi de 100 °C durante 1 minuto aumentando 50 °C/minuto até 200 °C, permanecendo 2 minutos, em seguida aumentando 4 °C/minuto até 250 °C, permanecendo 11,5 minutos, completando 29 minutos de corrida cromatográfica segundo Garda e Badiale-Furlong (2008).

A curva padrão foi estabelecida derivando soluções contendo entre 1,4 a 21 µg de DON com adição de 18 mg de bicarbonato de sódio e 200 µL de TFAA, reagindo durante 6 minutos a 74 °C. O limite de detecção foi determinado pelas sucessivas diluições de uma solução de 10 ng/µL até que fosse gerado um sinal do detector três vezes superior ao desvio padrão das áreas relativas no tempo de retenção das toxinas quando se injetou branco de derivação. Para a quantificação foi utilizado tempo e área relativa de acordo com o padrão interno metil éster de ácido aracdônico (Sigma Chemical Company – EUA) utilizado uma massa de 0,01 µg/injeção cromatográfica.

A recuperação foi estabelecida através da contaminação de 50mL de meio na faixa de 10 a 50 µg, nas três composições testadas em triplicatas, acondicionados em frascos de 125 mL durante 24 horas. As etapas de extração e quantificação foram executadas conforme descrito para determinação da quantidade residual de DON em meio fermentado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo de retenção relativo de DON em relação ao padrão interno (metil éster do ácido aracdônico) foi de 0,62 conforme apresentado na Figura 1. A performance do método nas condições empregadas descritas no item 2.5 para determinação de DON no meio fermentado teve como indicativos o limite de detecção de 84 ng/mL de meio fermentado, recuperação média de 98% e um coeficiente de variação média de 4%.

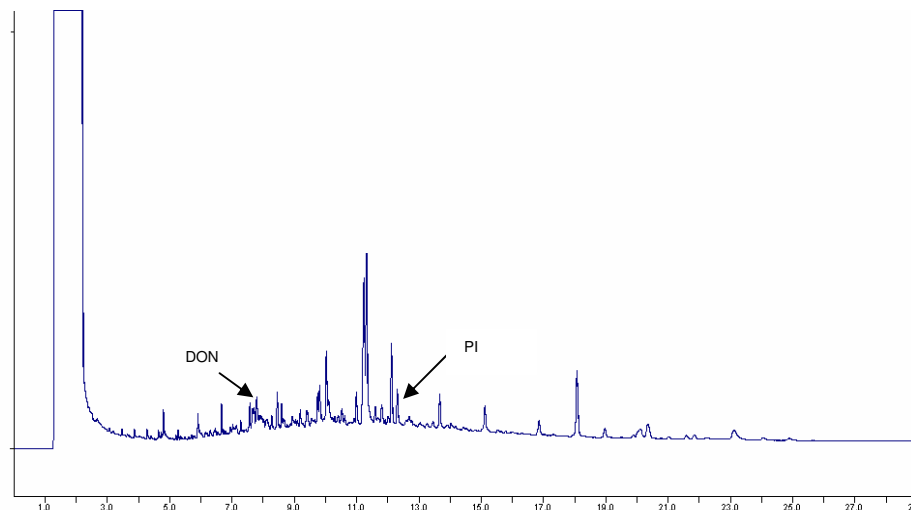


Figura 1. Cromatograma de meio fermentado contaminado com DON.

A capacidade de degradar DON do *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. foi calculada a partir relação entre a massa inicial de DON e a remanescente no meio fermentado apresentada na Tabela 3 como massa de DON detectado e respectivo percentual de degradação para cada experimento.

A degradação de DON em fermentação submersa com os dois microrganismos, *Aspergillus oryzae* CCT 3940 e *Rhizopus* sp., foi avaliada através da quantidade remanescente desta toxina após 240 horas de fermentação. Os efeitos da variação do meio de cultivo, do nível de contaminação e da viabilidade do inóculo possibilitaram verificar as condições em que ocorreram as maiores degradações.

A análise estatística confirmou que quanto maior a contaminação inicial do meio, maior a quantidade detectada no final do processo fermentativo. Isto indica que a micotoxina na faixa de contaminação utilizada não apresentou toxicidade para as espécies fúngicas estudadas e que ocorria a degradação de DON independente do nível de contaminação inicial. Isto pode ser verificado na quantidade média remanescente ao final do processo, 8 e 15,6 μg (Tabela 4), ou quando a diferença entre os níveis de contaminação recuperada foi de 14,4 e 19,3 μg para *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. respectivamente, quando a diferença da adição inicial foi de 31,5 μg (entre 0 e 31,5 e 63 μg).

A massa de DON residual média dos 9 experimentos realizados no primeiro planejamento experimental foi de 10,4 μg e 19,3 μg , correspondendo a uma degradação média de 62,5 e 32,9%, respectivamente para *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. A Tabela 4 apresenta a significância e os efeitos das variáveis estudadas na recuperação de DON. A presença do contaminante na faixa avaliada e utilização de microrganismos possibilita considerar uma significância de 70% (CAULCUTT e BODDY, 1983), e conforme o esperado,

a contaminação inicial de DON foi significativa para a eficiência dos processos fermentativos realizados com os dois microrganismos avaliados (0 a 63 µg).

Tabela 3. Massa de DON residual e percentual de degradação após processo fermentativo (planejamento fatorial fracionário 3⁽³⁾).

Experimento	Massa inicial de DON (µg)	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Rhizopus</i>	
		DON residual (µg)	Degradação (%)	DON residual (µg)	Degradação (%)
1	0	0	-	0	-
2	31,5	21,5	31,8	31,9	0
3	63	19,8	68,6	18,2	71,1
4	0	0	-	0	-
5	31,5	4,4	85,9	23,9	24,2
6	63	10,2	83,8	52,6	16,4
7	0	0	-	0	-
8	31,5	26,4	16,1	25,1	20,4
9	63	7,0	88,9	22,1	65,0
Média		10,2	62,5	19,3	32,9

Tabela 4. Efeitos e coeficientes para variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico 3⁽³⁾.

Espécie fúngica		Efeito	Desvio padrão	Nível de significância (p)	Coeficientes
<i>A. oryzae</i>	Média	12,14	2,00	0,0262	12,1444
	(1) Meio	-2,63	4,92	0,6458	-1,3167
	(2) Contaminação	19,00	4,92	0,0609	9,5000
	(3) Viabilidade	-9,37	4,92	0,1970	-4,6833
	(1) x (2)	6,42	7,37	0,4755	3,2125
	(1) x (3)	-21,67	7,37	0,0989	-10,8375
	(2) x (3)	-3,9750	7,37	0,6439	-1,9875
	<i>Rhizopus</i> sp.	Média/interação	15,64	2,37	0,0005
<i>Rhizopus</i> sp.	(1) Meio	-0,97	13,73	0,9552	-0,4833
	(2) Contaminação	30,97	13,73	0,2657	15,4849
	(3) Viabilidade	-7,90	13,73	0,6677	-3,9500
	(1) x (2)	19,27	15,16	0,3315	9,6375
	(1) x (3)	-19,52	15,16	0,3268	-9,7625
	(2) x (3)	-15,12	15,16	0,4236	-7,5625

(1)Meio fermentativo, (2) contaminação inicial de DON, (3) viabilidade dos esporos.

No processo em que foi utilizado o microrganismo *A. oryzae*, a viabilidade dos esporos influenciou a recuperação da toxina com uma significância de $p < 0,30$, ocasionando efeito antagônico (Tabela 4). Para a interação entre meio de cultura e viabilidade dos esporos, para os dois microrganismos avaliados, *Aspergillus oryzae* ($p < 0,30$) e *Rhizopus* sp. ($p = 0,30$), também ocorreu efeito antagônico.

Para avaliar o mecanismo envolvido na degradação da toxina, em alguns experimentos as células de esporos adicionados foram previamente inativadas por calor sob pressão (autoclavagem durante 20 minutos) e inoculadas na mesma concentração (4.10^6 esporos/mL) verificando, com este teste, a possibilidade de adsorção da toxina a superfície da célula. Outros experimentos foram realizados sem a presença de células microbianas para permitir a avaliação do efeito das condições físico-químicas do meio nos níveis de DON para estimar a degradação ocasionada física e quimicamente pelas condições do meio.

Na fermentação realizada por *A. oryzae*, quando presente a interação entre as variáveis meio e viabilidade dos esporos, ocorreu uma diminuição média na recuperação de 21,7 μg . Os efeitos isolados das variáveis células viáveis e não viáveis, nutrientes no meio, não apresentaram significância, quando o microrganismo foi *Rhizopus* sp., o que não permitiu concluir se a diminuição da contaminação ocorreu por adsorção ou pela metabolização da micotoxina, fato que norteou o segundo planejamento realizado. Este foi organizado considerando que a maior degradação ocorria em meio empregando água estéril e células viáveis. Os resultados deste planejamento relacionando quantidade da massa de DON inicial e detectada após fermentação estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Massa de DON e percentual de degradação segundo planejamento experimental 2^2 .

Experimento	Massa inicial (μg)	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Rhizopus</i>	
		DON residual (μg)	Degradação (%)	DON residual (μg)	Degradação (%)
1	63	19,8	68,5	18,6	70,4
2	63	17,6	72,0	2,4	96,1
3	63	52,9	16,0	6,2	90,1
4	63	4,2	93,3	4,5	92,9
Média		23,6	62,4	7,9	87,4

Na Tabela 6 estão os valores dos efeitos e seus respectivos coeficientes para o sistema fermentativo contendo *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.

Tabela 6. Valores de efeitos, coeficientes para fermentação com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.

Espécie fúngica		Efeito	Coeficientes
<i>A. oryzae</i>	Média	7,9	7,9
	(1) Viabilidade	-5,2	-2,6
	(2) Meio	-9,0	-4,5
	(1) x (2)	7,3	3,6
<i>Rhizopus</i> sp.	Média	23,6	23,6
	(1) Viabilidade	9,9	4,9
	(2) Meio	-25,5	-12,7
	(1) x (2)	-23,3	-11,6

(1) Viabilidade dos esporos, (2) meio fermentativo.

O segundo planejamento permitiu avaliar melhor o potencial de cada microrganismo no percentual de degradação de DON. As massas de DON residual médias foram de 23,6 µg e 7,9 µg, ou seja, 2,7 e 8 vezes menores que a massa inicial, respectivamente para *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. Os resultados estatísticos (Tabelas 6) comprovam que ocorreu uma diminuição significativa de DON em meio contendo apenas água destilada pela ação fermentativa dos dois microrganismos em estudo, mantendo a mesma tendência verificada no primeiro planejamento. O fato dos microrganismos se desenvolverem em meio onde não havia nutriente sugere a possibilidade da toxina ser utilizada como fonte de carbono.

A avaliação da média de recuperação de DON nos meios empregados em todos os experimentos realizados nos dois planejamentos, permitiu confirmar que a quantidade de nutrientes presentes altera a capacidade degradadora da espécie fúngica. A capacidade degradadora do microrganismo *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. foi menor em meios mais ricos, um fato que permite definir o tipo de meio mais adequado para que cada microrganismo degrade a micotoxina, ou seja, permite recomendar o melhor fungo para cada tipo de matéria-prima ou produto que se pretenda descontaminar.

A interação dos efeitos meio e esporos viáveis causaram efeito antagônico e sinérgico em relação à média de recuperação da micotoxina (Tabela 7) para *A. oryzae* e *Rhizopus* sp., respectivamente.

A viabilidade dos esporos, utilizados como inóculo, influenciou significativamente somente o fermentado com *Aspergillus oryzae*, ocasionando uma diminuição da média de recuperação em 12,5µg quando células viáveis foram utilizadas. É importante ressaltar que esta significância decorre do tipo de metabolismo e morfologia de cada espécie.

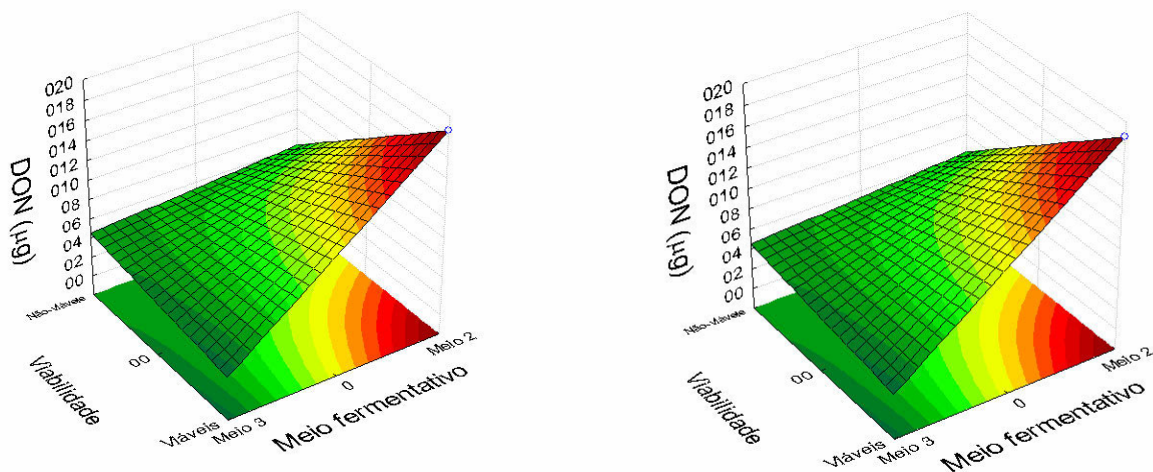


Figura 2. Recuperação de DON (μg) em meio fermentado com (a) *Aspergillus oryzae* e (b) *Rhizopus sp.*

O *Aspergillus oryzae* ocasionou a degradação de DON em meio com e sem nutrientes, e em presença de células viáveis e não viáveis. No entanto, os menores valores de recuperação (massas residuais menores) da toxina ocorreram quando empregada a interação das variáveis, água estéril e células não viáveis, sugerindo que a adsorção da micotoxina é a principal forma de degradação (Figura 2). O *Rhizopus sp.*, por sua vez, ocasionou a maior degradação em meio de água destilada estéril em presença de células viáveis (Figura 2), sugerindo que ele pode usar a micotoxina como fonte de carbono e não só adsorvê-la em sua superfície de hifas. Segundo Bata e Laszality (1999), a degradação microbiana de micotoxina é provavelmente um fenômeno de mineralização e não um co-metabolismo.

Na literatura não estão disponíveis informações sobre ação degradadora de *Rhizopus sp.* e *Aspergillus oryzae* sobre DON. Segundo Westby, Reilly e Bainbridge (1997), o *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus oligosporus* possuem a capacidade de reduzir ciclopentanona a aflatoxicol A, mas esta reação é reversível em presença de ácidos orgânicos. Entretanto Varga et al.(2005) mencionaram que *Rhizopus* não foi capaz de degradar aflatoxina B₁. Este gênero de microrganismo tem sido mencionado como capaz de degradar zearalenona, patulina e ocratoxina A até níveis inferiores aos limites de detecção dos métodos utilizados para tal.

Young e colaboradores (2007) verificaram que a flora microbiana intestinal de frango pode degradar DON e outros 11 tricotecenos através de reação de deepoxidação e desacetilação. Shima et al. (1997) demonstraram que a bactéria *Agrobacterium rhizobium* cepa E3-39 foi capaz de degradar DON a seu metabólito 3-ceto-4-deoxinivalenol, que apresenta toxicidade relativamente menor. Esta cepa E3-39 também foi capaz de degradar 3-acetil-deoxinivalenol, mas não nivalenol e fusarenona-X. Garda et al. (2005) demonstraram que após fermentação alcoólica com *Sacharomices cerevisiae* durante 120 horas, 46,4% da contaminação inicial de DON foram detectadas na porção sólida e líquida. Segundo Scott (1992), degradação por levedura também pode ocorrer pela capacidade de adsorção da célula ou segundo Flesh e Voight-Scherueman (1994 *apud* BATA e LÁSZTITY, 1999) por ação da enzima epihidrilase ou tricotecinas que podem afetar a estrutura química de DON, atuando como ligases e cetoenolautomerases. Em contradição, utilizando o mesmo processo fermentativo alcoólica, Scott (1992) demonstrou que DON foi estável ao processo.

4 CONCLUSÃO

A fermentação submersa realizada com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. foi uma forma promissora de degradar DON. O *Rhizopus* sp. diminuiu em 87,4% a contaminação e *Aspergillus oryzae* em 62,4%. A maior degradação de DON em fermentação submersa ocorreu quando meio de fermentação utilizado foi água estéril, independentemente do nível de contaminação. As respostas aos efeitos esporos viáveis e não viáveis sugerem que *Rhizopus* sp. degradou a micotoxina principalmente por metabolização e *Aspergillus oryzae* por adsorção da micotoxina.

5 REFERÊNCIAS

- BAARS, A.J.; VAN APELDOORN, M.; WOUTERS, M. Deoxynivalenol. In: Pieters MN, Fiolet DCM. **Derivation of concentration limits in wheat and wheat containing products. Appendix 1 Toxicology.** Milieu, Bilthoven, The Netherlands, Rijks Instituut voor Volksgezondheid, 1999.
- BATA, A.; LASZATITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.
- BENNET, G. A., SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.73, n. 2, p. 270-275, 1990.

- CACCIAMANI, J.M., PERES, G.L., GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **B. CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.
- CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical Chemists**, Chapman and Hall (ed.): London, 1983.
- CHIA-HUNG LIN, YI-TIEN WEI, CHENG-CHUN CHOU. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food Microbiology**, v. 23, p. 628–633, 2006.
- DANICKE, S.; VALENTA, H.; DOLL, S.; GANTER, M.; FLACHOWSKY, G. On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 14, n. 1-4, p. 141-157, 2004.
- DVORAKOVA, J., SCHMIDT, D., HUNKOVA, Z., THIEM, J., KREN, V. Enzymatic rearrangement of chitine hydrolysates with b-N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 225–232, 2001.
- FONSECA, H. In : **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. Rio de Janeiro: editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 261p.
- GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para determinação de desoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008
- GARDA, J.; BADIALE-FURLONG, E. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. **Revista Veter**, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2003.
- 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, J.; MACEDO, R.M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- KRABBE, E. L. **MONITORAMENTO E CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-PRIMAS E RAÇÕES**. Nutrição de Não - Ruminantes, BASF SA – Marketing Regional – Química Fina, São Bernardo do Campo – SP, 2005.
- MURTHY, M.R.; RADOUCO-THOMAS, S.; BHARUCHA, A.D.; LEVESQUE, G.; PANDIAN, S.; RADOUCO-THOMAS, C. Effects of trichothecenes (T-2 toxin) on protein synthesis in vitro by brain polysomes and messenger RNA. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 9, p. 251-258, 1985.
- RICHARD, J.J. Some major mycotoxins and their mycotoxicose-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.

- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) expressed on 2 December 1999), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCOOT, P.M. Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. **Mycotoxin Research**, v. 8, p. 58-66, 1992.
- SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solution. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 305-308, 1988.
- SHIMA, J.; TAKASE, S.; TAKAHASHI, Y.; IWAI, I.; FUJINOMOTO, H.; YAMAZAKI, K.; OCHI, K. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by enrichment culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3825-3830, 1997.
- SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterizacao de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 4, 2007.
- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- SUNTORNUSUK, W., POCHANAVANICH, P., SUNTORNUSUK, L. Fungal chitosan production on food processing by-products. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 727-729, 2002.
- TANAKA, T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course**, p. 283, 2001, Japão.
- UENO, Y. Trichothecene mycotoxins. **Mycologia, chemistry and toxicology**. In: H. H. Draper *Ed.*, v. 3, p. 301-353, New York, 1980.
- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed). *Developments in Food Science*. Elsevier, Tokyo, v. 4, 1983.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.
- WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. **Food Control**, v. 8, n. 5/6, p. 329-339, 1997.
- YOSHISAWA, T. Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil. **Training Course**, p. 283, 2001, Japão.
- YOUNG, J.C.; ZHOU, T.; YU, H.; ZHU, H.; GONG, J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 136-143, 2007.

**DEGRADAÇÃO DE DEOXYNIVALENOL (DON) E A ATIVIDADE DA ENZIMA
OXIDATIVA PEROXIDASE (PO) EM SISTEMA FERMENTATIVO SUBMERSO**

Jaqueline Garda, Larine Kupski, Eliana Badiale-Furlong

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Laboratório de Micotoxinas
Departamento de Química
Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 – Centro
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

DEGRADAÇÃO DE DEOXYNIVALENOL (DON) E A ATIVIDADE DA ENZIMA OXIDATIVA PEROXIDASE (PO) EM SISTEMA FERMENTATIVO SUBMERSO

Resumo

A descontaminação biológica empregando processos fermentativos parece ser uma alternativa promissora, pois permite a seleção de microrganismos que possuam seu sistema enzimático específico para a degradação de micotoxinas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a relação entre degradação de deoxinivalenol e a atividade de enzimas oxidativas durante fermentação submersa. O meio submerso compreendeu água destilada estéril contaminada com 50 µg de DON e inóculo de 4×10^6 esporos/mL de meio das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. A amostragem foi realizada a cada 48 horas de processo para a determinação da massa residual de DON, estimativa do percentual e velocidade de degradação e, a cada 24 horas, para medida da atividade específica da enzima PO e quantificação proteica. Os resultados mostraram que as espécies fúngicas *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae* possuem capacidade de metabolizar DON como demonstrado pelo aumento da atividade da enzima oxidativa PO, nos mesmos intervalos em que ocorreram as maiores velocidades de degradação da toxina. O intervalo de 48 horas de fermentação foi onde a atividade específica da enzima peroxidase e a velocidade de degradação de DON foram maiores para os dois microrganismos, 10,8 e 12,4 ppb/h e 800 e 198 U, respectivamente para *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*.

Palavras-chave: deoxinivalenol, enzima peroxidase, degradação.

1 INTRODUÇÃO

O deoxinivalenol (vomitoxina, DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado, tanto em alimentos como em rações. Sua molécula se caracteriza por apresentar um sesquiterpenóide tetracíclico com sete centros estéreos pertencente ao grupo B dos tricotecenos, nomeado como 12,13-epoxi-3,4,15-trihidroxitricotec-9-en-8-one, (3 α ,7 α)-(9Cl) (ATROSHI et al., 2002; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2006). O DON é sintetizado principalmente pelo gênero *Fusarium*, um dos mais abundantes fungos toxigênicos encontrados em produtos alimentícios, principalmente grãos de cereais (MELLO & MACDONALD, 1997; RICHARD, 2007).

Este composto formado apresenta como característica fundamental a estabilidade, que pode ser verificada durante muitos anos quando estocado à temperatura ambiente ou mesmo aquecido à 135°C (PRONYK et al., 2006). O DON é resistente à degradação e para desativa-lo pela destruição do anel epóxido são necessárias condições drásticas ácidas ou alcalinas, na presença de hidretos de alumínio e lítio ou peróxidos e hidratação em autoclave. Todas estas condições causam variações das propriedades físico-químicas, dificultando a detecção da micotoxina e emprego da matéria-prima descontaminada (JENO, 1983; PRONYK et al., 2006). O DON, bem como outros tricotecenos, podem ter sua estrutura química alterada pela metabolização por bactérias ou fungos pela atuação de seus sistemas enzimáticos, o que pode inclusive detoxificá-lo (SUDAKIN, 2003).

Processos fermentativos têm sido estudados com o fim de degradação de compostos há muitas décadas e continua sendo a atual preocupação da ciência, em decorrência das observações da efetiva redução dos níveis de contaminação (WESTBY, REILLY e BAINBRIDGE, 1997, BATA E LASZATITY, 1999, NIDERKORN, BOUDRA E MORGAVI, 2006). Este fato motiva o interesse em aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os microrganismos atuam como agentes biológicos de degradação (CACCIAMANI et al., 2007; GARDA et al., 2005). Alguns microrganismos produzem enzimas que poderiam alterar a estrutura das micotoxinas e/ou proteínas que conjugam estes compostos, tornando-os menos ativos como agentes patogênicos (PASTER et al. 1992; WESTBY, REILLY, BAINBRIDGE, 1997). A destruição e/ou abertura do grupamento epóxido, principal responsável pela toxicidade de DON, pode estar correlacionada a ação de enzimas oxidativas que ocasionariam a degradação do composto, por oxidação e abertura do anel epoxido (SWEENEY & DOBSON, 1998; MOSS e THRANE, 2004).

A partir destas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre degradação de deoxinivalenol e a atividade de enzimas oxidativas durante fermentação submersa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micotoxina

O padrão de DON foi adquirido da Sigma Chemical Company (EUA). Para o preparo da solução estoque de DON, a toxina foi dissolvida em benzeno: acetonitrila (95:5) resultando em uma concentração de 100 µg/mL, conforme Sheperd e Gilbert (1988). A solução de trabalho consistiu na diluição desta para uma concentração de 50 µg/mL, estimada pela relação p/v utilizada na preparação da solução estoque e confirmada pelo procedimento descrito por Bennett & Shotwell (1990) utilizando a absorvidade molar do padrão.

2.2 Experimento 1: Avaliação da atividade da enzima peroxidase (PO) durante fermentação submersa

O meio de cultura foi preparado contendo 50 mL de água estéril e 50 µg de DON, inoculados separadamente com 4.10^6 esporos/mL das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp., acondicionados em frasco de 150mL, em triplicatas para cada microrganismo. Paralelamente, foram preparados meios não contaminados e inoculados (1), meios contaminados sem inóculo (2), meio contaminados com inóculo não viável (3) (inativado em autoclave por 20 minutos a 120 °C e 1 kgf/cm²) usando triplicatas em todos os casos.

Os frascos contendo o meio inoculado permaneceram 240 horas a temperatura de 30 °C sob agitação orbital 0,005 G. A retirada da amostra analítica de 5 mL de meio fermentado foi realizada a cada 48 horas em ambiente inócuo utilizando material estéril e válvula de sucção, para quantificação de DON residual. A atividade enzimática foi realizada a cada 24 horas, retirando-se um volume de 1,5 mL de meio fermentado em condições inócuas.

A quantificação do nível residual da micotoxina, presente em 5 mL de meio fermentado, foi realizada por partição líquido-líquido utilizando cloreto de metileno segundo Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004). Para a derivação, utilizando o reagente anidrido trifluoroacético e quantificação por cromatografia gasosa, foi utilizado o método descrito por Garda-Buffer e Badiale-Furlong (2008).

O CG utilizado foi da marca Varian modelo 3400 equipado com injetor *split/splitless* e Detector de Ionização de Chama, coluna DB-17 (J&W Scientific) de 30 m, com 0,25 mm

de diâmetro interno e 0,25 µm de filme de 50%-fenil metilpolisiloxano. O equipamento foi monitorado pelo software Star Chromatography Workstation, versão 4.1, marca Varian.

As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura do injetor 250 °C, abertura da válvula a 0,75 minutos, fluxo de limpeza do injetor de 75 mL/minuto, detector 300 °C, atenuação de 16×10^{12} . A programação para a coluna cromatográfica foi de 100 °C durante 1 minuto aumentando 50 °C/minuto até 200 °C, permanecendo 2 minutos, em seguida aumentando 4 °C/minuto até 250°C, permanecendo 11,5 minutos, completando 29 minutos de corrida cromatográfica.

A curva padrão foi estabelecida derivando soluções contendo entre 1,4 a 21 µg de DON com adição de 18 mg de bicarbonato de sódio e 200 µL de TFAA, reagindo durante 6 minutos a 74 °C. O limite de detecção foi determinado pelas sucessivas diluições de uma solução de 10 ng/µL até que fosse gerado um sinal do detector três vezes superior ao desvio padrão das áreas relativas no tempo de retenção das toxinas quando se injetou branco de derivação. Para a quantificação foi utilizado tempo e área relativa de acordo com o padrão interno metil éster de ácido aracdônico (Sigma Chemical Company – EUA), utilizado uma massa de 0,01 µg/injeção cromatográfica.

A recuperação foi estabelecida através da contaminação de 50 mL de meio na faixa de 10 a 50 µg, nas três composições testadas em triplicatas, acondicionados em frascos de 125 mL durante 24 horas. As etapas de extração e quantificação foram executadas conforme descrito para determinação da quantidade residual de DON em meio fermentado.

A avaliação da atividade da peroxidase foi baseado na ação da enzima presente em 1 mL de meio fermentado diluída em 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM pH 6,0 sobre 0,5 mL do substrato guaiacol na concentração de 1%, juntamente com 1 mL de peróxido de hidrogênio a 0,08%. A mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura de 30 °C e a absorbância do composto oxidado foi realizada em espectrofotômetro modelo Cary 100 da Varian (EUA) a 470 nm. Uma unidade de atividade específica da enzima PO foi definida como a massa de proteína (enzima não purificada) capaz de causar um aumento da unidade de absorbância (ABS) em 0,001 por minuto/mg de proteína (KHAN e ROBINSON,1994).

2.3 Experimento 2: extração de enzimas PO do meio fermentado

A avaliação da curva de atividade específica da PO durante 240 horas de fermentação no experimento 1, mostrou que o intervalo de 48 horas correspondeu a maior atividade específica, sendo a extração da enzima realizada neste intervalo em um novo

experimento fermentativo para avaliar melhor a relação atividade da enzima PO em presença de DON.

Para tanto, como realizado no experimento 1, foram preparados os meios contaminados e não contaminados para controle do processo, sendo este interrompido quando decorrido 48 horas nas mesmas condições citadas no item 2.1

O meio fermentado (50 mL), denominado de fração 1, foi filtrado em papel filtro qualitativo para retirada de esporos das espécies fúngicas utilizadas. No filtrado (fração 2) foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até saturação de 80% com agitação branda (LIMA, PASTORE e LIMA, 2001). A solução após 24 horas sob refrigeração (4°C) foi centrifugada a 9040 G durante 30 minutos. O precipitado protéico foi dissolvido com tampão fosfato 5 mM pH 5,2 (fração 2) (ERAT, SAKIROGLU, KUFREVIOGLU, 2006) e dialisado por 48 horas a 4°C contra água destilada em membrana de acetato (fração 3). A porção protéica dialisada foi precipitada com álcool etílico a 70% sob refrigeração durante 24 horas, seguido por centrifugação a 36150 G durante 15 minutos a 4°C (fração 4) (LIMA, PASTORE e LIMA, 2001). Em todas as frações foi avaliada a atividade específica da PO, quantificada a proteína solúvel e a massa residual de DON.

A determinação de proteínas solúveis nas diferentes frações foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), quantificado em espectrofotômetro modelo Cary 100 da Varian (EUA) a 595 nm, correlacionada com a reação em quantidade crescente de proteína padrão de albumina.

2.4 Tratamento estatístico

A degradação de DON foi expressa como percentual de degradação determinado no meio fermentativo a cada 48 horas, relativo a massa adicionada no início do experimento (50 μg), descrita na Equação 1.

$$(\% \text{ de degradação} = (50 \mu\text{g de DON} - \text{quantidade detectada em 50 mL de meio}) \times 2) \quad (1)$$

A velocidade de degradação foi estimada a partir da massa de DON degradada e o tempo de fermentação, expressos conforme a Equação 2.

$$v = \text{DON} (\mu\text{g}) / \text{tempo (h)} \quad (2)$$

A unidade de atividade da enzima oxidativa peroxidase (U) estimada foi expressa como ABS/minuto. μg de proteína.

As diferenças estatísticas para as respostas foram verificadas através da análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo Teste de Tukey. Diferenças consideradas como significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tempo de retenção relativo de DON no sistema cromatográfico empregado para a determinação nos meios fermentados foi de 0,62 conforme apresentado na Figura 1. Os parâmetros de performance do método apresentaram como indicativo de mérito o limite de detecção de 0,28 $\mu\text{g/mL}$ de meio fermentado e recuperação de 96% e coeficiente de variação médio de 8% entre os diferentes níveis testados (10 a 50 μg).

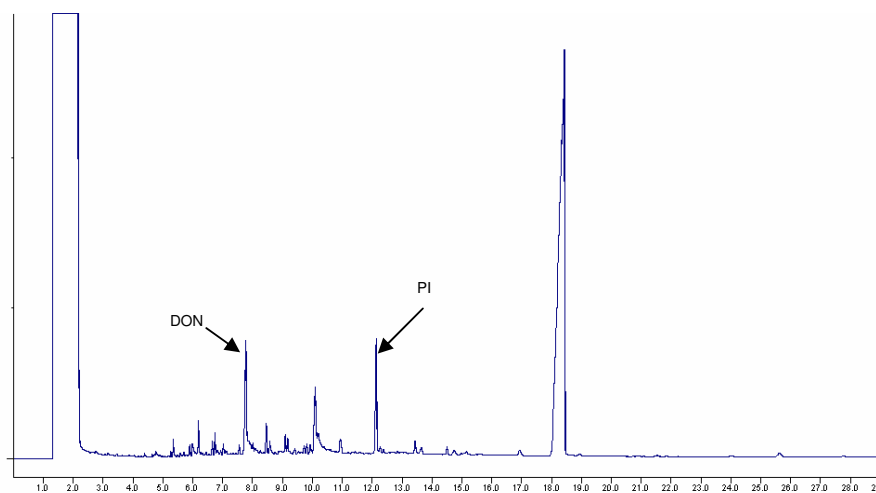


Figura 1. Cromatograma de meio fermentado contaminado com DON.

A degradação de DON por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. foi calculada a partir da massa de DON remanescente no meio fermentado durante 240 horas. Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados da massa de DON (μg) contida nos 50mL de meio fermentado como média dos três experimentos realizados e notadas as avaliações de significância da degradação nos intervalos de estudo.

No controle 1, experimento realizado sem a contaminação por DON, ocorreu a formação de compostos interferentes após 96 horas de fermentação, atingindo um máximo de 16,8 μg em 240 horas. No controle 2, constituído pelo meio submerso sem a adição do inóculo para as duas espécies fúngicas, a degradação após 240 horas de processo foi de 16,8%, verificada principalmente também após 96 horas de fermentação nas condições empregadas.

Os experimentos realizados em triplicatas com os dois microrganismos utilizando os esporos inativados por calor sob pressão e inoculadas na mesma concentração ($4 \cdot 10^6$ esporos/mL), demonstraram uma média de massa residual de DON de 15,9 e 16,5 μg ou uma degradação de 68 e 67% em meio fermentado por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. respectivamente, ao final do intervalo estudado. Estes experimentos sugerem que a toxina pode ter sido adsorvida na superfície da célula.

Tabela 1. Massa residual, percentual de degradação e velocidade de degradação de DON durante fermentação submersa.

Tempo (h)	<i>Aspergillus oryzae</i>				<i>Rhizopus</i> sp.		
	Controle 2 (μg DON)	DON _{RESIDUAL} (μg (SD)*)	Degradação (%)	VD** (μg DON/h)***	DON _{RESIDUAL} (μg (SD))	Degradação (%)	VD (μg DON/h)
0	49,8	44,4 (2,0)	11,1 ^a	0	49,7 (0,4)	0,7 ¹	0
48	49,8	15,6 (6,1)	69 ^b	0,62	24,4 (3,4)	51,3 ²	0,54
96	49,2	13,2(4,0)	73,6 ^{c, d}	0,05	10,1 (0,8)	79,7 ⁴	0,3
144	45,2	12,8 (0, 9)	74,4 ^d	0,008	12 (1,9)	76 ²	-0,04
192	42,5	14,1 (2,1)	71,8 ^c	-0,03	11,8 (0,9)	76,4 ³	0,004
240	41,6	16,3 (3,4)	67,4 ^b	-0,05	5,0 (0,5)	89,9 ⁵	0,14
Média	46,4	19,4	61,2	0,12	18,8	62,3	0,19

* SD - Desvio padrão.

** Velocidade de degradação.

*** μg DON/h – massa de DON degradado por hora de processo.

A estimativa do percentual de degradação de DON e a velocidade de degradação possibilitaram avaliar o tempo onde ocorreram os maiores índices de degradação realizada por cada microrganismo. O microrganismo *Aspergillus oryzae* degradou em 96 horas um percentual de 74% da massa inicial de DON. Em 144 horas de fermentação, não havia diferença significativa no nível do observado em 96 horas. A velocidade média de degradação estimada para este fungo foi de 0,12 $\mu\text{g}/\text{h}$. A espécie fúngica *Rhizopus* sp. teve a maior degradação em 244 horas quando reduziu em 90% o nível inicial de DON a uma velocidade média 0,19 $\mu\text{g}/\text{h}$. No intervalo de 48 horas de fermentação submersa foram verificadas as maiores velocidades de degradação realizada por ambas espécies fúngicas, sendo que o *Aspergillus oryzae* degradou DON mais rapidamente, 0,62 $\mu\text{g}/\text{h}$, quando comparado com *Rhizopus* sp., 0,54 $\mu\text{g}/\text{h}$ (Tabela 1). Estas velocidades permitem também estimar a degradação em 12,4 e 10,8 ppb/h para *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.

Na Tabela 2 estão os valores da atividade de enzimas oxidativas para os fermentados com as duas espécies fúngicas e para o controle (fermentado sem contaminação) e na Figura 2 estão graficados os resultados da atividade enzimática e velocidade de degradação nos extratos fermentados.

A atribuição da degradação ocorrer por ação da peroxidase se deve ao seu mecanismo de atuação, oxidando grupamentos doadores de elétrons em diferentes estruturas, em presença de peróxido de hidrogênio. Sendo assim, poderia atuar sobre o epóxido presente na estrutura química de DON. A atuação desta enzima em meio contaminado com a micotoxina pode ser resultado da manifestação do sistema enzimático do microrganismo utilizado como inóculo. No caso deste experimento, a metabolização da micotoxina pode ter ocorrido através de deepoxidação para posterior obtenção de energia para crescimento celular, uma vez que ela foi a única fonte de nutrientes presente no meio. Segundo Abrunhosa e Venâncio (2007), a metabolização enzimática foi confirmada para ocratoxina A, por ação de uma hidrolase obtida da espécie fúngica *Aspergillus niger* que degradou a micotoxina a outros compostos de menor toxicidade.

Tabela 2. Atividade específica da enzima PO (U) durante fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.

Tempo (h)	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Rhizopus</i> sp.	
	Controle*	Contaminado**	Controle*	Contaminado**
0	0,00	173,5 ⁱ	422,7	697,4 ^s
24	277,9	287,5 ⁱ	798,2	2380,7 ^v
48	11,4	356,7 ^l	753,0	1136,7 ^t
72	35,1	325,5 ^j	930,3	1579,1 ^u
96	16,4	156,9 ^d	184,0	585,2 ^r
120	18,7	147,7 ^c	259,5	382,1 ^m
144	112,3	215,0 ^h	250,9	454,1 ^q
168	0,0	107,5 ^b	238,3	387,5 ⁿ
192	0,0	54,0 ^a	264,4	345,5 ^k
216	20,1	181,5 ^g	261,6	432,9 ^p
240	138,6	177,5 ^f	244,9	424,0 ^o
Média	57,3	198,5	418,89	800,5

* Experimento com meio não contaminado inoculado com 4×10^6 esporos/mL.

** Experimento com meio contaminado com um massa de 50 μ g de DON inoculado com 4×10^6 esporos/mL

Letras diferentes na mesma coluna ou linha indicam que as médias diferem significativamente entre si ao nível de 95% ($p < 0,05$) segundo Teste de Tukey.

Os resultados da ANOVA permitiram verificar que não ocorreu semelhança na atividade enzimática dos extratos fermentados pelos dois microrganismos ou entre os tempos de fermentação, como pode ser verificado na Tabela 2. A atividade de enzimas oxidativas média foi de 198 e 800 U para *A. oryzae* e *Rhizopus* sp., respectivamente. A maior atividade média foi verificada para o microrganismo que apresentou os maiores percentuais de degradação de DON, *Rhizopus* sp. em 240 horas de fermentação. No

entanto, o grupo controle (sem contaminação por DON) fermentado por esta espécie fúngica, apresentou maior atividade da enzima peroxidase em todos os tempos quando comparado com o grupo controle fermentado com *Aspergillus oryzae*. No intervalo entre 24 e 48 horas de processo foi observada a equivalência do efeito, dado pela maior atividade específica da enzima no meio fermentado pelos dois microrganismos (Figura 2).

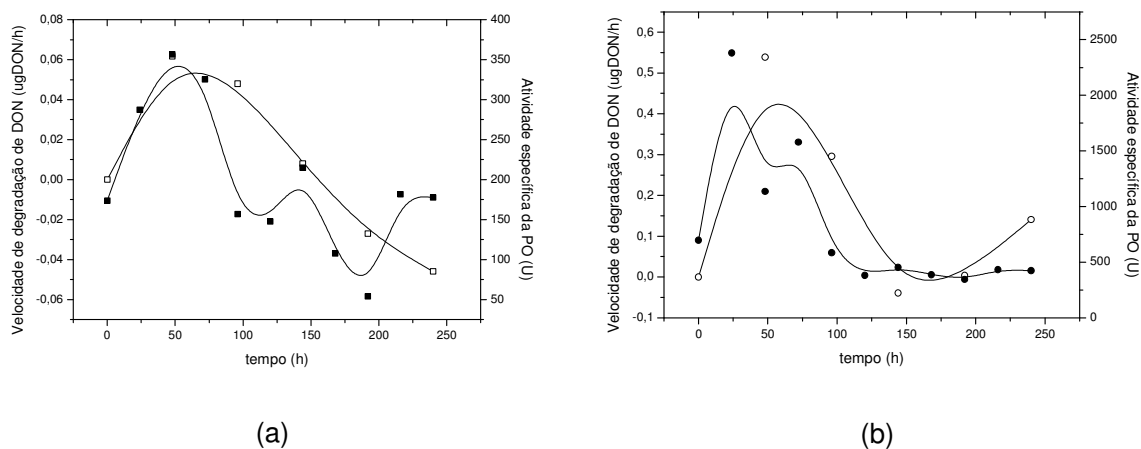


Figura 2. Velocidade de degradação de DON e atividade de enzimas oxidativas durante fermentação submersa com *A. oryzae* (a) e *Rhizopus sp.* (b). (□) velocidade de degradação em extrato fermentado com *A. oryzae*; (■) atividade de enzimas oxidativas em extrato fermentado com *A. oryzae*; (○) velocidade de degradação em extrato fermentado com *Rhizopus sp.*; (●) atividade de enzimas oxidativas em extrato fermentado com *Rhizopus sp.*

A comparação do perfil de atividade da enzima PO e da velocidade de degradação possibilitou verificar que a maior atividade da enzima foi acompanhada pela maior velocidade de degradação, principalmente no intervalo de tempo entre 0 e 96 horas. Os resultados sugerem que *Rhizopus sp.* e *Aspergillus oryzae* podem ter capacidade de metabolizar DON possivelmente pela variação da atividade específica da enzima PO em consonância com a variação da velocidade de degradação da toxina.

A variabilidade da atividade específica da enzima PO no intervalo de tempo entre 96 e 240 horas, ou após a sua velocidade máxima, pode ser explicada pela saturação da enzima com o substrato que mantém a velocidade de degradação estável por um período mais longo, resultando em um menor nível de degradação ao final de 240 horas de processo. Esta possibilidade foi reforçada quando se observou, no experimento realizado utilizando esporos inativos, a adsorção da micotoxina, que resultou em percentuais de degradação maiores que em experimentos com esporos viáveis, observados para o fungo *Aspergillus oryzae*, após 240 horas de fermentação.

O experimento que visou purificar a enzima PO do meio fermentado em presença e ausência de DON tem seus resultados demonstrados na Tabela 3, onde está o teor protéico de cada fração e a atividade enzimática estimada.

A atividade específica da enzima PO na fração 1, meio fermentativo contaminado, foi próxima dos valores determinados no experimento 1, comprovando a significância dos dados. No entanto, as demais frações, após as etapas de purificação não demonstraram atividade detectável. Este fato pode ser atribuído à filtração que retirou os esporos, sugerindo que a enzima PO é uma enzima endocelular devido a ausência de atividade não acompanhada pela diminuição da quantidade de proteína solúvel do meio (Tabela 3), o que reforçou a hipótese de adsorção da micotoxina pela célula e posterior formação do complexo enzimático e metabolização da micotoxina, conforme demonstrado na curva do experimento 1 (Figura 2). A. Para acompanhar a ação da PO de *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. sobre DON, seria interessante destruir a parede do esporo previamente à etapa de purificação.

Tabela 3. Teor protéico e atividade enzimática durante extração proteica.

Etapas	Teor protéico ($\mu\text{g/mL}$)		Atividade de enzimas oxidativas (U)	
	<i>A. oryzae</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>A. oryzae</i>	<i>Rhizopus</i> sp.
Fração 1	33,4	32,7	326,8	1331,5
Fração 2	29,2	27,4	0	0
Fração 3	28,0	26,5	0	0
Fração 4	29,5	26,8	0	0

4 CONCLUSÃO

As espécies fúngicas *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae* possuem capacidade de metabolizar DON e como demonstrado, esta capacidade está relacionada ao aumento da atividade da enzima oxidativa PO nos mesmos intervalos em que ocorreram as maiores velocidades de degradação da toxina. O intervalo de 48 horas de fermentação apresentou atividade específica de PO e velocidade de degradação de DON maiores para os dois microrganismos, 10,8 e 12,4ppb/h e 800 e 198 U, respectivamente, para *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*.

5 REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L., VENANCIO, A. Isolation and purification of na enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 1909-1914, 2007.

- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WEA\STERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.
- BATA, A.; LASZATITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.
- BENNET, G. A., SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 270-275, 1990.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CACCIAMANI, J.M., PERES, G.L., GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **B. CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.
- ERAT, M.; SAKIROGLU, H.; KUFREVIOLU, O.I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. **Food Chemistry**, v. 95, p. 503–508, 2006.
- GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para determinação de desoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008.
- 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, J.; MACEDO, R.M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- KHAN, G.M.; ROBINSON, D.S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.
- MELLO, J. P. F., & MACDONALD, A.M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.
- MOSS, M.O.; THRANE, U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 23-28, 2004.
- NIDERKORN, V., BOUDRA, H., MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.
- PASTER, N.; MENASHEROV, M.; LACEY, J.; FANELLI, C. Synergism between methods for inhibiting the spoilage of damp maize during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2, n. 2, p. 163-170, 1992.

- LIMA, E.D.P.; PASTORE, G.M.; LIMA, C.A. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE (PFO) DE POLPA DE PINHA (*Annona squamosa* L.) MADURA. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2001.
- PRONYK,C.; CENKOWSKI, S.; ABRANSOM, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, n. 10, p. 789-796, 2006.
- RICHARD, J.J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (2006), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxinivalenol standard reference solution. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 305-308, 1988.
- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, 141-158, 1998.
- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed). *Developments in Food Science*. Elsevier, Tokyo, v. 4, 1983.
- WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. **Food Control**, v. 8, n. 5/6, p. 329-339, 1997.

**CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS BIODEGRADADOS POR *Aspergillus oryzae*
E *Rhizopus sp.***

Jaqueline Garda, Gilma Trindade, Eliana Badiale-Furlong

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Laboratório de Micotoxinas
Laboratório de Bioensaio in vitro
Departamento de Química
Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 – Centro
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

**CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS BIODEGRADADOS POR *Aspergillus oryzae*
E *Rhizopus* sp.**

Resumo

O objetivo deste trabalho foi testar a citotoxicidade de DON, in vitro, na linhagem celular k-562, células de eritroleucemia humana, visando o seu emprego no acompanhamento de processos de biodegradação desta toxina em sistemas fermentativos. A micotoxina foi preparada em DMSO/PBS e adicionada em níveis de 0,03; 0,3 e 3 µg/mL de meio celular contendo $3 \cdot 10^5$ células/mL. A avaliação da toxicidade dos extratos fermentados foi realizada em meio celular utilizando extrato concentrados 10 vezes nas concentrações de 0,07 e 0,21 µg/mL para *Aspergillus oryzae*, e 0,01 e 0,03 µg/mL para *Rhizopus* sp. Os testes de viabilidade celular foram repetidos nove vezes e comparados com grupo controle através do método de exclusão azul de Trypan nos tempos imediatamente 24, 48 e 72 horas de exposição. O efeito tóxico agudo de DON foi verificado após 48 horas de cultura ($p < 0,05$) em relação ao seu crescimento na concentração de 3 µg/mL, indicado pelo IC₅₀. O limiar dose-resposta tóxica ocorreu na concentração de 0,03 µg DON/mL. Os extratos dos fermentados com *A. oryzae* e *Rhizopus* sp. apresentaram efeito agudo (IC₅₀) em 48 e 72 horas, respectivamente. Os meios fermentados com *Rhizopus* sp. apresentaram menor toxicidade (1,5 vezes) quando comparado com *Aspergillus oryzae*.

Palavras-chave: citotoxicidade, deoxinivalenol, degradação.

1 INTRODUÇÃO

O gênero fúngico *Fusarium*, que possui espécies toxigênicas, é um freqüente contaminante de grãos e cereais. Dentre as espécies toxigênicas, destaca-se o *F. graminearum* como o principal produtor de deoxinivalenol (DON, vomitoxina), cuja presença em alimentos pode resultar em sintomas de toxicidade aguda e/ou crônica (UHLIG, 2005).

Os sintomas de toxicidade aguda/subaguda são vômito, retardo gástrico, rejeição da dieta, perda de peso, diarreia, necrose em vários tecidos tais como trato intestinal, medula óssea e tecido linfático. Já os sintomas de toxicidade subcrônica são redução do ganho de peso, danos no sistema imunológico e tecido hematopoético (BAARS et al. 1999). Experimentos empregando doses capazes de desencadear efeitos crônicos e subcrônicos mostraram que estes são irreversíveis (SHLATTER, 2004; LARSEN et al., 2004; SUDAKIN, 2003). Em nível bioquímico, os sintomas são decorrentes da inibição da síntese protéica, DNA e RNA, inibição da ação enzimática principalmente de lactato desidrogenase (MURTHY et al., 1985, SUDAKIN, 2003; KIESSLING, 1986; UENO; 1986; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999; KRABBE, 2005; DANICKE et al., 2004). Efeitos quanto a carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e teratogenicidade não têm sido demonstrados (MEKI et al., 2001; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999).

DON tem como característica fundamental a estabilidade aos principais processos alimentícios a que grãos e seus resíduos contaminados são submetidos, antes do consumo animal ou humano. Este composto não volátil pode ser efetivamente desativado apenas sob condições drásticas ácidas ou alcalinas que inviabilizam utilização da matéria-prima ou insumo na indústria alimentícia. Esta toxina também é resistente à degradação por fatores ambientais, tais como temperatura e luz, enquanto que a coexistência de bactérias e fungos no meio pode alterar sua estrutura química, o que pode resultar em diminuição da toxicidade (SUDAKIN, 2003; SHIMA et al. 1997; BEETON e BULL, 1989).

Dados recentes sobre a ocorrência de DON em alimentos apontam a sua incidência em 57% das amostras analisadas, sendo estas quase na sua totalidade constituída por rações. Esta possibilidade de freqüente exposição a micotoxina gera riscos a saúde animal e humana, justificando a crescente demanda por investigações toxicológicas. A utilização de sistemas celulares para os testes toxicológicos tem chamado a atenção nos últimos anos pelo seu custo, rapidez da identificação da dose-resposta, alta capacidade de triagem e podem ser, em alguns casos, utilizadas em determinações quantitativas das toxinas (UHLIG, 2005). As culturas celulares testadas, BHK-21, XP RO12, K-562, CHO-K 1, foram as que apresentaram maior sensibilidade frente a citotoxicidade de DON (CETIN e BULLERMANN, 2005).

A biodegradação tem sido uma estratégia promissora quando aplicada à redução de ocratoxinas, aflatoxinas e zearalenona, mas poucos são os registros quanto a sua aplicação a DON (VARGA et al., 2005; VARGA, RIGÓ e TÉREN, 2000; ABRUNHOSA, SERRA e VENANCIO, 2002; NIDERKORN, BOUDRA e MORGAVI, 2006). A escolha de microrganismos seletivos, resistentes e GRAS que tenham demonstrado o seu potencial na degradação de toxinas possibilitariam minimizar descarte de matéria orgânica, gerar um produto com maior valor nutricional e resultar no desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis para tratamento de cereais e seus resíduos de grande interesse para o agronegócio (SILVEIRA e FURLONG, 2007).

A avaliação da ação de biodegradadores, fungos e bactérias, no meio natural resultando em redução parcial ou total de contaminação micotoxicológica, através de testes citotóxicos, permitiria, além de triar a contaminação, avaliar a presença de outros compostos tóxicos ou ainda metabólitos das vias de degradação de micotoxinas por microrganismos. Para emprego de culturas celulares como indicadores de biodegradação, há a necessidade de investigar uma linhagem capaz de ser afetada pela presença da micotoxina em estudo, mesmo em baixos limites, e as conseqüências metabólicas dos seus efeitos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar em modelo "in vitro" a capacidade de triagem micotoxicológica da linhagem celular k-562 e a citotoxicidade de extratos biodegradados inicialmente contaminados com DON.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Solução de DON

O padrão de DON foi adquirido da Sigma Chemical Company (EUA). A solução estoque da toxina DON foi preparada dissolvendo-a em benzeno: acetonitrila (95:5) de forma a resultar em uma concentração da solução de trabalho de 50 µg/mL conforme Shepeherd e Gilbert (1988). A determinação da concentração foi estimada pela relação p/v utilizado na preparação da solução e confirmada pelo procedimento descrito por Bennett & Shotwell (1990) que emprega a absorvidade molar do padrão em 219 nm.

Para o teste citotóxico, a solução padrão de DON foi seca sob nitrogênio em frasco âmbar, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 0,75 µg/µL. Desta solução foram tomadas alíquotas e diluídas com tampão fosfato salino (PBS) sob agitação ultrasônica, de forma a comporem concentrações de 0,03 µg/mL (0,1013 µM); 0,3 µg/mL (1,013 µM) e 3 µg/mL (10,13 µM) codificadas como DON 1, DON 2 e DON 3 respectivamente.

2.2 Preparo das células eritroleucêmicas e ensaio citotóxico

As células humanas eritroleucêmicas (k-562) oriundas do Laboratório de Cultura Ceular, DCF (FURG) foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado, a partir da concentração de 3.10^5 células/mL, à 37 °C, a umidade atmosférica (aproximadamente 40%). Na fase exponencial de crescimento, dois dias após o repique inicial, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio para uma concentração de 4.10^5 células/mL. Após as células foram distribuídas em placas de cultura com 24 poços num volume de 900 µL e acrescidos 100 µL das soluções experimentais (PBS para controle, padrão de DON e diferentes concentrações de extratos fermentados). A viabilidade celular foi avaliada através de técnica de exclusão por azul de Trypan, nos tempos imediatamente 24, 48 e 72 horas após exposição à toxina ou aos extratos. Os experimentos só foram realizados quando a viabilidade foi $\geq 95\%$.

2.3 Respostas de células tumorais humanas a citotoxicidade de DON

2.3.1 Triagem da capacidade citotóxica para DON

Para avaliar a resposta das células K-562 a toxicidade quanto a dose/resposta para DON foram utilizadas diferentes concentrações da micotoxina de 0,03 µg/mL; 0,3 µg/mL e 3 µg/mL de meio preparados como descrito no item 2.1.

A avaliação da toxicidade foi realizada comparativamente com um grupo controle, sendo a viabilidade celular avaliada imediatamente a cada 24 horas até 72 horas. Os testes foram repetidos em 9 ensaios. A partir destas determinações foi calculado a curva dose-resposta e efeito tóxico agudo, a IC_{50} , correspondendo à inibição da proliferação celular (células viáveis) em 50%. A IC_{50} foi estimada segundo a relação dada pela Equação 1.

$$\%(\text{IC}) = [1 - (\text{n}^\circ \text{células}_{\text{tratamento}} / \text{n}^\circ \text{células}_{\text{controle}})] \times 100 \quad (1)$$

2.3.2 Obtenção de extratos fermentados

Meios de cultura foram preparados contendo 50 mL de água e 50 µg de DON, inoculados separadamente com 4.10^6 esporos/mL das espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp., acondicionados em frasco de 125 mL, em triplicatas para cada

microrganismo. Paralelamente, foram preparados meios não contaminados. Os experimentos de fermentação com e sem contaminação por DON e as duas espécies fúngicas totalizaram 4 tratamentos.

A degradação de DON foi determinada pela quantificação da toxina no meio após 240 horas de fermentação. A extração da micotoxina do meio fermentado foi realizada segundo Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004) por partição líquido-líquido com cloreto de metileno na proporção 5:3 (meio:solvente), quantificado por cromatografia gasosa utilizando derivação com anidrido trifluoroacético e bicarbonato de sódio segundo metodologia descrita por Garda e Badiale-Furlong (2008).

O Cromatógrafo Gasoso utilizado foi Varian 3400 equipado com injetor *split/splitless* e Detector de Ionização de Chama, coluna DB-17 (J&W Scientific) de 30 m, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme de 50%-fenil metilpolisiloxano. O equipamento foi monitorado pelo software Star Chromatography Workstation, versão 4.1, marca Varian.

As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura do injetor 250 °C, abertura da válvula a 0,75 minutos, fluxo de limpeza do injetor de 75 mL/minuto, detector 300 °C, atenuação de 16×10^{12} . A programação para a coluna cromatográfica foi de 100 °C durante 1 minuto aumentando 50 °C/minuto até 200 °C, permanecendo 2 minutos, em seguida aumentando 4 °C/minuto até 250 °C, permanecendo 11,5 minutos, completando 29 minutos de corrida cromatográfica (Garda e Badiale-Furlong, 2008). O tempo de retenção relativo de DON no sistema cromatográfico empregado para a determinação nos meios fermentados foi relacionado com o tempo de retenção do metil éster de ácido aracdônico.

2.3.3 Triagem de citotoxicidade de extratos fermentados contaminados

Os extratos fermentados foram testados quanto a toxicidade comparativamente as concentrações de DON testadas e ao grupo controle.

Para o ensaio citotóxico os extratos fermentados foram concentrados 10 vezes sob pressão e filtrados em membrana de celulose de 0,22 µm. Alíquotas de 25 e 75 µL, quando contaminados, e 75 µL, quando não contaminados com DON, foram ajustadas a 100 µL com PBS e adicionadas ao meio celular para acompanhamento de número de células viáveis e viabilidade durante 72 horas. O plano do ensaio de citotoxicidade está esboçado na Figura 1.

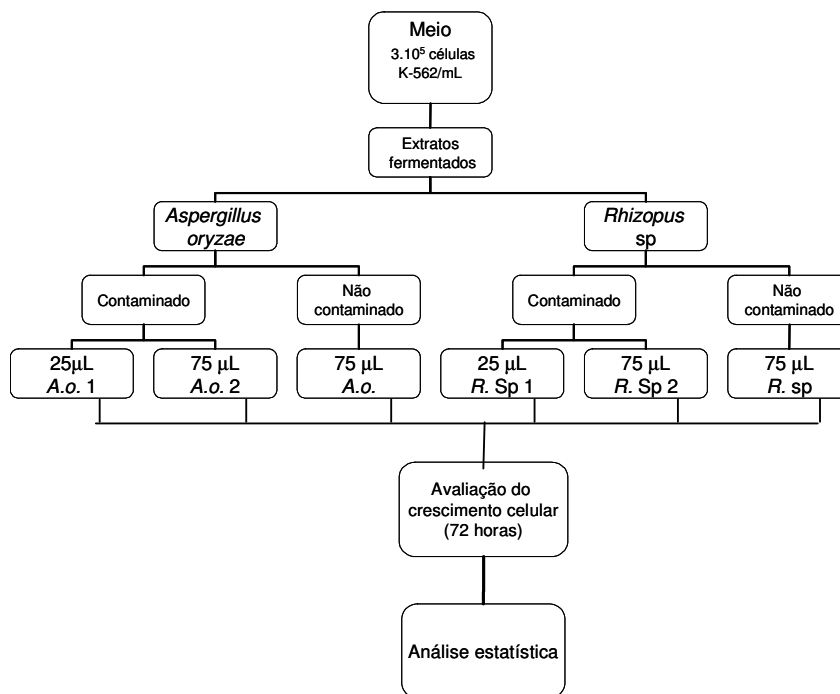


Figura 1. Ensaio citotóxico para os diferentes tratamentos. A.o.- espécie fúngica *Aspergillus oryzae*; R.sp.- espécie fúngica *Rhizopus sp*.

2.4 Estimativas de citotoxicidade e estatísticas

As relações indicativas de descontaminação e diminuição de toxicidade foram: percentual de degradação de DON, concentração celular, viabilidade celular (%), inibição da proliferação celular em 50% (IC₅₀), velocidade específica de crescimento celular (μ), tempo de duplicação da concentração celular (t_D).

O percentual de degradação foi calculado a partir da quantidade residual da toxina relacionada a 100mL de meio dada pela Equação 2. A viabilidade celular foi expressa como percentual de células viáveis relacionadas com o número de células totais. A inibição da proliferação celular (%IC) em 50% (IC₅₀) foi calculado como a metade da contagem celular encontrados no grupo controle contendo o número celular inicialmente coletado (tempo zero), calculada pela Equação 3. A velocidade específica e tempo de duplicação foi estimado como na Equação 4 entre os tempos de 24 e 72 horas, caracterizado pelo crescimento celular, onde x é o número de células viáveis.

$$(\% \text{ de degradação} = (50 \mu\text{g de DON} - \text{quantidade detectada em } 50 \text{ mL de meio}) \times 2) \quad (2)$$

$$\% \text{ IC} = [1 - (\text{n}^\circ \text{ células}_{\text{tratamento}} / \text{n}^\circ \text{ células}_{\text{controle}})] \times 100 \quad (3)$$

$$\mu = dx/dt \cdot 1/x \quad (4)$$

As curvas de dose-resposta (DON x células viáveis) foram graficadas segundo valores do número de células viáveis e viabilidade celular para os diferentes tratamentos, micotoxina e extratos fermentados. As diferenças estatísticas foram verificadas através da análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo Teste de Tukey, sendo significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Capacidade citotóxica das células eritroleucêmicas

O ensaio para avaliação do número de células viáveis e viabilidade celular teve duração de 72 horas, tempo suficiente para obtenção da curva dose/resposta nas diferentes concentrações testadas e manutenção da qualidade da cultura celular (através de células controle). Após este período, a regressão linear do tempo x número de células viáveis e viabilidade celular comparada ao grupo controle diminuiu drasticamente, possivelmente pela diminuição de nutrientes do meio devido à alta concentração celular (acima de $3 \cdot 10^6$ células/mL de meio) inviabilizando a continuidade do experimento por um período maior. O tempo de 72 horas para ensaios de cultura celular também foi utilizado por Berek et al (2001), Cetin e Bullerman (2005), Bony et al (2007).

A obtenção da curva dose/resposta e efeito citotóxico foi possível em 48 horas de cultura celular para as diferentes concentrações de DON, ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos com uma relação linear inversa entre concentração da toxina e número de células viáveis (Figura 2 e Tabela 1). A concentração de $0,03 \mu\text{g/mL}$ não casou resposta tóxica nas células. Amostras contendo níveis menores ou iguais de DON como contaminante não poderiam ser consideradas como suspeitas durante triagem utilizando teste citotóxico, com células K-562. No caso de consumo de alimentos contaminados com DON em níveis iguais ou inferiores a este, possivelmente os efeitos clínicos também não poderiam ser observados, mas poderia ocorrer supressão de funções imunes ao longo de um período de consumo nestes níveis (BEREK et al, 2001).

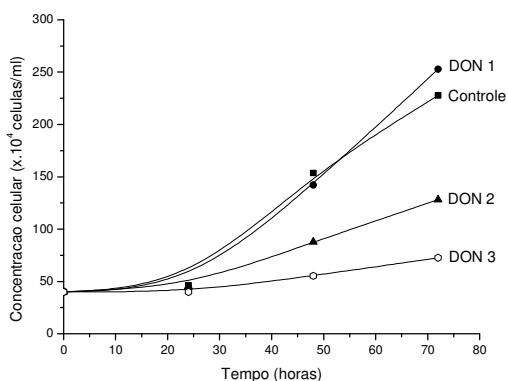


Figura 2. Curva de crescimento celular da cultura k562 durante ensaio de 72 horas.

(●)DON 1: concentração de 0,03 μ g /mL de meio; (◄)DON 2: 0,3 μ g/mL; (◻)DON 3: 3 μ g/mL .

A Tabela 1 apresenta os resultados da concentração celular no intervalo de estudo avaliado também quanto a sua significância estatística (ANOVA).

Tabela 1. ANOVA para os tratamentos em relação ao número de células viáveis (x.10⁴células/mL), valores médios dos tratamentos e diferença entre médias.

Tratamento	Tempo			
	0	24	48	72
Controle	39,7 ^a	41,9 ^{a,b}	117,3 ^l	176,8 ^m
DON 1	40 ^a	44,3 ^{a,b,c}	107 ^{i,j}	197 ⁿ
DON 2	40 ^a	45,3 ^{a,b,c}	65,66 ^{e,f}	95,3 ^{h,i}
DON 3	40 ^a	40 ^a	41 ^{a,b,c,d}	57,3 ^{b,c,d,e}
Asp.	40 ^a	59,7 ^{c,d,e}	98 ^{h,i}	134,3 ^k
Asp. 1	40 ^a	43,7 ^{a,b,c}	87 ^{g,h}	110,8 ^{i,j}
Asp. 2	40 ^a	38,7 ^a	35,2 ^{e,f,g}	37,9 ^{f,g}
Rhiz.	40 ^a	58,4 ^{c,d,e}	107,2 ^{i,j}	153,2 ^l
Rhiz. 1	40 ^a	48,7 ^{a,b,c,d}	97 ^{h,i}	117,8 ⁱ
Rhiz. 2	40 ^a	45,5 ^{a,b,c}	63,3 ^{d,e,f}	77,7 ^{f,g}

^x Médias significativamente ($p < 0,05$) diferentes segundo Teste de Média de Tukey.

Na maior concentração da micotoxina testada, 3 μ g/mL, a resposta de inibição da proliferação (IC₅₀) ocorreu em 48 horas de cultivo, causando inibição da proliferação celular em 65,1%, possivelmente pela inibição da síntese protéica. Este fato foi acompanhado pela menor velocidade específica de crescimento celular entre os experimentos, 0,007h⁻¹, permitindo estimar que fossem necessárias 127 horas para a duplicação da concentração celular nestas condições (Tabela 2). Este tempo poderia ser danoso para as sínteses protéicas para renovação que ocorrem em intervalos menores, visto que DON não causou morte celular, em nenhuma das concentrações estudadas. Os resultados da avaliação do tempo de resposta aos efeitos de DON estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 e

demonstrados na Figura 2. A confirmação do comportamento de ausência de morte celular ou perda da viabilidade de DON está apresentada na Tabela 3.

Tabela 2. Valores de percentual de inibição da proliferação celular (% IC), velocidade específica de crescimento e tempo estimado para duplicação celular para K-562 para os tratamentos.

Tratamentos	Tempo				$\mu^{**}(t_D)^{***}$ h ⁻¹ (h)
	0	24	48	72	
Controle	-	-	-	-	0,030 (47,3)
DON 1	0	0	8,8	0	0,031 (46,5)
DON 2	0	0	44,1	46,1	0,016 (66,5)
DON 3	0	4,5	65,0*	67,6*	0,007 (125,9)
Asp.	0	0	16,4	24,0	0,019 (60,3)
Asp. 1	0	0	25,8	37,3	0,019 (61,1)
Asp. 2	0	7,6	70,0*	78,6*	0,013 (78,6)
Rhiz.	0	0	8,6	13,4	0,020 (58,0)
Rhiz. 1	0	0	17,3	33,4	0,018 (62,5)
Rhiz. 2	0	0	46,0	56,0*	0,011 (85,3)

* - IC₅₀: Inibição da proliferação celular igual ou maior que 50%.

** - μ : velocidade específica de crescimento celular.

*** - Tempo de duplicação celular.

Tabela 3. ANOVA para os testes de viabilidade celular (% de células viáveis), valores médios dos tratamentos.

Tratamento	Tempo			
	0	24	48	72
Controle	97,7*	96,7	95,1	94,8
DON 1	98,3	99,4	95,0	96,5
DON 2	97,7	93,4	99,5	96,6
DON 3	98,6	99,0	95,1	96,2
Asp.	95,0	94,7	96,3	95,2
Asp. 1	100,0	98,0	100,0	95,4
Asp. 2	99,0	99,1	97,1	92,3
Rhiz.	95,0	96,0	98,9	94,0
Rhiz. 1	98,0	98,4	98,3	91,4
Rhiz. 2	99,0	99,2	97,0	97,4

^x Não ocorreu diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) segundo Teste de Média de Tukey.

Wu e colaboradores (2007) estudando a resposta da linhagem celular k-562 a DON, obtiveram dose-resposta também em 48 horas, mas não definiram o limite de concentração necessária para desencadear a inibição da proliferação. Estudos para definir dose-resposta da ocratoxina A também mostraram que 48 horas foram suficientes para diminuir a viabilidade celular e causar apoptose (KAMP et al, 2005). Citotoxicidade em tempo semelhante foi obtida para outras micotoxinas avaliadas como, citrinina, ochratoxina A,

gliotoxina, patulina, DON, aflatoxina B₁, zearalenona e DAS (TAMMER et al, 2007; CETIN e BULLERMAN, 2005; HASSEN et al, 2005; JUN et al, 2007, COMETA et al., 2006).

O efeito agudo para a micotoxina foi considerado aquele em que ocorreu uma inibição da proliferação celular igual ou maior que 50% comparado ao grupo controle.

3.2 Citotoxicidade de extratos fermentados biodegradados

As duas espécies fúngicas avaliadas como biodegradadoras são descritas como seguras a saúde humana e comumente utilizadas em bioprocessos para a produção de alimentos, fármacos, outros compostos químicos sem a geração de metabólitos demonstradamente tóxicos durante a fermentação (DVORAKOVA et al, 2001; CHIA-HUNG LIN, YI-TIEN WEI, CHENG-CHUN CHOU, 2006; SUNTORNSUK, POCHANAVANICH, SUNTORNSUK, 2004).

Para determinar os níveis de DON nos diferentes meios fermentados, foi adaptado o método Garda, Macedo e Badiale-Furlong (2004) e Garda e Badiale-Furlong (2008) que apresentou uma recuperação média de 98%, coeficiente de variação de 6% e limite de quantificação de 84 ng/mL de meio fermentado. Na Figura 3 está apresentado um cromatograma de extrato fermentado com destaques para o pico de DON e do padrão interno empregado no sistema cromatográfico.

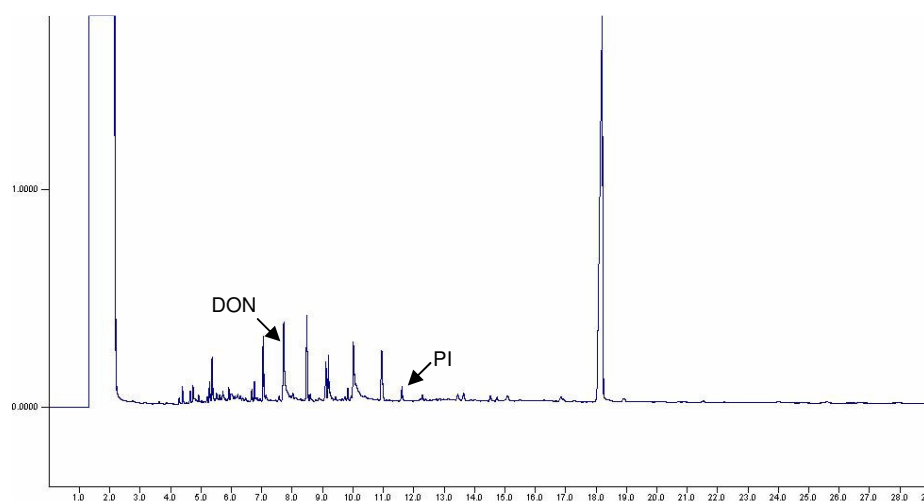


Figura 3. Cromatograma do extrato fermentado contaminado com DON.

A concentração média de DON remanescente determinada após fermentação submersa foi de 14,0 e 1,9 µg em 50 mL de meio quando utilizados os microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. permitindo estimar um percentual de degradação média de 72 e 96% respectivamente.

A quantificação residual de DON nos extratos fermentados permitiu estimar os níveis da toxina presente nos volumes dos extratos fermentados adicionados nos experimentos de cultura celular que indicariam a detoxificação. As concentrações de DON nos extratos fermentados por ação de *A. oryzae* foram 0,07 e 0,21 µg/mL, e adição de 0,01 e 0,03 µg/mL para os biodegradados por *Rhizopus* sp.

As baixas concentrações de DON residual detectadas após a fermentação tornaram necessária a concentração dos extratos para que se pudessem observar os efeitos tóxicos nas células eritroleucêmicas k-562. Autores como Uhlig et al (2005) também relataram a necessidade de concentrar 10 vezes extratos contendo micotoxinas para detectar efeito em culturas celulares. No caso deste trabalho, os níveis residuais de DON foram promissores sob o ponto de vista da degradação da estrutura da toxina e indicaram a necessidade de realizar estudos de efeito crônico visto que as concentrações residuais da micotoxina foram inferiores aos da curva dose-resposta das células k-562.

Durante todo o período de avaliação do crescimento celular em presença de extratos fermentados, foi observado a mesma relação inversa entre concentração de DON e o número de células viáveis, ou seja, quanto maior a concentração celular, menor o nível de contaminação de DON (Figura 4). No entanto, a viabilidade celular não foi alterada significativamente em presença dos extratos fermentados pelos dois microrganismos com e sem contaminação inicial de DON, apresentando um percentual médio de $97 \pm 2,8$ para todos os ensaios e tratamentos. Estes resultados mostram que durante a fermentação dos meios contendo DON, não foram produzidos metabólitos capazes de ocasionar morte celular, demonstrados na Tabela 3.

Os extratos fermentados com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. não contaminados adicionados aos meios favoreceram o crescimento celular em 24 horas de cultura, demonstrado pela concentração celular semelhante. Este fato sugere que durante processo fermentativo foram formados compostos de maior assimilação pelas células k-562, o que pode ser promissor quando se pretende disponibilizar nutrientes além de descontaminar matérias-primas.

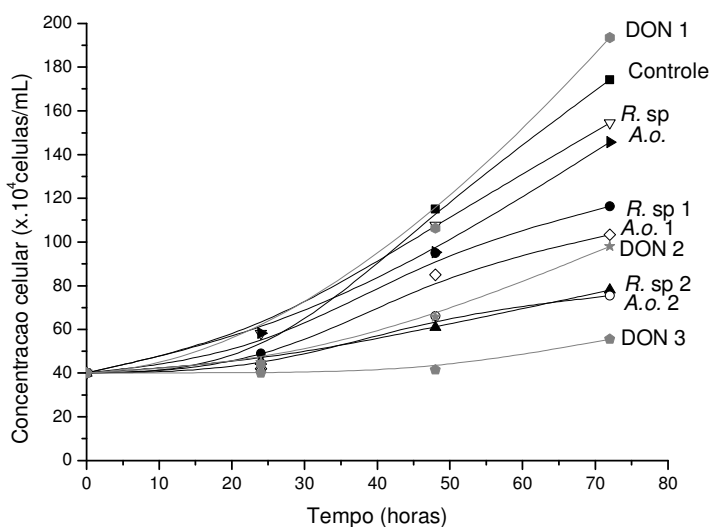


Figura 4. Curva de crescimento celular (k562) durante 72 horas. (●)DON 1: concentração de 0,03 μg DON /mL de meio; (*)DON 2: 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (●)DON 3: 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (■) controle; (►) A.o.: 75 μL de extrato fermentado com *Aspergillus oryzae* sem contaminação; (◊)A.o.1: 25 μL de extrato fermentado com *Aspergillus oryzae* contaminado; (◊)A.o. 2: 75 μL de extrato fermentado com *Aspergillus oryzae* contaminado;(Δ) R.sp.: 75 μL de extrato fermentado com *Aspergillus oryzae* sem contaminação; (●) R.sp. 1: 25 μL de extrato fermentado com *Aspergillus oryzae* contaminado; (▲) R.sp. 2: 75 μL de extrato fermentado com *Aspergillus oryzae* contaminado.

O efeito de inibição celular do extrato contaminado em maior nível fermentado pela espécie fúngica *Aspergillus oryzae* (A.o. 2 - 0,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio ou 75 μL de extrato), no tempo de cultura de 48 horas, também foi significativo para a relação dose/resposta e efeito agudo demonstrado pela inibição da proliferação (IC) e IC_{50} . Em relação à dose/resposta, ocorreu efeito agudo do extrato confirmada pela inibição da proliferação celular em 70% e baixa velocidade específica de crescimento celular, o que reforça a ausência de toxicidade e a ausência da produção de derivados tóxicos durante a fermentação (Tabela 2).

O efeito agudo de inibição celular foi verificado somente após 72 horas no extrato fermentado por *Rhizopus* sp., também para a maior quantidade testada (0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mas com uma inibição da proliferação menor, 56%. No entanto, para este experimento ocorreu a menor velocidade específica de crescimento celular entre os extratos fermentados, $0,011 \text{ h}^{-1}$, e tempo necessário para duplicação de aproximadamente 85 horas de cultura. Este efeito se deve principalmente a diferença da inibição da proliferação ocorrida entre 0 e 24 horas. Os resultados de inibição de proliferação descritos são semelhantes aos encontrados por Wu et al (2007) em relação a DON expressos como 0,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio quando

determinado por exclusão com azul de Trypan e 0,39 µg/mL quando por bioensaio MTS (sal de tetrazólio amarelo).

Este efeito pode ser atribuído à inibição de síntese protéica, de DNA e RNA causadas por interações químicas diretas e indiretas induzidas por DON ou seus derivados. DON também é apresentado como responsável pelo aumento de peroxidação lipídica em linhagens celulares como Caco-2. Estes produtos da peroxidação lipídica também podem causar danos ao DNA através da produção de espécies oxidativas reativas explicando a relação entre DON e DNA e o impedimento do crescimento celular (RIZZO et al, 1994, KOUADIO et al, 2005, KNASMÜLLERR et al, 1997). Fato que poderia justificar o efeito dose/resposta dos extratos fermentados mesmo a concentrações de DON menores que a necessária para o mesmo efeito em presença de padrão puro, decorrente da produção de peróxidos no meio.

Os extratos não contaminados de *Rhizopus sp.* e *Aspergillus oryzae* apresentaram o maior número de células viáveis dentre todos fermentados avaliados nos ensaios de toxicidade. Segundo Uhlig e colaboradores (2005), dose-resposta dos ensaios está correlacionada também com compostos desconhecidos presentes nos extratos, o que pode influenciar tanto positivamente como negativamente a avaliação citotóxica.

A comparação dos valores de inibição da proliferação celular entre os extratos das duas espécies fúngicas testadas permitiu afirmar que o efeito dos extratos fermentados com o microrganismo *Aspergillus oryzae* foi maior (1,5 vezes) que os extratos de *Rhizopus sp.* em todos os ensaios, tanto na ausência como em presença de quantidade de toxina residual, observados a partir de 48 horas de cultura celular. É evidente que gêneros fúngicos possuem metabolismos diferenciados, o que pode ser ainda marcado ou alterado quando estes se desenvolvem em condições adversas, como é o caso do processo fermentativo realizado.

O microrganismo *Rhizopus sp.* demonstrou um maior potencial para degradação da micotoxina e conseqüentemente diminuição da toxicidade do extrato comparado com *Aspergillus oryzae*, quando considerada a concentração residual de DON ao final do processo fermentativo, 7,4 vezes menor que os fermentados por *Aspergillus oryzae*. Estes dados foram confirmados pelo menor efeito de inibição da proliferação avaliada pelo IC₅₀ respectivamente 56 e 79% para *Rhizopus sp.* e *Aspergillus oryzae* (Tabela 2). A equação da regressão linear permitiu estimar que a inibição da proliferação celular em 50% ocorria em aproximadamente 34 e 64 horas para os microrganismos respectivamente

Estimando o preparo de extratos para ensaios citotóxicos respeitando a relação amostra:solvente 1:5 (TANAKA et al, 2000; GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2008), concentrando-o 10 vezes, o limite de detecção da micotoxina corresponderia a 150 ng/g de amostra ou 150 ppb, limites semelhantes a métodos quantitativos utilizando CCD.

Poderia ser considerado, portanto, como um teste eficiente para triagem de DON em amostras contaminadas (KRSKA, WELZIG, BOUDRA, 2007). Segundo Cetin e Bullermann (2005), a linhagem K-562 está entre as mais sensíveis para emprego como modelo in vitro para avaliar a citotoxicidade de DON.

O consumo humano de cereais e seus derivados, incluindo subprodutos é grande e conforme a literatura, estima-se que ocorra alta incidência de contaminação em matérias-primas produzidas mundialmente. Tal fato é considerado uma situação de risco para a saúde humana principalmente pela ocorrência de doenças secundárias devido à ingestão de alimentos contaminados (BEREK ET AL, 2001). Os resultados deste trabalho demonstraram a possibilidade de utilizar bioprocessos viáveis para a degradação e descontaminação de micotoxina e conseqüente diminuição de risco pela ingestão de DON acima da capacidade de defesa dos organismos. A estimativa do efeito de inibição celular da ingestão de extrato fermentado tendo como base a contaminação de 210 ppb (contaminação inicial 1000 ppb) dos extratos biodegradados, resultou que a ingestão de um litro do fermentado não concentrado representaria o dobro da concentração que não causaria este efeito e seria 64 vezes menor que a necessária para desencadear efeito agudo.

4 CONCLUSÃO

As células eritroleucêmicas possuem capacidade de triar a micotoxina DON quando presente concentração acima de 0,03 µg/mL de meio, caracterizando o limiar para teste de triagem de amostras suspeitas de contaminação pela micotoxina. A maior inibição da proliferação celular foi observada com 3 µg/mL em 48 horas de cultura celular.

Os extratos fermentados por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. concentrados demonstraram efeito de inibição da proliferação celular (maior que 50%-IC₅₀) em 48 horas de cultura para *A. oryzae* e em 72 horas para *Rhizopus* sp.

O *Rhizopus* sp. causou maior degradação de DON (7,4 vezes) e gerou extratos com menor efeito de inibição celular (1,5 vezes) que o *Aspergillus oryzae*.

5 REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENANCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- BEETON, S.; BULL, AT. Biotransformation and detoxificação of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. **Applied Environmental Microbiological**, v. 55, p. 190-197, 1989.

- BENNET, G. A., SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.73, n. 2, p. 270-275, 1990.
- BEREK, L.; PETRI, I.B.; MESTERHÁZY, Á.; TÉREN, J.; MOLNÁR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 5, p. 25-30, 2001.
- BONY,S., OLIVIER-LOISEAU,L., CARCELEN, M, DEVAUX, A. Genotoxic potential associated with low levels of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 3, p. 457-465, 2007.
- CETIN, Y.; BULLERMEN, L.B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755-764, 2005.
- COMETA, M.F.; LORENZINI, P.; FORTUNA, S.; VOLPE, M.T.; MENEGUZ, A.; PALMERY, M. In vitro inhibitory effect of aflatoxin B₁ on acetylcholinesterase activity in mouse brain. **Toxicology**, v. 206, p. 125–135, 2006.
- DANICKE, S.; VALENTA, H.; DOLL, S.; GANTER, M.; FLACHOWSKY, G. On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 14, n. 1-4, p. 141-157, 2004.
- CHIA-HUNG LIN, YI-TIEN WEI, CHENG-CHUN CHOU. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food Microbiology**, v. 23, p. 628–633, 2006.
- DVORAKOVA, J., SCHMIDT, D., HUNKOVA, Z., THIEM, J., KREN, V. Enzymatic rearrangement of chitine hydrolysates with b-N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 225–232, 2001.
- GARDA-BUFFON,J., BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para determinação de desoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- HASSEN, W.; GOLLI, E.E.; BAUDRIMONT, I.; MOBIO, T.; LADJIMI, M.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Cytotoxicity and Hsp 70 induction in Hep G2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. **Toxicology**, v. 207, n. 2, 14, p. 293-301, 2005.
- JUN, D.Y.; KIM, J.S.; PARK, H.S.; SONG, W.S. Cytotoxicity of diacetoxyscirpenol is associated with apoptosis by activation of caspase-8 and interruption of cell cycle progression by down-regulation of cdk4 and cyclin B1 in human Jurkat T cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 190-201, 2007.

- KAMP, H.G.; EISENBRAND, G.; SCHLATTER, J.; WÜRTH, K.; JANZOWSKI, C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, p. 413-425, 2005.
- KIESSLING, K.H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v.58, n. 2, p. 327-338,1986.
- KNASMÜLLER, S.; BRESGEN, N.; KASSIE, F.; MERSCH-SUNDERMANNV.; GELDERBLOM, W.; ZOHRER, E.; ECKL, P.M. Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary culture of rat hepatocytes. **Mutation Research**, v. 391, p. 39-48, 1997.
- KRABBE, E. L. **MONITORAMENTO E CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-PRIMAS E RAÇÕES**. Nutrição de Não - Ruminantes, BASF SA – Marketing Regional – Química Fina, São Bernardo do Campo – SP, 2005.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241–264, 2007.
- KOUADIO, J.H.; MOBIO, T.A.; BAUDRIMONT, I.; MOUKHA, S.; DANO, S.; CREPPY, E.E. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B₁ in human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology**, v. 213, p. 56-65, 2005.
- LARSEN, J.C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 1-22, 2004.
- MEKY, F.A.; HARDIE, L.J.; EVANS, S.W., WILD, C.P. Deoxunivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food Chemistry Toxicology**, v. 39, p. 827-836, 2001.
- MURTHY, M.R.; RADOUCO-THOMAS, S.; BHARUCHA, A.D.; LEVESQUE, G.; PANDIAN,S.; RADOUCO-THOMAS, C. Effects of trichothecenes (T-2 toxin) on protein synthesis in vitro by brain polysomes and messenger RNA. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 9, p. 251-258, 1985.
- NIDERKORN, V., BOUDRA,H., MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.
- RIZZO, A.F.; ATROSHI, F.; AHOTUPA, M.; SANKARI, S.; ELOVAARA, E. Protective effect of antioxidants against free radical-mediate lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 41, p. 81-90, 1994.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on *Fusarium* Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (expressed on 2 December 1999), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.

- SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solution. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 305-308, 1988.
- SHIMA, J.; TAKASE, S.; TAKAHASHI, Y.; IWAI, I.; FUJINOMOTO, H.; YAMAZAKI, K.; OCHI, K. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by enrichment culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3825-3830, 1997.
- SHLATTER, J. Toxicity data relevant for hazard characterization. **Toxicology Letters**, 153, 83-89, 2004.
- SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 4, 2007.
- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- TAMMER, B.; LEHMANN, I.; NIEBER, K.; ALTENBURGER, R. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. **Toxicology Letters**, v. 170, p. 124-133, 2007.
- TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, pp. 882, 2000.
- UENO, Y. Trichothecene as environmental toxicants. In: **Reviews in Environmental Toxicology 2**. Ernest Hodgson (ed). *Elsevier*, Amsterdam, N.York, Oxford, 1986.
- UHLIG, S.; GUTLEB, A.C.; THRANE, U.; FLAOYEN, A. Identification of cytotoxic principles from *Fusarium avenaceum* using bioassay-guided fractionation. **Toxicon**, v. 46, p. 150-159, 2005.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.
- WU, X.; MURPHY, P.; CUNNICK, J.; HENDRICH, S. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1846, 2007.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

A otimização da reação de derivação pela acetilação, estabelecendo as melhores condições de reação para emprego das variáveis: tempo (6 minutos), temperatura (74 °C), agente derivatizante (200 µL de TFAA) e catalisador (18 mg de bicarbonato de sódio) com resultados significativos e preditivos para área relativa detectada, permitiu a determinação de DON por cromatografia gasosa tendo como limite de detecção 1,4 µg de DON.

As espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. submetidas a processo de fermentação submersa mostraram que o tempo requerido para atingir a maior degradação ocorreu entre 96 e 240 horas, a velocidade média de degradação foi de 2,4 e 3,8 ppb/h; com uma velocidade máxima de degradação de 12,4 e 10,8 ppb/h respectivamente para cada microrganismo. Estes dados demonstraram que a espécie fúngica *Rhizopus* sp. foi a que apresentou os maiores teores de metabolização de DON e o *Aspergillus oryzae* a maior velocidade de degradação.

O *Rhizopus* sp. diminuiu em 87,4% os níveis de contaminação e *Aspergillus oryzae* em 62,4%. A maior degradação de DON foi verificada quando a fermentação foi realizada utilizando como meio água destilada estéril. As respostas aos efeitos esporos viáveis e não viáveis sugerem que *Rhizopus* sp. degradou a micotoxina principalmente por metabolização e *Aspergillus oryzae* por adsorção da micotoxina.

As espécies fúngicas demonstraram capacidade de metabolizar DON acompanhada pelo aumento da atividade das enzimas oxidativas em correspondência com a velocidade de degradação da toxina. O período entre 0 e 48 horas de fermentação foi o que melhor caracterizou esta relação entre a degradação de DON e a atividade específica da enzima peroxidase, representados pela correlação dos maiores índices registrados, velocidade de 12,4 e 10,8 ppb/h, e atividade de 198 e 800 U, respectivamente *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp.

As células eritroleucêmicas podem ser utilizadas para avaliar a citotoxicidade de DON em produtos fermentados, apresentando em IC₅₀ para níveis 0,3 µg/ml de meio celular. O microrganismo *Rhizopus* sp. causou maior degradação de DON (7,4 vezes) e gerou extratos com menor efeito de inibição celular (1,5 vezes) que o *Aspergillus oryzae*.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.K.; MIROCHA, C.J.; PAWLOSKEY, R.J.; PUSH, D.J. Effect of cleaning, milling and baking on deoxynivalenol in wheat. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 482-486, 1985.
- ABRAMSON, D., HOUSE, J.D., NYACHOTI, M. Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat. **Mycopathologia**, v. 160, p. 297-301, 2005.
- ABRUNHOSA, L., SANTOS, L., VENANCIO, A. Degradation of Ochratoxin A by Proteases and by a Crude Enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 231-242, 2006.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENANCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- ADEJUMO, T.O., HETTWER, U., KARLOVSKY, P. Occurrence of Fusarium species and trichothecenes in Nigerian maize. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 350-357, 2007.
- ANG, E. L., ZHAO, H., OBBARD, J.P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 487-496, 2005.
- ARIM, L., SARDJONO, R.H. Optimization and validation of a minicolumn method for determining aflatoxins in copra meal. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 4, p. 877-882, 1999.
- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WEASTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.
- BAARS, A.J.; VAN APELDOORN, M.; WOUTERS, M. Deoxynivalenol. In: Pieters MN, Fiolet DCM. **Derivation of concentration limits in wheat and wheat containing products. Appendix 1 Toxicology**. Milieu, Bilthoven, The Netherlands, Rijks Instituut voor Volksgezondheid, 1999.
- BADIALE-FURLONG, E., SOARES, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of the AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995.
- BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L.M.V. Variáveis bióticas e abióticas e a incidência de tricotecenos em trigo. **Revista Veter**, v. 5, p. 21-31, 1995.
- BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L.M.V.; LASCA, C.C. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995a.

- BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L.M.V.; LASCA, C.C. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995b.
- BADIALE-FURLONG, Eliana. **Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), FEA-UNICAMP, 1992.
- BALÁZS, E., SCHEPERS, J.S. The Mycotoxin Threat to Food Safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 1-2, 20 October, 2007.
- BARAJ, E. **Interferência dos tricotecenos no processo fermentativo**. Dissertação – Mestrado de Engenharia de Alimentos/FURG, 2000.
- BATA, A.; LASZATITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 223-228, 1999.
- BAXTER, E.D., SLAIDING, I.R., KELLY, B. Behavior of ochratoxin A in brewing. **Journal of the American Society of Brewing Chemist**, v. 59, n. 3, p. 98-100, 2001.
- BEETON, S.; BULL, AT. Biotransformation and detoxificação of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. **Applied Environmental Microbiological**, v. 55, p. 190-197, 1989.
- BEJAQUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbial Lett.**, v. 255, p. 203-208, 2006.
- BEJAQUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A. Conidia of Black Aspergilli as New Biological Adsorbents for Ochratoxin A in Grape Juices and Musts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 8224-8229, 2005.
- BENEDETTI, R., NAZZI, F., LOCCI, R., FIRRAO, G. Degradation of fumonisin B1 by a bacterial strain isolates from soil. **Biodegradation**, v. 17, p. 31-38, 2006.
- BENNET, G. A., SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 270-275, 1990.
- BENNETT, G.A., RICHARD, J.L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, May, p. 235-238, 1981.
- BEREK, L.; PETRI, I.B.; MESTERHÁZY, Á.; TÉREN, J.; MOLNÁR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 25-30, 2001.
- BERTHILLER, F.; SÜLYÖK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 33-37, 2007.

- BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 334, p. 211-276, 1985.
- BOEIRA, L.S., BRYCE, J.H., STEWART, G.G., FLANNIGAN, B. Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeast growth to *Fusarium* mycotoxins zearalenone, deoxinivalenol and fumonisin B1. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 69-81, 2002.
- BONY, S., OLIVIER-LOISEAU, L., CARCELEN, M., DEVAUX, A. Genotoxic potential associated with low levels of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 3, p. 457-465, April 2007.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRETZ, M., BEYER, M., CRAMER, B., KNECHT, A., HUMPF, H. Thermal Degradation of the *Fusarium* Mycotoxins Deoxynivalenol. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 6445-6451, 2006.
- BRETZ, M., KNECHT, A., GOCKLER, S., HUMPF, H. Structural elucidation and analysis of thermal degradation products of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 4, p. 309-316, 2005.
- CACCIAMANI, J.M., PERES, G.L., GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **B. CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.
- CALONI, F., SPOTTI, M., CAMP, H.O., GREMMELS, F., POMPA, G. *In Vitro* Metabolism of Fumonisin B1 by Ruminal Microflora. **Veterinary Research Communications**, v. 224, p. 379-387, 2000.
- CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical Chemists**, Chapman and Hall (ed.): London, 1983.
- CAVALIERE, C.; D'ASCENZO, G.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANÁ, A. Determination of type B trichothecene and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p.559-568, 2005.
- CENKOWSKI, S., PRONYK, C., ZMIDZINSKA, D., MUIR, W.E. Decontamination of food products with superheated steam. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 1, p. 68-75, 2007
- CETIN, Y.; BULLERMEN, L.B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755-764, 2005.

- CETIN, Y.; BULLERMEN, L.B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755-764, 2005.
- CHIA-HUNG LIN, YI-TIEN WEI, CHENG-CHUN CHOU. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food Microbiology**, v. 23, p. 628–633, 2006.
- CHISTI, Y. Bioremediation-keeping the Earth clean. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 371-372, 2005.
- CODDINGTON, K.A; SAWSON, S.P.; HASSAN, BUCK, W.B. Enterohepatic circulation of T-2 toxin metabolites in the rat. **Drug Metab. Dispos.** 17, 600-605, 1989.
- COLE, J., R., COS, R.H. The trichothecenes. **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. Academic Press, 1986.
- COMETA, M.F.; LORENZINI, P.; FORTUNA, S.; VOLPE, M.T.; MENEGUZ, A.; PALMERY, M. In vitro inhibitory effect of aflatoxin B₁ on acetylcholinesterase activity in mouse brain. **Toxicology**, v. 206, p. 125–135, 2006.
- CONZANE, R.S., STENZEL, W.R., KROH, L.W. Reducing the aflatoxin content in peanuts. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 98, n. 9, p. 321-325, 2002.
- DALL'ASTA, C., GALAVERNA, G., BIANCARDI, A., GASPARINA, M., SFORZA, S., DOSSENA, A., MARCHELLI, R. Simultaneous liquid chromatography–fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v.1047, p. 241–247, 2004.
- DANICKE, S.; VALENTA, H.; DOLL, S.; GANTER, M.; FLACHOWSKY, G. On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 14, n. 1-4, p. 141-157, 2004.
- DEMEKE, T.; CLEAR, R.M.; PATRICK, S.K.; GABA, D. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 271-284, 2005.
- DICKENS, J.W., WHITAKER, T.B. Efficacy of electronic color sorting and hand picking to remove aflatoxin contaminated kernels from contaminated lots of shelled peanuts. **Peanut Science**, v. 2, p. 45-50, 1975.
- DVORAKOVA, J., SCHMIDT, D., HUNKOVA, Z., THIEM, J., KREN, V. Enzymatic rearrangement of chitine hydrolysates with b-N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 225–232, 2001.
- EGMOND, H.P.; PAULSCH, W. Determination of mycotoxins. **Pure & Appl. Chem.**, v. 58, n. 2, p. 315-326, 1986.

- EL BANNA, A.A.; LAU, P.Y.; SCOTT, P.M. Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs II. Deoxynivalenol during making of Egyptian bread. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 484-487, 1983.
- ELLIS, W.O., SMITH, J. P., SIMPSON, B. K., OLDHAM, J. H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 403-439, 1991.
- EL-SHARKAWY, S.H., ABUL-HAJI, Y.J. Microbial transformation of Zearalenone. 2. Reduction, hydroxylation, and methylation products. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 515-519, 1988.
- ERAT, M.; SAKIROGLU, H.; KUFREVIOGLU, O.I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. **Food Chemistry**, v. 95, p. 503-508, 2006.
- FLANNIGAN, B.; DAY, S.W.; DOUGLAS, P.E.; McFARLANCE, G.B. *Fusarium* mycotoxins and the malting of barley. In: J. Lacey (Ed.), **Trichothecenes and other mycotoxins**, p. 171-184. New York, 1985.
- FONSECA, H. Aflatoxin removal from peanut meals with commercial aqueous ethyl alcohol. **Ver. Microbiol.**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 101-6, 1994.
- FONSECA, H. In : **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. Rio de Janeiro: editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 261p.
- FOULER, S. G.; TRIVEDI, A. B.; KITABATAKE, N. Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 631-637 1994.
- FREDLUND, E.; GIDLUND, A.; OLSEN, M.; BÖRJESSON, T.; SPLIID, N.H.H.; SIMONSSON, M. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. **Journal of Microbiological Methods**, in press, 2008.
- FREIMUND, S., SAUTER, M., RYS, P. Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides*. **Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 38, n. 3, p. 243-255, 2003.
- FROQUET, R. SIRIBIL, Y.; PARENT-MASSIN, D. Trichothecene toxicity on human megakaryocyte progenitors (CFU-MK). **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 20, p. 84-89, 2001.
- FUCHS, E., BINDER, E.M., HEIDLER, D., FRISKA, R. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. **Food additives and Contaminants**, v. 19, n.4, p. 379-386, 2002.
- FURLONG, E. B. ; BARAJ, E. . Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos: deoxinivalenol e toxina T2. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, Inst. Adolfo Lutz - São Paulo*, v. 62, n. 2, p. 18-26, 2003.

- GARDA, J.; BADIALE-FURLONG, E. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. **Revista Vetor**, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2003.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.
- GARDA, J.; MACEDO, R.M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G.C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.
- GARDA-BUFFON, J., BARAJ, E., BADIALE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, aceito, no prelo, 2008.
- GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para determinação de desoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008.
- GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 37-48, 1993.
- GILBERT, J.; STARTIN, J.R.; CREWS, C. Optimization of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 319, p. 376-381, 1985.
- HASSEN, W.; GOLLI, E.E.; BAUDRIMONT, I.; MOBIO, T.; LADJIMI, M.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Citotoxicity and Hsp 70 induction in Hep G2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. **Toxicology**, v. 207, n. 2, 14, p. 293-301, February 2005.
- HAZEL, C.M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecenes levels. **Toxicology Letters**, p. 51-59, 2004.
- HIGA-NISHIYAMA, A., TAKAHASHI-ANDO, N., SHIMIZU, T., KUDO, T., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. A model transgenic cereal plant with detoxification activity for the estrogenic mycotoxins zearalenone. **Transgenic Research**, v. 14, p. 713-717, 2005.
- IOOS, R.; BELHADJ, A.; MENEZ, M.; FAURE, A. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 894-902, 2005.
- IVERSON, F.; ARMOSTRONG, C.; NERA, E.; TRUELOVE, J.; FERNEI, S.; SCOTT, P.; STAPLEY, R.; HAYWARD, S.; GUNNER, S. Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v. 15, p. 283-306, 1995.
- JOHNSON, H.; ODDEN, E.; JOHNSON, B.A.; FONNUM, F. Metabolism of T-2 toxin by blood cell carboxylesterases. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 3193-3197, 1988.

- JONER, E.J., CORGIÉ, S.C., AMELLAL, N., LEYVAL, C. Nutricional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. **Siol Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 859-864, 2002.
- JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 342-362, 2007.
- JUN, D.Y.; KIM, J.S.; PARK, H.S.; SONG, W.S. Cytotoxicity of diacetoxyscirpenol is associated with apoptosis by activation of caspase-8 and interruption of cell cycle progression by down-regulation of cdk4 and cyclin B1 in human Jurkat T cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 190-201, 2007.
- KABAK, B., DOBSON, A.D.W., VAR, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593-619, 2006.
- KALOGERAKIS, N. Special issue: recent advances in bioremediation. **Environmental International**, v. 31, p. 47, 2005.
- KAMP, H.G., EISENBRAND, G., SCHLATTER, J., WURTH, K., JANZOSKI, C. Ochratoxin A—induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, p. 413-425, 2005.
- KAPLAN, C.W.; KITTS, C.L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1777-1786, 2004.
- KARLOVSKY, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. **Natural Toxins**, v. 7, p. 1-23, 1999.
- KIENTZ, C.E. e VERWEIJ, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silic capillary columns. **Journal of Chromatography**, v. 355, p. 229-240, 1986.
- KIESSLING, K.H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v.58, n. 2, p. 327-338, 1986.
- KNASMÜLLER, S.; BRESGEN, N.; KASSIE, F.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; GELDERBLUM, W.; ZOHRER, E.; ECKL, P.M. Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary culture of rat hepatocytes. **Mutation Research**, v. 391, p. 39-48, 1997.
- KOCH, P. State of the art of trichothecenes analysis. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 109-112, 2004.
- KOTAL, F.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; POUŠTKA, J.; RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 219-225, 1999.
- KOUADIO, J.H.; MOBIO, T.A.; BAUDRIMONT, I.; MOUKHA, S.; DANO, S.; CREPPY, E.E. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol,

- zearalenone or fumonisin B₁ in human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology**, v. 213, p. 56-65, 2005.
- KRABBE, E. L. **MONITORAMENTO E CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-PRIMAS E RAÇÕES**. Nutrição de Não - Ruminantes, BASF SA – Marketing Regional – Química Fina, São Bernardo do Campo – SP.
Marketing Regional – Química Fina, São Bernardo do Campo – SP.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241–264, 2007.
- LABUDA, R.; PARICH, A.; BERTHILLER, F.; TANCINOVÁ, D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 19-25, 2005.
- LANGSET, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 103-121, 1998.
- LARSEN, J.C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 1-22, 2004.
- LAUREN, D.R.; RINGROSE, M.A. Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet milling of maize using an improved HPLC analytical technique. **Food Addit. Cont.**, v. 14, n. 5, p. 435-443, 1997.
- LAUTRITE, S.; RIO, B.; PARENT-MASSIN, D. In vitro effects of Diacexyscirpenol (DAS) in human and rat granulomonocytic progenitors. **Mycopathologia**, v. 140, p. 59-64, 1997.
- LIMA, E.D.P.; PASTORE, G.M.; LIMA, C.A. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE (PFO) DE POLPA DE PINHA (*Annona squamosa* L.) MADURA. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2001.
- LINE, L.E.; BRACKET, R.E. Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal Food Protection**, v. 58, p. 91-94, 1995b.
- LINE, L.E.; BRACKET, R.E. Role of toxin concentration and second carbon source in microbial transformation of aflatoxin B₁. **Journal Food Protection**, v. 58, p. 1042-1044, 1995a.
- LINE, L.E.; BRACKET, R.E.; WILKINSON, R.E. Evidence for degradation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal Food Protection**, v. 57, p. 788-791, 1994.
- LORI, G.A.; SISTERNA, M.N.; HAIDUKOWSKI, M.; RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiol. Res.**, v. 158, p. 29-35, 2003.
- MAROCHI, M. A. **Uma metodologia para triagem, quantificação e confirmação de tricotecenos e zearalenona utilizando cromatografia de camada delgada**. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos/FEA, Universidade Estadual de Campinas, 1988.

- MATEO, J.J., LLORENS, A., MATEO, R., JIMENEZ, M. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 99–112, 2001.
- MEKY, F.A.; HARDIE, L.J.; EVANS, S.W., WILD, C.P. Deoxunivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food Chemistry Toxicology**, v. 39, p. 827-836, 2001.
- MELLO, J. P. F, PLACINTA, C. M., MACDONALD, M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.
- MELLO, J. P. F., & MACDONALD, A.M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.
- MILANEZ, T.V., VALENTE-SOARES, L.M., BAPTISTA, G.G. Avaliacao intralaboratorial e otimização de método para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia a gás-espectrometria de massas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 15-23, 2004.
- MILANEZ, T.V.; LEITAO, F.F. The effect of cooking on ochratoxin A content of beans, variety 'carioca'. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 1, p. 89-93, 1996.
- MILANEZ, T.V.; VALENTE-SOARES, L.M.; BAPTISTA, G.G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**, v. 17, n. 4, p. 293-298, 2006.
- MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.N. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol and fumonisin B₁ in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.
- MIURA, K., AMINOVA, L., MURAYAMA, Y. Fusarenon-X induced apoptosis in HL-60 cells depends on caspase activation and cytochrome c release. **Toxicology**, v. 172, n. 2, p. 103-112, 2002.
- MOBIO, A.T.; ANANE, R.; BAUDRIMONT, I.; CARRATÚ, M.R.; SHIER, T.W.; DANO, S.D.; UENO, Y.; CREPPY, E.E. Epigenetic Properties of Fumonisin B₁: Cell Cycle Arrest and DNA Base Modification in C6 Glioma Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, n. 1, p. 91-96, 2000.
- MOSS, M.O.; LONG, M.T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 387-399, 2002.
- MOSS, M.O.; THRANE, U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 23-28, 2004.
- MURPHY, P.A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.
- MURTHY, M.R.; RADOUCO-THOMAS, S.; BHARUCHA, A.D.; LEVESQUE, G.; PANDIAN, S.; RADOUCO-THOMAS, C. Effects of trichothecenes (T-2 toxin) on protein

- synthesis in vitro by brain polysomes and messenger RNA. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 9, p. 251-258, 1985.
- NAGATA, T.; SUZUKI, H.; ISHIGAMI, N.; SHINOZUKA, J.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 53, p. 309-315, 2001.
- NAGY, C.M.; FEJER, S.; BEREK, L.; MOLNAR, J.; VISKOLCZ, B. Hydrogen bondings in deoxinivalenol (DON) conformations – a density functional study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 726, p. 55-59, 2005.
- NAKAJIMA, M. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course**, 283p., 2001, Japão.
- NETO, B.B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 2° ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
- NICHOLSON, P.; CHANDLER, E. DRAEGER, R.C.; GOSMAN, N.E.; SIMPSON, D.; THOMSETT, M.; WILSON, A.H. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of Fusarium head blight of cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 691-703, 2003.
- NIDERKORN, V., BOUDRA, H., MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.
- NIESSEN, L., & DONHAUSER, S. Occurrence and Significance of Mycotoxins. K. **Scudamore Ed.** Central Science Laboratory, Slough, UK, p. 203-207, 1993.
- NUNES, I.L.; MAGANIN, G.; BERTOLIN, T.E.; BADIALE-FURLONG, E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Cienc. e tec. Aliment.**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
- OLANIRAN, A.O.; PILLAY, D.; PILLAY, B. Biostimulation And bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. **Chemosphere**, v. 63, n. 4, p. 600-608, April 2006.
- OLIVEIRA, A. Q., SOARES, L. M. V., SAWAZAKI, E. DEOXYNIVALENOL, DIACETOXYSCIRPENOL, AND T2 TOXIN IN POPCORN HYBRIDS PLANTED IN THE STATE OF SÃO PAULO AND IN POPCORN COMMERCIALIZED IN THE CITY OF CAMPINAS, SP. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 3, p. 330-333, 2001.
- OLIVEIRA, M.S., GARDA, J.; FARIA, R. ; SILVEIRA, S. T. ; DORS, G. C.; MARTINS, R. M. ; SCHWANKE, F. ; GOLDBECK, L. ; BERND, L. ; CACCIAMANI, J. ; BADIALE-FURLONG, E. Situação Micotoxicologica de Alimentos de Consumo Freqüente na Região Sul do Rio Grande Sul. In: XIX CBCTA, 07 a 10 de setembro, 2004, Recife/PE.

- OMURTAG, G.Z., BEYOGLU, D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. **Food Control**, v. 18, n.e 2, p. 163-166, february 2007.
- PAN, D., BONSIGNORE, F., RIVAS, F., PERERA, G., BETTUCCI, L. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 149–152, 2007.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PARENT-MASSIN, D. Haematotoxicity of trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 75-81, 2004.
- 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.
- PARK, D. L. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 49-60, 1993.
- PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 305-314, 2005.
- PASTER, N.; MENASHEROV, M.; LACEY, J.; FANELLI, C. Synergism between methods for inhibiting the spoilage of damp maize during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2, n. 2, p. 163-170, 1992.
- PATEY, A.; GILBERT, J. Fate of *Fusarium* mycotoxins in cereals during food processing and methods for their detoxification. In: Chelkowskj, J. (Ed.), **Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity**, Elsevier, Amsterdam, pp. 399-420, 1989.
- PITTED, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – na updated review. **Symposium International**, p. 79-492, 1998.
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. A REVIEW OF WORLDWIDE contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p. 21-37, 1999.
- PRONYK,C.; CENKOWSKI, S.; ABRANSOM, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, n. 10, p. 789-796, 2006.
- RADOVÁ, Z.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. **Journal of Chromatography**, v. 829, p. 259-267, 1998.
- RAMIREZ, M.L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium*

- graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 291-296, 2006.
- REINEHR, C. O.; BADIALE-FURLONG, E. FURLONG, E. B.. Profile of the alcohols produced in fermentations with malt contaminated with tricothecenes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 12-18, 2003.
- RICHARD, J.J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.
- RIO, B.; LAUTRAITE, S.; PARENT-MASSIN, D. In vitro toxicity of tricothecenes on human erythroblastic progenitors. **Human. Exp. Toxicol.**, v. 16, p. 673-679, 1997.
- RIZZO, A.F.; ATROSHI, F.; AHOTUPA, M.; SANKARI, S.; ELOVAARA, E. Protective effect of antioxidants against free radical-mediate lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 41, p. 81-90, 1994.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos:uma estratégia seqüencial de planejamentos**, 1° ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- ROTTER, B.A.; PRELUSKY, D.B.; PESTKA, J.J. Toxicology of deoxinivalenol (vomitoxin). **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 48, p. 1-34, 1996.
- SALANITRO, J.P.; BORN, P.B.; HUESEMANN, M.H.; MOORE, K.O.; RHODES, L.A.; JACKSON, L.M.R.; VIPOND, T.E.; WESTERN, M.M.; WISNIEWSKI, H.L. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, p. 1769-1776, 1997.
- SASSAHARA, M.; PONTES NETTO, D.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 43, p. 981, 2005.
- SAWINKI-ACSADI, J. Utilization of corn containing T-2 toxin by microbiological treatment'. **Acta Alimentaria**, v. 12, p. 249-263, 1983.
- SCHNEIDER, E., CURTUI, V., SEIDLER, C., DIETRICH, R., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E. Rapid methods for deoxynivalenol and other tricothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 113-121, 2004.
- SCHOLLEMBERGER, M.; LAUBER, U.; TERRY-JARA, H.; SUCHY, S.; DROCHNER, W.; MÜLLER, H.M. Determination of eight tricothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography**, v. 815, p. 123-132, 1998.
- SCHOLLEMBERGER, B- M., MULLER, H.M., RUFLE, M., SUCHY, S., PLANCK, DROCHNER, W. Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 317- 32, 2005 b.

- SCHOLLENBERGER, M., JARA, H.T., SUCHY, S., DROCHNER, W., MULLER, H.M. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 85– 89, 2002.
- SCHOLLENBERGER, M.; DROCHNER, W.; RÜFLE, M.; SUCHY, S.; TERRY-JARA, H.; MÜLLER, H.M. Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 69–78, 2005 a.
- SCHOTHORST, R.C., JEKEL, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionization detection. **Food Chemistry**, v. 73, p. 111-117, 2001.
- SCHRODTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (2006), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (2001), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion on Fusarium Toxins-Part 1: Deoxinivalenol (DON) (expressed on 2 December 1999), http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html.
- SCOOT, P.M. Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. **Mycotoxin Research**, v. 8, p. 58-66, 1992.
- SCOTT, P. M. Assesment of Quantitative methods for determination of trichothecenes in grains products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n.4, p. 876-883, 1982.
- SCOTT, P. M. Effects of Food Processing on Mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 6, p.489-499, 1984.
- SCOTT, P. M. Gas chromatography of mycotoxins. **Chromatography of Mycotoxins: techniques and Applications**. Ed. V. Betina, Elsevier, Amsterdam, 1991.
- SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 4, 875-882, 1996.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., WEBER, D. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography - mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n.4, p. 381-389, 1993.
- SCOTT, P. M., WEBER, D., KANHERE, S. R. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 765, n. 2, p.255-263, 1997.
- SCOTT, P.M. Trichothecenes in grains. **Cereal Foods Worl**, v. 5, n.7, p. 661-666, 1990.

- SCOTT, P.M; KANHERE, S.R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 4, p. 591-598, 1995.
- SCOTT, P.M; LAWRENCE, G. Determination of Aflatoxins in Beer. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 6, p. 1229-1234, 1997.
- SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solution. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 305-308, 1988.
- SHIMA, J.; TAKASE, S.; TAKAHASHI, Y.; IWAI, I.; FUJINOMOTO, H.; YAMAZAKI, K.; OCHI, K. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by enrichment culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3825-3830, 1997.
- SHLATTER, J. Toxicity data relevant for hazard characterization. **Toxicology Letters**, 153, 83-89, 2004.
- SHOKRI, F. HEIDARI, M., GHARAGOZLOO, S., GHAZI-KHANSARI, M. In vitro inhibitory effects of antioxidants on cytotoxicity of T-2 toxin. **Toxicology**, 146, 171-176, 2000.
- SIETZ, L.M.; YAMAZAKI, W. T.; CLEMENTS, R. L.; MOHR, H.; ANDREWS, L. Distribution of deoxynivalenol in soft wheat mill streams. **Cereal Chem.**, v. 62, p. 467-469, 1986.
- SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterizacao de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 4, 2007.
- SMITH, J.E.; HARRAN, G. Microbial degradation of mycotoxins **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, n. 1-3, p. 205-211, 1993.
- SNYDER, A. P. Qualitative, Quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **Journal of Food Protection**. v. 49, n.7, 544-569, july, 1986.
- SOARES, L.M.V; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
- SOKOLOVIC, M., SIMPRAGA, B. Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. **Food Control**, v. 17, p. 733-740, 2005.
- SOUZA, D.H.; BRACKETT, R.E. The role of trace metal ions in aflatoxin B₁ degradation by *Flavobacterium Aurantiacum*. **Journal Food Protection**, v. 61, p. 1666-1669, 1998.
- SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.
- Summary and Conclusion. P.1-33. **Joint FAO/WHO Expert Committee na Food Additives**, Fiftysixth Meeting, Geneva, p. 6-15, February, 2001.
- SUNTORNUSUK, W., POCHANAVANICH, P., SUNTORNUSUK, L. Fungal chitosan production on food processing by-products. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 727-729, 2002.
- SVEDRUZIC, D.; JONSSON, S.; TOYOTA, C.G.; REINHARDT, L.A.; RICAGNO, S., LINDQVIST, Y.; RICHARDS, N.G.J. The enzyme of oxalate metabolism: unexpected

- structures and mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, p. 176-192, 2005.
- SWANSON, S. P., & CORLEY, R. A. The distribution, metabolism, and excretion of trichothecenes mycotoxins. In: *BEASLEY, V., R. Trichothecenes Mycotoxicoses. Pathophysiologic Effects*, v. 1, Florida, 1989.
- SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, 141-158, 1998.
- SYDENHAM, E., THIEL, P.G. Physicochemical data from some selected *Fusarium* toxins. **Journal A.O.A.C. International**, v. 79, n. 6, p. 1365-1379, 1996.
- TAKAHASHI-ANDO, N., KIMURA, M., KAKEYA, H., OSADA, H., YAMAGUCHI, I. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. **Biochem. J.**, 365, 1-6, 2002.
- TAKAHASHI-ANDO, N., TOKAI, T., HAMAMOTO, H., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeast through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. **Applied Microbial Biotechnol**, 67, 838-844, 2005.
- TAMMER, B.; LEHMANN, I.; NIEBER, K.; ALTENBURGER, R. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. **Toxicology Letters**, v.170, p. 124-133, 2007.
- TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 59-66, 2007.
- TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 882, 2000
- TANAKA, T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course**, p.283, 2001, Japão.
- THUVANDER, A.; WIKMAN, C.; GADHASSON, I. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. **Food and Chemical toxicology**, v. 37, p. 639-648, 1999.
- TORRES, M.R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked-immunosorbent-aasay method. **J. Food Microbiology**, v. 39, p. 139-143, 1998.
- TRITSCHER, A.M., PAGE, S.W. The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 155-163, 2004.
- TUTELYAN, V.A. Deoxynivalenol in cereals in Russia. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 173-179, 2004.

- UENO, Y. Trichothecene as environmental toxicants. In: **Reviews in Environmental Toxicology 2**. Ernest Hodgson (ed). Elsevier, Amsterdam, N.York, Oxford, 1986.
- UENO, Y. Trichothecene mycotoxins. **Mycologia, chemistry and toxicology**. In: H. H. Draper *Ed.*, v. 3, p. 301-353, New York, 1980.
- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed). Developments in Food Science. Elsevier, Tokyo, v. 4, 1983.
- UHLIG, S.; GUTLEB, A.C.; THRANE, U.; FLAOYEN, A. Identification of cytotoxic principles from *Fusarium avenaceum* using bioassay-guided fractionation. **Toxicon**, v. 46, p. 150-159, 2005.
- UZARSKI, R.L., ISLAM, Z., PESTKA, J.J. Potentiation of trichothecene-induced leukocyte cytotoxicity and apoptosis by TNF- α and Fas activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 146, n. 2, p. 105-119, 2003.
- VAN LIMBERGEN; H. TOP, E.M.; VERSTRAETE, W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 16-23, 1998.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.
- VENOSA, A.D.; SUIDAN, M.T.; WRENN, B.A.; STROHMEIER, K.L.; HAINES, J.R.; EBERHART RT, B.L.; KING, D.; HOLDER, E. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. **Environmental Science Technol.**, v. 30, p. 1764-1775, 1996.
- WAGACHA, J.M., MUTHOMI, J.W. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 877-885, 2007.
- WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. **Food Control**, v. 8, n. 5/6, p. 329-339, 1997.
- WHITEHEAD, M.P., FLANNIGAN, B. The *Fusarium* mycotoxin deoxinivalenol and yeast growth and fermentation. **J. Inst. Brew.**, v. 95, p. 411-413, November-December, 1989.
- WOLF-HALL, C.E., HANNA, M.A., BULLERMAN, L.B. Stability of deoxinivalenol in heat treated foods. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 962-964, 1999.
- WOLLENHAUPT, K., DÄNICKE, S., BRÜSSOW, K.-P., TIEMANN, U. In vitro and in vivo effects of deoxynivalenol (DNV) on regulators of cap dependent translation control in porcine endometrium. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 60-73, 2006.

- WU, X.; MURPHY, P.; CUNNICK, J.; HENDRICH, S. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 10, p. 1846-1855, 2007.
- YANGEN, B.; BIALER, M. Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes. *Drug Metab. Rev.*, v. 25, p. 281-323, 1993.
- YOSHISAWA, T. **Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil**. Training Course, p. 283, 2001, Japão.
- YOUNG, J.C.; ZHOU, T.; YU, H.; ZHU, H.; GONG, J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 136-143, 2007.
- YU, J.; WHITELAW, C.A.; NIERMAN, W.C.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative role in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, p. 333-340, 2004.
- ZHOU, H.R.; HARKEMA, J.R.; YAN, D.; PESTKA, J.J. Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxinivalenol). *J. Toxicol. Environ. Health A*, v. 57, p. 115-136, 1999.

ANEXO 1