



FURG

Tese de Doutorado

**Degradação de Tricotecenos A e B por ação enzimática
em solução modelo**

Ana Carla Penteado Feltrin

Prof. Ms em Química Tecnológica e Ambiental

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

Degradação de Tricotecenos A e B por ação enzimática em solução modelo

por

Ana Carla Penteado Feltrin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos

DEDICATÓRIA

À minha família e ao Tiago, por serem meu suporte e esteio na conquista de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** por me guiar e colocar em meu caminho anjos de luz que possibilitaram minha evolução e a realização de meus sonhos.

Aos **meus pais**, obrigada por serem meus exemplos de amor e dedicação, por estarem sempre ao meu lado ajudando, apoiando e incentivando. Podem ter certeza que minhas conquistas são pra vocês e por vocês. Eu amo muito vocês!!

À **minha família**, irmão, tios(as), primos(as), afilhados(as) e avô, obrigada por todo apoio e torcida de sempre. Amo todos de coração!!

Ao meu noivo e futuro marido **Tiago**, obrigada por ser meu parceiro e companheiro em todas horas, obrigada pela pequena família que formamos com a Polenta. Obrigada por me incentivar e por ter paciência em me esperar durante esses 4 anos. Te amo guri!!

À **prof Jaqueline**, Jaque te agradeço não só pela tua orientação, total apoio, disponibilidade, saber que compartilhou, pelas opiniões e sugestões, colaboração ao solucionar dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização do trabalho, mas também te agradeço por acreditar em mim muito mais do que eu mesmo acredito.

À **prof Eliana** pela total disponibilidade em ensinar, sua transmissão de experiências é fundamental, não só para a minha pessoa, mas para todos no LAMCA, isso fica claro nos nossos pequenos sucessos.

Àquelas que têm o coração que não cabe no peito...

Anelise agradeço pela tua risada e alegria de viver que transformaram meus dias, com certeza tu foi uma pessoa que fez uma baita diferença durante esses 7 anos de LAMCA, te agradeço muitoooooooo por estar sempre disponível quando precisei seja para trabalhos acadêmicos, seja para algo de caráter pessoal...

Gabi obrigada pela tua amizade, pela luz que tu carrega e pelos teus conselhos, quero que tu saibas que és um exemplo pra mim...

Sabrina minha amiga/irmã de coração, nunca deixe tua essência e inocência de lado, tua alegria e teu comprometimento com tudo e todos, sem dúvida são um exemplo a todos que te cercam. Te amo negrinha...

Karen, obrigada por me ensinar o real significado da palavra convivência, que cada um tem seu tempo e suas vivências. Te agradeço por estar sempre disponível para festa, para aventuras e para o trabalho, obrigada pela parceria e agradável companhia no apê 202.

Karencita mi amor, que Deus te abençoe sempreee!!...

Amiga **Elisa** obrigada pelo teu carinho e paciência, tu és uma pessoa iluminada, que a Ana Laura te traga muitas alegrias. Meninas, muito obrigada por tudo, espero que nossa amizade continue para sempre.

Às minha IC's "fodásticas", **Cíntia, Rosana e Francine**, meninas muito obrigada por todo suporte, apoio, por aceitarem me acompanhar sábados, domingos e feriados e se dedicaram a esse trabalho tanto quanto eu. Essa conquista também é de vocês.

Aos meninos do LAMCA, **Rafael, Keven, Maicon** (e sua perfeição) e **Wesclen** muito obrigada pela amizade de vocês, pelos churrascos, cervejadas, jogos de sinuca e tantos momentos de descontração e amizade.

Aos amigos que fiz no tempo de LAMCA e FURG: **Naralice, Milena, Bibiana, Priscila, Daiane, Raquel, Adriana, Larissa e Antônio**, obrigada pela convivência e pela amizade que dura até hoje... Saudades de vocês!! Às amigas **Kelly e Marina** agradeço muito pelas agradáveis conversas, pelas risadas e pelas vivências transmitidas. Agradeço aos demais colegas de LAMCA: **Maris, Manuel, Carmen, Marcy, Vê, Taiana, Priscila e Carol** obrigada pela convivência, compartilhamento de experiências e pela paciência e respeito com o qual me trataram sempre.

À **Rosane**, secretária do PPGQTA por todos os esclarecimentos e atenção dispensadas a mim quando necessário.

Aos **professores** do PPGQTA, pelos ensinamentos durante minha formação.

À **banca examinadora**, pela disponibilidade de todos em participar da defesa da tese, meus agradecimentos pelas valiosas contribuições.

Institut für Lebensmittelchemie, Prof. Humpf, Annika and Yannicki, I would like to say thank you for all support and attention during the time in Münster.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior** pelo auxílio financeiro, e aos demais órgãos de fomento pelos recursos fornecidos para o desenvolvimento do projeto.

À **FURG** por disponibilizar a infraestrutura e os meios técnicos que permitiram a realização deste trabalho.

*No que diz respeito ao empenho, ao compromisso,
ao esforço, à dedicação, não existe meio termo.
Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.
(Ayrton Senna)*

RESUMO

Título: Degradação de Tricotecenos A e B por ação enzimática em solução modelo

Autor: Ana Carla Penteado Feltrin

Orientadora: Prof. Dr. Jaqueline Garda Buffon

Tricotecenos são compostos de interesse mundial por serem contaminantes de grãos e alimentos. Estudos vêm enfatizando a ação de enzimas na degradação dessas micotoxinas, detoxificando as matrizes sem alterar as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos. O objetivo desse estudo foi avaliar o mecanismo de degradação de tricotecenos A e B por ação de enzimas hidrolíticas e oxidativas. As enzimas avaliadas foram: lacase, peroxidase, lipase e esterase. Os tricotecenos avaliados foram: Toxina T-2, Deoxinivalenol (DON), Nivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol (3-ADON) e 15-Acetildeoxinivalenol (15-ADON). Um método cromatográfico foi adaptado e validado para determinação dos tricotecenos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector ultravioleta (UV). A extração dos tricotecenos da solução modelo dos ensaios de biodegradação ocorreu por extração líquido-líquido assistida por *salting-out*. A determinação da concentração residual de tricotecenos visando estimar a degradação, foi realizada em soluções modelo submetidas a ação de enzimas em diferentes tempos de incubação, concentração enzimática e cinéticas bioquímica e de degradação. Foi também investigada a formação de produtos de degradação, pelas técnicas de HPLC acoplado a espectrometria de massas em série (MS/MS) e HPLC de alta resolução (Orbitrap). As soluções modelo para as enzimas hidrolíticas e oxidativas padronizada, foram: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7 e pH 5, respectivamente. Lacase degradou 3-ADON (87%) e toxina T-2 (96%) utilizando 0,15 U mL⁻¹ de enzima e 2 µg mL⁻¹ dos tricotecenos. A interação de lacase com DON mostrou possível ação de adsorção enzimática com degradação de 72,4% com 2 h de incubação. Ficou demonstrada a necessidade do emprego da técnica de LC-MS/MS para confirmação da degradação em sistema lacase/ABTS. Ação de adsorção enzimática também pode explicar DON (4,1 µg mL⁻¹) em interação com peroxidase (0,00001 U mL⁻¹) mostrando degradação de 92,5% em 8 h de incubação. 15-ADON (2,7 µg mL⁻¹) apresentou degradação de 97% em interação com peroxidase (0,62 U mL⁻¹) com 8 h de incubação. A degradação de 3-ADON (3,8 µg mL⁻¹) e toxina T-2 (7,7 µg mL⁻¹) em interação com peroxidase (0,62 U mL⁻¹), não se ajustou a nenhum modelo cinético, apresentando diferenças nos percentuais de degradação em relação aos encontrados em ensaios anteriores. Esses resultados também enfatizam a necessidade do emprego de LC-MS/MS na confirmação da degradação. As enzimas hidrolíticas possuem ação degradativa sobre os tricotecenos, porém não apresentaram ajuste aos modelos cinéticos. HPLC-Orbitrap confirmou a ação degradativa da enzima lacase sobre 3-ADON e toxina T-2, pela formação de dímeros. A degradação enzimática dos tricotecenos poderá possibilitar a aplicação das enzimas em processos industriais, visando à descontaminação de alimentos contaminados.

Palavras-chave: Tricotecenos, enzimas, degradação, solução modelo.

ABSTRACT

Title: Degradation of Trichothecenes A and B by enzymatic action in model solution

Author: Ana Carla Penteado Feltrin

Advisor: Prof. Dr. Jaqueline Garda Buffon

Trichothecenes are compounds of worldwide interest because are contaminants of grains and foods. Studies have emphasized enzymatic action in these mycotoxins degradation, detoxifying the matrices without altering the functional and nutritional properties of the foods. The objective of this study was evaluated the mechanism of trichothecenes A and B degradation by enzymes hydrolytic and oxidative action. Enzymes evaluated were: laccase, peroxidase, lipase and esterase. Trichothecenes evaluated were Toxin T-2, Deoxynivalenol (DON), Nivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON). A chromatographic method was suitable and validated for trichothecenes determination by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to ultraviolet (UV) detector. Trichothecenes extraction from model solution of biodegradation assays occurred by salting-out assisted liquid-liquid extraction. Determination of trichothecenes residual concentration to estimate the degradation was carried out in model solutions submitted to enzymes action in different incubation times, enzymatic concentration and biochemical and degradation kinetics. Degradation products formation was also investigated by HPLC coupled with mass spectrometry (MS/MS) and high resolution HPLC (Orbitrap). Model solutions for the hydrolytic and oxidative enzymes were: phosphate buffer 0.05 mol L^{-1} pH 7 and pH 5, respectively. Lacase degraded 3-ADON (87%) and T-2 toxin (96%) using 0.15 U mL^{-1} of enzyme and $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of trichothecenes. Laccase interaction with DON showed a possible enzymatic action of adsorption, with 72.4% of degradation during incubation for 2 h. It demonstrated the necessity of LC-MS/MS technique employing to confirming the degradation in laccase/ABTS system. Enzymatic adsorption action can also explain DON ($4.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) in interaction with peroxidase ($0.00001 \text{ U mL}^{-1}$) showing 92.5% of degradation during 8 h of incubation. 3-ADON ($3.8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) and T-2 toxin ($7.7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) degradation, in interaction with peroxidase (0.62 U mL^{-1}) did not adjustment any kinetic model, presenting differences in the percentages of degradation in relation to those found in previous tests. These results also emphasize the necessity LC-MS/MS use in confirmation of degradation. Hydrolytic enzymes have degradative action on the trichothecenes, but did not present an adjustment to the kinetic models. HPLC-Orbitrap confirmed the degradative action of laccase enzyme on 3-ADON and T-2 toxin, by the formation of dimers. Enzymatic degradation of trichothecenes may allow the enzymes application in industrial processes, aiming at the decontamination of contaminated food and food raw materials.

Keywords: Trichothecenes, enzymes, degradation, model solution.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Transformação de 3-ADON em metabólitos menos tóxicos.....	39
Esquema 2. Transformação de NIV em deepoxiNIV.....	39
Esquema 3. Transformação de tricotecenos tipo A em metabólitos menos tóxicos.....	40
Esquema 4. Mecanismo de fragmentação proposto para os íons aduto de sódio [M+Na] ⁺ de 3-ADON. (adaptado de Liu et al. (2012)).....	122
Esquema 5. Mecanismo de fragmentação proposto para os íons adutos de sódio [M+Na] ⁺ de toxina T-2. (adaptado de Liu et al. (2012)).....	122

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas dos principais tricotecenos toxina T-2 (a) e tipo B NIV (b), (DON) (c), 3-ADON (d) e 15-ADON (e).. 28
- Figura 2.** Efeito da carboxilesterase em 3-ADON e 15-ADON (adaptado de Schmeitzl et al. (2015))..... 38
- Figura 3.** Ciclo catalítico da enzima peroxidase obtida de rábano mostrando as mudanças no grupo prostético heme (adaptado de Torres, Bustos-Jaimes e Borgne, 2003)... 46
- Figura 4.** Ciclo catalítico de lacases mostrando o mecanismo de redução e oxidação dos sítios de cobre da enzima. (adaptado de Torres, Bustos-Jaimes e Borgne, 2003) 48
- Figura 5.** Mecanismo de reação de lipases. (adaptado de Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999)..... 50
- Figura 6.** Representação esquemática do desenho experimental do estudo..... 60
- Figura 7.** Eluição cromatográfica em HPLC-UV dos padrões de tricotecenos. 82
- Figura 8.** Cromatogramas representativos da mistura de tricotecenos A e B, em HPLC-UV (a) e espectro UV em HPLC-DAD (b)..... 88
- Figura 9.** Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico linear obtido a partir do desenvolvimento matemático da equação de Hill (b), 3-ADON em interação com a enzima lacase.. 102
- Figura 10.** Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico linear obtido a partir do desenvolvimento matemático da equação de Hill (b), DON em interação com a enzima peroxidase..... 102
- Figura 11.** Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), 3-ADON em interação com peroxidase..... 106

Figura 12. Velocidade de degradação <i>versus</i> a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), toxina T-2 em interação com peroxidase.....	106
Figura 13. Velocidade de degradação <i>versus</i> a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), 3-ADON em interação com lipase.....	107
Figura 14. Velocidade de degradação <i>versus</i> a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), 15-ADON em interação com esterase.	107
Figura 15. Percentual de degradação de 3-ADON em função do tempo por ação da enzima lacase, realizada em HPLC-UV (a) e em LC-MS/MS (b).	111
Figura 16. Cromatogramas em HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap representando a comparação entre os diferentes tempos de incubação do sistema lacase/ABTS + 3-ADON com o padrão de 3-ADON. Em azul 45 min de incubação, em vermelho 5 h, em verde 8 h, em roxo 10 h e em preto o padrão de 3-ADON.	112
Figura 17. Comparação entre os sistemas reacionais de degradação de 3-ADON na análise de HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap, com detecção em PDA.....	112
Figura 18. Cinética de degradação de 3-ADON (a) e toxina T-2 (c), percentual de degradação de toxina T-2 em função do tempo (b) por ação da enzima lacase..	113
Figura 19. Percentual de degradação de DON em função do tempo por ação da enzima lacase... ..	115
Figura 20. Percentual de degradação de DON em função do tempo por ação da enzima peroxidase... ..	116
Figura 21. Curva da concentração de 15-ADON em função do tempo de degradação (a) e cinética de degradação (b) por ação da enzima peroxidase.....	117

Figura 22. Percentual de degradação de toxina T-2 em função do tempo por ação da enzima peroxidase.....	117
Figura 23. Percentual de degradação de 3-ADON em função do tempo por ação da enzima peroxidase.....	118
Figura 24. Espectros de massas obtidos em Orbitrap em modo total scan para 3-ADON (a) e para toxina T-2 (b).....	122
Figura 25. Proposta de estruturas químicas dos dímeros formados durante ação da enzima lacase sobre toxina T-2 (a) e 3-ADON (b).....	123 e 124
Figura 26. Fluxograma ilustrativo da produção de queijo.....	125
Figura 27. Fluxograma ilustrativo do processo cervejeiro.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites Máximos Tolerados (LMT) da presença de DON em alimentos..	32
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos tricotecenos mais frequentemente detectados.....	34
Tabela 3. Métodos químicos e físicos de degradação de tricotecenos.....	37
Tabela 4. Emprego de micro-organismos na degradação de tricotecenos.....	41
Tabela 5. Emprego de enzimas, em diferentes sistemas reacionais, na degradação de micotoxinas.....	42
Tabela 6. Absortividades molares e comprimentos de onda de máxima absorbância de cada tricoteceno em estudo (KRSKA et al., 2007)..	56
Tabela 7. Demonstração dos sistemas reacionais testados quanto ação sinérgica enzimática..	62
Tabela 8. Ensaio preliminares de incubação das enzimas lacase, peroxidase e esterase com os tricotecenos.....	68
Tabela 9. Condições empregadas nos ensaios de degradação de DON ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando diferentes atividades enzimáticas, após 2 h de incubação.....	68
Tabela 10. Efeito do aumento do tempo de incubação, atividades enzimática e concentração de tricotecenos na degradação das micotoxinas..	69
Tabela 11. Componentes gráficos das linearizações da equação de Michaelis-Menten.....	71
Tabela 12. Condições reacionais empregadas em avaliação de cinética de degradação.....	72
Tabela 13. Parâmetros otimizados para confirmação e quantificação dos tricotecenos em LC-MS/MS.....	75

Tabela 14. Condições otimizadas para avaliação dos compostos em HPLC-(PDA)-LTQ-Orbitrap.....	76
Tabela 15. Avaliação do pH do sistema reacional em tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹	79
Tabela 16. Condições cromatográficas empregadas para determinação de tricotecenos A e B.....	82
Tabela 17. Parâmetros avaliados para separação dos analitos.....	83
Tabela 18. Valores de diferentes parâmetros avaliados para validação de método analítico.....	83
Tabela 19. Comparação entre os métodos de extração (SALLE e LLE) em tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹	84
Tabela 20. Percentual de recuperação pelo método SALLE, de tricotecenos em diferentes níveis de contaminação em tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ , em pH 5 e 7.	86
Tabela 21. Degradação dos tricotecenos, em ensaios preliminares, por ação enzimática em solução modelo.....	90
Tabela 22. Ação da enzima lipase (0,001 U mL ⁻¹) sobre os tricotecenos (1 µg mL ⁻¹) com tempo de incubação de 120 min.	92
Tabela 23. Efeito da diminuição da atividade enzimática na degradação de DON (2 µg mL ⁻¹) com tempo de incubação de 2 h.	93
Tabela 24. Efeito da diminuição da atividade enzimática em 3-ADON, 15-ADON e toxina T-2.	94
Tabela 25. Percentual e velocidade de degradação dos tricotecenos em sistema modelo após 2 h de incubação com as enzimas.	95
Tabela 26. Efeito da concentração de ABTS como modulador redox de ação enzimática da enzima lacase na degradação de 3-ADON... ..	98

Tabela 27. Efeito da concentração de H_2O_2 na ação de peroxidase durante degradação dos tricotecenos A e B.....	100
Tabela 28. Equações das linearizações dos métodos, determinadas experimentalmente a partir das enzimas em estudo.....	101
Tabela 29. Parâmetros h , $K_{0,5}$ e $V_{máx}$, obtidos pelos gráficos de linearização de Hill..	104
Tabela 30. Parâmetros K_M e $V_{máx}$, obtidos pelos gráficos de linearização de Lineweaver-Burk.....	105
Tabela 31. Avaliação das interações entre lipase e esterase com tricotecenos, que não apresentaram adequação a modelos cinéticos.	109
Tabela 32. Degradação de DON, 3-ADON e 15-ADON por ação das enzimas hidrolíticas.	119
Tabela 33. Parâmetros otimizados nesses estudo para aplicação das enzimas oxidativas e enzimas hidrolíticas na degradação de tricotecenos A e B. ...	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. ΔG° , Variação da energia livre de Gibbs
2. [s], concentração de substrato
3. α , Fator de separação
4. ϵ , Absortividade molar
5. 3-ADON, 3-Acetildeoxinivalenol
6. 15-ADON, 15-Acetildeoxinivalenol
7. *p*-NPB, para-nitrofenilbutirato, do inglês *p-nitrophenylbutyrate*
8. Abs, Absorvância
9. AFB₁, aflatoxina B₁
10. API, Ionização a pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
11. Asp, Aspartato
12. ATA, Aleukia tóxico alimentar
13. C, Concentração final do analito
14. C₀, Concentração inicial do analito
15. C18, Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
16. CE, energia de colisão, do inglês *collision energy*
17. Cys, Cisteína
18. EC, Comissão de enzimas, do inglês *Enzyme Commission*
19. D, Valor da redução decimal
20. DAD, Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*
21. DMSO, dimetilsulfóxido
22. DNA, Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
23. DOM-1, Molécula de DON deepoxidado
24. DON, Deoxinivalenol
25. DP, potencial de dessolvatação, do inglês *desolvation potential*
26. E:S, complexo enzima-substrato
27. E⁰, potencial redox padrão
28. EFSA, Autoridade Europeia para segurança de alimentos, do inglês *European Food Safety Authority*
29. EH, modelo de Eadie-Hofstee

30. ELISA, Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
31. E.U.A., Estados Unidos da América
32. FDA, Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, do inglês *Food and Drug Administration*
33. f_{dil} , Fator de diluição
34. FID, Detector com Ionização de Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*
35. FURG, Universidade Federal do Rio Grande
36. FTIR-ATR, Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier acoplada a sistema de reflectância total atenuada, do inglês *Fourier Transform Infrared spectroscopy tandem with Attenuated Total Reflection*
37. GC, Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
38. h , coeficiente de Hill
39. h , Constante de Planck
40. HCA, ácido hidroxicinâmico
41. HFBA, Ácido heptafluorobutírico, do inglês *Heptafluorobutyric acid*
42. His, Histidina
43. HPLC, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*
44. HR, Alta resolução, do inglês *High Resolution*
45. HRMS, Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*
46. HW, modelo de Hannes-Woolf
47. IARC, Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*
48. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
49. JEFCA, Comitê Misto de Peritos FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
50. k , Fator de retenção
51. K_B , Constante de Boltzmann
52. k , Constante cinética de degradação
53. K_M , Constante de Michaelis-Menten
54. $K_{0,5}$, Constante de afinidade do substrato no modelo alostérico
55. LAMCA, Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos

- 56.LB, modelo de Lineweaver-Burk
- 57.LC- MS/MS, Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*.
- 58.LLE, Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- 59.LMT, Limites Máximos Toleráveis
- 60.LOD, Limite de Detecção
- 61.LOQ, Limite de Quantificação
- 62.LTQ, quadrupolo acoplado a sistema de trapeamento de íons linear
- 63.MM, Massa molecular
- 64.MS, Espectrômetro de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- 65.MSPD, Dispersão em matriz de fase sólida, do inglês *matrix solid phase dispersion*
- 66.n, número de replicatas
- 67.n, ordem de reação
- 68.NAD, Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*
- 69.NADP, Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
- 70.HFHPC, Planejamento Nacional da Saúde e da Família da República Popular da China, do inglês *National Healthy and Family Planning of People's Republic of China*
- 71.NIV, Nivalenol
- 72.P, produto de reação enzimática
- 73.P.A., Grau pró-análise
- 74.PE, Ponto de Ebulição
- 75.PF, Ponto de Fusão
- 76.PFPA, Ácido pentafluoropropiônico, do inglês *pentafluoropropionic acid*
- 77.QuEChERS, Anagrama para Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
- 78.r, coeficiente de correlação
- 79.R², Coeficiente de determinação
- 80.R, Constante dos gases

81. RMN ^1H , Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton
82. RP, fase reversa, do inglês *reverse phase*
83. rpm, rotações por minuto
84. RNA, Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*
85. RSD, Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
86. s, Estimativa do desvio padrão
87. SALLE, Extração Líquido-Líquido assistida por *salting-out*, do inglês *Salting-out Liquid-Liquid Extraction*
88. Ser, Serina
89. SPE, Extração em fase sólida, do inglês *Solid-Phase extraction*
90. t, tempo
91. $t'_{1/2}$, Tempo de meia-vida
92. T, Temperatura absoluta
93. TFAA, Ácido trifluoroacético, do inglês *Trifluoroacetic acid*
94. THF, Tetrahidrofurano
95. t_M , Tempo morto
96. TOF, Analisador por tempo de voo, do inglês *Time of Flight*
97. t_R , Tempo de retenção
98. U, Unidade enzimática
99. UV, Ultravioleta
100. v_0 , velocidade inicial
101. $V_{\text{máx}}$, Velocidade máxima de reação enzimática
102. $V_{(r \times n)}$, Volume de reação
103. V, Volume de enzima no sistema
104. X_m , Média de medidas em réplica

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ESQUEMAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	16
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 MICOTOXINAS	26
3.2 TRICOTECENOS	27
3.2.1 Ocorrência de tricotecenos	30
3.2.2 Legislação	32
3.2.3 Métodos para determinação de tricotecenos	33
3.2.4 Degradação de tricotecenos	36
3.3 ENZIMAS	42
3.3.1 Peroxidase	45
3.3.2 Lacase	47
3.3.3 Lipase	49
3.3.4 Esterase	52
3.4 USO DAS ENZIMAS EM PROCESSOS ALIMENTÍCIOS	53
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 MATERIAL	56

4.1.1	Preparo de enzimas e padrão dos tricotecenos A e B.....	56
4.1.2	Instrumentação	57
4.1.3	Reagentes e solventes	58
4.2	MÉTODOS.....	60
4.2.1	Medida de atividade enzimática.....	60
4.2.1.1	Condições de ensaio	61
4.2.1.2	Avaliação das atividades enzimáticas	61
4.2.1.3	Interações enzimáticas	62
4.2.2	Adequação da determinação de Tricotecenos A e B.....	62
4.2.3	Preparo de amostra	63
4.2.4	Validação de método analítico.....	64
4.2.4.1	Linearidade e curva analítica	65
4.2.4.2	Limite de detecção e limite de quantificação	65
4.2.4.3	Precisão.....	65
4.2.4.4	Seletividade	66
4.2.5	Degradação enzimática dos tricotecenos.....	66
4.2.5.1	Efeito do mediador redox enzimático ABTS na ação da enzima lacase	69
4.2.5.2	Efeito do cofator H ₂ O ₂ na ação da enzima peroxidase	70
4.2.6	Parâmetros de controle enzimático	70
4.2.7	Cinética de degradação de tricotecenos	71
4.2.8	Produtos de degradação enzimática dos tricotecenos	74
4.2.8.1	Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas – LC-MS/MS	74
4.2.8.2	Cromatografia líquida acoplado a arranjo de diodo (PDA) LTQ ion trap/Orbitrap com detecção de espectrometria de massas - HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap.....	75
4.2.9	Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidraria.....	76
4.2.10	Análise estatística.....	77
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	78
5.1	PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA MODELO	78
5.1.1	Padronização das soluções modelo	78
5.1.2	Interação enzimática.....	80

5.2	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRICOTECENOS EM SOLUÇÃO MODELO	81
5.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	83
	5.3.1 Recuperação de tricotecenos da solução modelo	84
	5.3.2 Seletividade	87
5.4	DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DOS TRICOTECENOS	89
	5.4.1 Efeito do ABTS na ação da Lacase	97
	5.4.2 Efeito do H₂O₂ na ação da enzima peroxidase	99
5.5	PARÂMETROS DE CONTROLE ENZIMÁTICO	100
5.6	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	110
5.7	INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DOS TRICOTECENOS	120
	5.7.1 Cromatografia líquida acoplada a arranjo de diodo (PDA) LTQ íon trap/Orbitrap com detecção de espectrometria de massas - HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap	120
5.8	SUGESTÃO PARA APLICAÇÃO ENZIMÁTICA EM PROCESSOS ALIMENTÍCIOS PARA DEGRADAÇÃO DE TRICOTECENOS	124
	5.8.1 Processamento de leite e queijos	125
	5.8.2 Processamento de cervejas	126
6.	CONCLUSÕES	128
7.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	130
8.	PRODUÇÃO ACADÊMICO-CIENTÍFICA	131
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

1. INTRODUÇÃO

Commodities e produtos utilizados na indústria de alimentos e rações podem estar contaminados por fungos filamentosos que em situação de stress que podem sintetizar de micotoxinas (PASCARI et al., 2018). A Organização para a Alimentação e Agricultura estimou que 25% das culturas alimentares mundiais estão significativamente contaminadas com micotoxinas (SPADARO e GARIBALDI, 2017). Uma classe de micotoxinas frequentemente detectadas em cereais, como cevada (IBÁÑEZ-VEA et al., 2012), trigo (DONG et al., 2016), aveia (SCHÖNEBERG et al., 2018) e milho (OLIVEIRA et al., 2017), são os tricotecenos. Sua toxicidade é descrita principalmente, pela capacidade de inibição da síntese protéica, prejudicando a multiplicação celular e induzindo a apoptose (BAERE et al., 2011; NDOSSI et al., 2012). A ocorrência dessas micotoxinas é imprevisível e difícil de estimar e pode representar um problema para a segurança alimentar (NUGMANOV et al., 2018).

O aumento da conscientização em segurança alimentar e saúde pública tem influenciado a preocupação global em prevenir, minimizar e controlar as micotoxinas nos alimentos e rações (ALBERTS et al., 2017). Métodos de descontaminação de tricotecenos foram investigados e classificados como físicos, químicos e biológicos (SPADARO e GARIBALDI, 2017). O uso de métodos físicos como lavagem (53% de redução de Deoxinivalenol (DON)) induz a re-secagem dos grãos, devido a este levar ao aumento de umidade para armazenamento (JAMES e ZIKANKUBA, 2018). No caso do emprego de métodos químicos recomenda-se que o produto utilizado não prejudique a nutrição, sabor, textura e a palatabilidade dos alimentos (SPADARO e GARIBALDI, 2017). A degradação biológica, em especial a enzimática tornou-se uma abordagem promissora e pode ser aplicada com foco na modificação direcionada das estruturas químicas por clivagem enzimática ou conversão de ligações químicas/grupamentos que desempenham papel fundamental na toxicidade (ALBERTS et al., 2017).

Enzimas hidrolíticas vêm sendo aplicadas na degradação de tricotecenos. Schmeitzl et al. (2015) utilizaram a enzima carboxilesterase na degradação total dos compostos. Estudos a cerca da degradação ou redução dos níveis de tricotecenos e outras micotoxinas por ação enzimática, vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de

Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LAMCA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Esses estudos demonstram percentuais de redução de DON em 74% por fermentação submersa com redução atribuída a enzima peroxidase (GARDA et al., 2005), 56% por ação de enzima peroxidase comercial (FELTRIN et al., 2017a) e 81% por ação de enzima peroxidase obtida de farelo de soja (FELTRIN et al., 2017b). Sendo esses estudos pioneiros em termos de aplicação da enzima peroxidase na degradação de tricotecenos.

No sentido de dar continuidade a esses estudos no LAMCA, e também de forma pioneira na literatura, objetivou-se estudar o emprego das enzimas lacase, peroxidase, lipase e esterase na degradação de tricotecenos (toxina T-2, DON, NIV, 3-ADON e 15-ADON). A utilização dessas enzimas com alto grau de purificação e baixo custo, suportadas pelos mecanismos de cinética de ação enzimática, representam um avanço significativo em termos de velocidade, tempo e seletividade de ação na degradação dos compostos. Esse estudo além de servir de base para outros, também apresenta potencial aplicabilidade das enzimas em processos alimentícios.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de degradação de tricotecenos A e B por ação de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a degradação de tricotecenos A e B através de ação enzimática
- Descrever o comportamento cinético durante processo de degradação
- Identificar os produtos de degradação após ação enzimática
- Adequar e validar método analítico para determinação e quantificação de tricotecenos A e B em HPLC-UV, LC-MS/MS e Orbitrap
- Padronizar método analítico para determinação e quantificação de enzimas oxidativas e hidrolíticas em solução modelo

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários de espécies toxigênicas de fungos filamentosos, que apresentam alta toxicidade. Uma grande variedade de espécies dos gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Stachybotrys* e *Trichoderma* podem produzir esses metabólitos (MARIN et al., 2013; DEL PALACIO, BETTUCCI e PAN, 2016; QUILES et al., 2016). Entre 400 a 500 compostos são reconhecidos como micotoxinas (BERTHILLER et al., 2007; BROOM, 2015), porém apenas algumas foram detectadas em produtos alimentícios e rações produzidos a partir de cereais como trigo (DEL PALACIO, BETTUCCI e PAN, 2016), centeio (BLAJET-KOSICKA et al., 2014), milho (CHEN et al., 2016), aveia (TWARUZEK et al., 2013) e arroz (FERRE, 2016) e de leguminosas (WANG et al., 2013; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2016).

A produção nas plantas é influenciada por um conjunto de fatores bióticos e abióticos, entre os mais importantes estão a composição de substrato, temperatura, pH, atividade de água e deficiência de nutrientes (MARIN et al., 2013; FONTAINE et al., 2015; SANZANI et al., 2016). Os climas temperado e tropical favorecem o desenvolvimento de espécies fúngicas em cereais, tais como *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxinas, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* produtores de ocratoxina A, *Fusarium graminearum* produtor de tricotecenos e zearalenonas (MARIN et al., 2013). Nas etapas seguintes à produção, transporte e armazenamento, grãos contaminados entram em contato com grãos saudáveis, o que pode aumentar os níveis de contaminação (DEGRAEVE et al., 2016; SANZANI et al., 2016).

Um aumento da contaminação por micotoxinas em grãos está sendo observado, e isto tem sido relacionado às mudanças climáticas e agrônômicas que promovem a contaminação por fungos. Um determinado número de fungos que são patógenos de plantas também podem produzir tricotecenos, um grupo de micotoxinas com consideráveis impactos econômicos e na saúde de humanos e animais bem como econômicos (FORONUD e EUDES, 2009; MCCORNICK et al., 2011).

Quando ingeridos, por intermédio de alimentos contaminados, as micotoxinas são capazes de causar depressão no sistema imunológico, e dependendo do nível de exposição, efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e estrogênicos em animais. Essas doenças são chamadas micotoxicoses e acabam muitas vezes não sendo diagnosticadas devido à inespecificidade de efeitos danosos. A classificação mais usual das micotoxinas usa como critério, órgãos alvo de suas ações (hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas), essa classificação segue para químicos orgânicos de acordo com a estrutura química (lactonas, cumarinas, pironas) e para bioquímicos pela origem biossintética (policetídeos, derivados de aminoácidos) (RICHARD, 2007; STOEVE, 2015; ZAIN, 2011).

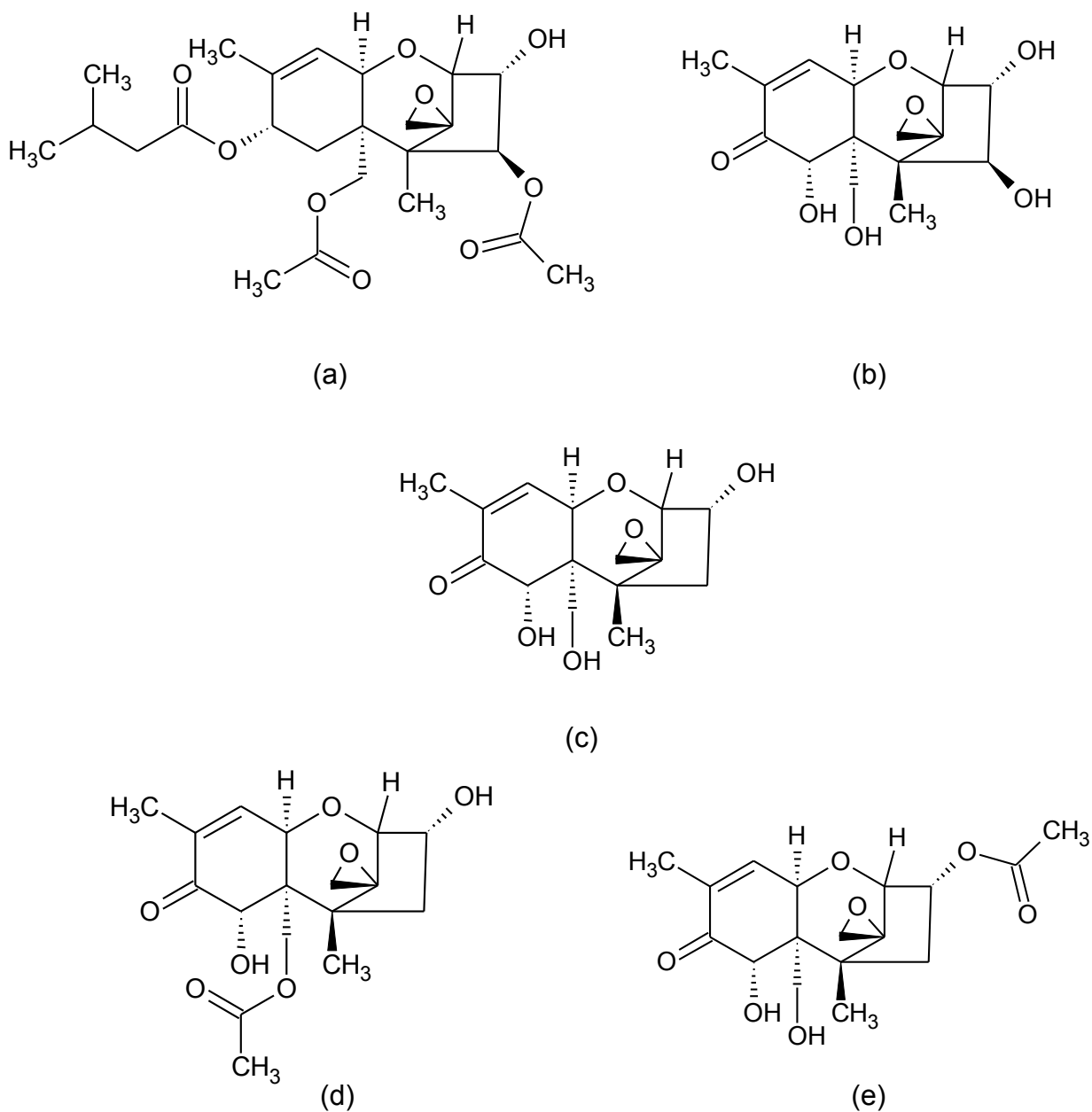
3.2 TRICOTECENOS

Os tricotecenos são produzidos por espécies toxigênicas do gênero *Fusarium*, compostos estruturalmente por um sistema comum de anéis sesquiterpenóide tetracíclico 12,13-epoxitricotec-9-eno, em resumo, uma dupla ligação entre o carbono (C) 9 e C10 e um anel epóxido entre o C12 e C13. O esqueleto dos tricotecenos é quimicamente estável e o anel 12,13-epoxi é resistente a ataques nucleofílicos (ROCHA, ANSARI e DOOHAN, 2005, LIU et al., 2012), são estáveis a temperaturas (DEL REGNO et al., 2015) e não são degradáveis em processos de autoclavagem, além de possuírem estabilidade em uma ampla gama de pH de neutro à ácido (UENO, 1987). Existem aproximadamente 170 tricotecenos identificados (PESTKA, 2007; MARIN et al., 2013), estes se dividem em 4 tipos, A, B, C e D e esta designação é explicada em maioria pelo grupo funcional substituinte no C8 e variações em grupos funcionais hidroxil e acetil. O tipo A é representado por Diacetoxiscirpenol (DAS) e pelas Toxinas T-2 e HT-2, já o tipo B é representado por NIV, DON e seus derivados acetilados, 3-ADON e 15-ADON (PESTKA, 2007; FOROUND e EUDES, 2009; IBÁÑEZ-VEA, LIZARRAGA e GONZÁLEZ-PEÑAS, 2011; MCCORNICK et al., 2011). A Crotocina é classificada no tipo C e no tipo D estão a Satratoxina G e Roridina E (PESTKA, 2007; MCCORNICK et al., 2011; ALEKSIC et al., 2016).

Os tricotecenos dos tipos A (toxina T-2) e B (NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON) são os mais frequentemente detectados e estão demonstrados na Figura 1 (IBÁÑEZ-

VEA et al., 2012; MARIN et al., 2013; ZHAO et al., 2014). A biossíntese de tricotecenos produzidos pelo gênero *Fusarium*, inicia com a ciclização do farnesil pirofosfato para tricodieno (um metabólito intermediário primário), reação catalisada pela enzima sintase tricodieno. A via posterior envolve uma série de reações de oxigenação catalisadas pelo citocromo P450, isomerização, ciclização, hidroxilação e acetilação (SWEENEY e DOBSON, 1999; MCCORMICK et al., 2011).

Figura 1. Estruturas químicas dos principais tricotecenos toxina T-2 (a) e tipo B NIV (b), (DON) (c), 3-ADON (d) e 15-ADON (e).



Alguns estudos vêm demonstrando que esse grupo de micotoxinas é responsável pela inibição da síntese de proteínas em células eucarióticas, por ligação a subunidade ribossomal 60S e por interação com a enzima peptidiltransferase. Impactos adicionais da toxicidade incluem rompimento de ácidos nucleicos, função mitocondrial, integridade da membrana e divisão celular (PESTKA, 2007; FOROUND e EUDES, 2009), estes fatores induzem a apoptose celular em animais e podem induzir a morte programada da célula em plantas (ROCHA, ANSARI e DOOHAN, 2005). Como consequência, os tecidos mais afetados são os que apresentam maior divisão celular, como o imunológico, as mucosas e o tecido sanguíneo (DÄNICKE et al., 2006; DÖLL et al., 2009).

DON é o tricoteceno mais estudado devido a sua frequente ocorrência em grãos e cereais em todo mundo (CANO-SANCHO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2015; DEGRAEVE et al., 2016; DONG et al., 2016). Há evidências que DON possua propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas (CHEAT et al., 2016). DON é classificado pela Agência Nacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) no grupo 3 (IARC, 1993), ou seja, não há evidência de carcinogenicidade em humanos, mas é conhecido o mecanismo de carcinogenicidade em animais experimentais. Os efeitos agudos da contaminação por DON em humanos são dores abdominais, dores de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia, entre outros. A administração crônica de DON em animais causa perda de peso, anorexia e diminuição na eficiência nutricional. Em suínos, espécie mais estudada quanto a exposição à tricotecenos, sendo que 1 – 2 mg L⁻¹ de DON causam rejeição parcial de rações, aumento no tamanho do fígado, declínio nos hematócritos, redução dos níveis de soro de cálcio e fósforo e efeitos neurotóxicos (MARIN et al., 2013).

DON tem sido relacionado com toxicoses agudas humanas, tais como *Akakabi-ryo* ou bolor vermelho, relatada em países como Rússia, Japão e China (IBÁÑEZ-VEA et al., 2012). Em relação aos seus derivados acetilados (3-ADON e 15-ADON), Wu et al. (2012) e Zhao et al. (2014), afirmaram que ambos induzem efeitos anorexígenos de resposta rápida e transiente de forma semelhante à de DON. De acordo com estudos quanto a toxicidade dos tricotecenos, DON não se apresenta tão tóxico quanto toxina T-2, que é um potente inibidor da síntese de proteínas e da função mitocondrial *in vivo* e *in vitro*, mostrando efeitos imunossupressivos e citotóxicos (ERIKSEN e

PETTERSON, 2004). Essa micotoxina pode ser rapidamente metabolizada *in vivo* para toxina HT-2 (JECFA, 2001). Dados experimentais avaliaram a ação carcinogênica da toxina T-2 para classificá-la no grupo 3 (IARC, 2003). Em porcos, esta toxina causa uma diminuição no ganho de peso, e exposição diária leva a recusa do alimento, baixa produção de leite, gastroenterites e, em alguns casos, a morte é observada (GIMENO e MARTINS, 2011). Toxina T-2 tem sido associada com a Aleukia Tóxica Alimentar (ATA) doença que teve lugar na Rússia na segunda guerra mundial (IARC, 2003).

Além de causar a mesma ampla faixa de efeitos nocivos a saúde, que são causados por DON, de acordo com Ok et al. (2014), NIV é um forte agente hemorrágico, que foi utilizado como agente de guerra química do sudoeste asiático, juntamente com a toxina T-2. Associado com outros tricotecenos, NIV foi apontado em correlação com a alta incidência de câncer de esôfago (GEREZ et al., 2015). *In vitro*, NIV inibe a proliferação de linfócitos humanos (CHEAT et al., 2016). Um fator preocupante diante da alta toxicidade dos tricotecenos é o grande número de estudos a respeito da sua presença em matérias-primas utilizadas na produção de alimentos tanto para humanos como para animais.

3.2.1.Ocorrência de tricotecenos

Devido a sua estabilidade, os tricotecenos podem permanecer nos alimentos por um longo período de tempo, causando efeitos adversos à saúde (LATTANZIO et al., 2011). A exposição ocorre de maneira generalizada em países de clima temperado, cujo cultivo prioritário é de trigo (TRALAMAZZA et al., 2016) (substrato importante para esses fungos). Tricotecenos também aparecem como contaminantes naturais presentes em outros grãos e cereais, tais como cevada (IBÁÑEZ-VEA et al., 2012), aveia (PASCALE, PANZARINI e VISCONTI, 2012), milho (WANG et al., 2013), arroz (OK et al., 2014) e produtos derivados destes (MONTES, SEGARRA e CASTILLO, 2012), como pão (GONZÁLEZ-OSNAYA et al., 2011), malte e cerveja (KUZDRALINSKI, SOLARSKA e MUSZYNSKA, 2013).

No Brasil, os tricotecenos foram detectados por Milanez et al. (2006), onde em 6 amostras de grãos de milho examinadas, toxina T-2 foi quantificada na concentração de 767 ng g⁻¹, NIV e DON foram detectados em uma amostra de farinha de milho (entre

11 amostras analisadas) com 166 e 167 ng g⁻¹, respectivamente. DON e NIV foram detectados em co-ocorrência em 59 de 66 amostras de trigo com níveis de contaminação de 540 e 337 µg kg⁻¹, respectivamente (DEL PONTE, GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2012). DON também foi avaliado em 113 amostras de trigo pertencentes ao estado do Paraná, estando presente em 64% destas (SANTOS et al., 2013). No Rio Grande do Sul, DON foi identificado em amostras de biscoito tipo cracker por De Souza et al. (2015), estando presente em 18 das 23 amostras analisadas, 22% destas apresentavam concentrações desta micotoxina acima do permitido na legislação vigente no Brasil. Tralamazza et al. (2016), confirmaram a presença de DON em 99% de amostras de trigo estudadas, pertencentes aos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, em concentrações que variaram entre 183 e 2150 µg kg⁻¹. Oliveira et al. (2017), quantificaram uma contaminação por DON em milho em 48% das 148 amostras analisadas, 3-ADON e 15-ADON foram encontrados em 5,3 e 49,9% das amostras, respectivamente.

DON e toxina T-2 foram extraídas de 75 amostras de pão e massa a base de trigo, essas micotoxinas estavam presentes em 28% e 2,6% das amostras, respectivamente, em estudo conduzido por González-Osnaya et al. (2011). Ibáñez-Vea et al. (2012) analisaram 123 amostras de cevada de uma região do norte da Espanha (Navarra) para co-ocorrência de tricotecenos dos tipos A e B, 95% das amostras estavam contaminadas com DON (1111,3 µg kg⁻¹, nível máximo), NIV estava presente em 20% das amostras, toxina T-2 foi encontrada em 10%, 15-ADON em 57% e 3-ADON em 28% das amostras. A ocorrência de DON foi observada também, na Polônia em 100% das amostras de cervejas produzidas por empresas nacionais, com níveis entre 6 e 70,2 µg L⁻¹ (KUZDRALINSKI, SOLARSKA e MUSZYNSKA, 2013).

No estudo de Zhao et al. (2014), a incidência de níveis de NIV, 3-ADON e 15-ADON, foram 50%, 6% e 63% em amostras de ração suína, 33%, 13% e 47% em amostras de ração de cavalo e 40%, 0% e 60% em amostras de milho, respectivamente. Juan-García et al. (2015), enfatizam que 15-ADON ocorre com maior frequência na América do Norte e Reino Unido, enquanto que as estirpes que produzem 3-ADON são prevalentes na Europa e Ásia. Uma coleção de dados sobre a ocorrência de toxinas *Fusarium* em gêneros alimentícios na União Europeia, mostraram que há uma incidência em 57% nas amostras de DON, e em co-ocorrência, a presença

de NIV em 17% das amostras (DEL REGNO et al., 2015). Dong et al. (2015) detectaram toxina T-2 em amostras de trigo e arroz com concentrações de 0,48 e 6,13 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Dong et al. (2016) avaliaram amostras de trigo entre 2013 e 2015 em Jiangsu, província chinesa, e observaram que a contaminação por DON ficou entre 3198 e 18709 $\mu\text{g kg}^{-1}$, foi também observada a co-ocorrência de 3-ADON, 15-ADON e NIV nas amostras, estes com concentrações de 730,2; 259,9 e 204,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Todos esses estudos enfatizam a exposição a essas toxinas, demonstrando a importância em se estabelecer limites toleráveis a sua exposição. Os limites por sua vez, devem ser cada vez mais rígidos, o que só pode ser atingido através da implementação de uma legislação eficaz para todos os tricotecenos.

3.2.2 Legislação

Diante dos diversos efeitos tóxicos dos tricotecenos e da alta ocorrência em nível mundial desses contaminantes, várias nações vêm implementando regulamentos para evitar uma exposição a produtos com uma concentração elevada dessas micotoxinas. No Brasil, está em vigor a Resolução Nº 138 de 8 de fevereiro de 2017, prorrogação da Resolução Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. De acordo com estas, ficam estabelecidos LMTs de exposição a DON nas mais diversas matrizes alimentares, os valores estabelecidos estão descritos na Tabela 1.

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

Aplicação	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Alimento
Janeiro de 2017	3000	Trigo e milho em grãos para posterior processamento.
	1250	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.
	1000	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.
Janeiro de 2019	1000	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.
	750	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Na China, a regulação de micotoxinas do gênero *Fusarium* em gêneros alimentícios, estabelece o nível máximo para DON em trigo, cevada, milho e derivados de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NFHPC, 2016). De acordo com o ministério da Federação Russa (2010), os níveis máximos de DON em trigo, cevada e seus derivados são de 700 e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para toxina T-2 em grãos e seus derivados o limite é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Nos Estados Unidos a Administração de Alimentos e Drogas (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) recomenda que os níveis de DON em alimentos humanos não devem exceder $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (FDA, 2001).

Na União Europeia, os limites toleráveis para doses diárias de tricotecenos são estabelecidos pelo Comitê de aditivos em Alimentos (JECFA, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*). A dose diária indicada para toxina T-2 é de $0,06 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo dia^{-1} . No que concerne a DON e seus derivados acetilados, a dose diária indicada é de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. NIV, devido ao seu potencial tóxico relativamente maior que os demais tricotecenos do tipo B, apresenta como dose diária de exposição $0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EFSA, 2011; EFSA, 2013).

Um fato preocupante, tendo em vista estudos de ocorrência dessas toxinas, é que na legislação brasileira, não há LMTs estabelecidos para a presença dos metabólitos acetilados e tricotecenos tipo A. No entanto, para controle e manutenção da ausência da ingestão ou de acordo com a ingestão tolerada diariamente, se torna necessário adequação de laboratórios para avaliação da contaminação, bem como que estes desenvolvam métodos exequíveis e validados para a avaliação da contaminação por tricotecenos e posterior estudos da exposição a que humanos e animais estão submetidos.

3.2.3 Métodos para determinação de tricotecenos

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com avanços significativos a fim de melhorar a determinação de tricotecenos, principalmente em amostras de cereais e derivados. As razões para a determinação de tricotecenos são, o controle e monitoramento da qualidade de fontes alimentares e a avaliação da exposição existente durante consumo de produtos contaminados, bem como o cumprimento da legislação (GARDA-BUFFON, 2008; MENEELY et al., 2011).

A maioria das técnicas analíticas utilizadas para a determinação de tricotecenos propõe sua extração a partir de uma matriz alimentar empregando um solvente, seguido por uma etapa de limpeza para remover quaisquer impurezas/interferentes, utilizando materiais que além de remover interferentes, concentram o extrato, auxiliando a quantificação em menor escala. A escolha do solvente ou mistura solvente orgânico/água a ser utilizada, depende das características físico-químicas dos tricotecenos em análise (Tabela 2) (JUAN, RITIENI e MAÑES, 2012).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos tricotecenos mais frequentemente detectados.

Composto	MM (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilidade (mg L ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)
Toxina T-2	450,2248	2,27	43,99	198,0	483,5
NIV	312,3150	-2,24	8,58 x 10 ⁵	203,2	479,9
DON	296,3160	-0,71	5,17 x 10 ⁴	186,2	443,5
3-ADON	338,3524	-0,55	2,15 x 10 ⁴	190,7	453,2
15-ADON	338,3524	0,30	4044	189	449,5

MM = Massa molecular dos compostos; solubilidade em água a 25 °C; PF = ponto de fusão; PE = ponto de ebulição. Fonte: Chemspider, em, <http://www.chemspider.com/>

De acordo com Meneely et al. (2011), uma consideração muito importante em termos de métodos de extração de tricotecenos é a eficiência. Não se pode ter certeza que as toxinas serão totalmente dispersas na fase líquida, no entanto os valores de recuperação obtidos deverão ser consistentes. Uma alternativa é a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*), em que a amostra e o material adsorvente são misturados e homogeneizados, esta mistura é então embalada em cartuchos e eluída com o solvente compatível com o analito (RUBERT et al., 2011). O método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) também se apresenta como uma alternativa rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura para extração dos tricotecenos tanto de matrizes líquidas como sólidas (PEREIRA, FERNANDES e CUNHA, 2015). Ainda podem-se destacar a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) (DONG et al. 2015), além de colunas e testes de imunoafinidade como ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Para extração de tricotecenos em amostras líquidas, também podem ser utilizadas técnicas de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*).

Como os tricotecenos são compostos polares, solventes como hexano e éter de petróleo que são imiscíveis em água são relativamente ineficientes para a extração desses compostos, devido às suas baixas constantes dielétricas. Embora os solventes orgânicos mais polares, tais como etanol, metanol, acetona ou acetonitrila, possam proporcionar solubilidade para os compostos relacionados, estes são miscíveis com água que não podem ser adotados para o método LLE convencional. No entanto, a adição de sais pode reduzir a miscibilidade mútua levando à separação de fases. Portanto, com a ajuda de sal, os analitos polares retidos na fase aquosa podem ser transferidos seletivamente para a fase orgânica polar. Esta técnica é chamada de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Liquid-Liquid Extraction*) (SONG et al., 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*), possivelmente a mais frequente técnica aplicada para determinação de tricotecenos, vem sendo utilizada em muitos trabalhos principalmente utilizando detector UV (ultravioleta). Estes são detectados em comprimentos de onda de 193 nm para tricotecenos tipo A (PASCALE, PANZARINI e VISCONTI, 2012) e 220 nm para tricotecenos tipo B (KRSKA et. al., 2007). A utilização da cromatografia líquida acoplada a detector de espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) para detecção de tricotecenos é cada vez maior, desempenhando um papel importante na análise devido a sua alta seletividade e sensibilidade (REN et al., 2007). Esta permite a determinação de tricotecenos e a determinação simultânea de micotoxinas multiclasses em diferentes matrizes (CAVALIERE et al., 2006; MENEELY et al., 2011). Métodos multi-micotoxinas são também altamente estudados, atraindo forte interesse (KRSKA e MOLINELLI, 2007).

HPLC apresenta aplicações de alta ou ultra-alta pressão, hifenadas com MS empregando analisadores de massa dos tipos: triplo quadrupolo, íon trap ou Orbitrap (VACLAVIK et al. 2010). Os analisadores de MS de alta resolução (HR, do inglês *High Resolution*) (HRMS), oferecem uma poderosa alternativa que viabiliza a identificação de micotoxinas multi-classe e seus metabólitos, identificação de estruturas química de produtos de degradação e análise toxicológica (ZACHARIAZOVA et al. 2010; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ et al. 2016; RUBERT et al. 2014). As vantagens de HRMS sobre os instrumentos convencionais de MS incluem primeiramente a maior resolução

de massa com capacidade de distinguir entre compostos com massas moleculares semelhantes, porém massas precisas diferentes, como no caso dos tricotecenos 3-ADON e 15-ADON (isômeros de posição) não identificáveis de forma individual utilizando cromatografia líquida convencional.

Além disso, todos os dados de massa são gravados simultaneamente, o que permite integração de dados para novos compostos de interesse, sem necessidade de re-extração ou nova análise instrumental (PASIN et al. 2015). O uso de sistemas como tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) e Orbitrap, apresentam várias vantagens, como operações em modo de varredura completa (do inglês *Full-Scan*) com alta especificidade sem limitar o número de compostos analisados (MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ et al. 2016).

Para determinação de tricotecenos também é empregada técnica de cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), utilizando detectores de MS e ionizadores de chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*). Embora tenha alta exatidão para compostos mais voláteis e apolares, compostos polares e pouco voláteis também podem ser analisados com o auxílio da derivatização. Para tricotecenos, a derivatização se realiza por reações de silanização, acilação e alquilação (MENEELY et al., 2011; RAN et al., 2013). A acilação emprega ácido trifluoroacético (TFAA, do inglês *Trifluoroacetic Anhydride*) (JELÉN e WÁSOWICZ, 2008), ácido heptafluorobutirato (HFBA, do inglês *Heptafluorobutyric acid*) (VEGA e CASTILLO, 2006) e ácido pentafluoropropiônico (PFPA, do inglês *Pentafluoropropionic anhydride*) (IBÁÑEZ-VEA, LIZARRAGA E GONZÁLEZ-PEÑAS 2011).

Os métodos analíticos devem ser validados através do estabelecimento de vários indicativos de eficiência como sensibilidade, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez (SANTE, 2015). A avaliação de todos esses fatores implica na utilização de métodos seguros e eficazes, aplicáveis também na avaliação de degradação e detoxificação dessas toxinas.

3.2.4 Degradação de tricotecenos

Existem três estratégias para se evitar a possível presença de tricotecenos em alimentos: prevenção da contaminação no cultivo das plantas ou pré-colheita, cuidados

no armazenamento dos grãos (SCHRÖDTER, 2004), e por fim a descontaminação dessa matriz contaminada através de métodos físicos (JALILI, JINAP e NORANIZAN, 2010), químicos (JOUANY, 2007) e biológicos (HE et al., 2010). Na primeira estratégia, melhorias podem ser alcançadas através do melhoramento genético obtendo plantas mais resistentes a proliferação de fungos (FUCHS et al., 2002). Métodos físicos de degradação não possuem ação efetiva, com baixos percentuais de eficiência (JALILI, JINAP, e NORANIZAN, 2010). Os métodos químicos são caros e, na maioria dos casos, afetam a qualidade dos grãos e das matérias-primas (FUCHS et al., 2002) (Tabela 3).

Tabela 3. Métodos químicos e físicos de degradação de tricotecenos.

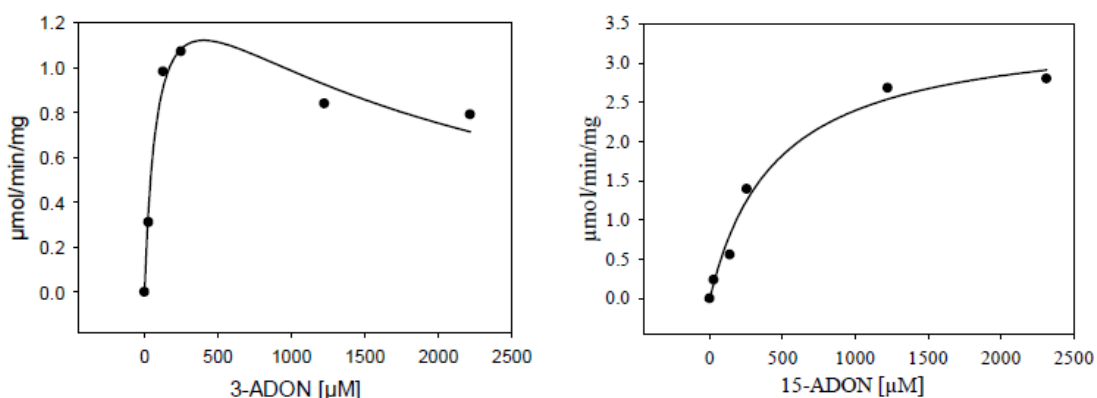
Amostra	Tricoteceno	Método de degradação	Tempo (min)	Redução (%)	Autor(es)
Pão	DON	Cozimento (230 °C)	30	7,6 – 9,9	Israel-Roming e Avram (2010)
Biscoito	DON	Cozimento	18	39	Voss e Snook, 2010
Bolacha	DON	Cozimento	6	30	
Pão	DON	Cozimento	18	70	
Donuts	DON	Fritura	1,5	56	
Silagem de milho	DON	Radiação UV	60	22	Murata et al. (2011)
Massa	DON	Cozimento	NE	8 - 41	Brera et al. (2013)
Grãos	DON	Separação gravitacional + lavagem	NE	74	Milani e Maleki (2014)
Cevada	DON, 3-ADON e 15-ADON	Maceração	1440	15 – 49	Habler et al., 2016
Biscoito	DON	Cozimento	360	9-68	Generotti et al. (2017)
Farinha de aveia	T-2 HT-2	Extrusão	1	35 22	Schmidt et al. (2017)
Grãos de milho	DON	Lavagem + Carbonato de sódio (Na)	NE	65 – 69	Scott (1998)
Milho	DON	Bissulfito de Na		100	
Cevada	DON	Carbonato de sódio – 80 °C	5 dias	58	Abramson; House, Nyachoti (2005)
Grãos de trigo	DON	Tratamento com ozônio	60	20,1	Wang et al. (2016)

NE - Informação não fornecida pelo autor

Com isso, uma alternativa promissora para degradação é o emprego de métodos biológicos, os quais preservam as características sensoriais dos alimentos através da utilização de condições brandas de processo sem o uso de substâncias químicas nocivas, o que pode ser alcançado pelo uso de enzimas (HE et al., 2010; BERTHILLER et al., 2013) e microrganismos como bactérias (FUCHS et al., 2002), cepas fúngicas (GARDA-BUFFON, KUPSKI e BADIALE-FURLONG, 2011) e leveduras (NATHANAIL et al., 2016).

De acordo com Tian et al. (2016), uma enzima pode atuar sobre a estrutura dos tricotecenos em reações de hidrólise, deepoxidação, oxidação, epimerização e/ou glicosilação. Hidrólise é uma reação na qual uma molécula é decomposta por uma molécula de água. No caso de tricotecenos que contém grupo(s) acetil, a reação de desacetilação pode causar mudanças na toxicidade, nesse caso o número ou a posição desses grupos afeta a toxicidade dos tricotecenos e a reação de degradação (HE et al., 2010). Como pode ser visto no estudo de Schmeitzl et al. (2015), a enzima carboxilesterase isolada a partir de *Brachypodium distachyon* desacetilou 3-ADON e 15-ADON (como demonstrado na Figura 2). Como resultado, os autores apresentaram 100% de desacetilação após 24 h de exposição. A constante de Michaelis-Menten (K_M) determinada neste estudo retrata a maior afinidade da enzima carboxilesterase para 15-ADON ($421 \mu\text{mol L}^{-1}$) do que a *p*-NPB (*p*-nitrofenilbutirato) ($5530 \mu\text{mol L}^{-1}$), seu substrato específico. Ensaio com 3-ADON revelaram inibição do consumo do substrato verificando o aumento da sua concentração ao longo da ação da enzima.

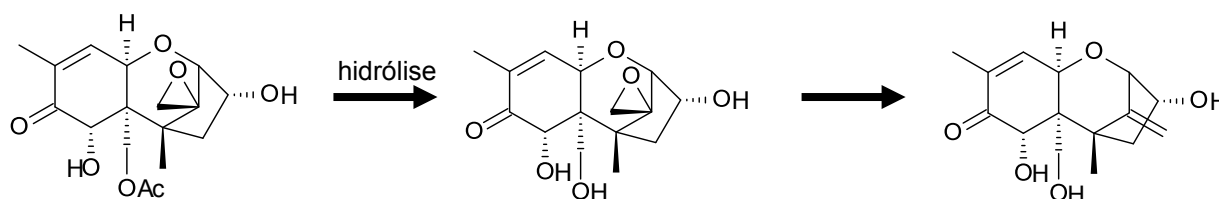
Figura 2. Efeito da carboxilesterase em 3-ADON e 15-ADON (adaptado de Schmeitzl et al. (2015)).



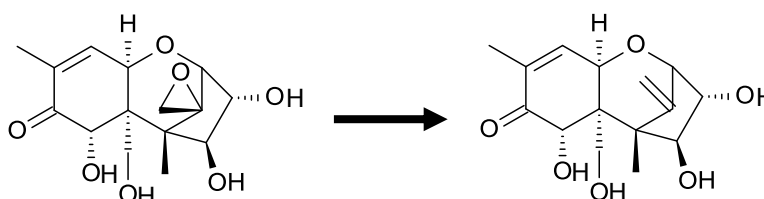
Ainda assim, no caso da estrutura química dos tricotecenos, o grupo epóxi acaba por ser o principal responsável pela toxicidade dos tricotecenos. Portanto, a deepoxidação é o próximo passo de detoxificação dos tricotecenos. Vários estudos se concentram na degradação de tricotecenos e as diferenças entre o seu mecanismo, não está claro neste momento, podendo ocorrer a catálise por uma única enzima ou por diferentes enzimas a partir das culturas testadas.

No estudo de Young et al. (2007), microbiota e culturas puras de isolados microbianos de intestino de frangos, tem demonstrado a capacidade de degradar DON por deepoxidação. Em tricotecenos acetilados o ataque aconteceu preferencialmente nos grupos acetil, e em pequenas quantidades foi observado a deepoxidação desses compostos. O mesmo pode ser observado no trabalho de Fuchs et al. (2002), onde uma cepa bacteriana (*Eubacterium* BBSH 797) foi empregada na degradação *in vitro* de tricotecenos A e B, 3-ADON foi transformado em DON, que foi transformado em seu metabólito menos tóxico DOM-1 (Esquema 1). O mesmo foi observado para NIV que foi transformado em seu metabólito menos tóxico deepoxiNIV (Esquema 2). Toxina T-2 foi convertida a deepoxi T-2-tetraol (Esquema 3). As enzimas produzidas por este organismo no interior do trato gastrointestinal (por exemplo, epoxidases) desempenham um importante papel ao realizar a ruptura específica do anel epoxi.

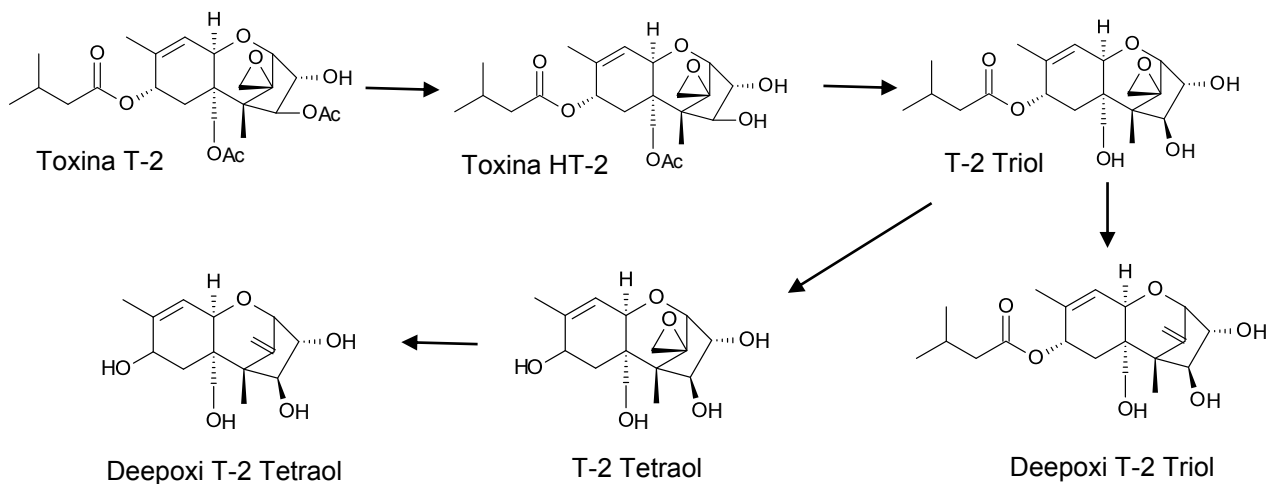
Esquema 1. Transformação de 3-ADON em metabólitos menos tóxicos.



Esquema 2. Transformação de NIV em deepoxiNIV.



Esquema 3. Transformação de tricotecenos tipo A em metabólitos menos tóxicos



O mesmo mecanismo de biotransformação foi observado por Guan et al. (2009), que avaliaram a transformação de tricotecenos por microrganismos do trato digestivo de peixes. Objetivando a avaliação da capacidade de espécies fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* em degradar DON em fermentação submersa, Garda et al. (2005) estudaram a cinética de degradação desta micotoxina. A degradação ocorreu durante o processo, onde se observou a adsorção da toxina como via de degradação principal até o intervalo de 144 h (74% de degradação). *Rhizopus oryzae* ocasionou a maior redução na concentração de DON, aproximadamente 90% em 240 h e *Aspergillus oryzae*, 74% de redução em 96 h. Neste estudo, além da adsorção, a redução de DON estava diretamente relacionada a maior atividade da enzima peroxidase.

A partir desses resultados, Feltrin et al. (2017a) empregaram a enzima peroxidase de rabanete (padrão comercial) em ensaios de degradação de DON. Neste estudo, a enzima exerceu ação na redução dos níveis de DON, com 56% de redução do tricoteceno após 60 min de interação. Em outro estudo Feltrin et al. (2017b), observaram um percentual de redução de DON de 81% a partir da enzima peroxidase obtida de farelo de soja após etapa de purificação, enquanto que o extrato enzimático bruto a degradação observada foi de 60% com um tempo de reação de 10 min para ambos os sistemas. Gautério et al. (2017), também empregaram a enzima peroxidase, obtida e purificada a partir de farelo de arroz e verificaram uma degradação de 82% de

DON em sistema modelo. Os autores enfatizam que não se pode afirmar com certeza se existe uma ação oxidativa da enzima na estrutura de DON, levantando assim a hipótese das proteínas apresentarem capacidade de adsorção devido aos grupos ativos presentes na superfície da proteína, o que pode ocorrer em substituição a um mecanismo oxidativo.

Outros trabalhos também apresentam a degradação de tricotecenos por micro-organismos, estas sempre relacionadas a presença de enzimas, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Emprego de micro-organismos na degradação de tricotecenos.

Fonte	Tricoteceno	Reação	Tempo (dias)	Degradação (%)	Autor(es)
<i>Blastobotrys muscicola</i> , <i>B. robertii</i> e <i>B. peoriensis</i> , <i>B. capitulata</i> , <i>B. mokoensis</i> e <i>B. malaysiensis</i>	Toxina T-2	Acetilação e glicosilação	6	100	McCormick, Price e Kurtzman (2012)
Bactéria de solo agrícola	DON	Deepoxidação	2,4	>99	Islam et al. (2012)
Microbiota fecal	DON	Deepoxidação	1	100	Gratz, Duncan e Richardson (2013)
<i>Devosia mutans</i> 17-2-E-8	DON	Epimeração	2	98	He et al. (2016)
<i>Pseudomonas</i> sp	NIV	Acetilação	1	100	Tanaka et al. (2016)
<i>Lemna minor</i> L.	DON	Epimeração	7	93	Vanhoutte et al. (2017)
<i>Stenotrophomonas</i> e <i>Alkaliphilus-Blautia</i>	DON NIV 3-ADON 15-ADON	Deepoxidação	2	100 92 59 100	Ahad et al. (2017)
<i>Sphingomonas</i> S3-4	Toxina T-2 DON	Redução	3	46 100	He et al. (2017)
<i>Acinetobacter</i> , <i>Leadbetterella</i> e <i>Gemmata</i>	DON	Epimeração	7	100	Wilson et al. (2017)
Bactérias fecais	3-ADON 15-ADON DON	Deacetilação Glicosilação	2	82,1 15	Ajandouz et al. (2018)

Além dos tricotecenos, em outras micotoxinas também foi verificado a ação das enzimas na detoxificação, degradação ou redução destes compostos (Tabela 5). A detoxificação enzimática está sendo discutida desde a década de 1970 como uma estratégia para a eliminação de micotoxinas de alimentos e matérias-primas (KARLOVSKY, 2011). Assim, o uso de enzimas apresenta grande potencial, pois estas possuem alta especificidade de ação e ausência de geração de resíduos ambientais tóxicos (ABRUNHOSA, SERRA e VENÂNCIO, 2002).

Tabela 5. Emprego de enzimas, em diferentes sistemas reacionais, na degradação de micotoxinas.

Micotoxina	Enzima	Concentração de enzima	Sistema reacional	Degradação (%)	Autores
Aflatoxina B ₁	Lacase	1 U mL ⁻¹	Meios de cultivo	87	Alberts et al., 2009
	Manganês peroxidase	1,5 U mL ⁻¹	Meio de cultivo	90	Yehia et al., 2014
		5 U mL ⁻¹	Meio de cultivo	86	Wang et al., 2010
	Peroxidase	0,2 U mL ⁻¹	Solução modelo	57	Das e Mishra, 2000
Fumonisina B ₁	Aminotransferase + carboxilesterase	0,1 mg mL ⁻¹	Meio reacional enzimático	100	Heinl et al., 2010
Ocratoxina A	Protease A	10 mg mL ⁻¹	Meio reacional enzimático	87	Abrunhosa, Santos e Venâncio, 2006
	Carboxipeptidase	0,1 U mL ⁻¹	Meio reacional enzimático	78	Kupski, 2015
	Lipase	2,32 U mg ⁻¹	Solução modelo	90	Stander et al., 2000
	Peroxidase	0,063 U mL ⁻¹	Solução modelo	60	Nora, 2015
Zearalenona	Peroxidase	0,6 U mL ⁻¹	Solução modelo	70	Garcia, 2016
	Lacase	0,4 mg mL ⁻¹	Solução modelo	82	Banu, Lupu e Apradu, 2013
Patulina	Lipase	1 mg mL ⁻¹	Solução aquosa	100	Li et al., 2017

3.3 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos que facilitam a conversão de substratos em produtos, fornecendo condições favoráveis que reduzem a energia de ativação da reação. Uma enzima pode ser uma proteína ou glicoproteína e consiste ao menos de

uma cadeia polipeptídica. As regiões da enzima que são diretamente envolvidas no processo catalítico são chamadas de sítios ativos. Uma enzima pode ter um ou mais grupos essenciais para sua atividade catalítica associadas com os sítios ativos através de ligações covalentes e não covalentes. A proteína ou glicoproteína em uma determinada enzima é chamada apoenzima, enquanto que a porção não proteica é chamada grupo prostético, a combinação da apoenzima com o grupo prostético produz a holoenzima (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002; BON, FERRARA e CORVO, 2008; KARIGAR e RAO, 2011).

A atividade de uma enzima é expressa em unidades (U), definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de 1 μmol de substrato por minuto sob condições ótimas (MOTAMED, GHAEMMAGHAMI e ALEMZADEH, 2009). Esta depende muito da estrutura da proteína, o número de cadeias peptídicas dessas estruturas, da natureza do substrato ou também da natureza do grupo prostético. De acordo com a classificação da Comissão de Enzimas (EC, do inglês *Enzyme Commission*) para reações bioquímicas, a cada enzima é atribuído um número de quatro dígitos.

O primeiro critério de classificação é referente ao tipo de reação catalisada: oxidoredutases compõem a classe 1, transferases a classe 2, hidrolases a classe 3, liases a classe 4, isomerasas a classe 5 e ligases compreendem a classe 6. O segundo refere-se ao grupo funcional específico influenciado pela enzima. Por exemplo, 1.1 relacionado à oxidoredutases atuantes no CH-OH grupo de doadores. O terceiro nível de classificação implica nos cofatores utilizados pela enzima. Por exemplo, 1.1.1 denota oxidoredutases atuantes em grupamentos CH-OH usando NAD^+ ou NADP^+ como aceptor. O quarto nível é específico para os substratos e produtos da reação. Por exemplo, a enzima 1.1.1.1 age sobre álcoois primários (HATZIMANIKATIS et al., 2004).

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

As enzimas apresentam atividade máxima, temperaturas acima ou abaixo desta podem causar a inativação ou desnaturação (CAI et al., 2012). A concentração de substrato também é um fator que influencia na atividade específica das enzimas. Em concentrações consideravelmente baixas de substrato a velocidade inicial da reação aumenta com certa linearidade com o aumento do substrato. Com o aumento das concentrações de substrato, a velocidade inicial segue aumentando, porém, de maneira cada vez menor. Em determinado momento, o aumento da concentração de substrato e a velocidade inicial seguem aumentando lentamente, essa região de velocidade inicial parecida com um platô é onde a enzima está próxima a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

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

Todos os fatores citados acima devem ser considerados e avaliados quando se trata do emprego de uma enzima em processos de descontaminação de contaminantes. Além disso, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos, relacionados com o tempo e temperatura de reação, também precisam ser avaliados. Compensações de cinética e termodinâmica vêm sendo reportadas em processos de alimentos em reações químicas, físicas e biológicas. A compensação cinética de uma reação está relacionada com a velocidade de reação, energia de ativação, tempo de meia-vida e tempo de redução decimal. Krug et al. (1976) demonstraram que a propagação de erros experimentais tende a distribuir as estimativas da compensação cinética seguindo uma relação linear que se chama compensação estatística. Com relação a compensação termodinâmica, os parâmetros (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs) referem-se a este estágio de equilíbrio específico entre os reagentes e o estado de transição (complexo de ativação) (IBARZ, GARVÍN e IBARZ, 2017).

As principais classes de enzimas que, vem sendo aplicadas em processos biológicos são oxidorreduções e hidrolases. As oxidorreduções clivam ligações químicas e auxiliam na transferência de elétrons de um substrato orgânico reduzido (doador) a outro composto químico (aceptor). Durante essas reações de redução e oxidação, os contaminantes são finalmente oxidados para produtos. Enquanto que hidrolases facilitam a clivagem das ligações C–C, C–O, C–N, e outras ligações por água. As enzimas hidrolíticas transformam as principais ligações de moléculas tóxicas resultando na redução de sua toxicidade (KARIGAR e RAO, 2011). Dentro dessas classes se destacam as seguintes enzimas: peroxidase, lacase, lipase e esterase.

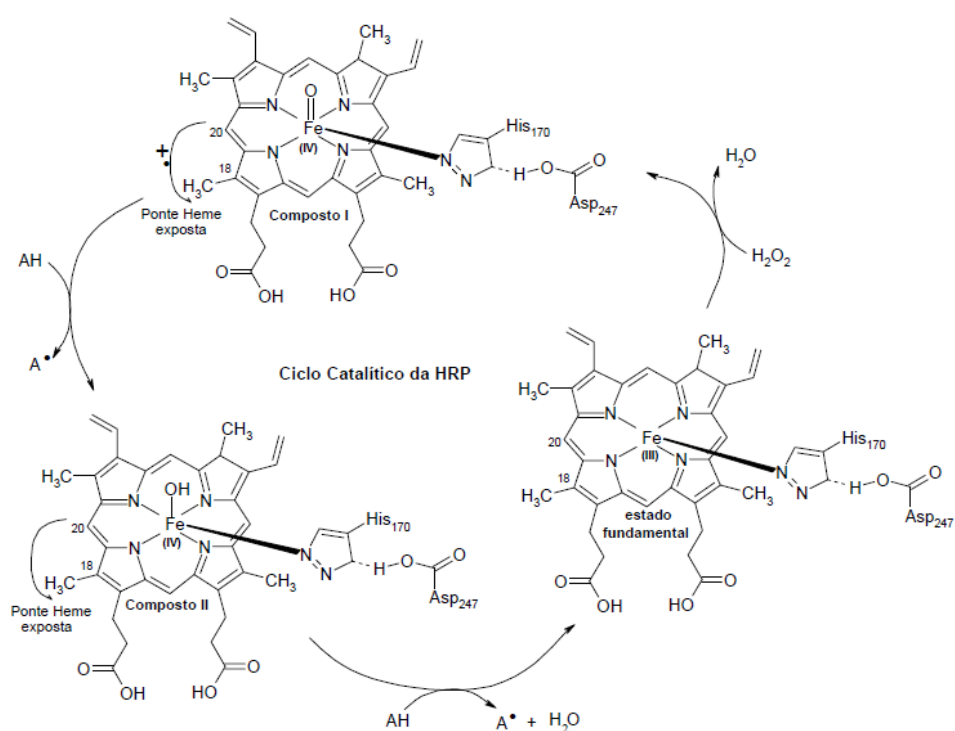
3.3.1 Peroxidase

Peroxidases (CE 1.11.1.7) catalisam a oxidação de elétrons de uma variedade de contaminantes oxidáveis usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como molécula aceptora (TEKCHANDANI e GURUPRASAD, 1998; TAFAZOLI e O'BRIEN, 2005; MATHÉ et al., 2010). Sua atividade foi identificada em plantas, microrganismos e animais. A maioria das peroxidases estudadas são, heme enzimas com grupo prostético de protoporfirina férrica IX, esse grupo heme oxida uma variedade de substratos estruturalmente diversos usando H_2O_2 , nos quais os oxidantes são reduzidos em água ou álcool. Embora a enzima catalise preferencialmente substratos com grupo fenol, ela também atua em anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos por meio do ciclo catalítico típico das peroxidases.

O ciclo catalítico de peroxidases na presença de H_2O_2 é mostrado na Figura 3, de acordo com Torres, Bustos-Jaimes e Borgne (2003) e Veitch (2004), consistindo nas seguintes etapas: (1) a enzima férrica nativa é inicialmente oxidada por H_2O_2 , gerando o composto I, deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do íon Fe^{3+} e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente, Fe^{4+} e radical cátion porfirínico; (2) em seguida, o composto I oxida um substrato doador de elétron, formando o composto II, um intermediário deficiente em um elétron. Ambos, o composto I e o composto II são oxidantes fortes, com potencial de redução próximos a +1 V; (3) o composto II pode oxidar outra molécula de substrato e, com isso, a enzima retorna ao seu estado nativo.

As moléculas de substrato oxidadas (radicais fenóxi) podem, por via não enzimática, reagirem entre si com proteínas e com formaldeído formado durante a reação, para formar estruturas poliméricas insolúveis. As duas primeiras reações (enzima férrica com H_2O_2 e composto I com substrato redutor) são cerca de 10 vezes mais rápidas que a reação do composto II; (4) o composto II ainda pode reagir com H_2O_2 resultando no composto III, uma forma de peroxidase com atividade reduzida.

Figura 3. Ciclo catalítico da enzima peroxidase obtida de rabanete mostrando as mudanças no grupo prostético heme (adaptado de Torres, Bustos-Jaimes e Borgne, 2003).



Devido à sua natureza oxidativa, há diversas áreas onde a peroxidase poderia substituir as técnicas atuais como oxidante químico (HAMID e REHMAN, 2009). A maior parte de reações de degradação de poluentes orgânicos envolve reações de oxidação, sendo natural que o emprego de enzimas nessas reações desperte o interesse de pesquisadores. Assim, pode-se citar a remoção por precipitação ou transformação, de compostos tóxicos ou recalcitrantes, e a alteração das características de um determinado efluente, como a biodegradabilidade ou diminuição da toxicidade (KARIM e HUSAIN, 2009).

Algumas novas aplicações de peroxidases incluem o tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos, a síntese de produtos químicos aromáticos e remoção de peróxidos de materiais. Estes compostos são encontrados nas águas residuais de uma ampla variedade de indústrias, refino de petróleo, resinas e plásticos, madeira, corantes e produtos químicos, têxteis, de mineração, pesticidas, herbicidas e outros agroquímicos (MAY, 1999; HAMID e REHMAN, 2009). A redução de peróxidos à custa de um substrato doador de elétrons faz com que peroxidases se tornem úteis em processos industriais e aplicações analíticas (HAMID e REHMAN, 2009). Também, são especialmente e temporalmente associadas à diminuição na taxa de multiplicação e disseminação de patógenos, sugerindo à peroxidase um papel ativo de resistência (CHITTOOR, LEACH e WHITE, 1997). Quanto à aplicação de Peroxidase Horseradish para degradação de micotoxinas, esta foi utilizada na degradação de aflatoxinas, como no estudo de Das e Mishra (2001), onde 60% de aflatoxina B₁ foi degradada. Uma peroxidase obtida de *Pseudomonas* sp foi capaz de degradar aflatoxina B₁ após 72 h de incubação, com um percentual de degradação de 87% com uma concentração 71 U mL⁻¹ (ZAID, 2017).

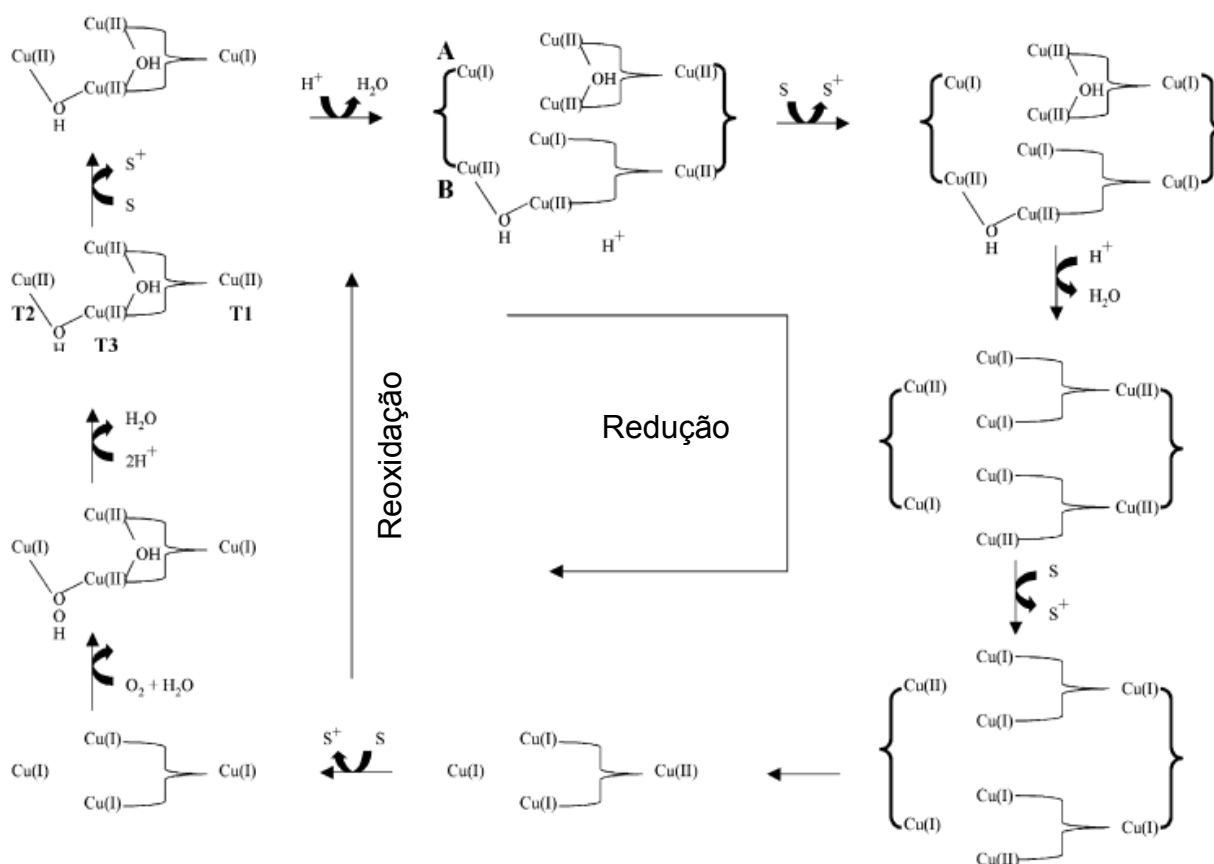
3.3.2 Lacase

As lacases constituem um grupo de enzimas oxidorreduativas. Lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que contém um centro multi cobre, sendo membro das oxidases azuis de cobre, catalisam a oxidação de vários compostos aromáticos, especificamente fenóis e anilinas, enquanto reduz concomitantemente oxigênio molecular e água. Lacases são encontradas em plantas insetos e bactérias, mas sua mais importante fonte são os fungos. A maioria dos estudos com aplicação dessa enzima tratam de sua fonte fúngica a partir de *Trametes versicolor*, com a capacidade de oxidar substratos orgânicos (especialmente aromáticos) e inorgânicos (ADEMAKINWA e AGBOOLA, 2016).

A lacase possui um cobre Tipo 1 (T1), um cobre do Tipo 2 (T2) e dois cobres Tipo 3 (T3) dispostos numa estrutura trinuclear formando um triângulo isósceles. A distância entre o centro T2 e T3 da enzima é de 4 Å e o íon cobre T1 está a uma distância de 12 a 14 Å do centro T2 e T3 (MOROZOVA et al., 2007, STRONG e

CLAUS, 2011). Um modelo que explica o mecanismo químico do ciclo catalítico de lacases, consistente com dados cinéticos e espectroscópicos disponíveis, tem sido proposto e está apresentado na Figura 4. O cobre do Tipo 1 existe na forma oxidada e está covalentemente ligado a uma cisteína que é responsável pela intensa cor azul destas enzimas tendo uma forte absorção eletrônica a 600 nm.

Figura 4. Ciclo catalítico de lacases mostrando o mecanismo de redução e oxidação dos sítios de cobre da enzima. (adaptado de Torres, Bustos-Jaimes e Borgne, 2003)



O T1 é o principal local de absorção eletrônica e está ligado a um aglomerado trinuclear pelo tripeptídeo de histidina-cisteína-histidina (STRONG e CLAUS, 2011). Este íon de cobre pode ser substituído por íons de mercúrio e cobalto. O T2 pode ser seletivamente removido da molécula de enzima, e este é acompanhado por uma perda significativa na atividade da enzima. O T3 é um sítio de cobre binuclear com íons de cobre emparelhados antiferromagneticamente através de uma ponte de hidróxido de

que faz este sítio diamagnético. As moléculas de cobre são geralmente coordenadas á resíduos de histidina, leucina e cisteína.

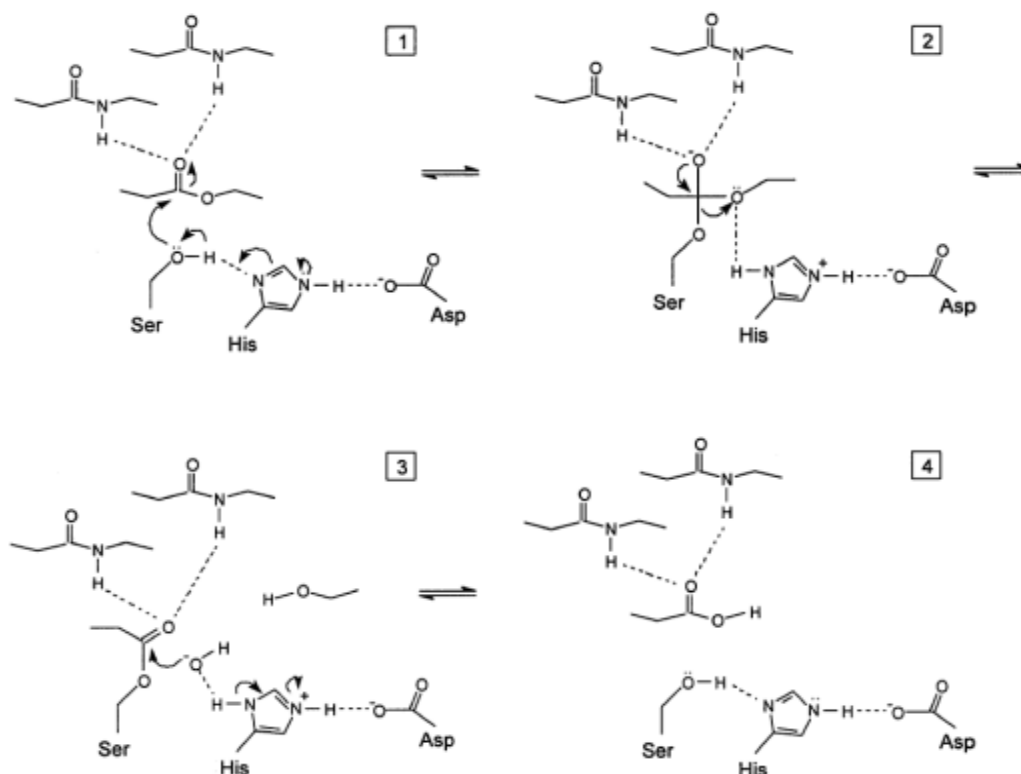
Iniciando do estado nativo, uma molécula de substrato reduz o sítio T1. A partir desse ponto, dois mecanismos distintos acontecem. (A) O sítio T1 transfere o seu elétron para o sítio T2, e T1 é novamente reduzido por uma segunda molécula de substrato; os sítios T1 e T2 transferem seus elétrons para T3. O sítio T1 é reduzido por uma terceira molécula de substrato e o elétron é novamente transferido para o sítio T2. Este processo reoxida o sítio T1, o qual é então reduzido por uma quarta molécula de substrato. Como resultado, uma forma totalmente reduzida da enzima é obtida. (B) O aglomerado trinuclear é consequentemente reduzido, durante três etapas, transferindo 1 elétron para o sítio T1, que é sequencialmente reduzido por uma molécula de substrato, terminando no mesmo estado totalmente reduzido da enzima (TORRES, BUSTOS-JAIMES e BORGNE, 2003).

Existem estudos que reportam que lacase catalisa a clivagem de anéis aromáticos o que é de interesse biotecnológico para a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitroaromáticos e corantes sintéticos. O mecanismo subjacente para a desintoxicação induzida por lacase envolve oxidação dos poluentes para libertar radicais ou quinonas que subseqüentemente sofrem polimerização e precipitação parcial. A oxidação enzimática de compostos é muitas vezes acompanhada por sua desalogenação parcial (STRONG e CLAUS, 2011). A aplicação de lacase na degradação de micotoxinas foi destacada por Alberts et al. (2009), onde a enzima obtida de uma cepa fúngica, degradou aflatoxina B₁ em 40% em meio de cultivo suplementado com sais, a mesma micotoxina também foi degradada (87%) por uma lacase obtida de *Trametes versicolor* em meio reacional enzimático (ZEINVAND-LORESTANI et al., 2015). De acordo com Banu, Lupu e Aprodu (2013), laccase também foi responsável pela degradação de outra classe de micotoxinas, zearalenona, nesse estudo, a enzima também foi obtida de *Trametes versicolor*, com uma degradação da micotoxina de 82%.

3.3.3 Lipase

Lipases (hidrolase triacilglicerol, EC 3.1.1.3) pertencem a uma família de serina-hidrolases, solúveis em água (STOYTCHIEVA et al., 2012). Na presença de água, a lipase apresenta preferências para a realização de hidrólise, alcoólise e aminólise de ligações éster (LAI et al., 2018). Lipases contém uma “tampa ou tampão” variável na região que abrange o sítio ativo e constitui a ligação com o substrato, em conjunto com um domínio do núcleo α/β -hidrolase, sua atividade depende principalmente da tríade catalítica geralmente formada por resíduos de serina (Ser), histidina (His) e aspartato/glutamato (ASCHAUER et al., 2016). A hidrólise do substrato é realizada através da formação de um intermediário tetraédrico, que é estabilizado por interações com os aminoácidos que constituem uma cavidade no sítio ativo, chamada cavidade do oxianion (FICKERS, MARTY e NICAUD, 2011). O mecanismo de ação de lipases se inicia com um ataque do átomo de oxigênio do grupo -OH do resíduo de Ser nucleofílico ao carbono carbonílico ativado do éster lipídico, ligado ao sítio ativo da enzima, na Figura 5 é possível observar o mecanismo de ação da lipase.

Figura 5. Mecanismo de reação de lipases. (adaptado de Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999)



Há a formação de um intermediário tetraédrico, com uma carga negativa no oxigênio carbonílico da ligação éster a ser clivada, e pelos quatro átomos ligados ao C carbonílico. O intermediário é estabilizado pelas ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio carbonílico (oxiânion) e entre pelo menos dois grupos -NH peptídicos da cavidade do oxiânion.

A nucleofilicidade da Ser, que ataca, é aumentada pela His do sitio catalítico, para a qual é transferido um próton do grupo -OH da Ser. A transferência desse próton é facilitada pela presença do ácido catalítico, o qual orienta o anel imidazol da His e, parcialmente, neutraliza a sua carga. A seguir, o próton é doado ao oxigênio da ligação éster, que é então clivada. Nesta fase, o componente ácido do substrato é esterificado à Ser nucleofílica (intermediário covalente), enquanto que o componente álcool se difunde no meio. Em seguida, ocorre a etapa de desacetilação, na qual uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. A His do sítio ativo, ativa essa molécula de água pela ligação a um de seus prótons. O íon OH resultante ataca o C carbonílico do grupo acil covalentemente ligado à Ser. Novamente se forma um intermediário tetraédrico com carga negativa, o qual é estabilizado por interações com a cavidade oxiânion. A histidina doa um próton ao oxigênio da serina ativa, liberando o componente acetil como ácido carboxílico, e a enzima pode iniciar a catálise de outra molécula de substrato (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; ROMANO et al., 2015).

Além de suas aplicações ambientais, as lipases também encontram relevância industrial generalizada em alimentos, detergentes, têxteis, couro, papel e setores farmacêuticos. Enzimas lipolíticas tem atraído atenção por conta de seu alto potencial biotecnológico (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006). Devido às suas propriedades únicas, as lipases são frequentemente utilizadas em vários setores industriais em: formulações de detergentes, indústria oleoquímica, biocombustíveis, alimentos e laticínios, agroquímicos, fabricação de papel e em cosméticos e produtos farmacêuticos (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015). Lipases são enzimas ubíquas e são produzidas por leveduras, fungos, bactérias e plantas (GUPTA et al., 2015).

Assim, lipases são, a escolha de enzimas para bioquímicos, farmacêuticos, químicos orgânicos, biofísicos, biotecnólogos e microbiologistas, pois a natureza regiosseletiva e enantiosseletiva das enzimas tem sido empregada para a resolução quiral de medicamentos, produção de biocombustíveis, modificação de gorduras,

síntese de cosméticos, intensificadores de sabor e à degradação dos resíduos com alta velocidade de ação. Lipases possuem a habilidade de hidrolisar substratos insolúveis em uma interface água-lipídeo, este fenômeno é chamado —“ação interfacial” e difere lipases de esterases (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015). Já para aplicação de lipase na degradação de micotoxinas, de acordo com Stander et al. (2010), uma lipase obtida de *Aspergillus niger* foi responsável pela hidrólise de Ocratoxina A em seu metabólito não tóxico, a reação ocorreu na presença de *p*-nitrofenil palmitato. Uma lipase pancreática de suínos foi efetiva na detoxificação de patulina em solução aquosa (LI et al., 2017). A mesma enzima foi aplicada na degradação de patulina em suco de maçã (TANG et al., 2018).

3.3.4 Esterase

Esterases (EC 3.1.1.1), assim como as lipases, pertencem à família de serino-hidrolases e partilham características estruturais e funcionais, incluindo uma tríade catalítica altamente conservada, uma dobra α/β -hidrolase e uma atividade independente de cofatores. Todas as proteínas nesta vasta família de hidrolases parecem partilhar um mecanismo fundamental comum, tendo em seu sítio ativo uma tríade catalítica consistindo de um nucleófilo (Ser, aspartato (Asp) ou cisteína (Cys)), uma His e um ácido carboxílico (Asp ou glutamato) (ROMANO et al., 2015). Porém, esterases diferem de lipases por não terem a capacidade para hidrolisar triglicéridos na interface lipídio-água (FICKERS, MARTY e NICAUD, 2011). As esterases exibem especificidade ampla de substrato catalisando não só a hidrólise da ligação éster de ácido graxo de cadeia curta, mas também ligações não-éster tais como tiois, amidas e carbamatos. Comparado com as lipases, as esterases atuam sobre substrato solúvel em água (LAI et al., 2018).

Esterases tornaram-se objetos de interesse especial para investigação estrutural e para uma ampla gama de aplicações biotecnológicas (ZHU et al., 2013). De acordo com Romano et al. (2015), essas enzimas têm sido quase sempre reconhecidas por sua ação sobre os ésteres solúveis em água, que ostentam os resíduos de acetil de cadeia curta (< 8 átomos de carbono). As esterases formam um grupo multifuncional e

heterogêneo de isoenzimas com característica comum a hidrólise de ésteres e outros compostos, como peptídios, amidas e haletos.

Com base neste critério, quatro classes de esterases são diferenciadas: (1) acetilesterases, que não são afetadas por inibidores e geralmente têm maior afinidade por substratos alifáticos, envolvendo derivados do ácido acético; (2) arilesterase, que são inibidas somente por reagentes sulfidrílicos e atuam principalmente sobre substratos aromáticos; (3) carboxilesterases, são inibidas somente por organofosforados e sua maior afinidade se dá por ésteres alifáticos, geralmente ácidos de cadeias longas; (4) colinesterase, que são inibidas por organofosforados e carbamatos e atuam preferencialmente sobre substratos como ésteres de colina a outros ésteres alifáticos e aromáticos, podendo ser separadas em acetilcolinesterases e pseudocolinesterases (OAKESHOTT et al., 1993). Em seu emprego na degradação de micotoxinas, a esterase foi responsável pela degradação de zearalenona (95,7%) (WANG et al, 2017). Também tem sido utilizada em uma formulação (FUMzyme), em que uma esterase obtida *Komagataella pastoris*, é utilizada para degradar fumonisinas encontradas como contaminantes de rações para suínos (EFSA, 2014).

3.4 USO DAS ENZIMAS EM PROCESSOS ALIMENTÍCIOS

Enzimas constituem uma alternativa eficiente na indústria de alimentos por serem específicas, seguras e amigáveis ao meio ambiente. Os métodos enzimáticos de processamento são utilizados atualmente para produzir vários alimentos, incluindo produtos lácteos, bebidas como cerveja, gorduras, óleos, carne e alimentos funcionais (ZHANG, HE e SIMPSON, 2018).

A atividade de enzimas peroxidases, é geralmente considerada prejudicial à qualidade sensorial, sendo relacionada a alterações de sabor e cor em produtos vegetais crus e não lavados. Assim, na indústria de alimentos, um processamento térmico deve ser utilizado para inativação da peroxidase. Esse tratamento é frequentemente utilizado como índice de adequação do processamento: uma vez que esta enzima sendo inativada, assume-se que outras enzimas também estejam. Um dimensionamento adequado e correto do processamento é primordial para garantir produtos, como sucos, de melhor qualidade (KUBO et al., 2017). Esta garantia se

estende também para o caso de uma contaminação por tricotecenos, em vista de que a presença de peroxidase, mesmo que durante pouco tempo antes de sua inativação, já representa ação degradativa de compostos tóxicos.

A lacase pode ser adicionada ao mosto ou no final do processo para remover os polifenóis que ainda podem permanecer na cerveja. O efeito *hazing* é um defeito de qualidade da mesma, que se caracteriza pelo escurecimento no produto final. Os complexos de polifenóis formados por lacases podem ser separados por filtração e eliminam a probabilidade de ocorrência do efeito *hazing*. Lacase também pode remover o excesso de oxigênio na cerveja, aumentando a vida útil. Em sucos de frutas, como maçã e uva, o excesso de oxidação de compostos fenólicos causa efeitos negativos no sabor, cor, odor, bem como outras características sensoriais. Em sucos, lacase foi indicada também por retardar a oxidação de polifenóis (OSMA, TOCA-HERRERA e RODRIGUEZ-COUTO, 2010).

Esterases e lipases de *Lactobacillus casei* CL96 foram utilizadas para a hidrólise da gordura do leite com o objetivo de melhorar o sabor durante fabricação de produtos relacionados ao queijo. Os ácidos hidroxicinâmicos (HCA), como ácidos ferúlicos, sinápticos, cafeicos e *p*-cumáricos, são amplamente aplicados nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos devido aos seus perfis de sabor desejáveis. Feruloil e cinamoil esterase, de forma sinérgica com pectinases, celulosas e xilanases, também podem ser utilizados para hidrolisar ésteres de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, farelo de milho, farelo de arroz, grãos usados de cerveja, cana-de-açúcar, bambus, polpa de beterraba e vários subprodutos agroindustriais, e liberando os HCAs benéficos (LAI et al., 2018). Também de acordo com Lai et al. (2018), as aplicações de lipase e esterase, particularmente no setor alimentar e farmacêutico, podem ser exploradas ainda mais para atender a demanda dos consumidores por alimentos seguros, saudáveis e nutritivos.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de alimentos por tricotecenos é um fator de preocupação mundial, por sua toxicidade e recorrente presença em níveis superiores aos preconizados nas legislações vigentes. No Brasil, a regulamentação para níveis

máximos toleráveis desses compostos ainda é precária, a regulamentação é apenas para DON. O estudo de degradação desses compostos por ação de enzimas vem ganhando cada vez mais destaque, tendo em vista que estas podem ser aplicadas na indústria de alimentos, apresentam especificidade de ação e condições de reação brandas e possíveis de serem controladas em escala industrial. Desta forma, há a necessidade de aprofundar a avaliação da interação de enzimas com tricotecnos, investigando o mecanismo enzimático de ação e a cinética das enzimas sobre os contaminantes, bem como identificar produtos de degradação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Preparo de enzimas e padrão dos tricotecenos A e B

Os padrões dos tricotecenos toxina T-2, DON, NIV, 3-ADON e 15-ADON, foram adquiridos da *Sigma Chemical Company* (E.U.A.). Para o preparo das soluções estoque, estas foram solubilizadas em benzeno:acetonitrila (95:5, v/v), exceto NIV, que foi solubilizado em benzeno:acetonitrila (50:50, v/v) (AOAC, 1995), onde todas as soluções estavam na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções de trabalho foram obtidas da diluição das soluções estoque para a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. A determinação das concentrações das soluções, dos tricotecenos tipo B, foi realizada pela relação massa/volume e confirmadas pelo procedimento descrito por Krska et al. (2007) utilizando a absorvidade molar do padrão em acetonitrila, de acordo com a Tabela 6.

A quantificação de toxina T-2 seguiu de acordo com as conclusões do estudo de Bennett e Shotwell (1990), onde na solução estoque foi mantida a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 6. Absortividades molares e comprimentos de onda de máxima absorbância de cada tricoteceno em estudo (KRSKA et al., 2007).

Tricotecenos	Absortividade molar (ϵ) ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Comprimento de onda de máxima absorção (nm)
DON	6808	220
NIV	6836	220
3-ADON	6911	220
15-ADON	6895	220

Os padrões das enzimas: peroxidase Horseradish (275 U mg^{-1}), lacase obtida de *Trametes versicolor* ($0,92 \text{ U mg}^{-1}$), lipase obtida de *Aspergillus niger* ($164,1 \text{ U g}^{-1}$) e esterase obtida a partir de *Rhizopus oryzae* (151 U g^{-1}), também foram adquiridos da Sigma Chemical Company (E.U.A.). As atividades enzimáticas foram determinadas a partir da solubilização de 0,1 g da enzima comercial em 10 mL de água ultrapura.

Desta solução seguiram-se diluições sucessivas até ser encontrada a concentração adequada para determinação da atividade enzimática.

A solução modelo foi constituída de solução tampão sem adição do substrato. Para as enzimas oxidoredutases foi usado tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 5,0 e para as enzimas hidrolíticas foi usado tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0.

4.1.2 Instrumentação

- Balança analítica de precisão FA2104N (Bioprecisa, São Paulo, Brasil);
- Banho termostático com agitação – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico 40 kHz, 150 W - UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico UNIQUE Ultra Cleaner 700 (São Paulo, Brasil);
- Bomba de vácuo Primatec – (São Paulo, Brasil);
- Capela de exaustão
- Coluna analítica Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); (Phenomenex, Torrance, USA);
- Concentrador TECNAL TE-019 (São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo líquido Shimadzu, disponível no Laboratório de Micotoxinas - FURG, equipado com sistema administrador CBM-20A módulo LC-20AT, degaseificador DGU-20A5 e detector UV-VIS SPD-20A, conectado em *software LC solution data acquisition*, amostrador automático;
- Cromatógrafo a líquido Waters (Milliford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição isocrática, detector por arranjo de diodos 2996, sistema de aquisição de dados software Empower PDA.
- Cromatógrafo líquido Agilent 1200 series (Agilent, B lingen, Alemanha), equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, separador de massas API 3200 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha), utilizado no modelo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Analyst 1.6.2 (Sciex, Darmstadt, Alemanha).
- Cromatógrafo líquido acoplado a arranjo de diodo (PDA) conectado a sistema de quadrupolo aliado a trap linear (LTQ) e trap orbital (Orbitrap XL) Accela LC

60057-60010 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), espectrômetro de massa (Thermo Fisher Scientific). A análise dos dados ocorreu em software Xcalibur 2.07 SP1 (Thermo Scientific).

- Destilador de água QUIMIS 341-25 (São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), AVANCE III HD Bruker 400 MHz.
- Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com reflectância total atenuada total horizontal (IR Prestige-21 Shimadzu, modelo A210045 – Japão).
- Espectrofotômetro Biospectro SP220 (São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80;
- Estufa (temperatura 120 °C) – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Membrana de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro de 47 mm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil) com utilização na filtração de solventes para HPLC.
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 – 1000 μL ;
- Microcentrífuga Eppendorf Mini Spin AG 22331;
- pHmetro Lutron pH 206
- Shaker incubadora Tecnal TE-420 – (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração em membrana Supelco (E.U.A);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3 Millipore (Millipore, E.U.A).
- Vórtex Biomixer Vtx-2500;
- Vidraria de rotina laboratorial (balões volumétricos, tubos de ensaio, copo de béquer, ...).

4.1.3 Reagentes e solventes

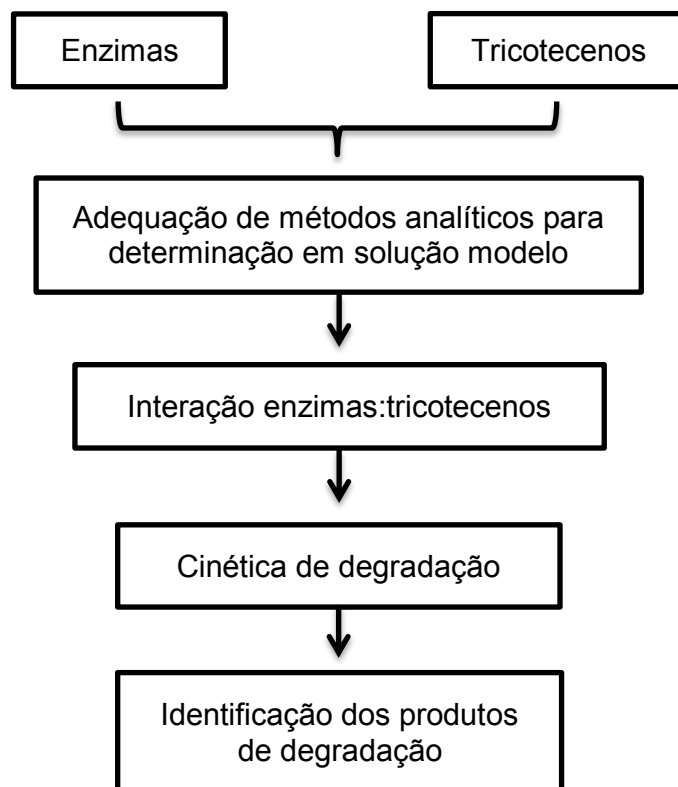
- Acetato de sódio anidro P.A. 99% (Vetec, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Panreac, Espanha);
- Ácido acético glacial P.A. 99,7% (Synth, Brasil);
- Ácido fórmico grau HPLC (Merck, Alemanha);

- Água destilada;
- Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Benzeno P.A. (Vetec, Brasil);
- Cloreto de sódio (Synth, Brasil);
- Clorofórmio P.A. (Proquimios, Brasil);
- Clorofórmio deuterado P.A. (*Sigma Chemical Company* – E.U.A.);
- Fosfato de sódio monobásico (Vetec, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec, Brasil);
- Guaiacol P.A. (Vetec, Brasil);
- Gás nitrogênio;
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA);
- Padrões analíticos: Toxina T-2, Deoxinivalenol, Nivalenol, 3-acetildeoxinivalenol e 15-acetildeoxinivalenol (*Sigma Chemical Company* – E.U.A.);
- Padrões das enzimas Peroxidase Horseradish, lacase obtida de *Trametes versicolor*, Lipase obtida de *Aspergillus niger* e Esterase obtida de *Rhizopus oryzae* (*Sigma Chemical Company* – E.U.A.);
- Peróxido de hidrogênio 30% (Êxodo Científica, Brasil);
- Solução tampão Hepes (*Sigma Chemical Company* - E.U.A.);
- Tetrahidrofurano 99% (*Sigma Chemical Company* - E.U.A.);
- Triton X-100 (*Sigma Chemical Company* - E.U.A.);
- 2,2'-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) sal diamônio 98% (*Sigma Chemical Company* - E.U.A.);
- *p*-nitrofenilbutirato (*Sigma Chemical Company* - E.U.A.).

4.2 MÉTODOS

A representação gráfica das atividades executadas nesse estudo está descrito na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática do desenho experimental do estudo.



4.2.1 Medida de atividade enzimática

As enzimas em estudo apresentam diferenças em seu sistema reacional (tipo de sal tamponante, pH e concentração salina). Para avaliar a ação destas enzimas nos tricotecenos, foi necessário estudar um sistema modelo padrão que mantivesse ação enzimática. Assim, foram avaliados: o tipo de sal tamponante empregando tampão fosfato em todos os sistemas, concentração e pH do tampão fosfato.

A atividade das enzimas peroxidase, lacase, lipase e esterase, foram calculadas de acordo com Kurt, Uckaya e Durmus (2017), onde uma unidade da enzima (U) foi

definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar ou hidrolisar 1 μmol de substrato por min. Todas as medidas de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

4.2.1.1 Condições de ensaio

De acordo com o fabricante, a enzima lacase é quantificada utilizando solução tamponante constituída de acetato de sódio como sal tamponante e ácido acético. Na quantificação das demais enzimas em estudo, o fabricante indica a utilização de fosfato de sódio como sal tamponante. Assim, tampão fosfato utilizando os sais fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico e o tampão acetato utilizando o sal acetato de sódio e ácido acético, foram verificados quanto sua influência na atividade da enzima lacase.

A enzima peroxidase é quantificada utilizando tampão fosfato na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Na quantificação das demais enzimas, a concentração do tampão utilizado é de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Assim, as concentrações de $0,05$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foram avaliadas quanto a sua influência na atividade da enzima.

As enzimas em estudo apresentaram diferentes valores de pH para medida de sua atividade ótima (lacase pH 5, peroxidase pH 6 e lipase e esterase pH 7). Assim, para aplicação das enzimas, foi testado o emprego do tampão fosfato pH 5 e pH 7 para a medida das atividades das enzimas.

4.2.1.2 Avaliação das atividades enzimáticas

A medida da atividade enzimática da enzima peroxidase foi realizada conforme estabelecido pelo fabricante, pela oxidação do guaiacol, com modificações de acordo com método de Feltrin et al. (2017a). Considerado ϵ_{470} do guaiacol $26600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da lacase foi medida de acordo com Tavares et al. (2015), através da oxidação do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzothiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio (ABTS). Considerando o ϵ_{420} do ABTS $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

E por fim, para lipase e esterase, a medida da atividade lipolítica do extrato enzimático foi realizada de acordo com Gathi e Paul (2015), pela hidrólise do substrato

o sintético *p*-NPB. A medida espectrofotometricamente foi realizada a 405 nm ($\epsilon_{405} = 15245 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.1.3 Interações enzimáticas

A fim de verificar o efeito sinérgico das enzimas sobre a degradação dos tricotecenos, foi avaliada a atividade das mesmas no sistema reacional, nas condições padronizadas de sal tamponante, concentração do tampão e pH (Tabela 7). A enzima lacase não foi avaliada perante interação com as enzimas lipase e esterase, por esta não apresentar ação diante das condições reacionais das enzimas hidrolíticas.

Tabela 7. Demonstração dos sistemas reacionais testados quanto ação sinérgica enzimática.

Meio reacional	Enzima adicionada			
	Lacase	Peroxidase	Lipase	Esterase
Lacase		X	-	-
Peroxidase	X		X	X
Lipase	-	X		X
Esterase	-	X	X	

X - adição da enzima; - sistema não avaliado devido a condições reacionais

4.2.2 Adequação da determinação de Tricotecenos A e B

As condições cromatográficas utilizadas para separação e quantificação dos tricotecenos em estudo foram otimizadas em HPLC-UV a partir das condições descritas por De Souza et al. (2015) para a detecção de um tricoteceno tipo A (toxina T-2) juntamente com DON e por Seus (2014), que realiza a determinação de tricotecenos do tipo B (NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON). Os solventes utilizados para eluição dos compostos foram: acetonitrila (MeCN) e água ultra pura de sistema Milli-Q com resistividade de 18,2 M Ω cm, a MeCN utilizada no sistema foi filtrada em bomba de vácuo com a utilização de membranas filtrantes em nylon de 0,45 μm e desgaseificada durante 30 min em banho ultrassônico de 40 kHz em temperatura ambiente.

A avaliação da separação dos tricotecenos foi realizada, em padrões diluídos e preparados conforme item 4.1.1, através do tempo de retenção (t_R) de cada analito,

fator de retenção (k) (Equação 1) e fator de separação (α) (Equação 2) (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: k é o fator de retenção, t_R é o tempo de retenção de um analito, tempo transcorrido desde a injeção até o ponto de máximo do pico, t_M é o tempo de retenção de um analito não retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{Rb} - t_M}{t_{Ra} - t_M} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: α é o fator de separação, k_2 é o fator de retenção do segundo composto a eluir na corrida cromatográfica, k_1 é o fator de retenção do primeiro composto a eluir na corrida cromatográfica, t_{Ra} é o tempo de retenção do primeiro composto a eluir na corrida cromatográfica, t_{Rb} é o tempo de retenção do segundo composto a eluir na corrida cromatográfica.

4.2.3 Preparo de amostra

Uma alíquota das soluções padrões dos tricotecenos (1 μ g) foi solubilizado em solução modelo (na presença ou ausência de cofatores enzimáticos). Após homogeneização em vórtex (30 s) e banho ultrassônico (3 min), duas técnicas de extração foram avaliadas quanto a sua eficiência na extração dos tricotecenos de ambos sistemas de solução modelo (pH 5 e pH 7). As técnicas de extração foram a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) com clorofórmio (CH_3Cl) e extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction*).

a) Extração líquido-líquido

Na solução modelo previamente fortificada com tricotecenos foi adicionado CH_3Cl como solvente extrator (1:3, v/v), seguido de agitação em vórtex (30 s) e banho

ultrassônico (3 min) e separada a fração orgânica. Em seguida, a partição utilizando CH₃Cl foi repetida por mais duas vezes. As alíquotas da fase contendo CH₃Cl foram combinadas e evaporadas a 60 °C em banho termostático para concentração das amostras (NORA, 2015). As amostras foram armazenadas sob temperatura de congelamento até o momento de análise, onde foram aferidas a 1 mL com MeCN. A recuperação foi calculada de acordo com a Equação 3.

b) Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*

A técnica de extração SALLE empregada foi adaptada do método estabelecido por Tabata et al. (1994). A solução padrão fortificada com tricotecenos, foram adicionados 2,33 mL de MeCN (solvente extrator), e agitados em vórtex (30 s) e banho ultrassônico (3 min). Logo após, foi adicionado ao sistema 0,25 g de cloreto de sódio (NaCl), seguido de nova agitação em vórtex (30 s) e banho ultrassônico (3 min) para melhor separação das fases. A extração foi repetida por mais duas vezes, com a adição de 1 e 0,5 mL de MeCN ao sistema modelo.

As alíquotas da fase contendo MeCN foram combinadas, homogeneizadas e evaporadas a 65 °C em banho termostático para concentração das amostras. As amostras foram armazenadas em temperatura de congelamento até o momento de análise, onde foram aferidas a 1 mL com MeCN. A recuperação foi avaliada de acordo com a Equação 3. Neste método, foi avaliada a adição de NaCl em diferentes quantidades, 0,1; 0,25 e 0,5 g, com o objetivo de descartar a influência do sal na separação das fases.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida após extração}}{\text{Concentração de contaminação}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

4.2.4 Validação de método analítico

Após as condições de separação e quantificação dos tricotecenos estabelecidas, foi realizada a validação do método analítico. Os parâmetros de qualidade para validação do método avaliados foram: linearidade, curva analítica, limite de detecção

(LOD) e limite de quantificação (LOQ), seletividade e precisão (repetibilidade) (RUIZ-ANGEL, 2014; SANTE, 2015).

4.2.4.1 Linearidade e curva analítica

A avaliação da linearidade (r) foi realizada a partir da curva analítica, com relação à área do pico do analito (sinal da amostra – sinal do branco) (EURACHEM/CITAC, 2000). Para construção das curvas analíticas foi preparada uma solução padrão contendo a mistura de todos os compostos em estudo, sendo também construída uma curva individual para 3-ADON e 15-ADON, por não ser possível a separação destes compostos que são isômeros de posição. Cada solução foi injetada três vezes.

4.2.4.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A detectabilidade do instrumento foi estabelecida de acordo com os limites de detecção e quantificação. Os LOD e LOQ foram estimados pela calibração externa no solvente, obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas através de diluições sucessivas da solução padrão trabalho em estudo (EURACHEM/CITAC, 2000), estes valores foram relacionados com a relação sinal/ruído considerando, respectivamente a concentração que gerou no mínimo um sinal de 3,3 e 10 vezes maior que a razão do sinal pela linha de base (ruído).

4.2.4.3 Precisão

Para avaliar a precisão instrumental foram feitas injeções sucessivas das soluções padrões na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 10$), esta foi estimada através do desvio padrão relativo (RSD) com relação a média das áreas de todas as injeções. A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade, onde foram realizados ensaios de extração e quantificação utilizando o método SALLE. O procedimento de extração foi testado em relação a suas recuperações em 3 níveis de contaminação (1, 5 e 10 vezes de LOQ) em pH 5,0 e pH 7,0 para toxina T-2, DON, NIV, 3-ADON, 15-

ADON e ADONS, os valores de recuperação calculados foram baseados na Equação 4. A partir das injeções das triplicatas foi calculado o RSD (%) (Equação 4).

$$RSD (\%) = \frac{s}{Xm} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: *s* é a estimativa do desvio padrão e *Xm* é a média de uma série de medidas (replicatas).

4.2.4.4 Seletividade

A seletividade foi avaliada pelo sinal do analito gerado em HPLC-DAD através do espectro eletrônico do sinal do analito comparado ao do padrão analítico.

4.2.5 Degradação enzimática dos tricotecenos

Os ensaios iniciais de degradação dos níveis dos tricotecenos A e B ocorreram nas condições ótimas de cada enzima (solução modelo e temperatura de reação), previamente determinadas neste estudo, utilizando um volume total de sistema modelo de 1 mL, contendo a seguinte composição:

Controle 1 - solução modelo na presença de tricoteceno e ausência de enzima;

Controle 2 - solução modelo na ausência de tricoteceno e presença de enzimas;

Tratamento - solução modelo e adição de tricoteceno e de enzima.

Os ensaios foram avaliados em triplicata. As micotoxinas foram adicionadas aos vials, secas sob corrente de nitrogênio e solubilizadas em solução modelo com o auxílio de vórtex (30 s) e banho ultrassônico (3 min), seguidas pela adição da enzima. A concentração, pH e tipo de sal tamponante empregados no sistema modelo, corresponderam as definidas no item 4.2.1. Todos os ensaios foram realizados sob agitação orbital a 150 rpm. Após incubação, foi realizada a extração, concentração e armazenamento das amostras para quantificação das micotoxinas residual. O percentual de degradação dos tricotecenos e a velocidade de degradação foram determinados conforme as Equações 5 e 6.

$$Degradação = \left(1 - \left(\frac{\text{concentração residual}}{\text{concentração inicial}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: *concentração_{residual}* é o nível de tricoteceno após tempo de reação e *concentração_{inicial}* é o nível de tricoteceno utilizada na fortificação do sistema.

$$Velocidade \text{ de degradação} = \frac{\% \text{ de degradação}}{U \text{ mL}^{-1} \times t} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde: *concentração_{inicial}* é o nível de tricoteceno utilizado na fortificação do sistema; *concentração_{residual}* é o nível de tricoteceno após tempo de reação; $U \text{ mL}^{-1}$ é a concentração enzimática adicionada ao sistema modelo e t é o tempo de reação (min).

A Tabela 8 mostra os ensaios realizados utilizando diferentes concentrações das enzimas, dos tricotecenos e em diferentes tempos de incubação. Todos os parâmetros foram estabelecidos de acordo com estudos preliminares. Para realização da incubação da enzima peroxidase com todos os tricotecenos em estudo, foi utilizado como base as condições reacionais descritas por Feltrin et al. (2017b), já avaliadas para esta enzima e DON. Com a definição do melhor tempo reacional para todas as enzimas, DON foi incubado com as diferentes enzimas avaliando três diferentes concentrações (Tabela 9). O critério para escolha de DON foi baseado na estrutura química desse composto, esta é a estrutura base de todos os tricotecenos.

Na condição com maior degradação de DON, foram realizadas as incubações para as demais micotoxinas (3-ADON, 15-ADON e toxina T-2), mantendo as seguintes condições: concentração dos analitos ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tempo de análise em 2 h. A lipase também foi avaliada quanto ao potencial de degradação nas condições de degradação, utilizando as condições de ação da enzima esterase, obtidas dos estudos preliminares. A partir dos dados obtidos, foi avaliada a concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DON, 3-ADON e 15-ADON, e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para toxina T-2. Na sequência, foi avaliada a concentração das enzimas de 0,001 a 1 U mL^{-1} , mantendo o tempo de incubação de toxina T-2 em 6 h e para os demais tricotecenos em 2 h. As condições empregadas nos ensaios encontram-se descritas na Tabela 10.

Tabela 8. Ensaios preliminares de incubação das enzimas lacase, peroxidase e esterase com os tricotecenos.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Proteína (µg)	Micotoxina	µg mL ⁻¹	Tempo (min)	Proporção E:S (µg:µg)
Lacase	0,63	45	DON	0,5	30	83:1
	0,63	45	DON	0,5	60	83:1
	0,63	45	DON	0,5	120	83:1
	0,63	45	15-ADON	1	120	42:1
	2,25	160	DON	0,5	60	296:1
	0,67	48	3-ADON	1	120	48:1
	0,67	48	Toxina T-2	1	120	48:1
Peroxidase	0,12	0,8	DON	1	180	1:1,2
	0,12	0,8	3-ADON	1	180	1:1,2
	0,12	0,8	15-ADON	1	180	1:1,2
	0,12	0,8	Toxina T-2	1	180	1:1,2
Esterase	0,04	240	15-ADON	1	30	226:1
	0,04	240	15-ADON	1	60	226:1
	0,04	240	15-ADON	1	120	226:1
	0,08	528	15-ADON	1	60	500:1
	0,08	528	15-ADON	1	120	500:1
	0,08	528	DON	0,5	240	980:1
	0,08	528	DON	0,5	1440	980:1
	0,08	528	3-ADON	1	120	528:1
	0,08	528	Toxina T-2	1	120	528:1

Tabela 9. Condições empregadas nos ensaios de degradação de DON (2 µg mL⁻¹) utilizando diferentes atividades enzimáticas, após 2 h de incubação.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Proteína (µg)	Proporção E:S (µg:µg)
Lacase	0,001	0,71	1:3
	0,0001	0,071	1:28
	0,00001	0,007	1:286
Peroxidase	0,001	0,66	1:3,3
	0,0001	0,06	1:33
	0,00001	0,006	1:333
Lipase	0,001	500	250:1
	0,0001	50	25:1
	0,00001	5	2,5:1
Esterase	0,001	66	33:1
	0,0001	6,6	3,3:1
	0,00001	0,66	1:3

E:S – Proporção enzima:substrato

Tabela 10. Efeito do aumento do tempo de incubação, atividade enzimática e concentração de tricotecenos na degradação das micotoxinas.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Proteína (µg)	Micotoxina	µg mL ⁻¹	Tempo (h)	Proporção E:S (µg:µg)
Lacase	0,15	11	DON	2	2	5,5:1
	0,15	11	3-ADON	2	2	5,5:1
	0,15	11	15-ADON	2	2	5,5:1
	0,15	11	Toxina T-2	5	6	2,2:1
Peroxidase	1	6,6	DON	2	2	3,3:1
	1	6,6	3-ADON	2	2	3,3:1
	1	6,6	15-ADON	2	2	3,3:1
	1	6,6	Toxina T-2	5	6	1,3:1
	0,62	4,1	3-ADON	2	2	2:1
	0,62	4,1	15-ADON	2	2	2:1
	0,62	4,1	Toxina T-2	5	6	1:0,8
Lipase	0,025	1250	DON	2	2	625:1
	0,025	1250	3-ADON	2	2	625:1
	0,025	1250	15-ADON	2	2	625:1
	0,025	1250	Toxina T-2	5	6	250:1
Esterase	0,025	150	DON	2	2	75:1
	0,025	150	3-ADON	2	2	75:1
	0,025	150	15-ADON	2	2	75:1
	0,025	150	Toxina T-2	5	6	30:1
	0,001	66	3-ADON	2	2	33:1
	0,001	66	15-ADON	2	2	33:1
	0,001	66	Toxina T-2	5	6	13:1
	0,0001	6,6	3-ADON	2	2	3,3:1
	0,0001	6,6	15-ADON	2	2	3,3:1
	0,0001	6,6	Toxina T-2	5	6	1,3:1

4.2.5.1 Efeito do mediador redox enzimático ABTS na ação da enzima lacase

Com a concentração enzimática estabelecida, foi testado o efeito de diferentes concentrações do ABTS (0; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5 e 0,75 mmol L⁻¹) na atividade da enzima lacase durante processo de degradação.

4.2.5.2 Efeito do cofator H₂O₂ na ação da enzima peroxidase

O efeito da concentração do cofator na ação da enzima peroxidase foi avaliado nas concentrações de 6,7; 13,5; 27; 40,5 e 67,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂ adicionadas ao sistema reacional prévia a adição a enzima.

4.2.6 Parâmetros de controle enzimático

Os parâmetros K_M, K_{0,5} e V_{máx} foram determinados para as enzimas lacase, peroxidase, lipase e esterase, utilizando como substrato cada tricoteceno de forma separada. Estes valores foram avaliados a partir da definição da concentração enzimática e tempo de incubação dos sistemas. As concentrações de tricotecenos tipo B variaram de 1 à 5 µg mL⁻¹ (com intervalos de 0,5 µg mL⁻¹) e de toxina T-2 de 4 à 12 µg mL⁻¹ (com intervalos de 1,2 µg mL⁻¹). O tempo de incubação foi de 120 min para todas as enzimas e os ensaios executados em triplicata e comparados ao experimento controle, na presença da micotoxina e ausência da enzima.

O efeito da concentração dos tricotecenos sobre a ação enzimática foi investigada a partir da determinação dos modelos de ligação. Avaliando, a ligação da enzima com um único substrato descrita pelos modelos de Michaelis-Menten e Briggs-Haldane, a ligação da enzima com dois ou mais substratos descrita pela nomenclatura de Cleland e a avaliação de um modelo cinético cooperativo ou sigmoidal. Ambos os modelos foram identificados a partir do gráfico da velocidade *versus* a concentração do substrato (tricoteceno), onde os parâmetros foram obtidos por meio da linearização da equação de Michaelis-Menten, através dos métodos gráficos de Lineweaver-Burk (LB), Hanes-Woolf (HW) e Eadie-Hofstee (EH), onde os valores de K_M e V_{máx} foram calculados a partir dos coeficientes angular e linear, respectivamente, de acordo com as Equações 7, 8 e 9. A avaliação dos componentes gráficos das linearizações (Tabela 11), permitiu determinar o modelo de cinética enzimática para cada interação enzima-tricoteceno.

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_{máx}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad \text{Equação (7)}$$

$$\frac{[S]}{v} = \left(\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}\right) [S] + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (8)}$$

$$v = -K_M \left(\frac{v}{[S]}\right) + V_{m\acute{a}x} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (9)}$$

No caso de um modelo cinético cooperativo, a avalia\c{c}\~{a}o ocorreu atrav\~{e}s do m\~{e}todo gr\~{a}fico obtido por meio da lineariza\c{c}\~{a}o da equa\c{c}\~{a}o de Hill (Equa\c{c}\~{a}o 10), o m\~{e}todo gr\~{a}fico \~{e} expresso pelo gr\~{a}fico de $\log (v_0 / V_{m\acute{a}x} - v_0)$ *versus* $\log [S]$, sendo uma reta com declive h .

$$\log \frac{v_0}{V_{m\acute{a}x} - v_0} = h \log [S] - \log (K_{0,5}) \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (10)}$$

Tabela 11. Componentes gr\~{a}ficos das lineariza\c{c}\~{o}es da equa\c{c}\~{a}o de Michaelis-Menten.

M\~{e}todo gr\~{a}fico	Eixo x	Eixo y	Intersec\c{c}\~{a}o	
			Eixo x	Eixo y
LB	1/[s]	1/v ₀	- 1/K _M	1/V _{m\acute{a}x}
EH	v ₀ /[s]	v ₀	V _{m\acute{a}x} /K _M	V _{m\acute{a}x}
HW	[s]	[s]/v ₀	K _M /V _{m\acute{a}x}	- K _M
Hill	log [s]	log = $\frac{v_0}{V_{m\acute{a}x} - v_0}$	log K _{0,5}	- h log K _{0,5}

LB – Lineweaver-Burk; EH – Eadie-Hofstee; HW - Hannes-Woolf; Hill – Lineariza\c{c}\~{a}o de Hill

4.2.7 Cin\~{e}tica de degrada\c{c}\~{a}o de tricotecenos

A cin\~{e}tica da degrada\c{c}\~{a}o dos tricotecenos ao longo 24 h foi realizada em reator tipo Erlenmeyer, com volume \~{u}til de 125 mL, onde a fortifica\c{c}\~{a}o das micotoxinas foi realizada adicionando solu\c{c}\~{a}o padr\~{a}o (Tabela 12) e o solvente evaporado sob corrente de nitrog\~{e}nio. Posteriormente, foi adicionada ao reator a solu\c{c}\~{a}o modelo padronizada para a a\c{c}\~{a}o de cada enzima estudada (0,05 mol L⁻¹ com pH 5 para as enzimas oxidativas e 0,05 mol L⁻¹ com pH 7 para as enzimas hidrol\~{i}ticas), conforme avaliado nesse estudo. A massa do tricoteceno adicionado ao reator foi solubilizada em solu\c{c}\~{a}o modelo com o aux\~{i}lio de v\~{o}rtex (30 s) e banho ultrass\~{o}nico (3 min).

A adi\c{c}\~{a}o da enzima ao sistema foi realizada ap\~{o}s o emprego do banho ultrass\~{o}nico, completando o volume \~{u}til do reator de 20 mL. O reator foi incubado

durante 24 h sob agitação orbital (150 rpm) a 30 ± 2 °C para enzimas oxidativas e 37 ± 2 °C para enzimas hidrolíticas. Nos intervalos de tempo de 0 e 45 min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h, foram retiradas alíquotas para posterior extração e quantificação das micotoxinas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e comparados com o controle (branco) na presença da micotoxina e na ausência enzimática. O percentual de degradação foi determinado conforme Equação 5.

Tabela 12. Condições reacionais empregadas em avaliação de cinética de degradação.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Proteína (µg)	Micotoxina	µg mL ⁻¹	Proporção E:S (µg:µg)
Lacase	0,15	71	3-ADON	2,0	37,5:1
	0,00001	0,006	DON	4,1	1:683
Peroxidase	0,62	4,1	3-ADON	3,8	1,2:1
	0,62	4,1	15-ADON	2,7	1,5:1
	0,62	4,1	ToxinaT-2	7,7	1,8:1
	0,00001	1250	DON	2,0	658:1
Lipase	0,025	1250	3-ADON	2,0	658:1
	0,025	1250	15-ADON	3,0	416:1
	0,0001	0,66	DON	3,6	1:5,5
Esterase	0,0001	0,66	3-ADON	3,0	1:4,5
	0,001	6,6	15-ADON	2,0	3,6:1

A ordem de reação (n) foi determinada por meio da plotagem dos valores de concentração dos tricotecenos *versus* o tempo de ação enzimática de cada tratamento. A correlação linear foi determinada utilizando diferentes modelos (pseudo-primeira ordem, primeira ordem e segunda ordem) definidos pelo melhor ajuste que utiliza como critério o coeficiente de determinação (R²).

A constante da velocidade de reação (k) foi determinada por meio do coeficiente angular da reta que determinou a ordem da reação. As formas integradas dos modelos de zero, primeira e segunda ordem são dadas de acordo com as Equações 11, 12 e 13, respectivamente, de acordo com proposto por Remini et al. (2015).

$$C = C_0 - kt \quad \text{Equação (11)}$$

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad \text{Equação (12)}$$

$$\frac{1}{c} - \frac{1}{c_0} = kt \quad \text{Equação (13)}$$

Onde: C é a concentração final do tricoteceno, C₀ é concentração inicial do tricoteceno e k é a constante da velocidade.

O tempo de meia vida (t_{1/2}) será determinado por meio do tempo necessário para que os valores da concentração dos tricotecenos se reduzam à metade do valor inicial, utilizando uma das seguintes equações, conforme a ordem de reação determinada: ordem zero (Equação 14), primeira ordem (Equação 15), segunda ordem (Equação 16).

$$t_{1/2} = \frac{[C]}{2k} \quad \text{Equação (14)}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação (15)}$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[C_0]} \quad \text{Equação (16)}$$

O valor D, ou o tempo necessário para redução de um log 10 na concentração do composto (ou seja, a redução de 90% da concentração do composto), foi calculado de acordo com a Equação 17 (REMIMI et al., 2015).

$$D = \frac{\ln 10}{k} \quad \text{Equação (17)}$$

A avaliação termodinâmica foi realizada para a temperatura ótima de ação de cada enzima utilizada no estudo de degradação de cada tricoteceno, e expressa em termos de energia livre de Gibbs ($\Delta G^\circ = \text{kJ mol}^{-1}$), de acordo com Equação 18.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \quad \text{Equação (18)}$$

Onde: T é a temperatura absoluta (K) correspondente, R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), h é a constante de Plank ($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$) e k_B é a constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$).

4.2.8 Produtos de degradação enzimática dos tricotecenos

A confirmação da ação degradativa das enzimas sobre os tricotecenos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS) e cromatografia líquida acoplada a arranjo de diodo (PDA) LTQ ion trap/Orbitrap com detecção de espectrometria de massas (HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap). Essas análises foram realizadas no Instituto de Química de Alimentos na Universidade de Münster na Alemanha, durante período de estágio de doutorado sanduíche.

4.2.8.1 Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas – LC-MS/MS

A presença de tricotecenos e possíveis produtos de degradação, nas amostras de biodegradação, por ação da enzima lacase foi confirmada e quantificada utilizando um espectrômetro de massas API 3200 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) acoplado a um HPLC Agilent 1200 series (Agilent, B lingen, Alemanha), com análise dos dados em software Analyst 1.6.2 (Sciex, Darmstadt, Alemanha). O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo para análise de todos os compostos, com ionização *electrospray*. A voltagem foi de + 5500 V e nitrogênio foi usado como gás de nebulização (35 psi) e como gás de secagem (45 psi) aquecido a 500 °C.

A presença de produtos de degradação, foi analisada, em uma coluna Supelco Acentis RP-amida 150 x 2.1 mm de diâmetro interno, 5 μm , acoplada a coluna de guarda universal C18 (4 x 2 mm de diâmetro) com temperatura de 40 °C. O volume de injeção foi de 10 μL , usando um gradiente linear binário a vazão de solvente foi de 0,5 mL min^{-1} . Solvente A foi metanol (MeOH) e o solvente B foi água, ambos contendo 1% de ácido fórmico. O gradiente linear utilizado foi o seguinte: entre 0 e 1 min, 95% A; 3 min, 60% A; 6 min, 50% A; entre 8 e 10 min, 0% A, seguindo de equilíbrio da coluna com as condições iniciais durante 3,5 min. Os parâmetros para aquisição dos

resultados em LC–MS/MS que foram usados para análise dos tricotecenos estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros otimizados para confirmação e quantificação dos tricotecenos em LC-MS/MS.

Composto	Íons (m/z)	Dwell time (ms)	DP (V)	CE (eV)
DON	297	50	50	20
	249			
	231			
	175			
15-ADON	339	50	60	15
	321			
	261			
	137			
3-ADON	339	50	60	15
	231			
	203			
Toxina T-2	489	50	100	35
	387			
	327			
	245			

DP - Potencial de dessolvatação; CE – energia de colisão.

A avaliação da linearidade (r) foi realizada a partir da curva analítica, com relação intensidade do sinal do analito (sinal da amostra – sinal do branco) (HARRIS, 2011). A faixa linear variou entre 0,5 a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DON, 3-ADON e toxina T-2, para construção das curvas analíticas foi preparada uma solução padrão contendo a mistura de todos os compostos em estudo na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto, a partir da diluição desta foram preparadas as soluções nas concentrações a serem utilizadas para construção da curva analítica.

4.2.8.2 Cromatografia líquida acoplado a arranjo de diodo (PDA) LTQ ion trap/Orbitrap com detecção de espectrometria de massas - HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap

Para análise em HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap, um sistema Accela LC 60057-60010 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) foi conectado a um LTQ Orbitrap XL espectrômetro de massa (Thermo Fisher Scientific) no qual foi usado em modo *scan*. A análise dos dados ocorreu em software Xcalibur 2.07 SP1 (Thermo Scientific).

A presença de produtos de degradação por ação enzimática foi analisada em uma coluna Supelco Acentis RP-amida (150 x 2.1 mm, 5 μ m) acoplada a coluna de guarda universal C18 (4 x 2 mm de diâmetro), usando o seguinte gradiente binário: entre 0 e 1 min de análise 5% de solvente A (MeOH com 1% de ácido fórmico) e 95% de solvente B (H₂O com 1% de ácido fórmico), 40% solvente A e 60% do solvente B até 3 min de análise, 50% de solvente A e 50% de solvente B até 6 min de análise, 100% de solvente A de 8 até 10 min de análise e de 10,1 até 15 min de análise 5% de solvente A e 95% de solvente B. A vazão dos solventes foi de 0,25 mL min⁻¹. As condições otimizadas encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Condições otimizadas para avaliação dos compostos em HPLC-(PDA)-LTQ-Orbitrap.

Condições	3-ADON e toxina T-2
Temperatura do vaporizador (°C)	380
Vazão de gás (unidades)	40
Vazão do gás auxiliar (unidades)	20
Voltagem do spray (kV)	3,5
Voltagem do capilar (V)	20
Temperatura do capilar (°C)	350
Lentes do tubo (V)	125
Tempo de injeção (ms)	150

A temperatura utilizada na coluna foi de 40 °C, e o volume de injeção de 10 μ L. O espectrômetro de massas operou em modo positivo com ionização *eletronspray* aquecida. Os produtos de degradação foram determinados em modo *scan* num intervalo de 100 - 500 *m/z* e monitoramento da formação de oligômeros foi realizado em um intervalo de 100 – 800 *m/z* para 3-ADON e 150 – 1200 *m/z* para T-2, com uma resolução de 30000.

4.2.9 Tratamento de resíduos químicos e limpeza de vidraria

A limpeza do material utilizado nos diferentes ensaios na presença de micotoxinas foi realizada através da imersão deste em solução, esta contendo a concentração de 1% de hipoclorito de sódio. Este reagente garante a degradação da

estrutura química dos compostos e a ausência de recontaminação ambiental durante descarte dos resíduos. Os resíduos orgânicos dos ensaios de degradação foram rotulados e armazenados de acordo com sua classificação, seguindo regulamento para tratamento de resíduos estabelecido na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande.

4.2.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA considerando as médias de triplicatas dos ensaios por teste t e teste de Tukey, utilizando o software —Statistica” (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA), tendo os percentuais de degradação dos tricotecenos (%), como respostas das variáveis em estudo. O nível de significância foi fixado em 90% para os ensaios enzimáticos.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA MODELO

5.1.1 Padronização das soluções modelo

São muitos os fatores que devem ser considerados ao escolher um tampão para determinação enzimática. Quando se estuda uma enzima, deve-se considerar o pH ótimo desta, efeitos do tampão na enzima e interações com substratos (STOLL e BLANCHARD, 2009). Com base na manutenção da estabilidade química e física das enzimas em estudo, alguns testes foram realizados no sentido de padronizar as soluções modelo empregadas neste estudo.

Para enzima lacase, o tampão acetato foi o que promoveu melhor eficiência catalítica, diferente dos métodos das demais enzimas para os quais o tampão fosfato já era utilizado. A avaliação da influência da mudança do tampão acetato pH 4,5 (0,05 mol L⁻¹) para tampão fosfato pH 5 (0,05 mol L⁻¹) mostrou um decréscimo de 8,6% na atividade da enzima, porém não significativa. Também foi avaliado o emprego de tampão fosfato pH 7 no meio reacional da enzima lacase, o resultado demonstrou ausência de atividade da enzima lacase (Tabela 15). De acordo com a literatura, lacases obtidas de *Trametes versicolor* apresentam sua atividade acentuadamente diminuída em pH acima de 6 (BROWN, ZHAO e MAUK, 2002; CATAPANE et al., 2013).

Durante a oxidação de substratos doadores de elétrons como o ABTS, a atividade da lacase diminui constantemente à medida que aumenta o pH. Isto ocorreu porque os prótons não estão envolvidos na oxidação deste substrato e a influência do pH no potencial redox deste composto é mínima. Neste caso, a diminuição da atividade enzimática esta associada a ligação do íon hidroxila (OH⁻) com o centro T2/T3 da enzima (MOROZOVA et al., 2007). Geralmente a inibição por OH⁻ na auto oxidação torna as lacases mais estáveis em pH ácido (GIANFREDA et al., 1999). Em vista da padronização da solução modelo, foi adotado o emprego de tampão fosfato pH 5 (0,05 mol L⁻¹), para determinação de lacase.

Tabela 15. Avaliação do pH do sistema reacional em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	
	pH 5	pH 7
Lacase	7,86	ND
Peroxidase	2,53	2,55
Lipase	ND	0,1
Esterase	ND	0,13

ND – Atividade Não detectada.

Para peroxidase, o meio reacional foi constituído de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 6, de acordo com o fabricante. Nesta condição a peroxidase apresentava uma atividade de 2,57 U mL⁻¹, como os demais estavam adequados para uma concentração de 0,05 mol L⁻¹ em pH 5 (lacase) e pH 7 (lipase e esterase), a atividade enzimática da peroxidase foi avaliada nestas condições. As diferenças observadas entre as atividades não foram significativas (Tabela 15). De acordo com Duarte-Vasquez et al. (2003), peroxidase mostrou uma ação ótima na descontaminação de fenóis em uma faixa de pH entre 5 a 7, o que confirma a ação da enzima no intervalo em estudo e facilita o emprego da enzima em ensaios de degradação que apliquem enzimas oxidativas e hidrolíticas no mesmo sistema. Assim, ficou estabelecido que os ensaios de determinação da atividade de peroxidase ocorreriam em tampão fosfato pH 5 (0,05 mol L⁻¹).

A avaliação de tampão fosfato em pH 5 no meio reacional para as enzimas hidrolíticas (Tabela 15) acarretou na não detecção da atividade, possivelmente pela precipitação da enzima. A ausência de atividade das enzimas hidrolíticas em pH 5, se justifica por estas apresentarem alta atividade em condições alcalinas, ou seja, em uma faixa de atuação entre pH 6 e 10 (VERMA, THAKUR e BHATT, 2012; YAN et al., 2014; GATHI e PAUL, 2015).

Sendo assim, foi estabelecido que as soluções modelo para aplicação das enzimas nos ensaios de degradação dos tricotecenos são: para peroxidase tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ em pH 5 com adição do cofator H₂O₂; para lacase tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ com adição do modulador ABTS também em pH 5; para as enzimas hidrolíticas a solução modelo permaneceu tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ com pH 7.

5.1.2 Interação enzimática

A aplicação destas enzimas na degradação de tricotecenos está relacionada à estereoespecificidade de ação, ou seja, enzimas agindo sobre grupamentos específicos. No caso das enzimas oxidativas, a ação sobre a estrutura química dos tricotecenos pode ocorrer pela oxidação dos grupamentos hidroxila e redução do grupamento epóxido. As enzimas hidrolíticas podem atuar hidrolisando grupamentos acetil e na abertura do anel epóxido nos tricotecenos.

Neste sentido, a lacase foi empregada utilizando a solução tampão padronizada da peroxidase com $0,006 \text{ U mL}^{-1}$, bem como peroxidase em solução tampão padronizada da lacase com $0,019 \text{ U mL}^{-1}$. Após o emprego da enzima lacase em meio reacional da enzima peroxidase, a atividade da enzima peroxidase aumentou em 33% ($0,008 \text{ U mL}^{-1}$), o que pode ser explicado pelo fato do guaiacol não ser o substrato preferencial de ação da enzima lacase (não havendo competição pelo substrato). Esta por sua vez, sendo uma enzima oxidativa pode interagir com esse substrato, levando ao aumento na atividade aqui constatado, esses resultados estão diretamente relacionados com o potencial redox da enzima.

A maioria das lacases possui uma elevada afinidade por ABTS, com uma elevada constante catalítica, enquanto guaiacol é oxidado de forma mais lenta e as constantes de Michaelis são significativamente mais elevadas (MOROZOVA et al., 2007). Para lacase, a transferência de elétrons do substrato para o cobre T1 é provavelmente controlada pela diferença de potencial redox, assim um elevado potencial redox da lacase ou um menor potencial de oxidação do substrato pode resultar numa elevada taxa de oxidação do substrato. O que enfatiza sua afinidade por ABTS. O centro T1 da lacase obtida de *Trametes versicolor* tem um potencial redox de aproximadamente 730-780 mV, mas o uso de mediadores permite oxidar moléculas com potencial redox padrão (E°) acima de 1100 mV (STRONG e CLAUS, 2011).

Com o emprego da peroxidase em meio reacional de lacase, a atividade enzimática diminuiu para $0,006 \text{ U mL}^{-1}$, ou seja, uma queda de 66%, o que indica que peroxidase compete com a enzima lacase por seu substrato (ABTS). Isso porque as propriedades catalíticas únicas de peroxidases incluem a oxidação de substratos de

alto e baixo potencial redox, fazendo dessa enzima atraente para processos biotecnológicos (POZDNYAKOVA et al., 2013).

Também foi avaliada a adição de esterase em meio reacional de lipase com $0,07 \text{ U mL}^{-1}$ de ambas as enzimas, e lipase em meio reacional de esterase com $0,09 \text{ U mL}^{-1}$ de ambas as enzimas. Devido ao fato de que as enzimas possuem o mesmo método de determinação, a identificação de qual enzima está sendo quantificada fica prejudicada. Esterase na presença de lipase apresentou uma atividade de $0,17 \text{ U mL}^{-1}$ e lipase na presença de esterase teve um aumento em sua atividade para $0,21 \text{ U mL}^{-1}$.

A avaliação da enzima peroxidase em meio reacional das enzimas hidrolíticas foi realizada, porém nesta não foi observada atividade da enzima, o que pode estar relacionado com a ação inibitória da peroxidase por algum componente do meio reacional. Esse resultado não descarta o emprego das enzimas concomitantemente em solução modelo, que contém apenas o tampão fosfato. A avaliação da adição de enzimas hidrolíticas no meio reacional das enzimas oxidativas não foi realizada, tendo em vista que as primeiras possuem ação em pH 7, e de acordo com os dados apresentados neste trabalho, não possuem atividade em pH 5, o que torna inviável o estudo neste pH.

Esses ensaios tiveram como objetivo a avaliação da possibilidade de aplicação simultânea das enzimas, oxidativas e hidrolíticas. Estes são importantes quando se pretende verificar se há uma interação entre enzimas ou uma ação simultânea, com consequente aumento na degradação dos substratos.

5.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRICOTECENOS EM SOLUÇÃO MODELO

A Tabela 16 apresenta as condições cromatográficas estabelecidas no sistema HPLC-UV para determinação e quantificação dos tricotecenos DON, NIV, 3-ADON, 15-ADON e toxina T-2. As melhores condições de separação para os 5 compostos foram alcançadas usando água ultrapura (30%) e MeCN (70%) com variação de comprimento de onda, 220 nm para detecção de tricotecenos tipo B e 193 nm para detecção de tricotecenos tipo A, em um tempo de eluição cromatográfica de 12 min,

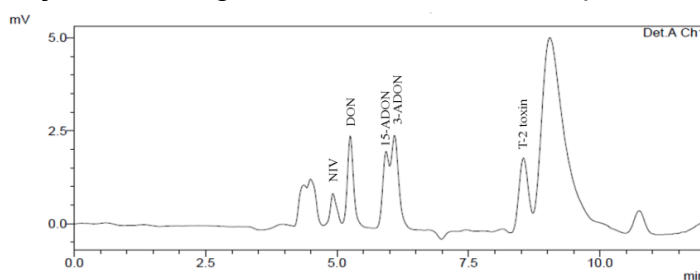
onde, até 7 min foi empregado 220 nm como comprimento de onda e 193 nm até o tempo final da análise.

Tabela 16. Condições cromatográficas empregadas para determinação de tricotecenos A e B.

Parâmetros	HPLC-UV
Coluna analítica	Gemini 5 μm C ₁₈ – 250 x 4,6 mm
Vazão de fase móvel (mL min ⁻¹)	0,5
Fase móvel (v/v)	MeCN:água milli-Q (70:30)
Volume do injetor (μL)	20
Temperatura (°C)	25

O tempo de eluição do analito não retido (t_M), nas condições selecionadas foi de 3,9 min (Figura 7). Quanto aos parâmetros avaliados na separação cromatográfica, pode-se ressaltar que a determinação de k é importante, pois o fator de retenção é um parâmetro amplamente utilizado para descrever as velocidades de migração dos analitos nas colunas (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015). Quanto maior for o valor de k , maior será o tempo de retenção do analito. O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico.

Figura 7. Eluição cromatográfica em HPLC-UV dos padrões de tricotecenos.



Os valores ideais de k para os dois componentes da separação podem variar entre 1 a 10, envolvendo múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 a 20 (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015). No caso do fator de separação, se $\alpha = 1$, os picos não estão separados e um valor de $\alpha > 1$ implica em uma boa separação (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015), quanto maior for o valor de α , mais seletiva será a fase líquida e, portanto, uma melhor separação será

encontrada. Tanto os resultados encontrados para k como para α e o tempo de retenção de cada analito em estudo, podem ser observados na Tabela 17.

O menor α entre os compostos 3-ADON e 15-ADON é explicado por estes serem isômeros de posição e mesma massa molecular, diferindo entre si somente pela posição do grupo acetil (Figura 1), por isso sua separação cromatográfica torna-se muito difícil. Os valores encontrados de k na coluna Gemini C₁₈ são satisfatórios, estes se mostraram ser superiores a 1, assim como os valores de α . Assim, as condições cromatográficas empregadas neste estudo ficam estabelecidas para determinação e quantificação dos compostos em estudo.

Tabela 17. Parâmetros avaliados para separação dos analitos.

Compostos	t _R (min)	K	Micotoxinas	A
NIV	4,9	1,25		
DON	5,3	1,36	DON/NIV	1,09
15-ADON	6	1,54	15-ADON/DON	1,13
3-ADON	6,3	1,61	3-ADON/15-ADON	1,14
Toxina T2	8,5	2,18	Toxina T2/3-ADON	1,35

t_R - tempo de retenção; k - fator de retenção; α - fator de separação

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

As moléculas dos tricotecenos (Figura 1) e sua solubilidade em solventes orgânicos e água (Tabela 2), faz da técnica de HPLC a mais apropriada para sua detecção e separação. A linearidade foi avaliada pela construção de curvas analíticas, utilizando-se de padronização externa. Os parâmetros de linearidade obtidos para cada tricoteceno estão expressos na Tabela 18.

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

Compostos	Faixa de calibração (µg mL ⁻¹)	R	Equação da curva analítica	LOD (µg mL ⁻¹)	LOQ (µg mL ⁻¹)
DON	0,3 – 4,0	0,999	y = 37158x – 2642,3	0,09	0,29
NIV	0,3 – 3,5	0,995	y = 43792x – 712,68	0,10	0,30
3-ADON	0,15 – 3,6	0,993	y = 38187x + 822,64	0,04	0,15
15-ADON	0,07 – 4,1	0,996	y = 29257x – 583,6	0,02	0,07
ADONS	0,7 – 7,6	0,997	y = 33481x + 912,21	0,21	0,66
Toxina T-2	0,2 – 3,7	0,995	y = 70460x – 12416	0,06	0,20

LOD - limite de detecção; LOQ - limite de quantificação; r - coeficiente de correlação

Com os resultados obtidos em relação a construção das curvas analíticas e da análise das equações das curvas analíticas em HPLC-UV, é possível concluir que o modelo de regressão linear se mostra adequado para as determinações em estudo. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações do EURACHEM/CITAC (2000), que recomenda r acima de 0,99.

Para avaliar a precisão instrumental foram realizadas injeções sucessivas de solução padrão na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 10$). Os valores de RSD foram de 0,6% para DON, 2,6% para NIV, 3,1% para 3-ADON, 1,4% para 15-ADON, 2,2% para ADONS e 2,8% para toxina T-2. Para a precisão do método, os valores de RSD (%) da recuperação dos tricotecenos estão expressos na Tabela 20. Pode-se concluir que a precisão instrumental e a precisão do método cromatográfico empregado foram adequadas, uma vez que apresentaram valores de RSD menores que 20 %.

5.3.1 Recuperação de tricotecenos da solução modelo

Tampões são considerados como um importante componente de sistemas químicos e bioquímicos, para os compostos alcançarem uma estabilidade ótima ou para que a reação seja realizada com condições controladas de pH e força iônica (SHERAZ et al., 2014), fatores esses que podem influenciar no método de extração (CALDAS et al., 2011). Neste estudo, foram avaliados dois métodos de extração dos tricotecenos de um sistema tamponante, onde, ficou demonstrado que o emprego do método de extração usando CH_3Cl (Tabela 19), apresenta baixa recuperação para os tricotecenos.

Tabela 19. Comparação entre os métodos de extração (SALLE e LLE) em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Compostos	Recuperação (%)			
	LLE		SALLE	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
DON	43,7 (6,9)*	46,3 (0,5)	96,2 (0,8)	86,5 (0,4)
NIV	13,7 (1,8)	15,0 (2,8)	47,4 (1,4)	36,6 (0,7)
3-ADON	58,2 (0,9)	67,2 (0,9)	86,0 (1,8)	81,5 (0,9)
15-ADON	102,4 (0,4)	73,3 (0,1)	99,5 (0,9)	86,0 (1,0)
Toxina T-2	80,0 (0,5)	38,0 (0,8)	103,4 (1,8)	106,8 (1,2)

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

LLE é considerada hoje, uma técnica clássica de extração, tendo como vantagens simplicidade e baixo custo, mas como ponto negativo está o alto volume de solventes orgânicos tóxicos utilizados, como os organoclorados. O emprego dessa técnica é relatado na análise de alimentos, utilizando solventes orgânicos imiscíveis com a água, mas para extração de compostos polares, como nesse estudo, suas recuperações se demonstram relativamente baixas. Muito embora CH_3Cl , venha sendo usado no LAMCA para extração de micotoxinas de matrizes alimentares e tenha demonstrado alta eficiência na extração dessas a partir de solução modelo, como Ocratoxina A (NORA, 2015) e Zearalenona (GARCIA, 2016),

Os valores de recuperação encontrados estão abaixo dos valores recomendados para a aplicabilidade e validação de procedimentos analíticos (SANTE, 2015). Cabe salientar também que, desde 1980, métodos utilizando solventes clorados são evitados, isto pela preocupação com o meio ambiente e com a saúde dos analistas, o que levou ao desenvolvimento de vários métodos novos (ANASTASSIADES et al., 2003). Desta forma, o método SALLE utilizando solventes orgânicos com maior polaridade como etanol, metanol, acetona e acetonitrila, apresentam as vantagens de miscibilidade em água, podendo solubilizar os compostos em estudo e que a partir da adição de sal, permite a partição pela separação das fases.

De acordo com as Tabelas 19 e 20, NIV apresentou baixas recuperações em ambos os métodos e pHs avaliados. Estes resultados podem ser explicados por duas possibilidades: primeiramente a dificuldade na extração do composto se deve a presença em sua estrutura de quatro grupos hidroxila (Figura 1 (b)), os quais podem facilitar a formação de ligações de hidrogênio com a água. A segunda possibilidade considera o $\log K_{OW}$ (Tabela 2), parâmetro incluído como principal propriedade química das substâncias, altos valores de $\log K_{OW}$ representam a tendência do soluto para migrar da fase aquosa para a fase orgânica (LYMAN, 1982), no caso dos tricotecenos, NIV apresenta o menor valor de K_{OW} (-2,24).

Na Tabela 20, estão os resultados encontrados para as recuperações em três diferentes níveis de concentração para cada tricoteceno. Os sistemas foram submetidos ao método de extração SALLE, as concentrações foram: o valor do LOQ, 5 vezes o valor de LOQ e 10 vezes o valor de LOQ. Pelos valores de RSD do método de recuperação expressos na Tabela 20, é possível concluir que a precisão instrumental

foi adequada para o emprego deste método em ensaios de degradação dos tricotecenos, em valores acima do limite de quantificação. As recuperações dos demais tricotecenos variaram entre 82,2 – 120,6% em pH 5 e 72,8 a 112,5% em pH 7. Os dados de recuperação estão dentro dos critérios adotados pelo Comitê Regulatório Europeu (EC N° 401/2006), que rege métodos analíticos utilizados para determinação de micotoxinas.

Tabela 20. Percentual de recuperação pelo método SALLE, de tricotecenos em diferentes níveis de contaminação em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, em pH 5 e 7.

Compostos	Recuperação (%)					
	pH 5			pH 7		
	LOQ	5 x LOQ	10 x LOQ	LOQ	5 x LOQ	10 x LOQ
DON	114,2 (1,6)*	102,8 (0,9)	96,2 (0,8)	176,6 (3,4)	107,2 (2,4)	86,4 (0,4)
NIV	89,3 (14,6)	48,2 (2,7)	47,4 (1,4)	89,4 (0,3)	86,4 (2,3)	36,6 (0,7)
3-ADON	141,3 (13,6)	99,3 (0,9)	85,9 (1,8)	139,7 (2,1)	91,6 (2,0)	81,5 (0,9)
15-ADON	120,5 (6,4)	99,2 (0,6)	99,5 (0,9)	142,2 (1,4)	112,5 (1,2)	86,0 (1,0)
ADONS	114,3 (2,7)	82,2 (1,2)	95,1 (1,3)	94,6 (0,9)	72,8 (1,5)	68,1 (2,9)
Toxina T-2	263,6 (0,2)	120,6 (1,7)	103,4 (1,8)	270,5 (0,6)	111,2 (1,0)	106,8 (1,2)

*RSD (%) - estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade; LOD - limite de detecção; LOQ - limite de quantificação.

É importante considerar, que a eficiência do método varia em função da concentração do analito. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando o analito em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI, et al., 2004).

Em relação à recuperação de toxina T-2 (Tabela 20) com nível de fortificação equivalente ao LOQ, é possível observar que as recuperações foram em torno de 265%, isso está relacionado ao sistema modelo e seu efeito de aumento no sinal resultante. O comprimento de onda de absorção máxima de toxina T-2 (193 nm) permite que outros grupos químicos se apresentem como potenciais interferentes ao realizar essas baixas concentrações de toxina T-2. No entanto, este efeito é minimizado quando níveis mais altos de concentração de toxina T-2 foram avaliados, uma vez que a concentração interferente do sistema modelo permanece constante.

Outra possibilidade é o efeito da solução modelo na molécula de toxina T-2 e a formação de compostos (cromóforos) que absorvem em 193 nm.

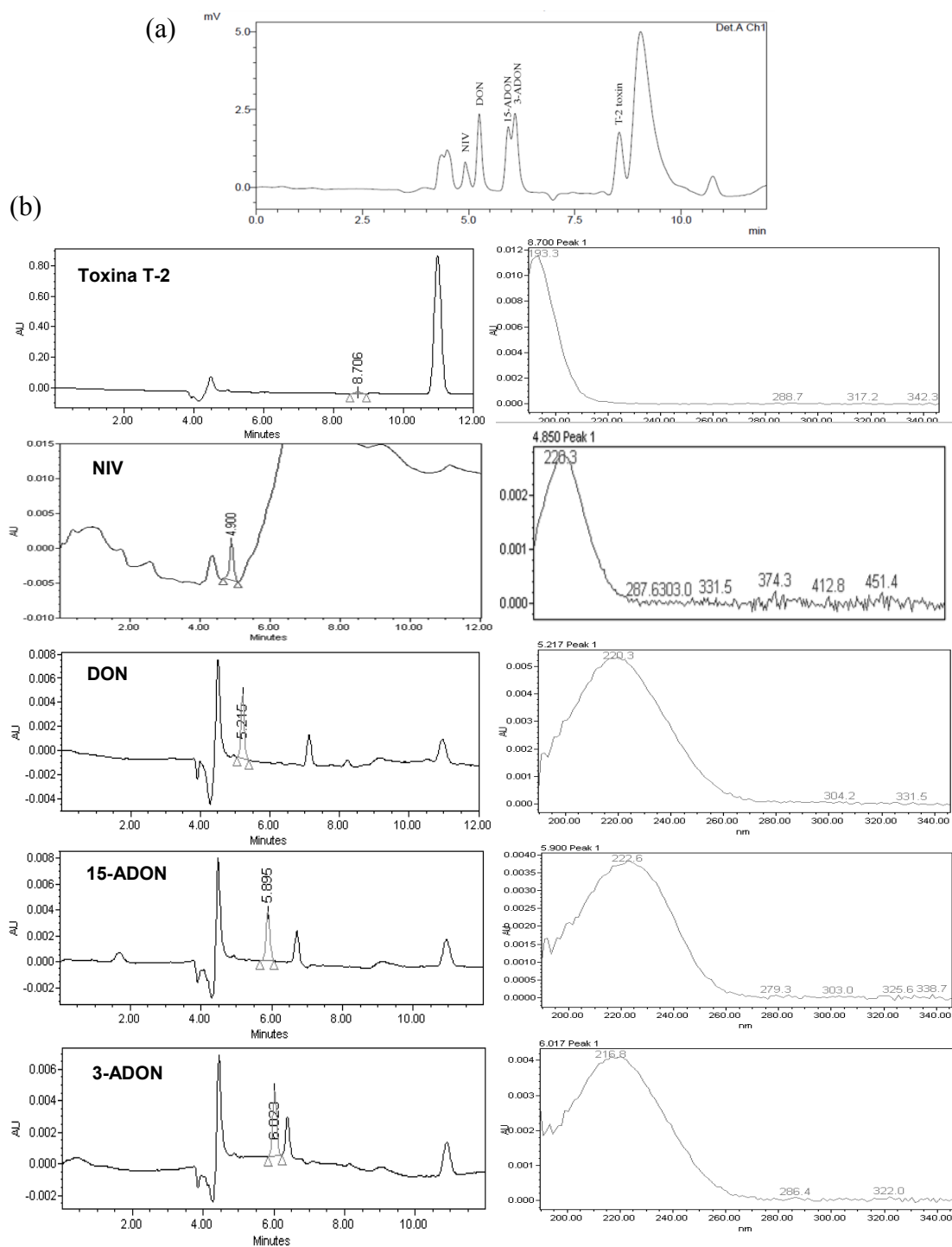
Neste estudo, a influência de NaCl no percentual de recuperação foi avaliado somente para DON, isto por este composto ter apresentado menor taxa de recuperação e por apresentar maior polaridade, em comparação com os demais analitos em estudo. Com uma adição de NaCl de 0,1 g foi observada uma recuperação de 36,2% com RSD de 10,3%, adicionando 0,25 g a recuperação passou a 95,4% com um RSD de 0,4% e com a adição de 0,5 g a recuperação obtida foi de 83,5% com RSD de 3%, assim ficou estabelecido que a quantidade de NaCl a ser adicionada para *salting-out* durante processo de extração seria 0,25 g.

5.3.2 Seletividade

HPLC-DAD foi utilizada para confirmar, através do comprimento de onda de máxima absorção, a presença dos tricotecenos na análise realizada pela técnica de HPLC-UV (Figura 8). A seletividade foi avaliada através da injeção, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, em HPLC-DAD dos tricotecenos individualmente, isto porque houve a coeluição de 3-ADON e 15-ADON. Cada sinal cromatográfico, no tempo de retenção dos analitos, foi avaliado quanto ao comprimento de onda de máxima absorção pelo espectro UV. Toxina T-2 (tricoteceno tipo A) apresentou máxima absorção em 193 nm, comprimento de onda usado nesse estudo para determinação desse composto. A média dos comprimentos de onda de máxima absorção observada para NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON (tricotecenos tipo B), foi 220 nm, o qual também é utilizado neste estudo para determinação destes compostos.

Em vista de que, a seletividade se caracteriza como a validação de um resultado, nesse sentido o uso de outra técnica analítica torna possível verificar a confirmação da existência de determinada espécie química obtida através do uso de técnica original (EURACHEM/CITAC, 2000), assim é possível dizer que foi confirmada a presença dos compostos na análise cromatográfica.

Figura 8. Cromatogramas representativos da mistura de tricotecenos A e B, em HPLC-UV (a) e espectro UV em HPLC-DAD (b).



5.4 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DOS TRICOTECENOS

Tendo em vista a exposição do analista às toxinas, um estudo preliminar do uso dos tricotecenos foi realizado, sendo os ensaios conduzidos levando em consideração a ação estereoespecífica das enzimas. Os percentuais de degradação, bem como a velocidade de degradação para os ensaios preliminares de incubação das enzimas com os tricotecenos, estão apresentados na Tabela 21. As condições dos ensaios que demonstraram maiores percentuais de degradação foram utilizadas para os demais compostos em estudo. Cabe ressaltar que nos ensaios iniciais empregando a enzima lacase, não houve a adição do modulador de ação enzimática ABTS. A necessidade do uso do modulador foi constatada durante avaliação dos resultados e do sistema reacional.

Os resultados da avaliação dos diferentes tempos de incubação da enzima lacase (Tabela 21), evidenciaram que com o aumento do tempo de incubação de 60 para 120 min observou-se um aumento de 4 vezes no percentual de degradação de DON. Entre os tempos de 30 e 60 min não foi observado diferença significativa. O aumento da proporção enzima:substrato de 83:1 para 296:1, com mesmo tempo de incubação (60 min) resultou em uma degradação de 14% de DON. Estes resultados ressaltam a importância da avaliação de tempos de incubação ainda maiores, que podem resultar em percentuais também maiores de degradação de DON. Em comparação aos melhores percentuais de degradação, 14,6 e 14% com proporção enzima:substrato 83:1 e 296:1, respectivamente, conclui-se que entre eles não há diferença significativa, porém o emprego da proporção 83:1 com tempo reacional de 120 min, demonstrou maior eficiência por apresentar maior velocidade de degradação.

A aplicação da maior proporção enzima:substrato em larga escala, quando utilizada a enzima em grau comercial, também acarretaria em maiores custos. As condições de tempo (120 min) e concentração de enzima ($0,63 \text{ U mL}^{-1}$) que demonstraram maior eficiência para DON foram empregados na degradação de toxina T-2, 15-ADON e 3-ADON, também demonstrando resultado promissor, o que ressaltou a necessidade de avaliação das condições reacionais com o objetivo de aumentar esses percentuais.

Tabela 21. Degradação dos tricotecenos, em ensaios preliminares, por ação enzimática em solução modelo.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Micotoxina	µg mL ⁻¹	Tempo (min)	Degradação (%)	Velocidade de degradação (% U ⁻¹ min ⁻¹)
Lacase	0,63	DON	0,5	30	3,1 (2,0) ^b	0,16
	0,63	DON	0,5	60	3,7 (0,5) ^b	0,10
	0,63	DON	0,5	120	14,6 (4,5) ^a	0,20
	2,25	DON	0,5	60	14,0 (2,2)	0,04
	0,63	15-ADON	1	120	7,0 (2,8)	0,10
	0,63	3-ADON	1	120	20,3 (11,1)	0,27
	0,63	Toxina T-2	1	120	1,5 (6,0)	0,02
Peroxidase	0,12	DON	1	180	44,5 (2,0) [*]	2,10
	0,12	3-ADON	1	180	24,5 (20,6)	1,13
	0,12	15-ADON	1	180	4,3 (4,0)	0,20
	0,12	Toxina T-2	1	180	0,0 (1,7)	0
Esterase	0,04	15-ADON	1	30	3,8 (2,0) ^b	3,16
	0,04	15-ADON	1	60	19,5 (3,0) ^a	8,12
	0,04	15-ADON	1	120	19,5 (2,2) ^a	4,06
	0,08	15-ADON	1	60	13,0 (1,6) ^b	2,71
	0,08	15-ADON	1	120	38,1 (1,5) ^a	4,00
	0,08	DON	0,5	240	20,6 (1,8) ^a	1,10
	0,08	DON	0,5	1440	22,4 (7,0) ^a	0,20
	0,08	3-ADON	1	120	36,3 (0,5)	3,80
0,08	Toxina T-2	1	120	2,3 (0,2)	0,24	

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

A mesma avaliação se faz quanto à ação da enzima peroxidase, onde embora tenha ficado demonstrada sua potencial ação degradativa nos ensaios de incubação com 3-ADON e DON, com relação a 15-ADON e toxina T-2 a degradação observada foi muito baixa e inexistente, respectivamente. Em relação aos ensaios preliminares de aplicação da enzima esterase sobre 15-ADON, o que se observa é que o tempo de incubação e a concentração enzimática exercem grande influência na ação da enzima.

Com o aumento do tempo, e aumento na concentração da enzima (aumento da razão enzima:substrato), um aumento nos percentuais de degradação desse tricoteceno foi observado. Nos ensaios iniciais, com a menor concentração (0,04 U mL⁻¹) em 60 min de incubação foi obtido o maior percentual de degradação (19,5%), com também maior velocidade de reação 8,12 % U⁻¹ min⁻¹. A partir desse resultado, foi investigado o aumento do tempo de incubação, que apresentou o mesmo percentual de degradação, porém metade da velocidade de degradação, 4,06 % U⁻¹ min⁻¹.

A concentração enzimática foi então aumentada para $0,08 \text{ U mL}^{-1}$ e o resultado encontrado foi diretamente proporcional ao aumento, sendo observada o dobro da degradação do tricoteceno (38,1%). Esse resultado levou a investigação da diminuição do tempo para 60 min de incubação, com a maior concentração de enzima ($0,08 \text{ U mL}^{-1}$), porém a degradação encontrada foi de 13%. Este resultado foi 33,4% inferior ao encontrado no ensaio empregando $0,04 \text{ U mL}^{-1}$ com 120 min de incubação, 66% menor que o encontrado no ensaio empregando $0,08 \text{ U mL}^{-1}$ com 120 min de incubação.

As condições de tempo (120 min) e concentração de enzima ($0,08 \text{ U mL}^{-1}$) que demonstraram maior eficiência para degradar 15-ADON foram empregadas nas degradações de 3-ADON e toxina T-2, demonstrando resultado promissor para 3-ADON mas pequena ação sobre a toxina T-2. Os resultados encontrados para 3-ADON e 15-ADON foram 36,3 e 38,1%, respectivamente, e significativamente diferentes. O que pode ter acontecido devido à semelhança na estrutura química dos compostos, ambos os compostos apresentam um grupamento acetil em sua estrutura química, porém em posições distintas. DON apresentou degradação menor aos compostos acetilados em um período de tempo de 240 min, o que pode ser explicado por sua estrutura química não apresentar grupamentos que facilitem a ação estereoespecífica da enzima esterase. A enzima esterase, como citado no item 3.3.4, exibe especificidade ampla de substrato catalisando a hidrólise da ligação éster de ácido graxo de cadeia curta (LAI et al., 2018).

Os resultados encontrados para a enzima esterase foram aplicados para a enzima lipase nos ensaios seguintes uma vez que estas enzimas pertencem à mesma classe reacional, como mostra a Tabela 22. A concentração enzimática foi reduzida tendo em vista a baixa atividade da enzima apresentada no padrão enzimático, quando comparada a enzima esterase. A Tabela 22 mostra a alta velocidade de reação da enzima lipase em comparação as demais enzimas (Tabela 21), isso pode significar uma maior afinidade ou maior especificidade de ação dessa enzima sobre os substratos alternativos avaliados nesse estudo (tricotecenos).

Tabela 22. Ação da enzima lipase ($0,001 \text{ U mL}^{-1}$) sobre os tricotecenos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) com tempo de incubação de 120 min.

Composto	Proporção enzima:substrato ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$)	Degradação (%)	Velocidade de degradação ($\% \text{ U}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
DON	50:1	68,4 (8,1)*	570,00
3-ADON	50:1	45,4 (8,0)	378,33
15-ADON	50:1	50,2 (26,3)	418,33
Toxina T-2	50:1	12,3 (9,3)	102,50

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

Os resultados podem ser considerados contrários ao comportamento reacional de lipases, essas enzimas possuem ação preferencial em ésteres de cadeia longa, enquanto que as esterases possuem ação em ésteres de cadeia curta (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015). Toxina T-2, que apresenta em sua estrutura o maior número de grupos acetilados e maior cadeia carbônica, em comparação aos demais compostos, apresentou o menor percentual de degradação. DON que não apresenta ésteres em sua estrutura apresentou percentual de destaque em termos de degradação. Em sua incubação com DON, os resultados foram contrários aos encontrados em avaliação de incubação com esterase, o que com uma menor concentração enzimática pode ter acontecido por maior especificidade de ação da lipase em comparação com esterase.

Assim, ficaram estabelecidas as seguintes condições para os ensaios subsequentes:

- 1) para todas as enzimas um tempo de incubação de 2 h, tendo em vista os resultados encontrados para lacase e esterase serem melhores nesse tempo;
- 2) avaliação da diminuição da concentração enzimática observando os resultados promissores encontrados em concentrações menores;
- 3) aumento da concentração de todos os compostos para $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que facilita a determinação e quantificação, levando em consideração maiores degradações que podem apresentar concentrações abaixo do limite de quantificação.

Mantendo o tempo de incubação de 2 h, DON foi incubado com todas as enzimas em 3 diferentes concentrações conforme mostra a Tabela 23. Esse teste foi realizado buscando diminuir a concentração de enzima no sistema, fazendo com que o custo do processo diminuísse. Diante dos resultados, foi observado que a enzima

lacase apresenta ação em concentrações mais elevadas, levando a necessidade de um estudo de maiores concentrações enzimáticas para essa enzima. Para as outras enzimas foi observado o contrário, quanto menor a quantidade enzimática maior a degradação e maior a velocidade de reação.

Tabela 23. Efeito da diminuição da atividade enzimática na degradação de DON ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) com tempo de incubação de 2 h.

Enzima	Atividade enzimática (U mL^{-1})	Degradação (%)	Velocidade da reação ($\% \text{U}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Lacase	0,001	2,4 (6,7)*	20,00
	0,0001	0,0 (157,0)	0
	0,00001	0,0 (144,0)	0
Peroxidase	0,001	0,0 (4,5)	0
	0,0001	0,0 (12,5)	0
	0,00001	47,2 (11,0)	39333,33
Lipase	0,001	12,5 (6,5)	104,16
	0,0001	11,0 (24,6)	916,66
	0,00001	18,7 (6,2)	15583,33
Esterase	0,001	12,7 (13,2)	105,83
	0,0001	14,5 (11,4)	1208,33
	0,00001	22,3 (35,5)	18583,33

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

Partindo dos resultados expressos na Tabela 23, ensaios de degradação de toxina T-2, 3-ADON e 15-ADON foram realizados, utilizando as concentrações de $0,00001 \text{ U mL}^{-1}$ de peroxidase e lipase, e $0,0001 \text{ U mL}^{-1}$ para esterase (Tabela 24). Embora esterase tenha apresentado o maior percentual de degradação com $0,00001 \text{ U mL}^{-1}$ o RSD observado é muito alto, assim optou-se por utilizar a concentração superior para os estudos seguintes ($0,0001 \text{ U mL}^{-1}$).

Diferentemente do que foi observado para DON na Tabela 23, nos resultados expressos na Tabela 24 se observou a necessidade de aumento da concentração enzimática para os demais tricotecenos. Como a toxina T-2 não apresentou degradação em nenhum dos sistemas, além do aumento da concentração enzimática também foram avaliados os aumentos: do tempo de incubação (6 h) e da concentração do composto ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), esse aumento da concentração poderia levar a um aumento de colisões entre as moléculas (enzima:tricoteceno) no sistema reacional, facilitando a

interação entre ambos. O efeito dessas modificações no sistema reacional pode ser observado na Tabela 25.

Lacase não foi estudada nessas concentrações para 3-ADON, 15-ADON e toxina T-2, por não ter sido observada a reprodutibilidade dos resultados encontrados na Tabela 18, com isso foi testada a adição de ABTS ao meio reacional. ABTS foi então empregado nos ensaios seguintes (Tabela 25) na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ por mL de meio reacional.

Tabela 24. Efeito da diminuição da atividade enzimática em 3-ADON, 15-ADON e toxina T-2.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Micotoxina	Degradação (%)	Velocidade de degradação (% U ⁻¹ min ⁻¹)
Peroxidase	0,00001	3-ADON	8,6 (120,0)*	7166,66
	0,00001	15-ADON	0,0 (77,8)	0
	0,00001	Toxina T-2	0,0 (16,7)	0
Lipase	0,00001	3-ADON	12,8 (4,0)	1066,66
	0,00001	15-ADON	0,0 (28,4)	0
	0,00001	Toxina T-2	0,0 (13,0)	0
Esterase	0,0001	3-ADON	16,0 (19,6)	1333,33
	0,0001	15-ADON	15,0 (17,3)	1250,00
	0,0001	Toxina T-2	1,7 (128,0)	141,66

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

Com a adição de ABTS, ficou demonstrada que na concentração de lacase de 0,15 U mL⁻¹ (Tabela 25), a enzima possui ação somente sobre 3-ADON, em análise por HPLC-UV. Estes dados aliados aos dados encontrados na Tabela 21 mostram que a necessidade do uso de ABTS no sistema reacional ficou comprovada, isso tomando como base a velocidade de degradação enzimática. Essa se demonstrou consideravelmente maior com a adição do modulador na reação com 3-ADON, com uma concentração de 0,63 U mL⁻¹ de lacase (na ausência de ABTS no sistema) foi observada uma velocidade de 0,20 % U⁻¹ min⁻¹, já com a diminuição da concentração para 0,15 U mL⁻¹ (na presença de ABTS no sistema), foi observada uma velocidade de reação 3 vezes maior (0,64 % U⁻¹ min⁻¹). A enzima lacase, a partir desses resultados, foi empregada na concentração de 0,15 U mL⁻¹, somente em ação degradativa sobre 3-ADON, tendo em vista a não confirmação dos percentuais de degradação (Tabela 25) dessa enzima sobre DON, 15-ADON e toxina T-2

Tabela 25. Percentual e velocidade de degradação dos tricotecenos em sistema modelo após 2 h de incubação com as enzimas.

Enzima	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Micotoxina	Degradação (%)	Velocidade de degradação (% U ⁻¹ min ⁻¹)
Lacase	0,15	DON	0 (7,2)*	0
	0,15	3-ADON	11,6 (25,3)	0,64
	0,15	15-ADON	0 (52,1)	0
	0,15	Toxina T-2	0 (157,4)	0
Peroxidase	1	DON	36,7 (16,2)	0,30
	1	3-ADON	21,2 (2,0)	0,17
	1	15-ADON	11,0 (23,1)	0,10
	1	Toxina T-2	3,0 (82,1)	0,02
	0,62	3-ADON	21,0 (11,1)	0,30
	0,62	15-ADON	45,2 (10,2)	0,61
	0,62	Toxina T-2	25,5 (8,1)	0,34
Lipase	0,037	DON	0,0 (40,0)	0
	0,037	3-ADON	13,0 (20,4)	2,93
	0,037	15-ADON	8,6 (18,6)	1,95
	0,037	Toxina T-2	0,0 (20,7)	0
Esterase	0,025	DON	0,0 (42,4)	0
	0,025	3-ADON	1,0 (481,0)	0,33
	0,025	15-ADON	0,0 (84,5)	0
	0,025	Toxina T-2	0,0 (36,2)	0
	0,001	3-ADON	1,4 (117,3)	11,66
	0,001	15-ADON	7,4 (3,0)	61,66
	0,001	Toxina T-2	0,0 (8,1)	0

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

A concentração de lacase empregada no sistema está de acordo com estudos de degradação de disruptores endócrinos químicos, onde lacase foi aplicada na concentração de 0,1 U mL⁻¹ (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014). Zeng, Qin e Xia (2017), empregaram lacase na degradação do herbicida isoproturon com uma concentração de 0,3 U mL⁻¹. De acordo com os autores, o aumento da concentração enzimática não apresentou diferença significativa na degradação, e utilizando concentrações abaixo de 0,3 U mL⁻¹ foi observada uma gradual diminuição na degradação. Os autores também destacam que a degradação só ocorreu quando na presença do mediador redox. Vallecillos et al. (2017) descreveram a degradação de fragrâncias sintéticas quando aplicado uma concentração de lacase de 0,2 U mL⁻¹, também utilizando ABTS como mediador do sistema.

O percentual de degradação de 36,7%, encontrado para DON após incubação com peroxidase (1 U mL^{-1}), apresentou velocidade de degradação de $0,30 \text{ \% U}^{-1} \text{ min}^{-1}$, esse resultado embora promissor é menor em relação ao encontrado para a mesma enzima com $0,00001 \text{ U mL}^{-1}$, com degradação 22% maior. Os percentuais encontrados para 3-ADON são iguais, tanto para concentração de 1 U mL^{-1} como para $0,62 \text{ U mL}^{-1}$, porém na menor concentração enzimática foi observada velocidade de degradação 1,6 vezes maior. 15-ADON e toxina T-2 apresentaram os maiores percentuais de degradação 45,2% e 25,5%, respectivamente, quando empregada a menor concentração enzimática. A velocidade de degradação para esses dois compostos foi semelhante em comparação com as obtidas na maior concentração enzimática. Segundo Alneyadi e Ashraf (2016), verificaram que um aumento da concentração enzimática pode levar a reação com peróxido de hidrogênio ao ponto de esgotá-lo da mistura de reação, e, portanto, levar a uma diminuição na degradação do composto orgânico.

Sendo assim, ficou definido que para a peroxidase em interação com DON a concentração de enzimas foi de $0,00001 \text{ U mL}^{-1}$ e para 3-ADON, 15-ADON e toxina T-2 na concentração de $0,62 \text{ U mL}^{-1}$. Concentrações similares de peroxidase também foram empregadas em diversos estudos, como: Das e Mishra (2000), que aplicaram peroxidase na degradação de aflatoxina B₁ a uma concentração de $0,2 \text{ U mL}^{-1}$, Hongmei e Nicell (2011) empregaram peroxidase na degradação de bisfenol A com uma concentração de $0,019 \text{ U mL}^{-1}$. Preethi et al. (2013) avaliando o processo de degradação de corantes azo em águas residuais, utilizaram uma concentração de peroxidase de $0,08 \text{ U mL}^{-1}$. Peroxidase também foi empregada na remoção do antimicrobiano triclosan com uma concentração de $0,3 \text{ U mL}^{-1}$ (LI et al., 2016) e na transformação de micropoluentes fenólicos utilizando uma concentração de $0,006 \text{ U mL}^{-1}$ de peroxidase (NA e LEE, 2017).

O aumento da concentração da lipase durante incubação com DON não apresentou degradação, esse resultado enfatiza a necessidade do emprego de baixa concentração enzimática ($0,00001 \text{ U mL}^{-1}$) no processo de degradação desse composto. Com relação à toxina T-2, os resultados seguiram não apresentando percentuais de degradação, mesmo com incremento no tempo e concentração do composto, com isso a toxina T-2 não foi mais avaliada nos ensaios seguintes. Esses

resultados demonstram que esse composto não é um substrato alternativo para essa enzima. 3-ADON apresentou o mesmo percentual de degradação nas duas concentrações enzimáticas ($0,0001 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,037 \text{ U mL}^{-1}$), porém foi escolhida a concentração de $0,037 \text{ U mL}^{-1}$ para a continuação dos ensaios, isso porque com essa concentração foram encontrados resultados semelhantes para 15-ADON. Esses percentuais podem ser aumentados através da otimização das condições reacionais.

A enzima esterase, quando testada sua incubação com DON, 3-ADON, 15-ADON e toxina T-2, em concentração enzimática de $0,025 \text{ U mL}^{-1}$ não apresentou percentuais de degradação, em comparação com o observado nas Tabelas 19, 21 e 22. Assim foi definida a concentração enzimática de $0,0001 \text{ U mL}^{-1}$ para os ensaios posteriores utilizando os compostos DON e 3-ADON. Para 15-ADON foi definida a concentração de $0,001 \text{ U mL}^{-1}$, esta escolha feita porque esta menor concentração estudada apresentou um maior percentual de degradação. Da mesma forma que para enzima lipase, a toxina T-2 não seguiu para futuras avaliações em interação com a enzima esterase.

Uma razão para a otimização da concentração em reações de biorremediação, está relacionada com o custo das enzimas, este se apresenta como um grande obstáculo no processo de biorremediação tendo em vista que o mesmo deve ser economicamente viável (ALNEYADI e ASHRAF, 2016).

5.4.1 Efeito do ABTS na ação da Lacase

Os resultados indicados na Tabela 26 mostram um aumento do percentual de degradação de 3-ADON, proporcional ao aumento da concentração de ABTS no sistema até $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Altas concentrações de ABTS resultaram em um decréscimo no percentual de degradação. Também é possível observar que na ausência de ABTS, não são observados percentuais de degradação, utilizando uma concentração enzimática de $0,15 \text{ U mL}^{-1}$, o que enfatiza a necessidade do uso do modulador na ação da enzima. Sendo assim, ficou adotada a concentração de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de ABTS em sistema modelo para o emprego da lacase na degradação de 3-ADON. A presença de ABTS, também foi relatada como de fundamental importância na ação da enzima lacase from *Trametes versicolor* na degradação de

outros compostos, como para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (KOSCHORRECK et al., 2008), aromáticos brominados (UHNÁKOVÁ et al., 2009), *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (TRAN e HU, 2013) e fragrâncias sintéticas (VALLECILLOS et al., 2017).

Tabela 26. Efeito da concentração de ABTS como modulador redox de ação enzimática da enzima lacase na degradação de 3-ADON.

ABTS (mmol L ⁻¹)	Degradação (%)	Velocidade de degradação (% U ⁻¹ min ⁻¹)
0	0 (12,8) ^b	0
0,1	4,1 (21,8) ^{a,b}	0,22
0,2	9,6 (23,7) ^{a,b}	0,53
0,25	22,5 (5,1) ^a	1,25
0,5	15,6 (0,1) ^b	0,86
0,75	11,6 (25,3) ^{a,b*}	0,64

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

Lacases são enzimas essenciais para a catálise “verde”, uma vez que para redução dos compostos, essas enzimas utilizam O₂, possuindo como único subproduto, H₂O. Os principais substratos oxidados por essas enzimas são fenóis, anilinas e benzenotiois (XU et al., 1996), e as reações prosseguem por oxidação monoelétrica da molécula do substrato para um radical reativo correspondente (MARJASVAARA, JÄNIS e VAINIOTALO, 2008). Este intermediário pode produzir dímeros, oligômeros e polímeros. Porém, lacases podem também ser utilizadas na transformação de compostos não fenólicos, mas não diretamente sem adição de compostos chamados moduladores (BOURBONNAIS e PAICE, 1990). Moduladores redox são moléculas pequenas, que uma vez oxidadas pela lacase atuam como hábeis radicais difusores estáveis, podendo aumentar a atividade enzimática (RODGERS et al., 2009).

Diferentes tipos de moduladores têm sido estudados, com variáveis eficiências na mediação (FABBRINI, GALLI e GENTILI, 2002), porém o modulador que vem sendo mais frequentemente utilizado, em reações com lacase, é o ABTS. O ABTS possui um baixo potencial redox (0,67 V), além da vantagem de seu potencial redox ser independente do pH utilizado (RODGERS et al., 2009). A enzima lacase obtida de *Trametes versicolor* possui um potencial redox de 0,79 V, o que só permite sua ação direta em compostos fenólicos de baixo potencial redox (XU et al., 1996), assim a presença de ABTS potencializa a ação da enzima, possibilitando a oxidação desde de

compostos fenólicos (potencial redox entre 0,5 e 1 V) até compostos não fenólicos (com alto potencial redox, acima de 1,1 V), como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Quando um modulador redox está presente, este pode ser oxidado pela enzima e, subsequentemente, oxidar outra molécula, que pode ser substrato ou não da enzima, resultando na formação do produto oxidado e na regeneração do modulador. Dessa forma, o uso de moduladores oferece importantes possibilidades para criar modos múltiplos de ataque ao substrato, levando com isso, ao aumento da conversão do composto alvo.

Porém, o maior obstáculo para implementação do uso de um sistema lacase/ABTS em processos de biorremediação, em escala industrial, são os custos da enzima e do modulador. Quanto à enzima, sua obtenção a partir de micro-organismo torna seu custo mais acessível, mas, como situação crítica, a utilização de um modulador redox sintético (ABTS), inviabiliza a aplicação do processo na indústria alimentícia, para sanar esse problema é necessário o estudo de moduladores redox, mais acessíveis em fontes naturais.

5.4.2 Efeito do H₂O₂ na ação da enzima peroxidase

Como peroxidase tem um requisito absoluto do uso de H₂O₂ para sua atividade a concentração de H₂O₂ é um dos fatores mais críticos na otimização da degradação de compostos orgânicos mediada por peroxidase. Uma concentração insuficiente de H₂O₂ levará a uma degradação ineficiente dos compostos orgânicos, no entanto, altas concentrações de H₂O₂ pode oxidar (irreversivelmente) e danificar a enzima, a ponto de levar a uma menor taxa de degradação (ALNEYADI e ASHRAF, 2016).

As concentrações utilizadas no estudo estão baseadas no volume de H₂O₂ que é empregado no sistema reacional da enzima. Como pode ser visto na Tabela 27, o aumento da concentração de H₂O₂ de 27 para 40,5 mmol L⁻¹, causou um decréscimo no percentual de degradação de DON e 3-ADON, bem como a diminuição da concentração para 13,5 mmol L⁻¹. Este resultado é oposto ao encontrado para 15-ADON e toxina T-2, tendo em vista que para a ação de peroxidase sobre esses compostos, foi necessária uma concentração de 67,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂.

Tabela 27. Efeito da concentração de H₂O₂ na ação de peroxidase durante degradação dos tricotecenos A e B.

H ₂ O ₂ (mmol L ⁻¹)	Degradação (%)			
	DON	3-ADON	15-ADON	Toxina T-2
0	0	0	0	0
6,7	1,1 (290)	-	-	-
13,5	13,5 (17,0)	12 (12,8)	-	-
27	47,2 (11,0)	39,1 (4,5)	10,5 (9,0)	7,1 (17,7)
40,5	9,2 (13,2)*	6,0 (18,1)	20,9 (10,6)	23,3 (8,5)
67,5	-	21,0 (11,1)	45,2 (10,2)	25,5 (8,1)
H ₂ O ₂ (mmol L ⁻¹)	Velocidade de degradação (% U ⁻¹ min ⁻¹)			
	DON	3-ADON	15-ADON	Toxina T-2
0	0	0	0	0
6,7	916,66	-	-	-
13,5	11250,00	0,16	-	-
27	39333,33	0,52	0,14	0,10
40,5	7666,66	0,08	0,28	0,31
67,5	-	0,28	0,60	0,34

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade. (-) – Concentrações não testadas.

Estes resultados podem estar relacionados com a estabilidade de H₂O₂, sua molécula é termodinamicamente instável, o que faz com que sua presença no sistema não seja observada com o passar do tempo reacional. Essa instabilidade também pode ter ação sobre a estrutura química dos tricotecenos, uma maior disponibilidade de H₂O₂ no sistema reacional é requerida para oxidação de 15-ADON e toxina T-2 em comparação a DON e 3-ADON.

5.5 PARÂMETROS DE CONTROLE ENZIMÁTICO

A cinética enzimática investiga a atividade e as propriedades catalíticas das enzimas. *In vitro*, estuda-se a atividade da enzima relacionada ao tipo de reações que esta pode catalisar, com que substratos pode atuar e como modifica essa atividade (qualitativa e/ou quantitativamente) quando há variação das condições de reação na aplicação. Para cada enzima há um substrato natural específico, que apresenta maior afinidade (menor K_M), sendo assim, existe um único valor de K_M para cada par enzima-substrato: substratos diferentes que reagem com uma dada enzima o fazem com valores de K_M diferentes (VOET, VOET E PRATT, 2014). A V_{máx} de uma reação ocorre a concentrações de substrato nas quais a enzima está saturada, ou seja, quando a

enzima está inteiramente na forma enzima-substrato (E:S) (VOET, VOET E PRATT, 2014). Esses parâmetros são obtidos através das equações de linearização dos modelos enzimáticos. As equações de linearização de cada método utilizado para análise dos modelos enzimáticos estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28. Equações das linearizações dos métodos, determinadas experimentalmente a partir das enzimas em estudo.

Enzima	Tricoteceno	Método	Equação de linearização	R ²
Lacase	3-ADON	LB	$y = 337,32 x - 37,07$	0,979
		EH	$y = 9,8191 x - 0,0278$	0,515
		HW	$y = 4,2401 x + 237,97$	0,110
		Hill	$y = 1,1164 x - 0,6474$	0,991
Peroxidase	DON	LB	$y = 0,0171 x - 0,0024$	0,981
		EH	$y = 10,384 x - 628,8$	0,973
		HW	$y = -0,0016 x + 0,0165$	0,925
		Hill	$y = 3,4478 x - 0,8438$	0,959
	3-ADON	LB	$y = 261,6998 x + 58,584$	0,983
		EH	$y = 4,0254 x - 0,0017$	0,956
		HW	$y = 53,348 x + 277,91$	0,897
		Hill	$y = 0,9192 x - 0,757$	0,960
	15-ADON	LB	$y = 609,27 x - 23,551$	0,957
		EH	$y = 2,1117 x + 0,0029$	0,932
		HW	$y = -53,54 x + 719$	0,490
		Hill	$y = 0,955 x - 0,6229$	0,709
	T-2	LB	$y = 570,8136 x + 22,467$	0,987
		EH	$y = -1,4794 x + 0,0123$	0,364
		HW	$y = 42,247 x + 359,96$	0,929
		Hill	-	
Lipase	3-ADON	LB	$y = 34,545 x + 1,4684$	0,902
		EH	$y = 2,0748 x + 0,0034$	0,942
		HW	$y = 1,7114 x + 33,587$	0,083
		Hill	$y = -1,7375 x + 0,4405$	0,663
Esterase	15-ADON	LB	$y = 1,1739 x + 0,1137$	0,978
		EH	$y = 5,8945 x - 0,9917$	0,979
		HW	$y = 0,0753 x + 1,2747$	0,108
		Hill	$y = 1,1432 x - 0,8827$	0,878

LB – Lineweaver-Burk; EH – Eadie-Hofstee; HW - Hannes-Woolf; Hill – Linearização de Hill.

Nas Figuras 9 e 10 (a) e (b), é possível observar os gráficos de v_0 versus a concentração de substrato e a linearização da equação de Hill para o modelo cinético do tipo sigmoidal.

Figura 9. Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico linear obtido a partir do desenvolvimento matemático da equação de Hill (b), 3-ADON em interação com a enzima lacase.

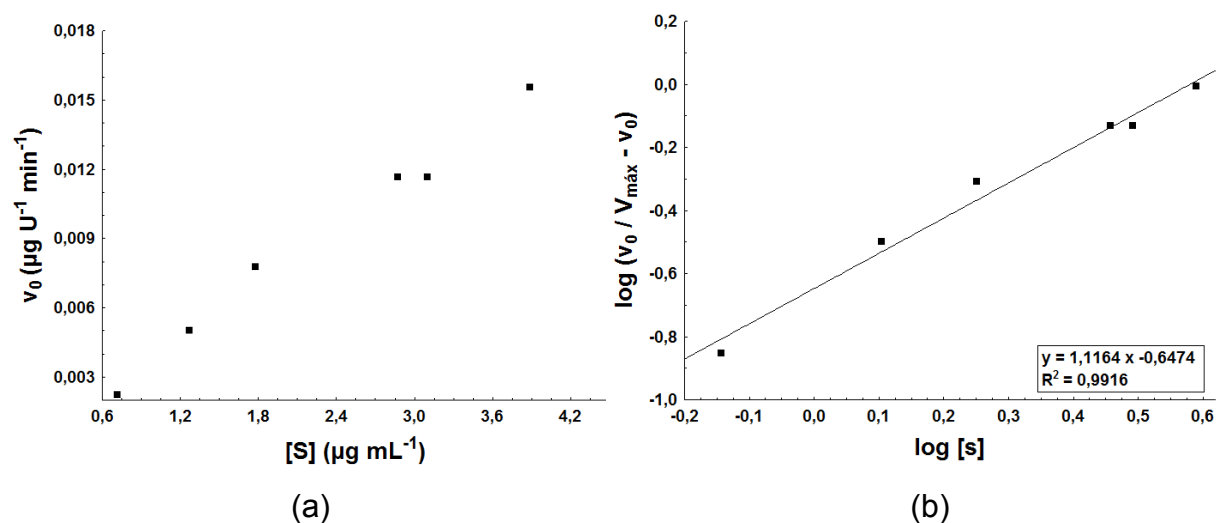
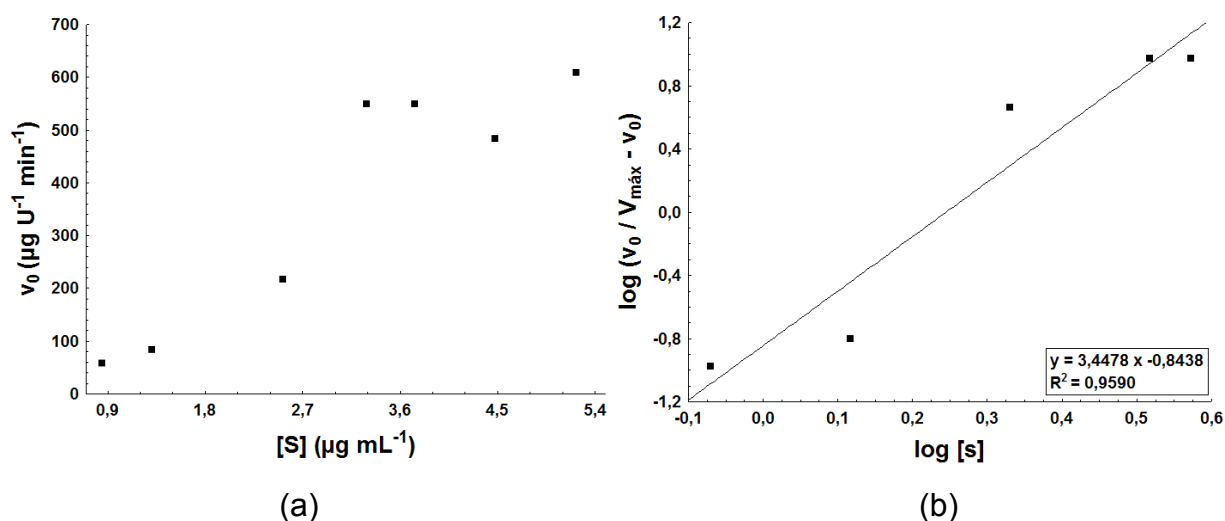


Figura 10. Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico linear obtido a partir do desenvolvimento matemático da equação de Hill (b), DON em interação com a enzima peroxidase.



Quando a cinética enzimática se apresenta do tipo, cooperativo ou sigmoidal, nesse sistema há uma resposta à presença de um modulador, gráficos são obtidos a partir de v_0 *versus* a concentração de substrato com a forma de um sigmoide, típicas de enzimas regulatórias (NELSON, COX e LEHNINGER, 2014). Para baixas

concentrações de substrato, a atividade aumenta de forma exponencial com a concentração do substrato utilizada. Para altas concentrações de substrato manifesta-se o fenômeno da saturação; o fato de existir uma quantidade limitada de enzima no meio de ensaio implica que, quando a enzima está próxima da saturação, as variações da concentração de substrato provocam modificações mínimas na atividade. É comum chamar as enzimas de tipo cooperativo de enzimas alostéricas, o grau de alosterismo pode ser medido pela avaliação do grau de cooperação, através do coeficiente de Hill (h), este sendo igual a um diz-se que a interação é não cooperativa, coeficiente maior que um a cooperação é positiva e menor que um é negativa. O valor de h é equivalente ao declive da reta de linearização.

Em enzimas com cinética alostérica, a presença de efetores ou moduladores, provocaria na enzima uma alteração em sua conformação, refletindo em uma alteração na sua atividade catalítica ou também a possível existência de duas conformações enzimáticas em equilíbrio químico, porém com atividades distintas, tendo o mediador, maior afinidade sobre uma das conformações (NELSON, COX e LEHNINGER, 2014). Conceitualmente, não existe grande diferença entre substratos e moduladores. No entanto, um modulador é um substrato, cujo radical é capaz de restaurar a configuração eletrônica original à custa de outro composto, que geralmente é resistente à ação direta da enzima (ZUCCA et al., 2015).

Como foi exposto anteriormente, enzimas alostéricas agem por meio de ligações reversíveis e não covalentes com compostos regulatórios denominados moduladores alostéricos ou efetores alostéricos, que geralmente são metabólitos pequenos ou cofatores, é nesse contexto que se encaixam as enzimas lacase e peroxidase em interação com 3-ADON e DON, respectivamente. A ação oxidativa da enzima lacase, por exemplo, é fortemente influenciada pela presença de moduladores, como descrito no item 5.4.1. Neste estudo, após avaliação de todos os demais modelos de cinética enzimática, ficou definido que a cinética enzimática da interação entre a enzima lacase e 3-ADON é do tipo sigmoidal. Essa mesma conclusão aplica-se para a enzima peroxidase em interação com DON, levando em consideração a ação do cofator de ação enzimática (H_2O_2) no sistema reacional enzimático, conforme item 5.4.2.

A partir das equações apresentadas na Tabela 28, foram determinados os parâmetros h, $K_{0,5}$ e $V_{m\acute{a}x}$ conforme segue demonstrado na Tabela 29. O termo K_M não

tem significado real para uma enzima alostérica, particularmente se as propriedades de ligação e cinética estão sendo consideradas: um termo mais apropriado é $K_{0,5}$, que é a concentração do ligante necessária para produzir 50% de saturação da proteína. Quando $v_0 = V_{m\acute{a}x}/2$ a concentração de substrato é $K_{0,5}$. A Tabela 29 apresenta os valores do declive da reta de linearização da equação de Hill, h se mostrou maior que 1, para a interação entre a enzima lacase e 3-ADON, o que demonstra uma cooperatividade positiva na modulação enzimática, sendo o modulador considerado um modulador heterotrópico positivo.

Tabela 29. Parâmetros h , $K_{0,5}$ e $V_{m\acute{a}x}$, obtidos pelos gráficos de linearização de Hill.

Sistema	H	$K_{0,5}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g U}^{-1} \text{min}^{-1}$)
3-ADON x Lacase	1,11	4,4	0,0156
DON x peroxidase	3,44	7,0	608,33

h – coeficiente de Hill; $K_{0,5}$ – afinidade de substrato; $V_{m\acute{a}x}$ – velocidade máxima.

No caso do modulador positivo, a possível mudança conformacional causada na enzima pode auxiliar na catálise enzimática (LIMA et al., 2001), conforme já observado no item 5.4.1. O mesmo foi encontrado para a enzima peroxidase, onde o sistema de interação com DON demonstra cooperatividade positiva na modulação enzimática, com coeficiente de Hill também maior que 1. Sendo assim essa enzima, em sistema reacional com DON e H_2O_2 , é influenciada por um modulador heterotrópico positivo.

Cabe ressaltar que um determinado composto, pode ser modulador alostérico positivo para algumas enzimas e modulador alostérico negativo para outras (LIMA et al., 2001). Os resultados aqui apresentados são inéditos na literatura, no que se refere ao modelo cinético de interação dessas enzimas com tricotecenos e demais micotoxinas. Um aumento na afinidade da enzima por seu substrato está diretamente relacionado com a diminuição do valor de K_M , no caso das enzimas alostéricas esta relação é expressa pelo valor de $K_{0,5}$. Em análise dos resultados obtidos nesse estudo, a enzima lacase apresentou maior afinidade por seu substrato (3-ADON) em relação à enzima peroxidase por DON. Em contrapartida, os resultados encontrados na Tabela 29, demonstram que a velocidade de reação da enzima peroxidase em interação com DON é 39000 vezes maior que a interação entre lacase e 3-ADON. $V_{m\acute{a}x}$ é a maior velocidade na qual uma enzima consegue transformar substrato em produto.

Para a interação da enzima peroxidase com 3-ADON e toxina T-2, da enzima lipase com 3-ADON e esterase com 15-ADON foi possível a determinação dos parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 30), utilizando as equações encontradas através da linearização pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, conforme Figuras 11, 12, 13 e 14 (a) e (b).

Tabela 30. Parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$, obtidos pelos gráficos de linearização de Lineweaver-Burk.

Sistema	K_M		$V_{m\acute{a}x}$	
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\mu\text{g U}^{-1} \text{min}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1} \text{U}^{-1} \text{min}^{-1}$)
3-ADON x peroxidase	59,0	0,173	0,017	$5,02 \times 10^{-5}$
Toxina T-2 x peroxidase	23,0	0,0486	0,044	$9,43 \times 10^{-5}$
3-ADON x Lipase	1,5	$4,34 \times 10^{-3}$	0,70	$2,01 \times 10^{-3}$
15-ADON x Esterase	0,05	$1,47 \times 10^{-4}$	18,0	0,05

Os resultados expressos na Tabela 30 evidenciam ainda, que a enzima peroxidase tem maior afinidade pela toxina T-2 como substrato, o que fica comprovado por esta interação ter apresentado maior velocidade de reação em relação à interação 3-ADON + peroxidase. Peroxidase catalisa a oxidação de pares de elétrons, preferencialmente reações de oxidação de substratos fenólicos, o que faz com que os resultados expressos acima estejam diretamente ligados a estrutura química dos compostos degradados. Com relação às enzimas hidrolíticas, a esterase mostrou possuir maior afinidade por 15-ADON quando comparado com lipase e peroxidase, o que também se refletiu na avaliação de $V_{m\acute{a}x}$.

Os valores de K_M , $K_{0,5}$ e $V_{m\acute{a}x}$ são de grande importância, tendo em vista que fornecem as concentrações de substrato e enzima, respectivamente, necessários para um sistema com condições ótimas de ação enzimática. Os valores encontrados para concentração de 3-ADON e toxina T-2 para interação com peroxidase se mostraram altos para aplicação no estudo de cinética de degradação, isto porque seu emprego levaria a exposição do analista a altas concentrações dos contaminantes. Diferentemente do que foi encontrado para as enzimas hidrolíticas que apresentaram concentrações de 3-ADON e 15-ADON menores, no caso do sistema 15-ADON + esterase, a concentração $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ está abaixo do limite de quantificação do

método em HPLC-UV o que inviabiliza manter essa concentração para os ensaios de degradação.

Para que um modelo de regressão esteja bem ajustado aos dados, a nuvem de pontos deve se distribuir aleatoriamente e de forma homogênea em torno do eixo horizontal (eixo das abscissas). Em vista disso, não foi possível a definição de um modelo cinético para interação de peroxidase com 15-ADON.

Figura 11. Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), 3-ADON em interação com peroxidase.

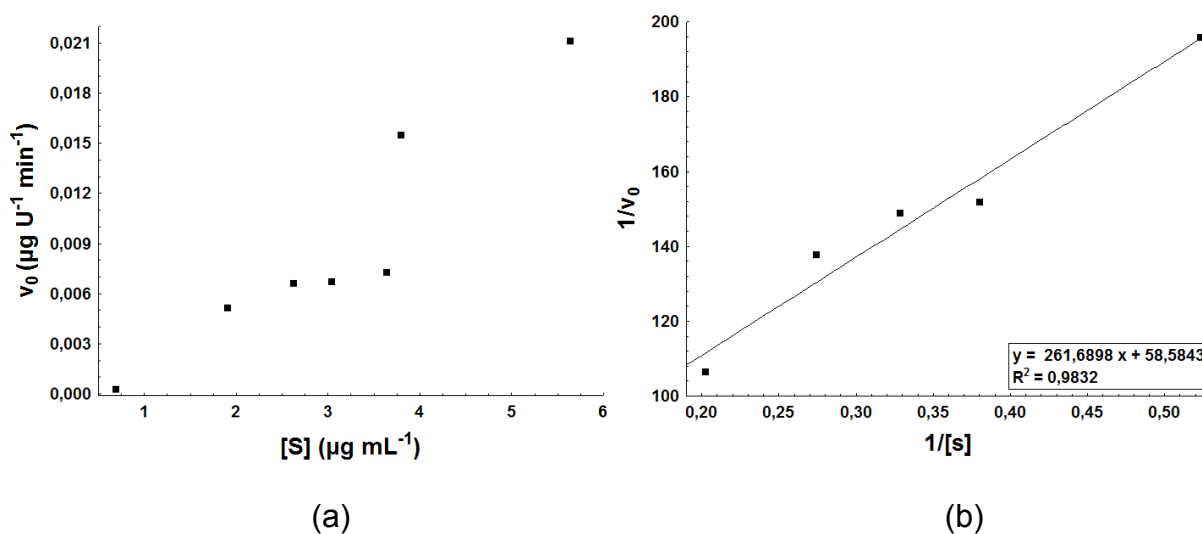


Figura 12. Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), toxina T-2 em interação com peroxidase.

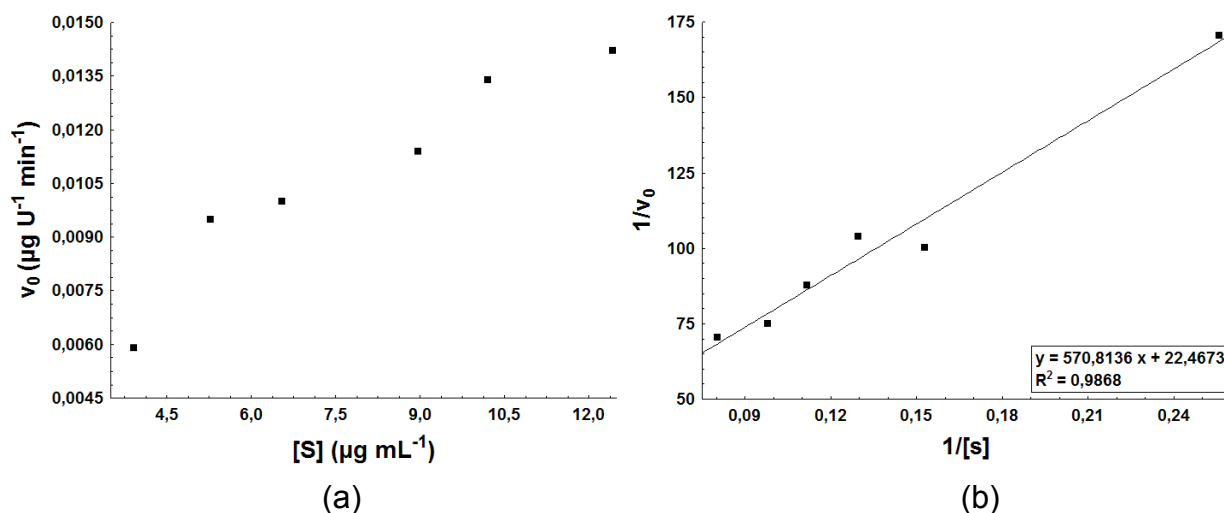


Figura 13. Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), 3-ADON em interação com lipase.

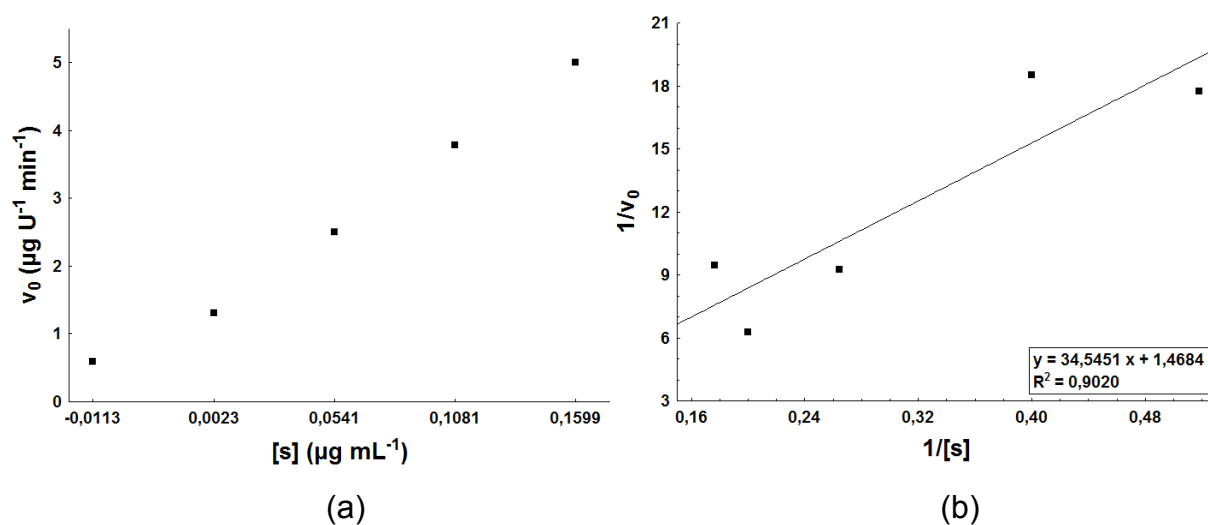
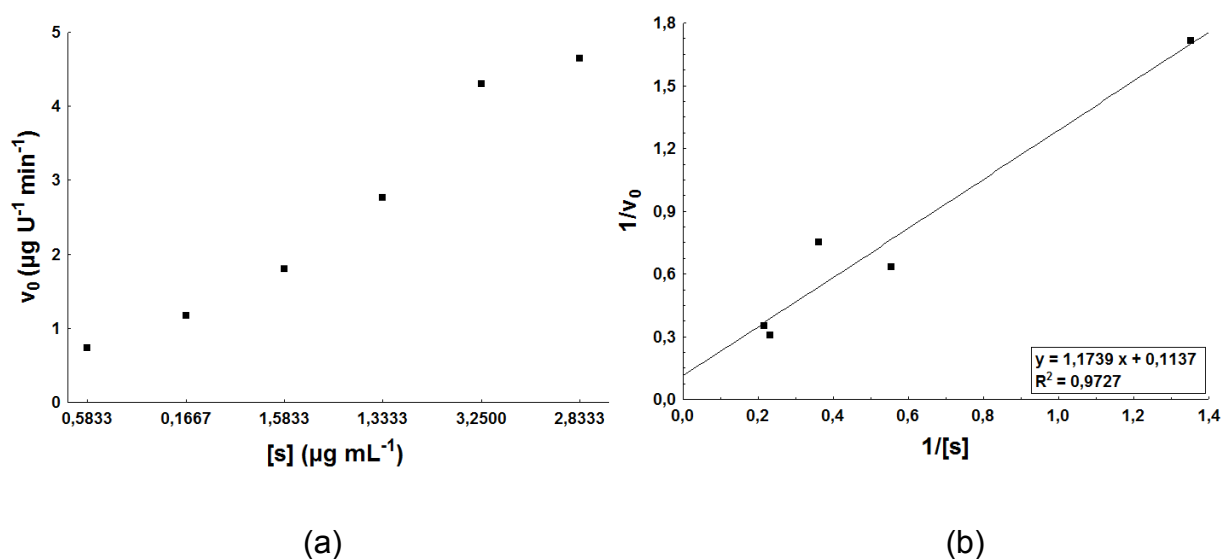


Figura 14. Velocidade de degradação *versus* a concentração de substrato (a) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (b), 15-ADON em interação com esterase.



Outro fator importante a ser considerado nesse caso, que também foi abordado por Cuadrado et al. (2012), é relativo a estudos de especificidade de substratos de peroxidases, que são geralmente realizados com apenas um substrato presente, além de H_2O_2 , na mistura de reação sem quaisquer substratos alternativos capazes de sofrer a mesma reação. Conforme os autores, isso ocorre, porque a presença de substratos concorrentes tende a complicar a análise sem fornecer muito mais informações, que

poderiam ser obtidas estudando os substratos separadamente. Neste sentido, a maioria das enzimas não é perfeitamente específica para um único substrato e muitas vezes, deve selecionar um entre vários que estão disponíveis simultaneamente.

Os resultados das interações que seguiram o método de linearização de Lineweaver-Burk, também são inéditos na literatura. No caso da enzima peroxidase, já existem estudos utilizando esta, em interação com outras micotoxinas, como no caso da zearalenona, onde Garcia (2016) obteve um K_M de $12,61 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que enfatiza a maior afinidade da enzima peroxidase por zearalenona como substrato em relação a 3-ADON e toxina T-2. Em outro estudo, Nora (2015) utilizando como substrato ocratoxina A, obteve um K_M de $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que demonstra também, maior afinidade de peroxidase por ocratoxina A, tendo em vista que quanto menor o valor de K_M maior é a afinidade da enzima por seu substrato.

Assim, para os ensaios de cinética de degradação ficou estabelecido o emprego das concentrações que apresentaram maior percentual de degradação dos tricotecenos obtidos na avaliação de cinética enzimática. Sendo assim para a concentração de 3-ADON em interação com lacase foi de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, já para as interações com a enzima peroxidase, as concentrações foram: $4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DON, $3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 3-ADON, $2,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 15-ADON e para toxina T-2 a concentração foi de $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados das interações enzima-substrato utilizando enzimas hidrolíticas, estão apresentados na Tabela 31. Para estas, não foi possível a adequação dos dados a nenhum modelo cinético. Isto enfatiza a necessidade de maiores estudos com relação a essa interação. Conforme pode ser observado na Tabela 31, não há um padrão que pode ser estabelecido para análise dos dados encontrados das interações das enzimas hidrolíticas com os tricotecenos. Para a realização dos estudos de cinéticas de degradação entre enzimas hidrolíticas e tricotecenos, ficou estabelecido que: a interação com menor concentração de tricoteceno que apresentou maior percentual de degradação, bem como menor valor de RSD.

Assim, para enzima lipase foram estabelecidas as seguintes concentrações dos tricotecenos, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DON, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 3-ADON e $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 15-ADON. Já para enzima esterase, as concentrações definidas foram: $3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DON, $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 3-ADON e $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 15-ADON.

Tabela 31. Avaliação das interações entre lipase e esterase com tricotecenos, que não apresentaram adequação a modelos cinéticos.

Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Micotoxina	Tempo (h)	Micotoxina (µg mL ⁻¹)	Degradação (%)	Velocidade de degradação (% U ⁻¹ min ⁻¹)
Enzima lipase					
0,00001	DON	2	0,7	0 (11,6)*	-
			1,2	0 (11,9)	-
			2,0	3,0 (40,7)	2500,00
			2,4	0,7 (533)	583,33
			2,7	0 (110)	-
			3,0	0 (6,9)	-
			3,6	3,1 (94,7)	2583,33
			4,6	3,6 (23,4)	3000,00
			5,0	0 (370)	-
			0,037	15-ADON	2
1,3	0 (22,1)	-			
2,1	0 (23,6)	-			
2,7	3 (20,1)	0,70			
3,0	3 (3,4)	0,70			
4,0	0,01 (8025)	-			
4,4	0 (879)	-			
4,8	2,7 (28)	0,61			
5,5	0 (459)	-			
Enzima esterase					
0,0001	DON	2	0,8	0 (29,1)	-
			1,4	0 (53,2)	-
			2,1	0 (123)	-
			2,7	0 (10,1)	-
			3,6	9 (8,4)	750,00
			4,1	6,1 (11,7)	508,33
			5,0	4,7 (1,8)	391,66
			5,3	0 (14,4)	-
			5,9	0 (625)	-
			0,0001	3-ADON	2
1,3	0 (30,1)	-			
1,8	0 (168)	-			
2,5	6,0 (41,4)	500,00			
3,0	4,2 (1,3)	350,00			
3,6	5 (40)	416,66			
4,0	0 (25,6)	-			
5,1	16 (22,1)	1333,33			
5,1	0 (21,9)	-			

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

Dados relativos a afinidade de enzimas por micotoxinas como seus substratos também são encontrados na literatura, como Wen et al. (2011) utilizaram uma oxidase obtida de *Pichia pastoris* para conversão de AFB₁ utilizando pH 6,0 e temperatura de 30 °C como condições ótimas reacionais, com um valor de K_M de 3,93 x 10⁶ mol L⁻¹.

5.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

A partir da definição da concentração enzimática seguida da definição da concentração de substrato (tricoteceno) utilizadas no sistema reacional, foi avaliada a cinética de degradação. O conhecimento sobre cinética de degradação é crucial para estudos de controle de micotoxinas, nosso estudo representa uma alternativa promissora para aplicação dessas enzimas na descontaminação de tricotecenos em produtos alimentares. Este é o primeiro trabalho sobre cinética de degradação de tricotecenos por ação das enzimas em estudo. A enzima peroxidase já vem sendo utilizada para degradação de DON (FELTRIN et al., 2017 a e b; GAUTÉRIO et al., 2017), porém ainda não existem estudos de sua aplicação na degradação dos demais tricotecenos em estudo. Os resultados obtidos da cinética de degradação dos tricotecenos ocorreram ao longo de 24 h, mediante a ação das enzimas lacase, peroxidase, lipase e esterase.

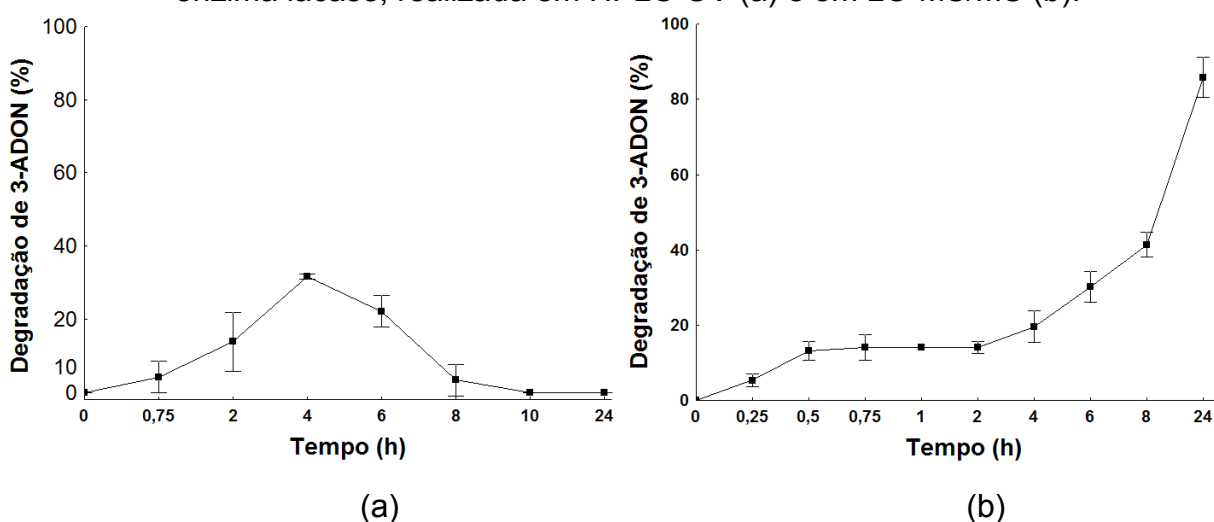
A avaliação da cinética de degradação por ação da enzima lacase foi realizada pelo emprego de técnicas de HPLC-UV, LC-MS/MS e HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap. Os resultados encontrados para a enzima lacase em interação com 3-ADON fazem parte do projeto desenvolvido durante atividade de cooperação interinstitucional no exterior. O objetivo do projeto intitulado —Degradação de tricotecenos A e B por ação enzimática” foi identificar os produtos de degradação enzimática dos tricotecenos após ação enzimática, com o emprego de espectrometria de massas. Durante período de atividades no Instituto de Química de Alimentos da Universidade de Münster na Alemanha, foi possível estabelecer a cinética de degradação da enzima lacase sobre 3-ADON, toxina T-2 e DON. 15-ADON não foi avaliado por não ser um composto de estudo no instituto.

Para as determinações em LC-MS/MS, foram obtidas as seguintes equações a partir das curvas analíticas: $y = 3 \times 10^{-5} x + 0,1459$ ($r = 0,988$) para DON,

$y = 3 \times 10^{-5} x + 0,1873$ ($r = 0,991$) para 3-ADON e $y = 6 \times 10^{-6} x + 0,4227$ ($r = 0,979$) para toxina T-2, sendo estas utilizadas para quantificação dos tricotecenos. A determinação do percentual de degradação das amostras foi realizada em comparação com a intensidade do sinal do branco (previamente quantificado). Como o objetivo das análises em LC-MS/MS foi apenas confirmar a degradação dos compostos, o método analítico não foi validado.

Os ensaios de cinética de degradação de 3-ADON iniciaram por determinações realizadas em HPLC-UV (Figura 15 a), e o tempo de máxima degradação foi de 4 h, com 28,3%. Os mesmos ensaios foram reproduzidos no Instituto de Química de Alimentos na Universidade de Münster e analisados em LC-MS/MS, os resultados encontrados dos ensaios são mostrados na Figura 15 (b).

Figura 15. Percentual de degradação de 3-ADON em função do tempo por ação da enzima lacase, realizada em HPLC-UV (a) e em LC-MS/MS (b).



Comparando as duas técnicas empregadas na análise das amostras de degradação e observando as Figuras 15 (a) e (b), fica clara a diferença nos percentuais de degradação de 3-ADON, diferença explicada pela Figura 16. Na Figura 16 estão representados os diferentes tempos de incubação de lacase/ABTS + 3-ADON avaliadas em HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap, ficou demonstrada a influência de produtos de oxidação de ABTS formados durante reação, na quantificação de 3-ADON. Esse resultado foi confirmado após avaliação da Figura 17, que demonstra a influência do meio reacional na determinação de 3-ADON em PDA

Figura 16. Cromatogramas em HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap representando a comparação entre os diferentes tempos de incubação do sistema lacase/ABTS + 3-ADON com o padrão de 3-ADON. Em azul 45 min de incubação, em vermelho 5 h, em verde 8 h, em roxo 10 h e em preto o padrão de 3-ADON.

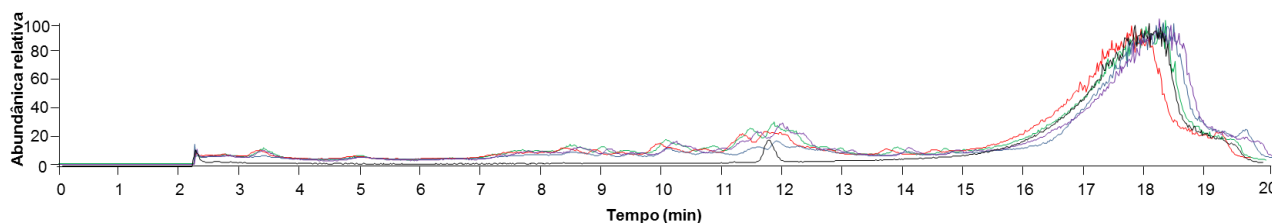
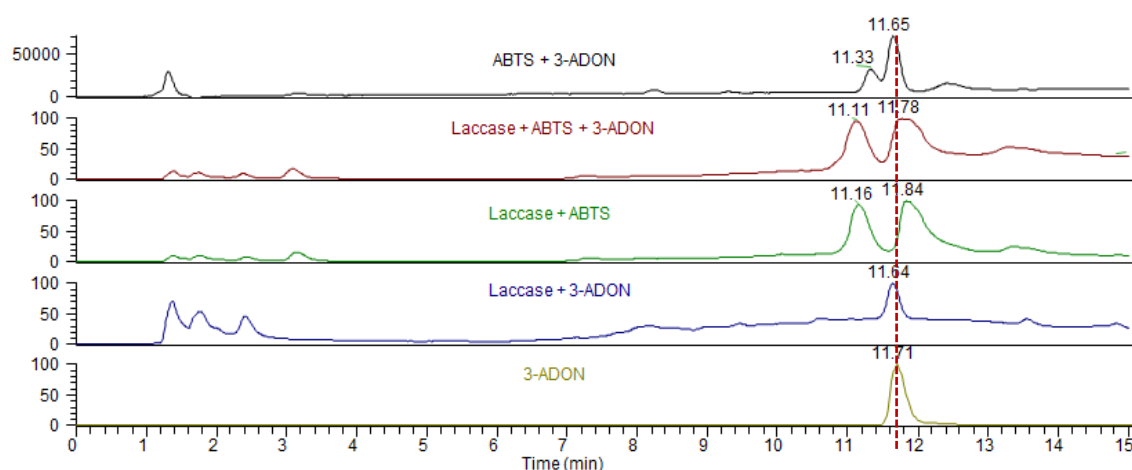


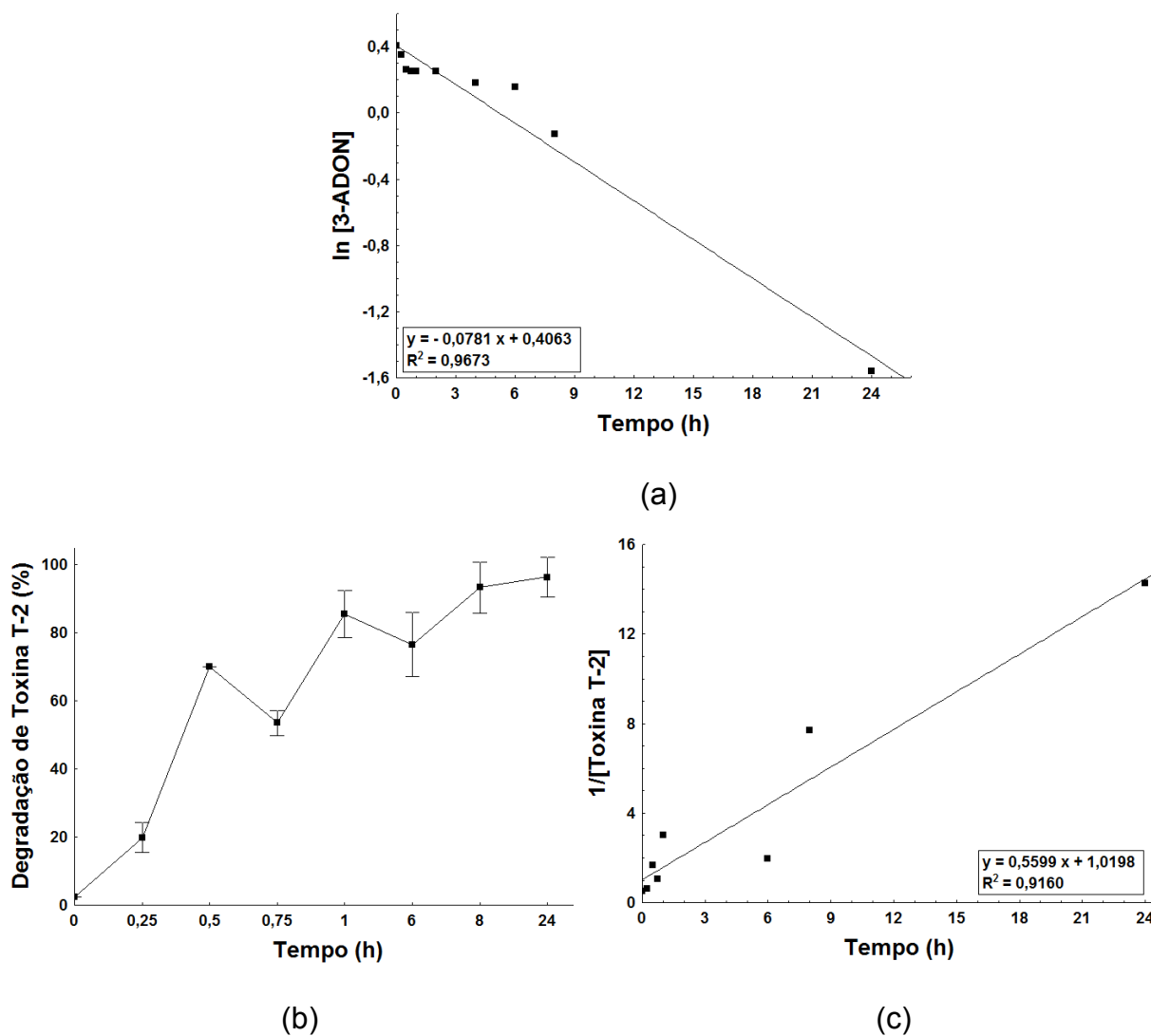
Figura 17. Comparação entre os sistemas reacionais de degradação de 3-ADON na análise de HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap, com detecção em PDA.



Esses resultados evidenciam a necessidade do uso da técnica de espectrometria de massas para avaliar a degradação de tricotecenos por ação do sistema lacase/ABTS. O emprego da técnica de espectrometria de massas permite o monitoramento do íon de massa molecular específica do composto em estudo, com isso diante dos resultados encontrados e da definição da formação de compostos de oxidação de ABTS, o monitoramento de degradação seguiu para toxina T-2 e DON em LC-MS/MS. Estes compostos não apresentavam percentuais de degradação por ação da enzima lacase conforme mostrado na Tabela 25. A curva de degradação de 3-ADON em função do tempo (Figura 15 b) foi linearizada, e a Figura 18 (a) mostra que esses dados seguiram claramente uma relação linear, sendo essa a condição para a

existência de uma compensação cinética, o mesmo foi observado para toxina T-2 (Figura 18 b e c).

Figura 18. Cinética de degradação de 3-ADON (a) e toxina T-2 (c) e percentual de degradação de toxina T-2 em função do tempo (b) por ação da enzima lacase.



As constantes de degradação dos tricotecenos pela ação da lacase em tampão fosfato de sódio na presença do modulador ABTS, foram calculadas e a relação linear para a degradação de 3-ADON seguindo uma cinética de primeira ordem ($R^2 = 0,96$), enquanto que a degradação da toxina T-2 seguiu uma cinética de segunda ordem ($R^2 = 0,91$). A atividade enzimática ocorre ao longo do tempo, daí a justificativa para um aumento gradual da degradação dos tricotecenos com o tempo. Diferenças entre as

cinéticas de degradação dos dois tricotecenos estudados foram detectadas, pela determinação da constante k (declive da reta) foi possível definir os valores de tempo de meia-vida e valor D .

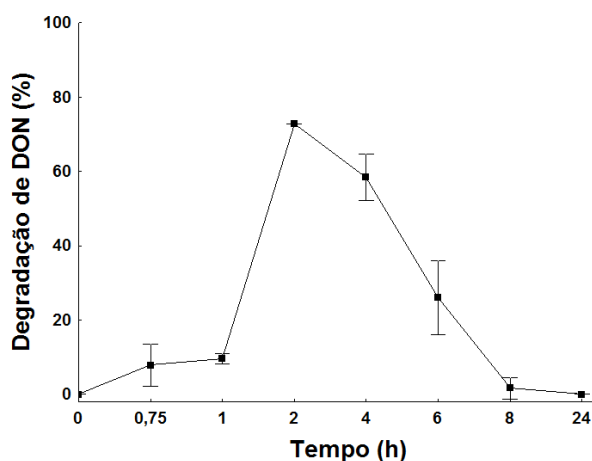
O valor da constante k para 3-ADON ($k = - 0,0781 \text{ h}^{-1}$) e toxina T-2 ($k = 0,5599 \text{ h}^{-1}$), foi utilizado para calcular o tempo de meia-vida dos compostos, 8,9 h e 0,9 h, respectivamente, sendo esse o tempo necessário para redução de 50% na concentração dos tricotecenos por ação da enzima lacase. Quanto menor é o valor do tempo de meia-vida maior a velocidade da reação, demonstrando uma maior eficiência da lacase na degradação de toxina T-2 em comparação a 3-ADON. A rapidez da ação da enzima também pode ser confirmada pela avaliação do valor D , representando em nosso estudo, o tempo necessário para redução de 90% da concentração dos tricotecenos, sendo este valor de 29,5 h para 3-ADON, e 4,1 h para toxina T-2, o que representou ao final das 24 h de incubação, 87 e 96% de degradação, respectivamente.

Em termos de estabilidade térmica, o parâmetro de maior confiabilidade, para avaliação é a energia livre de Gibbs (SAQIB et al., 2010). O equilíbrio entre P (produto) e S (substrato) reflete a diferença entre as energias livres dos seus estados fundamentais, no caso da energia livre do estado fundamental de P ser menor do que a de S, ΔG° para a reação é negativa e a reação é chamada exergônica, e o equilíbrio favorece mais P que S (NELSON, COX e LEHNINGER, 2014). Um valor negativo foi encontrado para ΔG° na termodinâmica reacional da enzima lacase, tendo como substratos 3-ADON ($- 80,73 \text{ kJ mol}^{-1}$) e toxina T-2 ($- 75,73 \text{ kJ mol}^{-1}$). Esse resultado reflete um equilíbrio de reação mais favorável para 3-ADON que para toxina T-2. A cinética de degradação de DON não foi possível de ser realizada, pois, conforme pode ser observado na Figura 19, não há um perfil cinético na degradação.

A cinética de degradação de DON por lacase, não apresentou redução gradativa mostrando variação aleatória. Após duas horas de incubação os percentuais de degradação chegaram a 72,4%, porém esse percentual diminuiu já após quatro horas de incubação (55,8%) e após oito horas de incubação o percentual de degradação foi de 1,6%. Esses resultados podem estar relacionados com um processo de adsorção do tricoteceno pela enzima devido a grupos ativos presentes na superfície da proteína, esse processo pode não ser efetivo fazendo com que DON seja novamente liberado no

sistema reacional. Esse processo pode ocorrer, principalmente, porque DON é um substrato alternativo e não um substrato preferencial para interação com a enzima.

Figura 19. Percentual de degradação de DON em função do tempo por ação da enzima lacase.



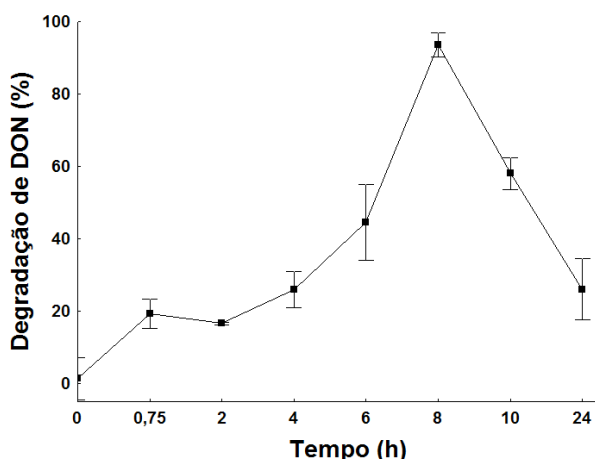
Um mecanismo que também poderia ser usado para responder essa questão seria o —PingPong Bi-Bi”. Neste, não há a formação de um complexo ternário de substratos e enzima. O primeiro substrato em um mecanismo —PingPong Bi-Bi” combina com a enzima para formar um intermediário enzimático substituído, com a liberação concomitante do primeiro produto. O segundo substrato então interage com o intermediário enzimático substituído para formar o segundo produto e regenerar a enzima nativa. Ping-Pong e mecanismos sequenciais podem ser diferenciados por uma análise cinética em estado estacionário da reação usando os procedimentos descritos por Cleland (GALENDE et al., 2015).

Os resultados encontrados neste estudo se demonstram promissores quando comparados ao emprego da enzima lacase em interação com outras micotoxinas. Isto porque os percentuais de degradação são maiores e com tempos de degradação menores, com relação aos percentuais e tempos encontrados em estudos da literatura. Como, por exemplo, no estudo de um tipo de enzima lacase obtida de *Trametes versicolor* (1 U mL⁻¹) que degradou 87,3% de AFB₁ depois de 72h de incubação (ALBERTS et al., 2009). Zeinvand-Lorestani et al. (2015) encontraram a seguinte condição ótima de ação enzimática: tampão citrato na concentração de 0,1 mol L⁻¹ contendo 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) a uma temperatura de 35 °C, utilizando pH

de 4,5 e atividade de lacase de 30 U mL^{-1} , após 2 dias de incubação cerca de 67% da AFB_1 foi degradada. Uma lacase produzida por *Aspergillus niger* D15-Lcc2#3 (118 U L^{-1}) diminuiu 55% da concentração de AFB_1 após 72 h de incubação (ALBERTS et al., 2009).

Perfil semelhante, à lacase x DON, foi observado para degradação de DON (Figura 20) por ação da enzima peroxidase, nesse caso o monitoramento do perfil de degradação foi realizado por HPLC-UV. DON demonstrou um percentual de degradação máxima de 92,5% com oito horas de incubação, esse percentual diminuiu para 26% após vinte e quatro horas de incubação.

Figura 20. Percentual de degradação de DON em função do tempo por ação da enzima peroxidase.

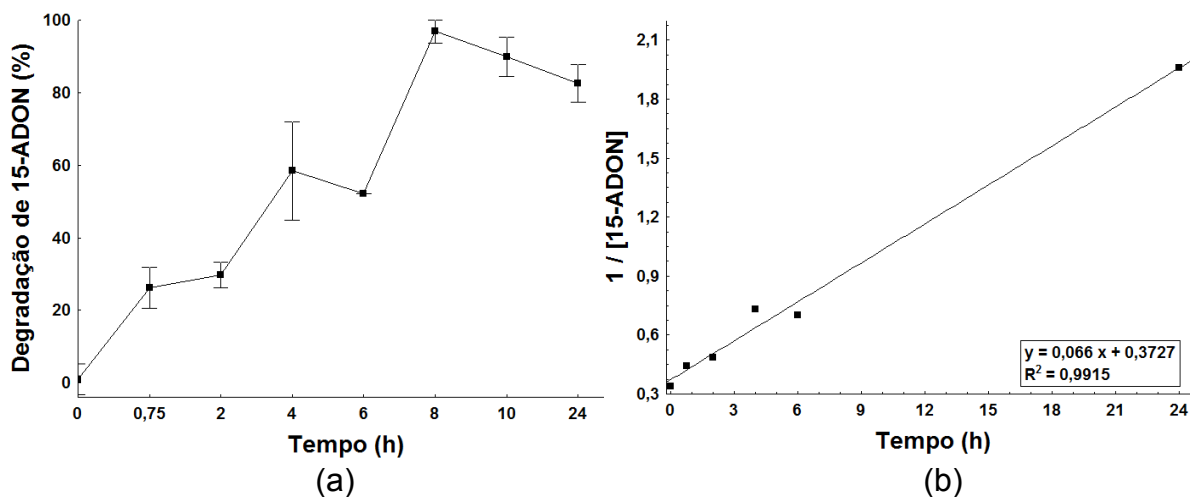


Neste caso, o ciclo da peroxidase é geralmente considerado irreversível. No entanto, não há dúvida de que os complexos de adsorção entre a enzima e seus substratos existem fisicamente (POULOS, 2010). Mesmo que a presença dos co-substratos (doador ou H_2O_2) na enzima module a afinidade, o mecanismo pode prosseguir através de ligação aleatória. Esta descoberta, bem como algumas características cinéticas especiais, suportam a noção de que não há necessidade de o peróxido ligar-se à enzima antes da adsorção do doador (GALENDE et al., 2015).

A degradação de 15-ADON por ação de peroxidase apresentou cinética de segunda ordem (Figura 21 a e b), com um percentual máximo de degradação em 8 h de 97%. Do estudo foram definidos os parâmetros: valor da constante k para 15-ADON foi $0,066 \text{ h}^{-1}$, cálculo do tempo de meia-vida apresentou um valor de 5,3 h, valor de ΔG°

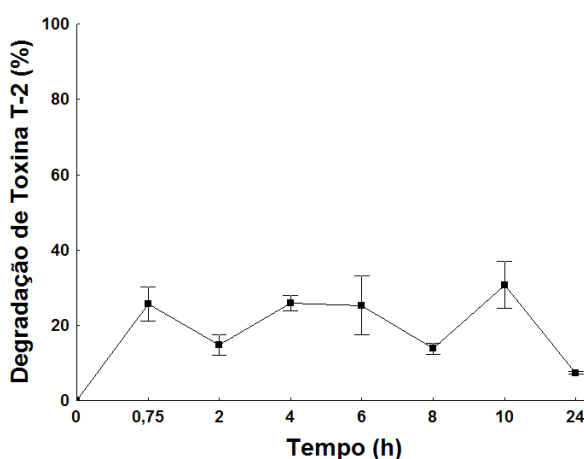
foi de $-81,13 \text{ kJ mol}^{-1}$ e o valor de D foi de $34,8 \text{ h}$. Reação que se demonstrou mais favorável que as interações entre 3-ADON e toxina T-2 com a enzima lacase.

Figura 21. Percentual de degradação de 15-ADON em função do tempo (a) e cinética de degradação (b) por ação da enzima peroxidase.



Na degradação de toxina T-2 por ação da enzima peroxidase, com perfil mostrado na Figura 22, pode-se observar que não há um padrão de ação com a degradação máxima (33,6%) ocorrendo após dez horas de incubação.

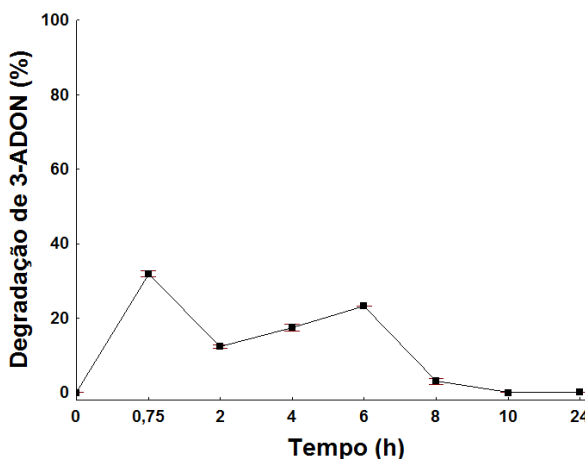
Figura 22. Percentual de degradação de toxina T-2 em função do tempo por ação da enzima peroxidase.



Este comportamento é contrário ao encontrado quando foi estudado o efeito da concentração de substrato, onde, utilizando um tempo de incubação de duas horas

com uma concentração de toxina T-2 de $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi observada uma degradação de 45%, percentual esse três vezes maior que a encontrada na avaliação da cinética de degradação que foi de 13,3%. Mesmo comportamento foi observado para degradação de 3-ADON por ação da enzima peroxidase, conforme Figura 23.

Figura 23. Percentual de degradação de 3-ADON em função do tempo por ação da enzima peroxidase.



A degradação de 3-ADON foi de 30,2% durante avaliação de cinética enzimática, porém na avaliação da cinética de degradação utilizando as mesmas condições reacionais (duas horas de incubação com concentração de 3-ADON de $3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), o percentual de degradação foi de 11,5%. Os resultados encontrados para DON, toxina T-2 e 3-ADON, ressaltam a necessidade de avaliação do sistema degradativo em LC-MS/MS, o que viabilizaria o monitoramento do íon específico de cada composto, nas etapas reacionais, possibilitando o descarte de interferentes reacionais. Como por exemplo, grupamentos de aminoácidos presentes na própria enzima, que podem ser extraídos durante processo de extração.

Essa avaliação também se faz necessária, pois por ação da enzima peroxidase sobre 15-ADON, houve uma diminuição de 2,4 vezes na degradação, quando comparados os períodos de incubação de oito (97,3%) e vinte e quatro horas (40,3%). Na Tabela 32 estão descritos os resultados de degradação dos tricotecenos por ação das enzimas hidrolíticas, expressos em termos de percentual de degradação.

Tabela 32. Degradação de DON, 3-ADON e 15-ADON por ação das enzimas hidrolíticas.

Tempo (h)	Degradação (%)					
	Esterase			Lipase		
	DON	3-ADON	15-ADON	DON	3-ADON	15-ADON
0,75	9 (9,1)*	4,2 (12,7)	0 (29)	0,7 (79)	0 (1,3)	0 (0)
2	6,5 (9,1)	0 (2,6)	0 (77)	13,5 (14,2)	2,6 (6)	19,5 (34)
4	6,5 (4,6)	0 (65)	4,4 (9,5)	3,8 (82)	0 (15,3)	22,4 (38)
6	2,2 (18,1)	3,2 (0,7)	0 (62)	5,8 (14,1)	0 (8)	25,6 (11,5)
8	3 (3,6)	5,9 (0,2)	1,4 (38)	0 (0)	0 (9,2)	24,1 (14,2)
10	4,7 (0,1)	0 (8,1)	0 (34)	0 (85)	0 (20,7)	25,4 (22,7)
24	0 (37)	10,7 (19,4)	0 (7,1)	0 (36)	10,5 (13,3)	0 (23)

*RSD (%) – estimativa do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

A lipase pancreática de suínos foi efetiva na detoxificação de patulina em solução aquosa com pH 6,0, 40 °C durante 42 h (LI et al., 2017). A mesma enzima foi aplicada na degradação de patulina em suco de maçã, os resultados mostraram que as condições ótimas de degradação foram: 40 °C durante 18 h, com a adição de 0,03 g L⁻¹ da enzima imobilizada (TANG et al., 2018).

Como pode ser observado nos dados acima, fatores como tempo de interação, temperatura, pH e concentração da solução modelo, concentração de enzima e tricotecenos, são parâmetros fundamentais para aplicação das enzimas na degradação dos tricotecenos. No caso das enzimas em estudo, as condições ótimas de aplicação das enzimas oxidativas (tampão fosfato 0,05 mmol L⁻¹ pH 5, 30 °C) e das enzimas hidrolíticas (tampão fosfato 0,05 mmol L⁻¹ pH 7, 37 °C) em processos de degradação dos tricotecenos, estão presentes na Tabela 33.

Tabela 33. Parâmetros otimizados nesse estudo para aplicação das enzimas oxidativas e enzimas hidrolíticas na degradação de tricotecenos A e B.

Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Micotoxina (µg mL ⁻¹)	Tempo (h)	Degradação (%)	V _{máx} (µg U ⁻¹ min ⁻¹)	K _{0,5} (µg mL ⁻¹)	K _M (µg mL ⁻¹)
Lacase						
0,15	DON (2)	2	72,4	NC	NC	NC
0,15	3-ADON (2)	24	87	0,0156	4,4	-
0,15	Toxina T-2 (2)	24	96	NC	NC	NC
Peroxidase						
0,00001	DON (4,1)	8	92,5	608,33	7	-
0,62	3-ADON (3,8)	0,75	30,2	0,017	-	59
0,62	15-ADON (2,7)	8	97	NC	NC	NC
0,62	Toxina T-2 (7,7)	10	33,6	0,044	-	23
Lipase						
0,00001	DON (2)	2	13,5	NC	NC	NC
0,037	3-ADON (2)	24	10,5	0,70	-	1,5
0,037	15-ADON (3)	6	25,6	NC	NC	NC
Esterase						
0,0001	DON (3,6)	0,75	9	NC	NC	NC
0,0001	3-ADON (3)	24	10,7	NC	NC	NC
0,001	15-ADON (2)	4	4,4	18	-	0,05

NC – Dado não confirmado

5.7 INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DOS TRICOTECENOS

5.7.1 Cromatografia líquida acoplada a arranjo de diodo (PDA) LTQ íon trap/Orbitrap com detecção de espectrometria de massas - HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap

O emprego das técnicas de espectrometria de massas, neste estudo, está fundamentado basicamente no reconhecimento do sinal do íon molecular do

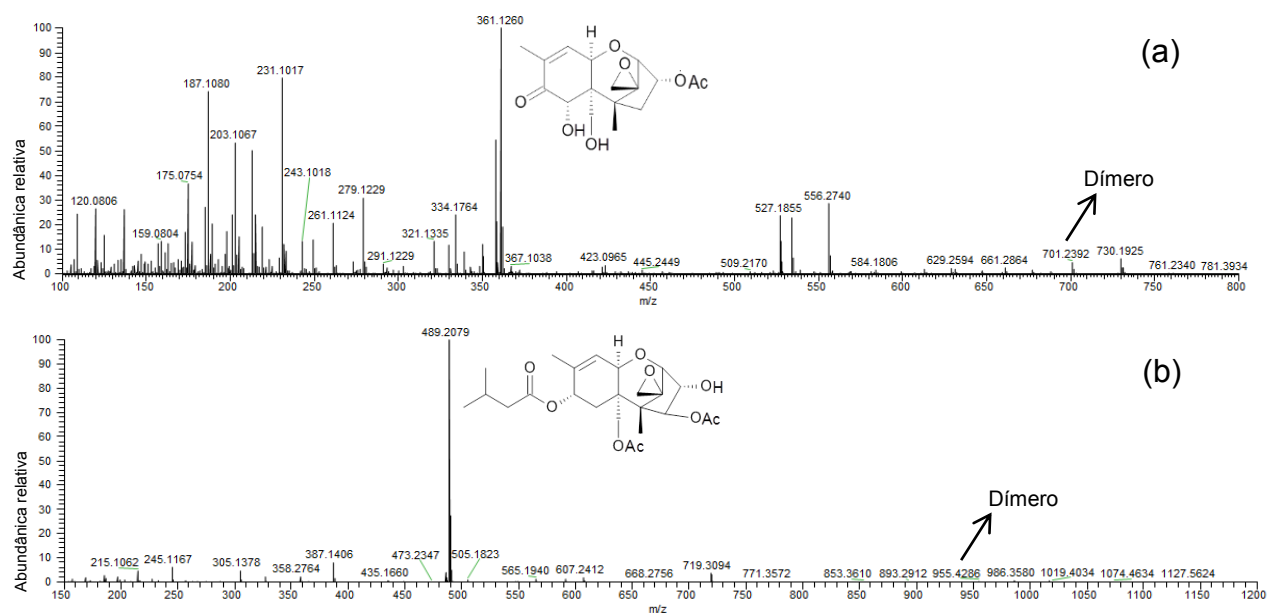
tricoteceno. Isto porquê não existem estudos a cerca do emprego das enzimas aplicadas em interação com tricotecenos, o que faz com que a procura de possíveis produtos de degradação fique prejudicada. Análises iniciais de quantificação e determinação dos tricotecenos foram realizadas em LC-MS/MS e utilizadas na avaliação da cinética de degradação, depois de otimizadas essas condições, o método foi utilizado para análise em HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap, com a finalidade de investigar a possível presença de produtos de biodegradação.

As análises em Orbitrap foram realizadas somente para interação entre 3-ADON e toxina T-2 com a enzima lacase, em vista dos resultados encontrados para a cinética de degradação, somente 3-ADON e toxina T-2 demonstraram possibilidade de estarem sendo degradados pela enzima e não apenas metabolizados como no caso dos resultados obtidos para DON.

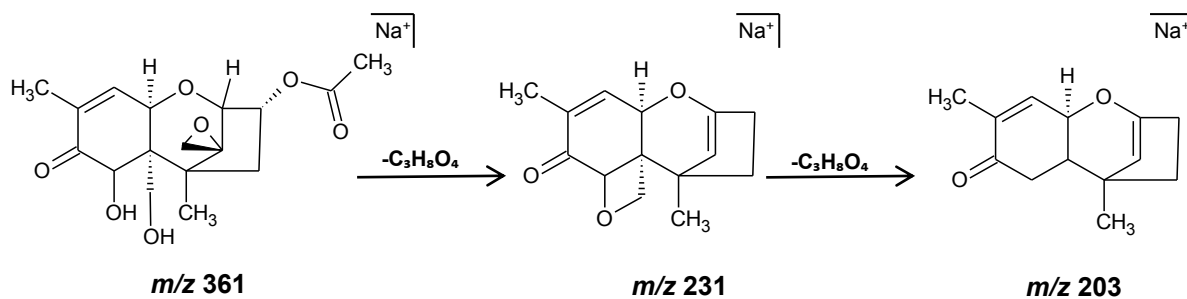
Os espectros de massas dos tricotecenos foram obtidos em modo positivo, uma vez que a intensidade dos sinais em modo negativo se mostrou baixa. Adutos de sódio $[M+Na]^+$ de toxina T-2 (m/z 489,2079) e 3-ADON (m/z 361,1260), foram observados em espectro de massas obtidos de HPLC-(PDA)-LTQ Orbitrap. Esses dados indicam que a seleção e confirmação dos dois compostos, podem ser completadas em uma medida. A Figura 24 apresenta os espectros de massas em Orbitrap de 3-ADON (a) e toxina T-2 (b), onde é possível observar o *scan* total do sistema reacional formado por tricoteceno + lacase + ABTS, após 24 h de incubação. A presença dos picos de íon molecular dos compostos em estudo foi confirmada em todas as amostras e não foram detectados picos que correspondam a produtos de degradação dos tricotecenos.

Como pode ser observado na Figura 16, que apresenta a análise das amostras de degradação em diferentes tempos de incubação em Orbitrap, e na Figura 17 a análise em PDA, há formação de diversos picos no decorrer da determinação cromatográfica. No entanto, após avaliação de todos os picos, nenhum desses se demonstrou como potencial produto de degradação enzimática. Isso confirmado pela presença dos íons produtos da fragmentação de 3-ADON e toxina T-2 (Esquemas 4 e 5), nos espectros de massas da Figura 24.

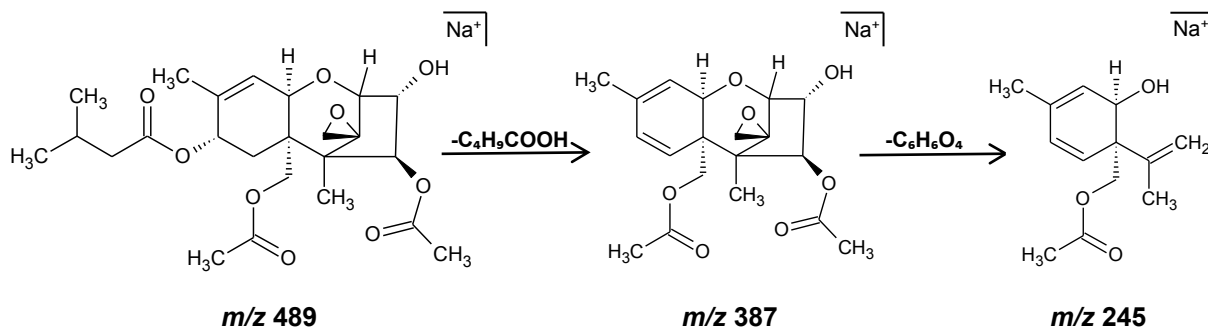
Figura 24. Espectros de massas obtidos em Orbitrap em modo total scan para 3-ADON (a) e para toxina T-2 (b).



Esquema 4. Mecanismo de fragmentação proposto para os íons aduto de sódio $[M+Na]^+$ de 3-ADON. (adaptado de Liu et al. (2012))

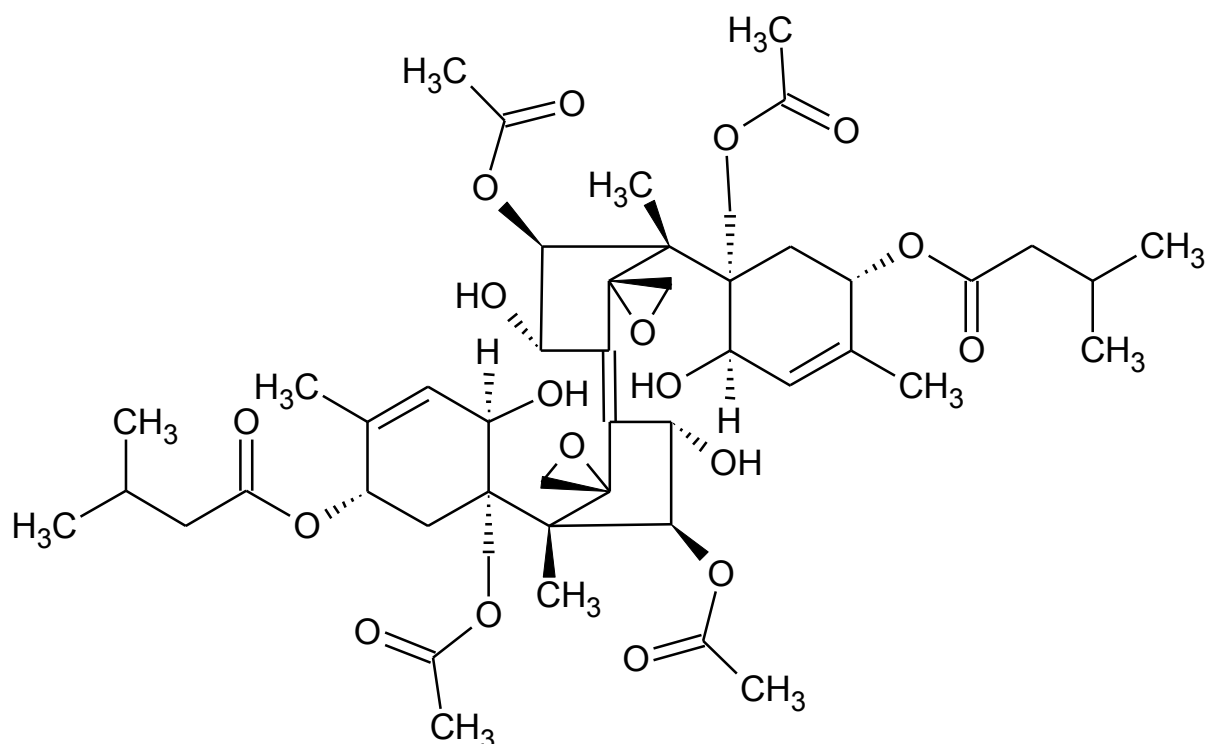


Esquema 5. Mecanismo de fragmentação proposto para os íons adutos de sódio $[M+Na]^+$ de toxina T-2. (adaptado de Liu et al. (2012))

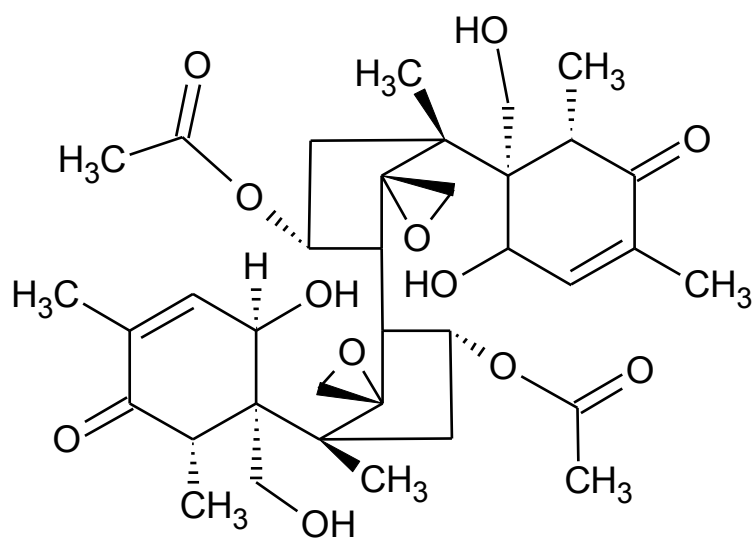


Em contrapartida, a avaliação dos espectros de massas em Orbitrap, outro pico de massa molecular correspondente ao dímero de toxina T-2 (m/z 955,4295) e 3-ADON (m/z 701,2392) foi identificado. Este dímero de toxina T-2 pode ser formado pela oxidação e consequente abertura do anel epóxido de 6 membros, essa oxidação leva a formação de uma hidroxila em C11 e há um acoplamento C=C com o mesmo C11 de outra molécula de toxina T-2. A estrutura química correspondente ao dímero de toxina T-2 (Figura 25 a) apresentou massa molecular teórica de 955,4298, correspondente ao aduto $[M+Na]^+$. Já para o dímero formado entre moléculas de 3-ADON, as estruturas químicas correspondentes ao acoplamento C-C propostas nesse estudo estão demonstradas na Figura 25 b. A massa molecular teórica encontrada para o dímero de 3-ADON foi 701,2780, também correspondente ao aduto $[M+Na]^+$.

Figura 25. Proposta de estruturas químicas dos dímeros formados durante ação da enzima lacase sobre toxina T-2 (a) e 3-ADON (b).



(a)



(b)

A avaliação de micotoxinas por emprego de técnicas HRMS fornecem não só informações de massas precisas, como MS/MS, mas também informações estruturais complementares. Especialmente, o analisador de íons quadrupolo com trap linear e orbital (LTQ-Orbitrap), pode ser usado para rastreamento e quantificação de micotoxinas e ajuda na elucidação estrutural, identificação e caracterização de produtos químicos com base em resultados de massa de alta resolução e resultado de precisão em modo MS/MS (BERTHILLER et al., 2017).

Com base nos resultados obtidos expressos na Figura 25, fica evidente a ação da enzima lacase na formação de oligômeros, o que possibilitaria o emprego dessa enzima no processamento de alimentos, visando a descontaminação do mesmo. Embora os complexos formados apresentem maior toxicidade em relação ao composto inicial, estes podem ser separados durante processo alimentício por filtração, por precipitarem facilmente.

5.8 SUGESTÃO PARA APLICAÇÃO ENZIMÁTICA EM PROCESSOS ALIMENTÍCIOS PARA DEGRADAÇÃO DE TRICOTECENOS

Esse estudo, de caráter inédito, abre caminho para o desenvolvimento de outras investigações acerca do tema, tendo em vista que o processo de degradação proposto

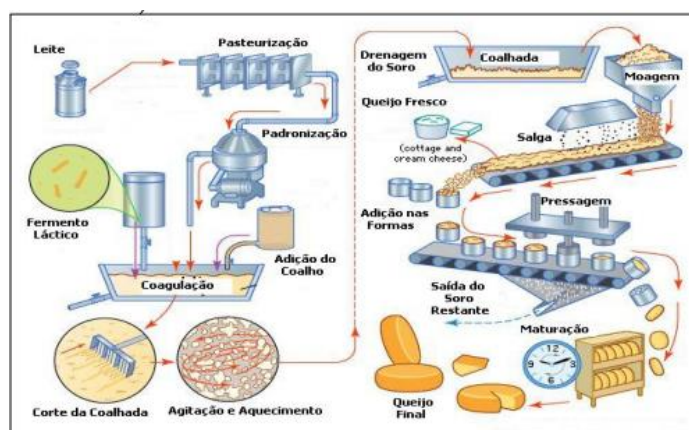
se apresenta com potencial para a aplicação na remoção de tricotecnos de produtos alimentares mais complexas, como no caso da cerveja, sucos, vinho, massas e leite. A aplicação dessas enzimas também se torna uma alternativa, quando se observa que em matérias-primas e produtos alimentares já processados, encontram-se outros contaminantes como: micotoxinas em geral, desreguladores endócrinos estrogênicos, agrotóxicos e antimicrobianos.

A principal vantagem de usar estratégias baseadas em enzimas é a possibilidade de atuar, nos diferentes estágios das cadeias de produção de alimentos para humanos e animais. As aplicações enzimáticas propostas baixo partem dos processos relatados por Lima et al. (2001).

5.8.1 Processamento de leites e queijos

No processamento de queijos (Figura 26), as enzimas peroxidase e lacase podem ser adicionadas ao leite antes do processo de pasteurização. Uma etapa limitante da aplicação da peroxidase seria a adição de H_2O_2 , porém H_2O_2 já é utilizado (na mesma etapa) como aditivo no leite para preservar a qualidade até pasteurização. A pasteurização é uma etapa limitante, em vista que esta destrói patógenos, bactérias acidófilas e ainda inativa algumas enzimas. A eliminação de H_2O_2 do leite é realizada pela adição da enzima catalase, com teste residual de detecção de H_2O_2 após agitação por 20 min.

Figura 26. Fluxograma ilustrativo da produção de queijo.

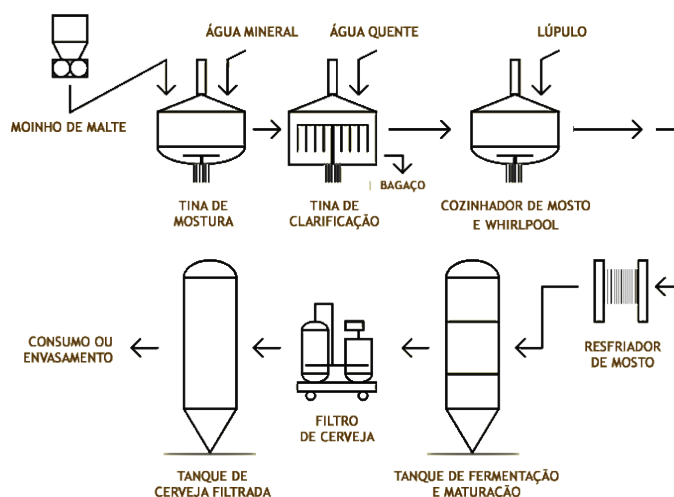


As lipases também podem ser aplicadas com a finalidade de modificar as propriedades funcionais das proteínas no leite, promover alterações na gordura da manteiga. Dentro do processamento, a lipase pode ser adicionada ao processo antes da etapa de pasteurização.

5.8.2 Processamento de cervejas

Os níveis de micotoxinas tendem a diminuir durante o processamento da cerveja (Figura 27), devido a limpeza e classificação da matéria-prima, processo de maltagem, torrefação, maceração e fermentação, mas tais substâncias não são totalmente eliminadas. Lacase pode ser adicionada ao processo cervejeiro no tanque de fermentação, após a fermentação ocorre a filtração etapa que pode levar a eliminação, no caso dos tricotecenos, dos oligômeros formados. Peroxidase e as enzimas hidrolíticas podem ser aplicadas no processo pré (durante a mosturação ou após a filtração) ou pós fermentação (antecedendo a pasteurização, que ocorre antes do envase).

Figura 27. Fluxograma ilustrativo do processo cervejeiro.



Cabe salientar que, neste estudo, a ação das enzimas ocorreu em sistema modelo com os parâmetros de sistema controlados. Para aplicação das enzimas nos processamentos citados acima, é necessária a investigação de diversos parâmetros,

entre eles: pH, temperatura e presença de inibidores ou ativadores enzimáticos, cinética enzimática e tempo de reação enzimática. Outro fator importante, é que as enzimas lacase, peroxidase e esterase necessitam ser inativadas durante o processamento (inativação térmica ou por enzimas proteolíticas), reduzindo seus efeitos indesejáveis ou para prevenir seus efeitos continuados após alcançar a atividade desejada (ZHANG, HE e SIMPSOM, 2018).

6. CONCLUSÕES

De forma inovadora, buscou-se contribuir para futuras estratégias que visem reduzir a presença de tricotecenos em produtos alimentares. Tendo em conta esse objetivo, conseguiu-se:

- Demonstrar a ação degradativa de enzimas oxidativas e hidrolíticas sobre os tricotecenos dos tipos A e B.
- Caracterizar por meio de modelos cinéticos, a ação catalítica das enzimas sobre os tricotecenos.
- Avaliar métodos analíticos capazes de determinar, e comprovar com sensibilidade a degradação dos compostos.

Um sistema modelo foi padronizado em tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5 e pH 7, para avaliação da ação degradativa das enzimas oxidativas e hidrolíticas, respectivamente, sobre os tricotecenos.

Os tricotecenos não apresentaram ajuste aos modelos cinéticos em interação com as enzimas hidrolíticas, porém foi observado que estas possuem ação degradativa sobre as micotoxinas, necessitando estudos mais aprofundados dessa interação.

Lacase apresentou cinética de primeira e segunda ordem na degradação de 3-ADON e toxina T-2 com degradação de 87 e 96%, respectivamente, utilizando $0,15 \text{ U mL}^{-1}$ de enzima e $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos tricotecenos. A interação de lacase com DON mostrou um possível ação de adsorção do composto por parte da enzima, não apresentando ajuste aos modelos cinéticos, a degradação máxima do composto foi de 72,4% com 2 h de incubação.

Ação de adsorção enzimática também pode se aplicar a DON ($4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em interação com peroxidase ($0,00001 \text{ U mL}^{-1}$), com uma degradação máxima de 92,5% em 8 h de incubação. 15-ADON ($2,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou cinética de segunda ordem em interação com peroxidase ($0,62 \text{ U mL}^{-1}$) com 97% de degradação em 8 h de incubação. A curva de degradação de 3-ADON ($3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e toxina T-2 ($7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) em função do tempo de interação com peroxidase ($0,62 \text{ U mL}^{-1}$), não se ajustou a nenhum modelo cinético, apresentando diferenças nos percentuais de degradação em relação aos encontrados em ensaios anteriores.

Assim, as enzimas apresentaram ação degradativa sobre os tricotecenos, isso comprovado pela proposição do mecanismo de ação da enzima lacase sobre 3-ADON e toxina T-2 em LC-MS/MS e Orbitrap, o que não foi possível reproduzir nos demais compostos e para as demais enzimas.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Este estudo abre caminho para o desenvolvimento de outras investigações sobre o assunto, considerando que o processo de degradação desenvolvido é um potencial candidato na aplicação da remoção de tricotecenos de produtos alimentícios. Para dar continuidade a esse trabalho, propõe-se:

- A avaliação de outros mediadores-redox, por exemplo, mediadores naturais, visando aumentar a taxa de conversão enzimática da lacase, sobre os tricotecenos e possibilitando sua aplicação na indústria alimentícia.
- Estudar o desempenho do método de degradação, quando aplicado em amostras alimentares, por exemplo, durante processamento de cerveja, sucos, vinhos, massas, pães e biscoitos.
- A avaliação citotóxica dos extratos de biodegradação, visando avaliar o potencial tóxico desses extratos.
- A partir de diferentes fontes biológicas, obter, purificar, caracterizar e aplicar, as enzimas em estudo, em ensaios de degradação de tricotecenos, bem como sua imobilização em suportes de baixo custo e baixo impacto ambiental.
- Avaliar o isolamento das toxinas a partir de sua produção, por espécies toxigências do gênero *Fusarium*, a fim de facilitar a determinação de estruturas químicas.
- Aprofundar os estudos a cerca do mecanismo Ping-Pong Bi-Bi na interação entre a enzima peroxidase e 15-ADON.
- Investigar o mecanismo de degradação dos tricotecenos, por ação das enzimas peroxidase, lipase e esterase.

8. PRODUÇÃO ACADÊMICO-CIENTÍFICA

- ARTIGOS PUBLICADOS

TÍTULO: *Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction*

AUTOR (ES): Gabrielle Victoria Gautério, Danielle Specht Malta, Laís Reginatto, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda-Bufferon e Susana Juliano Kalil

REVISTA: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*

DATA: Publicado em fevereiro de 2017

TÍTULO: *Peroxidase from soybean meal: obtention, purification and application in reduction of deoxynivalenol levels*

AUTOR (ES): Ana Carla Penteado Feltrin, Milena Ramos Vaz Fontes, Henrique Delgado Kikumoto Gracia, Eliana Badiale-Furlong e Jaqueline Garda-Bufferon

REVISTA: *Química Nova*

DATA: Publicado em julho de 2017

TÍTULO: *Characterization and application of the enzyme peroxidase to the degradation of the mycotoxin DON*

AUTOR (ES): Ana Carla P. Feltrin, Sabrina De O. Garcia, Sergiane S. Caldas, Ednei G. Primel, Eliana Badiale-Furlong e Jaqueline Garda-Bufferon

REVISTA: *Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*

DATA: Publicado em outubro de 2017

TÍTULO: *Evaluation of the suitability of analytical methods in trichothecene A and B degradation*

AUTOR (ES): Ana Carla Penteado Feltrin, Karen Marimóm, Cíntia Tusnski, Sergiane Souza Caldas, Ednei Gilberto Primel, Jaqueline Garda-Bufferon

REVISTA: *Journal of the Brazilian Chemical Society*

DOI: 10.21577/0103-5053.20180086

DATA: Publicado *on-line* em abril de 2018

TÍTULO: *Occurrence of Aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and UHT, consumed in the city of Assomada (Cape Verde islands) and southern Brazil*

AUTOR (ES): Keven David Moreira Gonçalves; Karen Vanessa Marimón Sibaja; Ana Carla Penteado Feltrin; Rafael Diaz Remedi; Sabrina De Oliveira Garcia; Jaqueline Garda-Bufferon.

REVISTA: *Food Control*

DATA: Publicado em junho de 2018

TÍTULO: *Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidase from soybean bran and rice bran*

AUTOR (ES): Sabrina de Oliveira Garcia, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda-
Buffon

REVISTA: *Food Additives & Contaminants: Part A*

DOI:10.1080/19440049.2018.1486044

DATA: Publicado on line em junho de 2018.

TÍTULO: *Common resistance to Fusarium head blight in Brazilian wheat cultivars*

AUTOR (ES): Gabriela da Rocha Lemos Mendes, Emerson Medeiros Del Ponte, Ana
Carla Feltrin, Eliana Badiale-Furlong, Antônio Costa de Oliveira

REVISTA: *Scientia Agricola*

DATA: Publicado setembro/outubro de 2018.

- ARTIGOS SUBMETIDOS

TÍTULO: Reduction of ochratoxin A by peroxidase enzyme of rice bran in a model
system and grape juice

AUTOR (ES): Náthali Nora, Ana Carla Feltrin, Eliana Badiale-Furlong, Karen Sibaja,
Jaqueline Garda-Buffon

REVISTA: *Brazilian Journal of Microbiology*

TÍTULO: Enzyme activation and protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* by
deoxynivalenol contamination

AUTOR (ES): Julio César Johner Flores, Ana Carla Penteado Feltrin, Eliana Badiale-
Furlong, Jaqueline Garda-Buffon

REVISTA: *Ciência Rural*

- TRABALHOS EM EVENTOS

EVENTO: 12º Slaca – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2017, São
Paulo – SP.

DATA: 4 a 7 de Novembro/2017

TÍTULO DO TRABALHO: Zearalenone stability in a model solution

AUTOR (ES): Sabrina de Oliveira Garcia, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda
Buffon

EVENTO: 16º Mostra de Produção Universitária, 2017, Rio Grande – RS.

DATA: 04 a 06 de Outubro/2017

TÍTULO DO TRABALHO: ABTS como modulador na ação da lacase durante
degradação de 3-ADON

AUTOR (ES): Rosana Basso Kraus, Francine Kerstner Oliveira, Ana Carla Penteado
Feltrin, Jaqueline Garda-Buffon

EVENTO: 15º Mostra de Produção Universitária, 2016, Rio Grande – RS.

DATA: 19 a 21 de Outubro/2016

TÍTULO DO TRABALHO: Redução dos níveis de 15-Acetildeoxinivalenol por ação da enzima lacase

AUTOR (ES): Ana Carla Penteado Feltrin, Cíntia Tusnski, Maicon Garcia, Jaqueline Garda-Bufferon

EVENTO: 15º Mostra de Produção Universitária, 2016, Rio Grande – RS.

DATA: 19 a 21 de Outubro/2016

TÍTULO DO TRABALHO: Extração de aflatoxina B1: uma comparação entre dois métodos

AUTOR (ES): Cíntia Tusnski, Karen Sibaja Marimón, Ana Carla Penteado Feltrin, Maristela Barnes Rodrigues Cerqueira, Jaqueline Garda-Bufferon

EVENTO: XII Seminário Brasileiro de tecnologia enzimática, 2016, Caxias do Sul – RS.

DATA: 17 a 20 de julho/2016

TÍTULO DO TRABALHO: Redução dos níveis de deoxinivalenol por ação da enzima lacase em solução modelo

AUTOR (ES): Rosana Basso Kraus, Ana Carla Penteado Feltrin, Milena R. V., Karen Sibaja Marimón, Jaqueline Garda Bufferon

EVENTO: XII Seminário Brasileiro de tecnologia enzimática, 2016, Caxias do Sul – RS.

DATA: 17 a 20 de julho/2016

TÍTULO DO TRABALHO: Degradação dos níveis de aflatoxina B1 por ação da peroxidase em solução modelo

AUTOR (ES): Karen Sibaja Marimón, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda Bufferon

EVENTO: Séptimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, 2015, Montevideo – Uruguai.

DATA: 7 a 9 de Outubro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Sistemas reacionais para ação biodegradativa da peroxidase

AUTOR (ES): Sabrina de Oliveira Garcia, Ana Carla Penteado Feltrin, Juliano Lucas G., Jaqueline Garda Bufferon

EVENTO: Séptimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, 2015, Montevideo – Uruguai.

DATA: 7 a 9 de Outubro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Perfil de ácidos graxos de células de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas na presença de nivalenol

AUTOR (ES): Milena R. V. Fontes, Cecília D. G. Cougo, Vanessa D. G., Taiana D de Souza, Ana Carla Penteado Feltrin, Juliano Lucas G., Jaqueline Garda Bufferon

EVENTO: XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2015, Buenos Aires – Argentina.

DATA: 3 a 5 de Novembro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Redução de Zearalenona por emprego da enzima peroxidase

AUTOR (ES): Sabrina de Oliveira Garcia, Ana Carla Penteado Feltrin, Milena R. V., Jaqueline Garda Bufferon

EVENTO: XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2015, Buenos Aires – Argentina.

DATA: 3 a 5 de Novembro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Toxicidade de nivalenol às células de *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentação alcoólica

AUTOR (ES): Milena R. V. Fontes, Cecília D. G. Cougo, Vanessa D. G., Sabrina de Oliveira Garcia, Ana Carla Penteado Feltrin, Milena R. V., Jaqueline Garda Buffon

EVENTO: 14º Mostra de Produção Universitária, 2015, Rio Grande – RS.

DATA: 26 a 29 de Outubro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Efeito do modulador carbonato de cálcio na atividade da peroxidase

AUTOR (ES): Cíntia Tusnski, Rosana Basso Kraus, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda-Buffon

EVENTO: 14º Mostra de Produção Universitária, 2015, Rio Grande – RS.

DATA: 26 a 29 de Outubro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Efeito do pH do meio tamponante na recuperação de deoxinivalenol

AUTOR (ES): Rosana Basso Kraus, Cíntia Tusnski, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda-Buffon

EVENTO: 14º Mostra de Produção Universitária, 2015, Rio Grande – RS.

DATA: 26 a 29 de Outubro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Concentração proteica extracelular durante fermentação alcoólica na presença de aflatoxina B1

AUTOR (ES): Paulo Roberto Reschke, Maria Augusta de Carvalho Silvello, Tiago Silveira de Lima, Rosana Basso Kraus, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda-Buffon

EVENTO: 14º Mostra de Produção Universitária, 2015, Rio Grande – RS.

DATA: 26 a 29 de Outubro/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Processo fermentativo com *Saccharomyces cerevisiae* na presença de nivalenol

AUTOR (ES): Carolina Zulian Boeira, Maria Augusta de Carvalho Silvello, Rafael Diaz Remedi, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda-Buffon

EVENTO: V Congresso farmacêutico da UNESP, 2015, São Paulo – SP.

DATA: 15 a 21 de agosto/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Perfil de glutatona durante fermentação alcoólica de aflatoxina B1

AUTOR (ES): Paulo Roberto Reschke, Maria Augusta de Carvalho Silvello, Rosana Basso Kraus, Tiago Silveira de Lima, Ana Carla Penteado Feltrin, Eliana Badiale Furlong, Jaqueline Garda Buffon

EVENTO: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação científica, 2015, Campinas – SP.

DATA: 19 a 22 de julho/2015

TÍTULO DO TRABALHO: Fermentação submersa utilizando *Saccharomyces cerevisiae* na presença da aflatoxina B1

AUTOR (ES): Maria Augusta de Carvalho Silvello, Paulo Roberto Reschke, Tiago Silveira de Lima, Rosana Basso Kraus, Ana Carla Penteado Feltrin, Jaqueline Garda Buffon

EVENTO: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal – RN.

DATA: 3 a 7 de novembro/2014

TÍTULO DO TRABALHO: Degradação de deoxinivalenol por ação da peroxidase confirmado por LC-MS/MS

AUTOR (ES): Ana Carla Penteado Feltrin, Sabrina de Oliveira Garcia, Sergiane Caldas, Ednei Gilberto Primel, Jaqueline Garda Buffon

EVENTO: XV Encontro Nacional de Micotoxinas, 2014, Pirassununga – SP.

DATA: 23 a 25 de abril/2014

TÍTULO DO TRABALHO: Extração de deoxinivalenol (DON) a partir de um meio tamponante

AUTOR (ES): Ana Carla Penteado Feltrin, Sergiane Caldas, Ednei Gilberto Primel, Eliana Badiale Furlong, Jaqueline Garda Buffon

- COMISSÃO ORGANIZADORA

EVENTO: 21º Semana Aberta da FURG

DATA: 20 a 21 de outubro/2016

- PARTICIPAÇÃO EM BANCA

EVENTO: 14º Mostra de Produção Universitária, 2015, Rio Grande – RS.

DATA: 26 a 29 de Outubro/2015

- PREMIAÇÃO

EVENTO: II Les Doctoriales, 2015 – Bento Gonçalves – RS

DATA: 8 a 12 de novembro/2015

PREMIAÇÃO: 3º lugar no Desafio 24 h Innov'

- ATIVIDADE DE COOPERAÇÃO INTERINSTITUCIONAL NO EXTERIOR

TÍTULO: Degradation of trichothecenes A and B by enzymatic action

INSTITUIÇÃO: Westfälische Wilhelms-Universität Münster – Institut of Food Chemistry

CO-ORIENTADOR: Hans-Ulrich Humpf

PERÍODO: 6 de abril à 10 de agosto de 2017

- DISCIPLINAS CURSADAS

Estatística Experimental (30 h)

Estatística Multivariada (30 h)

Estágio de Docência I (30 h)

Estágio de Docência II (30 h)
Química Orgânica Avançada I (45 h)
Físico-Química Avançada I (45 h)
Química Inorgânica Avançada I (45 h)
Seminários II (30 h)
TE QTA: Tópicos em Química (Análise multivariada) (30 h)
Processos Bioquímicos dos alimentos (60 h)

- SUPORTE NA ORIENTAÇÃO DE ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Cíntia Tusnski
Maicon Garcia
Rosana Kraus
Francine Kerstner

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, D.; HOUSE, J. D.; NYACHOTI, C. M. Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat. **Mycopathologia**, v. 160, n. 4, p. 297-301, 2005.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of Ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, p. 231-242, 2006.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A by Fungi Isolated from Grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- ADEMAKINWA, A. N.; AGBOOLA, F. K. Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase from newly isolated *Aureobasidium pullulans* NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2016.
- AHAD, R.; ZHOU, T.; LEPP, D.; PAULS, K. P. Microbial detoxification of eleven food and feed contaminating trichothecene mycotoxins. **BMC biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 30, 2017.
- AJANDOUZ, E. H., BERDAH, S., MOUTARDIER, V., BEGE, T., BIRNBAUM, D. J., PERRIER, J.; ERIC, D. P.; MARESCA, M. Hydrolytic fate of 3/15-acetyldeoxynivalenol in humans: Specific deacetylation by the small intestine and liver revealed using in vitro and ex vivo approaches. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 232, 2016.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; BOTHA, A.; VAN ZYL, W. H. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. **International journal of food microbiology**, v. 135, p. 47-52, 2009.
- ALBERTS, J. F.; LILLY, M.; RHEEDER, J. P.; BURGER, H. M.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLOM, W. C. A. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. **Food Control**, v. 73, p. 101-109, 2017.
- ALEKSIC, B.; BAILLY, S.; DRAGHI, M.; PESTKA, J. J.; OSWALD, I. P.; ROBINE, E.; BAILLY, J. D. ; LACROIX, M. Z. Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. **Building and Environment**, v. 106, p. 265-273, 2016.
- ALNEYADI, A. H.; ASHRAF, S. S. Differential enzymatic degradation of thiazole pollutants by two different peroxidases—A comparative study. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 529-538, 2016.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and —dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of Association Official Analytical Chemistry International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ASCHAUER, P.; RENGACHARI, S.; LICHTENEGGER, J.; SCHITTMAYER, M.; DAS, K. M. P.; MAYER, N.; BREINBAUER, R.; BIRNER-GRUENBERGER, R.; GRUBER, C. C.; ZIMMERMANN, R.; GRUBER, K.; OBERER, M. Crystal

structure of the *Saccharomyces cerevisiae* monoglyceride lipase Yju3p. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 5, p. 462-470, 2016.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**. AOAC INTERNATIONAL: Official Methods of Analysis of International. 16th Edition, v. 2, 1995.
- BACH, C. E.; WARNOCK, D. D.; HORN, D. J. V.; WEINTRAUB, M. N.; SINSABAUGH, R. L.; ALLISON, S. D.; GERMAN, D. P. Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: effect of assay conditions and soil type. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 183-191, 2013.
- BAERE, S. DE; GOOSSENS, J.; OSSELAERE, A.; DEVREESE, M.; VANDENBROUKE, V.; BACKER, P. DE; CROUBELS, S. Quantitative determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in animal body fluids using LC-MS/MS detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2403– 2415, 2011.
- BANU, I.; LUPU, A.; APRODU, I. Degradation of Zearalenone by Laccase enzyme. **Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 14, p. 79, 2013.
- BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v.73, p.270-275, 1990.
- 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, n. 1, p. 33-37, 2007.
- BERTHILLER, F. BRERA, C.; CREWS, C.; IHA, M.H.; KRŠKA, R.; LATTANZIO, V. M. T.; MACDONALD, S.; MALONE, R. J.; MARAGOS, C.; SOLFRIZZO, M.; STROKA, J.; WHITAKER, T. B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin Journal*, v. 10, n. 1, p. 5-29, 2017.
- BŁAJET-KOSICKA, A.; TWARUZEK, M.; KOSICKI, R.; SIBIOROWSKA, E.; GRAJEWSKI, J. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. **Food Control**, v. 38, p. 61-66, 2014.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, p. 506, 2008.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, p. 99-102, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 7**, de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 março 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 138**, de 8 de Fevereiro de 2017. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 fevereiro 2017.
- BRERA, C.; PEDUTO, A.; DEBEGNACH, F.; PANNUNZI, E.; PRANTERA, E.; GREGORI, E.; DE GIACOMO, M.; DE SANTIS, B. Study of the influence of the

- milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 309-312, 2013.
- BROOM, L. Mycotoxins and the intestine. **Animal Nutrition**, v. 1, p. 262-265, 2015.
- BROWN, M. A.; ZHAO, Z.; MAUK, A. G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 331, p. 232-238, 2002.
- CAI, F.; YANG, X. O.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 1-37, 2012.
- CALDAS, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.
- CALONI, F.; CORTINOVIS, C. Effects of fusariotoxins in the equine species. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 157-161, 2010.
- CANO-SANCHO, G. VALLE-ALGARRA, F. M.; JIMÉNEZ, M.; BURDASPAL, P.; LEGARDA, T. M.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). **Food Control**, v. 22, n. 3, p. 490-495, 2011.
- CATAPANE, M.; NICOLUCCI, C.; MENALE, C.; MITA, L.; ROSSI, S.; MITA, D. G.; DIANO, N. Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248, p. 337-346, 2013.
- CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 107, p. 700-710, 2006.
- CHEAT, S.; PINTON, P.; COSSALTER, A-M.; COGNIE, J.; VILARIÑO, M.; CALLU, P.; RAYMOND-LETRON, I.; OSWALD, I. P.; KOLF-CLAUW, M. The mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol show in vivo synergism on jejunum enterocytes apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 87, p. 45-54, 2016.
- Chemspider, in, <http://www.chemspider.com/>
- CHEN, Y.; Chen, Q.; Han, M.; Zhou, J.; Gong, L.; Niu, Y.; Zhang, Y.; He, L.; Zhang, L. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. **Food Chemistry**, v. 213, p. 478-484, 2016.
- CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **The American Phytopathological Society**, v. 10, p. 861-871, 1997.
- COELHO, M. A.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**, Editora EPUB, Brasil, 2008.
- CUADRADO, N. H.; ARELLANO, J. B.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ZHADAN, G. G.; POLIKARPOV, I.; BURSAKOV, S.; ROIG, M. G.; SHNYROV, V. L. Substrate specificity of the *Chamaerops excelsa* palm tree peroxidase. A steady-state

- kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 1-2, p. 103-108, 2012.
- DANICKE, S.; BRUSSOW, K. P.; VALENTA, H.; UEBERSCHAR, K. H.; TIEMANN, U.; SCHOLLENBERGER, M. On the effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 932-943, 2006.
- DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of Aflatoxin B₁ by horseradish peroxidase. **Food chemistry**, v. 68, p. 309-313, 2000.
- DE SOUZA, T. D.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E. Exposure to deoxynivalenol, Ht-2 and T-2 toxins by consumption of wheat-based product in southern Brazil. **Food Control**, v. 50, p. 789-793, 2015.
- DEGRAEVE, S.; MADEGE, R. R.; AUDENAERT, K.; KAMALA, A.; ORTIZ, J.; KIMANYA, M.; TIISEKWA, B.; DE MEULENAER, B.; HAESAERT, G. Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania. **Food Control**, v. 59, p. 225-233, 2016.
- DEL PALACIO, A.; BETTUCCI, L.; PAN, D. *Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.
- DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1087-1091, 2012.
- DEL REGNO, M.; ADESSO, S.; POPOLO, A.; QUARONI, A.; AUTORE, G.; SEVERINO, L.; MARZOCCO, S. Nivalenol induces oxidative stress and increases deoxynivalenol pro-oxidant effect in intestinal epithelial cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 285, n. 2, p. 118-127, 2015.
- DÖLL, S.; SCHRICKX, J. A.; DÄNICKE, S.; FINK-GREMMELS, J. Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. **Toxicology Letters**, v. 184, 97-106, 2009.
- DONG, M.; SI, W.; JIANG, K.; NIE, D.; WU, Y.; ZHAO, Z.; SAEGER, S.; HAN, Z. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents for simultaneous determination of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1423, p. 177-182, 2015.
- DONG, F.; QIU, J.; XU, J.; YU, M.; WANG, S.; SUN, Y.; ZHANG, SHI, J. Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu province, China. **International journal of food microbiology**, v. 230, p. 58-63, 2016.
- DUARTE-VÁZQUEZ, M. A.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; WHITAKER, J. R.; ARROYAVE-HERNÁNDEZ, C.; REGALADO, C. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isozyme. **Phytochemistry**, v. 62, n. 1, p. 5-11, 2003.
- ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H.; LUNDH, T. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 619-624, 2004.

- EURACHEM/CITAC. (2000). Quantifying uncertainty in analytical measurement (2nd ed.). London: EURACHEM.
- European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA J.* 2011, 9, 1–187.
- European Food Safety Authority. Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA J.* 2013, 11.
- European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety and efficacy of fumonisin esterase (FUMzyme®) as a technological feed additive for pigs. *EFSA J.* 2014, 12, 3667.
- EUROPEIA, União. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, L, v. 70, p. 31.
- FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 231-240, 2002.
- Feltrin, A. C. P. Obtenção de peroxidase e avaliação de ação biodegradativa de Deoxinivalenol. 2013. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2013.
- FELTRIN, A. C. P.; GARCIA, S. D. O.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Characterization and application of the enzyme peroxidase to the degradation of the mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 10, p. 777-783, 2017.
- FELTRIN, A. C. P.; FONTES, M. R. V.; GRACIA, H. D. K.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase from soybean meal: obtention, purification and application in reduction of Deoxynivalenol levels. **Química Nova**, v. 40, n. 8, p. 908-915, 2017.
- FERRE, F. S. Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. **Food Control**, v. 62, p. 291-298, 2016.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 632-644, 2011.
- FONTAINE, K.; HYMERY, N.; LACROIX, M. N.; PUEL, S.; PUEL, O.; RIGALMA, K.; GAYDOU, V.; COTON, E.; MOUNIER, J. Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. **International journal of food microbiology**, v. 215, p. 187-193, 2015.
- FORNSTEDT, T.; FORSSÉN, P.; WESTERLUND, D. Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. **Analytical Separation Science**, 2015.
- FORONUD, N. A.; EUDES, F. Trichothecenes in cereal grains. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 1, p. 147-173, 2009.
- FRUHMANN, P.; MIKULA, H.; WIESENBERGER, G.; VARGA, E.; LUMPI, D.; ST GER, B.; H UBL, G.; LEMMENS, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; ADAM, G.; HAMETNER, C.; FR HLICH, J. Isolation and structure elucidation of pentahydroxyscirpene, a trichothecene *Fusarium* mycotoxin. **Journal of natural products**, v. 77, n. 1, p. 188-192, 2013.

- FUCHS, E.; BINDER, E. M.; HEIDLER, D.; KRŠKA, R. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 4, p. 379-386, 2002.
- GALENDE, P. P.; CUADRADO, N. H.; KOSTETSKY, E. Y.; ROIG, M. G.; VILLAR, E.; SHNYROV, V. L.; KENNEDY, J. F. Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi-Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 1005-1011, 2015.
- Garcia, S. O. **Sistema modelo para redução dos níveis de zearalenona por ação enzimática**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2016.
- GARCÍA-CELA, E.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard? **Food Control**, v. 25, p. 797-808, 2012.
- GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G. C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v.16, p.423-428, 2005.
- GARDA-BUFFON, J. **Biodegradação de deoxinivalenol por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus sp*: Um estudo bioquímico de degradação e toxicidade**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2008.
- GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 2, p. 710-714, 2010.
- GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 31, n.1, p.198-200, 2011.
- GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1998-2008, 2017.
- GENEROTTI, S.; CIRLINI, M.; ŠARKANJ, B.; SULTYOK, M.; BERTHILLER, F.; DALL'ASTA, C.; SUMAN, M. Formulation and processing factors affecting trichothecene mycotoxins within industrial biscuit-making. **Food chemistry**, v. 229, p. 597-603, 2017.
- GHATI, A.; PAUL, G. Purification and characterization of a thermo-halophilic, alkali-stable and extremely benzene tolerant esterase from a thermo-halo tolerant *Bacillus cereus* strain AGP-03, isolated from 'Bāreshwar' hot spring, India. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 771-781, 2015.
- GEREZ, J. R.; PINTON, P.; CALLU, P.; GROSJEAN, F.; OSWALD, I. P.; BRACARENSE, A. P. F. L. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 2, p. 89-98, 2015.
- GIANFREDA, L.; SANNINO, F.; FILAZZOLA, M. T.; LEONOWICZ, A. Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, p. 13-23, 1999.

- GIMENO, A.; MARTINS, M.L. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. *Special Nutrients*, Florida, p. 50–53, 2011.
- GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; CORTÉS, C.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. **Food chemistry**, v. 124, n. 1, p. 156-161, 2011.
- GRATZ, S. W.; DUNCAN, G.; RICHARDSON, A. J. The human fecal microbiota metabolizes deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary deepoxy-deoxynivalenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1821-1825, 2013.
- GUAN, S.; HE, J.; YOUNG, J. C.; ZHU, H.; LI, X-Z.; JI, C.; ZHOU, T. Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta. **Aquaculture**, v. 290, n. 3, p. 290-295, 2009.
- GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in lipid research**, v. 57, p. 40-54, 2015.
- HABLER, K.; HOFER, K.; GEILINGER, C.; SCHLEIFER, J.; HICKELHOVEN, R.; HESS, M.; GASTL, M.; RYCHLIK, M. Fate of *Fusarium* toxins during the malting process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1377-1384, 2016.
- HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**. v. 115, p. 1177-1186, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HATZIMANIKATIS, V.; LI, C.; IONITA, J. A.; BROADBELL, L. J. Metabolic networks: enzyme function and metabolite structure. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 300-306, 2004.
- HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, T. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 21, p.67-76, 2010.
- HE, J. W.; HASSAN, Y. I.; PERILLA, N.; LI, X. Z.; BOLAND, G. J.; ZHOU, T. Bacterial epimerization as a route for deoxynivalenol detoxification: The influence of growth and environmental conditions. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 572, 2016.
- HE, W. J.; ZHANG, L.; YI, S. Y.; TANG, X. L.; YUAN, Q. S.; GUO, M. W.; WU, AI-BO.; QU, B.; LI, HE-PING; LIAO, Y. C. An aldo-keto reductase is responsible for *Fusarium* toxin-degrading activity in a soil *Shingomonas* strain. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9549, 2017.
- HEINL, S.; HARTINGER, D.; THAMHESL, M.; VEKIRU, E.; KRŠKA, R.; SCHATZMAYR, G.; MOLL, W-D.; GRABHERR, R. Degradation of fumonisin B₁ by the consecutive action of two bacterial enzymes. **Journal of biotechnology**, v. 145, p. 120-129, 2010.
- HONGMEI, L.; NICELL, J. A. Optimal conditions for oxidative degradation of bisphenol A by Horseradish Peroxidase in aqueous phase. In: **Multimedia Technology (ICMT), 2011 International Conference on**. IEEE, 2011. p. 5442-5446.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Some Naturally Occurring

Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, v. 56, p. 397 - 444, 1993.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Summaries and Evaluations: Aflatoxins. IARC Press, Lyon, France. **2003**.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1428-1434, 2011.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E. GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A .L. Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 81-88, 2012.

IBARZ, R.; GARVÍN, A.; IBARZ, A. Kinetic and thermodynamic study of the photochemical degradation of patulin. **Food Research International**, v. 99, p. 348-354, 2017.

ISLAM, R.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; GOODWIN, P. H.; PAULS, K. P. Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 7-13, 2012.

ISRAEL-ROMING, F.; AVRAM, M. Deoxynivalenol stability during wheat processing. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 3, p. 48, 2010.

JAMES, A.; ZIKANKUBA, V. L. Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in sub-Sahara Africa. **Food Control**, v. 90, p. 372-381, 2018.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization, pp. 281-320.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

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

JELÉN, H. H.; WAŚOWICZ, E. Determination of trichothecenes in wheat grain without sample cleanup using comprehensive two-dimensional gas chromatography-

- time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1215, n. 1, p. 203-207, 2008.
- JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342-362, 2007.
- JUAN, C.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2389-2397, 2012.
- JUAN-GARCÍA, A.; JUAN, C.; KÖNIG, S.; RUIZ, M. J. Cytotoxic effects and degradation products of three mycotoxins: Alternariol, 3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyl-deoxynivalenol in liver hepatocellular carcinoma cells. **Toxicology letters**, v. 235, p. 8-16, 2015.
- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme research**, 2011.
- KARIM, Z.; HUSAIN, Q. Guaiacol-mediated oxidative degradation and polymerization of bisphenol A catalyzed by bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 185–189, 2009.
- KARLOVSKY, P. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 491-504, 2011.
- KOSCHORRECK, K.; RICHTER, S. M.; ENE, A. B.; RODUNER, E.; SCHMID, R. D.; URLACHER, V. B. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 217-224, 2008.
- KRSKA, R.; MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 145-148, 2007.
- KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETTERSSON, H.; VAN EGMOND H. P.; SCHOTHORST, R. C.; MACDONALD, S.; CHAN, D. Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 5-6, p. 1215-1226, 2007.
- KRUG, R. R.; HUNTER, W. G.; GRIEGER, R. A. Enthalpy-entropy compensation. 1. Some fundamental statistical problems associated with the analysis of van't Hoff and Arrhenius data. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 80, n. 21, p. 2335-2341, 1976.
- KUBO, M. T. K.; ROJAS, M. L.; CURET, S.; BOILLEREAUX, L.; AUGUSTO, P. E. D. Peroxidase inactivation kinetics is affected by the addition of calcium chloride in fruit beverages. **LWT**, v. 89, p. 610-616, 2018.
- Kupski, L. **Degradação de Ocratoxina A: estudo de processo e toxicidade**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2015.
- KURT, B. Z.; UCKAYA, F.; DURMUS, Z. Chitosan and carboxymethyl cellulose based magnetic nanocomposites for application of peroxidase purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 149-160, 2017.

- KUZDRALIŃSKI, A.; SOLARSKA, E.; MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 22-24, 2013.
- LAI, O. M.; LEE, Y. Y.; PHUAH, E. T.; AKOH, C. C. Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications, 2018.
- LATTANZIO, V. M. T.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A.; CHULZE, S. N.; TORRES, A. M.; VISCONTI, A. LC-MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 707-715, 2011.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 3.ed, 2002.
- LI, J.; PENG, J.; ZHANG, Y.; JI, Y.; SHI, H.; MAO, L.; GAO, S. Removal of triclosan via peroxidases-mediated reactions in water: Reaction kinetics, products and detoxification. **Journal of hazardous materials**, v. 310, p. 152-160, 2016.
- LI, X.; PENG, X.; WANG, Q.; ZUO, H.; MENG, X.; LIU, B. Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, v. 78, p. 48-56, 2017.
- LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. **São Paulo: Edgard Blücher**, v. 3, p. 1-43, 2001.
- LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. **São Paulo: Edgard Blücher**, v. 4, p. 1-43, 2001.
- LIU, Z-Y.; YU, C-H.; WAN, L.; SUN, Z-L. Fragmentation study of five trichothecenes using electrospray hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry with accurate mass measurements. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, p. 133-140, 2012.
- LYMAN, W. J.; REEHL, W. F.; ROSENBLATT, D. H. Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds. 1982. New York: McGraw-Hill, p. 1-1
- MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.
- MARJASVAARA, A.; JÄNIS, J.; VAINIOTALO, P. Oxidation of a laccase mediator ABTS as studied by ESI-FTICR mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 43, p. 470-477, 2008.
- MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; ARREBOLA, F. J.; FRENICH, A. G. Multi-class determination of pesticides and mycotoxins in isoflavones supplements obtained from soy by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. **Food Control**, v. 59, p. 218-224, 2016.
- MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 58-65, 2010.
- MAY, S. W. Applications of oxidoreductases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 370-375, 1999.

- MCCORMICK, S. P.; PRICE, N. P.J.; KURTZMAN, C. P. Glucosylation and other biotransformations of T-2 toxin by yeasts of the *Trichomonascus clade*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8694-8702, 2012.
- MCCORMICK, S. P. Microbial detoxification of mycotoxins. **Journal of chemical ecology**, v. 39, p. 907-918, 2013.
- MENEELY, J. P.; RICCI, F.; VAN EGMOND, H. P.; ELLIOTT, C. T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 192-203, 2011.
- MILANI, J.; MALEKI, G. Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2372-2375, 2014.
- 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.
- Ministry of Health of the Russian Federation. Amendments and Additions No. 18 to Hygienic Requirements for Safety and Nutrition Value of Food Products; 2.3.2.1078-01; Ministry of Health of the Russian Federation: Moscow, Russia, 2010.
- MONTES, R.; SEGARRA, R.; CASTILLO, M-Á. Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 38-44, 2012.
- MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROLOV, A I.; —Bluèlaccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.
- MOTAMED, S.; GHAEMMAGHAMI, F.; ALEMZADEH, I. Turnip (*Brassica rapa*) peroxidase: purification and characterization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 23, p. 10614-10618, 2009.
- MURATA, H.; YAMAGUCHI, D.; NAGAI, A.; SHIMADA, N. Reduction of deoxynivalenol contaminating corn silage by short-term ultraviolet irradiation: A pilot study. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 8, p. 1059-1060, 2011.
- NA, S-Y.; LEE, Y. Elimination of trace organic contaminants during enhanced wastewater treatment with horseradish peroxidase/hydrogen peroxide (HRP/H₂O₂) catalytic process. **Catalysis Today**, v. 282, p. 86-94, 2017.
- NATHANAIL, A. V.; GIBSON, B., HAN, L., PELTONEN, K., OLLILAINEN, V., JESTOI, M., LAITILA, A. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. **Food chemistry**, v. 203, p. 448-455, 2016.
- National Health and Family Planning of People's Republic of China (NFHPC). China GB 2761-2011 Maximum Levels of Mycotoxins in Foods. 2011. Available online: http://www.cirs-group.com/food/news/GB_2761_2011_maximum_levels_mycotoxins.html (accessed on 9 April 2016).
- NDOSI, D.G.; FRIZZELL, C.; TREMOEN, N.H.; FAESTE, C.K.; VERHAEGEN, S.; DAHL, E.; ERIKSEN, G.S.; SORLIE, M.; CONNOLLY, L.; ROPSTAD, R. An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. **Toxicology Letters**, v. 214, p. 268-278, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **São Paulo: Sarvier**, v. 3, 2014.

- NOBLE, R. W.; GIBSON, Q. H. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 2409-2413, 1970.
- Nora, N. **Redução dos níveis de ocratoxina a por ação da enzima peroxidase**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2015.
- NUGMANOV, A.; BEISHOVA, I.; KOKANOV, S.; LOZOWICKA, B.; KACZYNSKI, P.; KONECKI, R.; KRYSZYNA S.; ELZBIETA W.; NURZHAN S.; ABDIGALIYEVA, T. Systems to reduce mycotoxin contamination of cereals in the agricultural region of Poland and Kazakhstan. **Crop Protection**, v. 106, p. 64-71, 2018.
- OAKESHOTT, J. G.; PAPENRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSELL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v.90, p.239-268, 1993.
- OK, H. E.; KIM, D. M.; KIM, D.; CHUNG, S. H.; CHUNG, M-S.; PARK, K. H.; CHUN, H. S. Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. **Food Control**, v. 37, p. 284-291, 2014.
- OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, A.; SULYOK, M.; KRKA, R.; MALLMANN, C. A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 127-132, 2017.
- OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Uses of laccases in the food industry. **Enzyme research**, 2010.
- OSSELAERE, A.; DEVREESE, M.; GOOSSENS, J.; VANDENBROUCKE, V.; BAERE, S.; BACKER, P.; CROUBELS, S. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 350–355, 2013.
- PASCALE, M.; PANZARINI, G.; VISCONTI, A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Talanta**, v. 89, p. 231-236, 2012.
- PASCARI, X.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S.; SANCHÍS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, 2017.
- PASIN, D.; BIDNY, S.; FU, S. Analysis of new designer drugs in post-mortem blood using high-resolution mass spectrometry. **Journal of analytical toxicology**, v. 39, p. 163-171, 2015.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.
- PEIRIS, K.H. S.; BOCKUS, W. W.; DOWELL, F. E. Infrared spectral properties of germ, pericarp, and endosperm sections of sound wheat kernels and those damaged by *Fusarium graminearum*. **Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 9, p. 1053-1060, 2012.
- PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC–MS. **Food chemistry**, v. 182, p. 143-149, 2015.
- PESTKA, J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v.137,p. 283-298, 2007.

- POULOS, T. L. Thirty years of heme peroxidase structural biology. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 500, n. 1, p. 3-12, 2010.
- POZDNYAKOVA, N.; MAKAROV, O.; CHERNYSHOVA, M.; TURKOVSKAYA, O.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Versatile peroxidase of *Bjerkandera fumosa*: substrate and inhibitor specificity. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 1, p. 44-53, 2013.
- PREETHI, S.; ANUMARY, A.; ASHOKKUMAR, M.; THANIKAVELAN, P. Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. **Springer Plus**, v. 2, p. 341, 2013.
- PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS—Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.
- QUILES, J. M.; SALADINO, F.; MAÑES, J.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; MECA, G. Occurrence of mycotoxins in refrigerated pizza dough and risk assessment of exposure for the Spanish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 94, p. 19-24, 2016.
- RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I.; JUNGHANNS, C.; ORNELAS-SOTO, N.; CÁRDENAS-CHÁVEZ, D. L.; HERNÁNDEZ-LUNA, C.; DEMARCHE, P.; ENAUDD, E.; GARCÍA-MORALES, R.; AGATHOS, S. N.; PARRA, R. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 32-42, 2014.
- RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 2, p. 1, 2015.
- RAN, R.; WANG, C.; HAN, Z.; WU, A.; ZHANG, D.; SHI, J. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivative s: Current status of analytical methods. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 138-148, 2013.
- REMINI, H.; MERTZ, C.; BELBAHI, A.; ACHIR, N.; DORNIER, M.; MADANI, K. Degradation kinetic modelling of ascorbic acid and colour intensity in pasteurised blood orange juice during storage. **Food chemistry**, v. 173, p. 665-673, 2015.
- REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1, p. 48-64, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 1, p. 3-10, 2007.
- ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005.
- RODGERS, C. J.; BLANFORD, C. F.; GIDDENS, S. R.; SKAMNIOTI, P.; ARMSTRONG, F. A.; GURR, S. J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. **Trends in biotechnology**, v. 28, p. 63-72, 2010.

- ROMANO, D.; BONOMI, F.; MATTOS, M. C.; FONSECA, T. S.; OLIVEIRA, M. C. F.; MOLINARI, F. Esterases as stereoselective biocatalysts. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 547-565, 2015.
- RUBERT, J.; SOLER, C.; MANES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC-MS/MS. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 206-215, 2011.
- RUBERT, J.; JAMES, K. V.; MAÑES, J. SOLER, C. Study of mycotoxin calibration approaches on the example of trichothecenes analysis from flour. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2034-2041, 2012.
- RUBERT, J.; LEÓN, N.; SÁEZ, C.; MARTINS, C. P.; GODULA, M.; YUSÀ, V.; MAÑES, J.; SORIANO, J. M.; SOLER, C. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 820, p. 39-46, 2014.
- RUIZ-ANGEL, M. J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Are analysts doing method validation in liquid chromatography?. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 2-9, 2014.
- SAIEN, J.; DALIRI, S. Mass transfer coefficient in liquid- liquid extraction and the influence of aqueous phase pH. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 171-175, 2008.
- SANTE. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2015. Available at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wr_kdoc_11945.pdf.
- SANTOS, J. S.; OLIVEIRA, T. M.; MARTINS, L. M.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; PIRES, J. L. F.; MIRANDA, M. Z.; GARCIA, S.; ITANO, E. N.; ONO, E. Y. S.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1439-1450, 2013.
- SANZANI, S. M.; REVERBERI, M.; GEISEN, R. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. **Postharvest Biology and Technology**, 2016.
- SAVARD, M. E.; BLACKWELL, B. A.; GREENHALGH, R. An ^1H nuclear magnetic resonance study of derivatives of 3-hydroxy-12, 13-epoxytrichothec-9-enes. **Canadian journal of chemistry**, v. 65, n. 9, p. 2254-2262, 1987.
- SAQIB, A. A.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.
- SCHMIDT, H. S.; BECKER, S.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U. Impact of Mechanical and Thermal Energies on the Degradation of T-2 and HT-2 Toxins during Extrusion Cooking of Oat Flour. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 20, p. 4177-4183, 2017.
- SCHMEITZL, C.; VARGA, E.; WARTH, B.; KUGLER, K. G.; MALACHOVÁ, A.; MICHLMAYR, H.; WIESENBERGER, G.; MAYER, K. F. X.; MEWES, H-W.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R.; BERTHILLER, F.; ADAM, G. Identification and Characterization of carboxylesterases from *Brachypodium distachyon* deacetylating trichothecene mycotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 1, p. 6, 2015.

- SCHÖNEBERG, T.; JENNY, E.; WETTSTEIN, F. E.; BUCHELI, T. D.; MASCHER, F.; BERTOSSA, M.; MUSA, T.; SEIFERT, K.; GRÄFENHAN, T.; KELLER, B.; VOGELGSANG, S. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Swiss oats—Impact of cropping factors. **European Journal of Agronomy**, v. 92, p. 123-132, 2018.
- SCHRÖDTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology letters**, v. 153, n. 1, p. 47-49, 2004.
- SCOTT, P. M. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. **Revue de Medecine Veterinaire (France)**, 1998.
- SEUS, E. R. **Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo**. Dissertação. (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2014.
- SHANK, R. A.; FOROUD, N. A.; HAZENDONK, P.; EUDES, F.; BLACKWELL, B. Current and future experimental strategies for structural analysis of trichothecene mycotoxins—a prospectus. **Toxins**, v. 3, n. 12, p. 1518-1553, 2011.
- SHERAZ, M. A.; Kazi, S.H.; Ahmed, S.; Mirza, T.; Ahmad, I.; Evstigneev, M.P. Effect of phosphate buffer on the complexation and photochemical interaction of riboflavin and caffeine in aqueous solution: A kinetic study. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 273, p. 17-22, 2014.
- SONG, S.; EDIAGE, E. N.; WU, A.; DE SAEGER, S. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 111-120, 2013.
- SPADARO, D.; GARIBALDI, A. Containment of Mycotoxins in the Food Chain by Using Decontamination and Detoxification Techniques. In: **Practical Tools for Plant and Food Biosecurity**. Springer, Cham, 2017. p. 163-177.
- STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 5736-5739, 2000.
- STANIC, A.; UHLIG, S.; SOLHAUG, A.; RISE, F.; WILKINS, A. L.; MILES, C. O. Nucleophilic addition of thiols to deoxynivalenol. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 34, p. 7556-7566, 2015.
- STOEV, S. D. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 794-809, 2015.
- STOLL, Vincent S.; BLANCHARD, John S. Buffers: Principles and Practice1. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2009. p. 43-56.
- STOYTCHIEVA, M.; MONTERO, G.; ZLATEV, R.; A LEON, J.; GOCHEV, V. Analytical methods for lipases activity determination: A review. **Current Analytical Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 400-407, 2012.
- STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373-434, 2011.
- SURUP, F.; MEDJEDOVIC, A.; SZCZYGIELSKI, M.; SCHROERS, H-J.; STADLER, M. Production of trichothecenes by the apple sooty blotch fungus *Microcyclospora tardicrescens*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3525-3530, 2014.

- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 149-163.
- TABATA, M.; KUMAMOTO, M.; NISHIMOTO, J. Chemical properties of water-miscible solvents separated by salting-out and their application to solvent extraction. **Analytical sciences**, v. 10, p. 383-388, 1994.
- TAFAZOLI, S.; O'BRIEN, P. J. Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. **Drug discovery today**, v. 10, p. 617-625, 2005.
- TANAKA, A., SAIKAWA, S., SUZUKI, T., ECHIGO, A., MAEDA, K., SATO, M., FUJIMURA, M.; TOKAI, T.; USAMI, R.; YOSHIDA, Y.; KIMURA, M. Acetyltransferase activity in *Pseudomonas* sp. capable of acetylating the C-4 hydroxyl group of nivalenol-type trichothecenes. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 62, n. 6, p. 326-329, 2016.
- TANG, H.; PENG, X.; LI, X.; MENG, X.; LIU, B. Biodegradation of mycotoxin patulin in apple juice by calcium carbonate immobilized porcine pancreatic lipase. **Food Control**, 2018.
- TAVAREZ, A. P. M.; SILVA, C. G.; DRAZIC, G.; SILVA, A. M. T.; LOUREIRO, J. M.; FARIA, J. L. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. **Journal of Colloid and Interface Science**. V. 454, p. 52–60, 2015.
- TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K. N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. **Plant Science**, v. 136, p. 131-137, 1998.
- TIAN, Y.; TAN, Y.; LIU, N.; LIAO, Y.; SUN, C.; WANG, S.; WU, A. Functional agents to biologically control deoxynivalenol contamination in cereal grains. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1-8, 2016.
- TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2003.
- TRALAMAZZA, S. M.; Bemvenuti, R. H.; Zorzete, P.; Garcia, F. S.; Corrêa, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food chemistry**, v. 196, p. 445-450, 2016.
- TRAN, N. H.; HU, J. URASE, Taro. Removal of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) by laccase-mediated systems. **Bioresource technology**, v. 147, p. 667-671, 2013.
- TWARUŹEK, M.; Blajet-Kosicka, A.; Wenda-Piesik, A.; Palubicki, J.; Grajewski, J. Statistical comparison of *Fusarium* mycotoxins content in oat grain and related products from two agricultural systems. **Food control**, v. 34, n. 2, p. 291-295, 2013.
- UENO, Y., NAKAYAMA, K., ISHII, K., TASHIRO, F., MINODA, Y., OMORI, T. Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium* sp. Strain 114-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 120–127, 1987.
- UHNÁKOVÁ, B.; PETRÍCKOVÁ, A.; BIEDERMANN, D.; HOMOLKA, L.; VEJVODA, V.; BEDNÁR, P.; PAPOUSKOVÁ, B.; SULC, M.; MARTÍNKOVÁ, L. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 76, n. 6, p. 826-832, 2009.
- US Food and Drug Administration (US FDA). Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. US FDA: Silver Spring, MD, USA, 2001.

- VACLAVIK, L.; ZACHARIASOVA, M.; HRBEK, V.; HAJŠLOVA, J. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1950-1957, 2010.
- VALLECILLOS, L.; SADEF, Y.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; BESTER, K. Degradation of synthetic fragrances by laccase-mediated system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 334, p. 233-243, 2017.
- VANHOUTTE, I.; DE METS, L.; DE BOEVRE, M.; UKA, V.; DI MAVUNGU, J. D.; DE SAEGER, S.; DE GELDER, L.; AUDENAERT, K. Microbial Detoxification of Deoxynivalenol (DON), Assessed via a Lemna minor L. Bioassay, through Biotransformation to 3-epi-DON and 3-epi-DON-1. **Toxins**, v. 9, n. 2, p. 63, 2017.
- VEGA, M.; CASTILLO, D. Determination of deoxynivalenol in wheat by validated GC/ECD method: comparison with HPTLC/ FLD. **Electronic Journal of Food and Plants Chemistry**, v. 1, p. 16-20, 2006.
- VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.
- VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). **International Research Journal of Biological Science**, v. 1, p. 88-92, 2012.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.
- VOSS, K. A.; SNOOK, M. E. Stability of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) during the production of flour-based foods and wheat flake cereal. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 12, p. 1694-1700, 2010.
- WANG, J.; Ogata, M.; Hirai, H.; Kawagishi, H. Detoxification of aflatoxin B₁ by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. **FEMS microbiology letters**, v. 314, p. 164-169, 2010.
- WANG, Y.; NING, B.; PENG, Y.; BAI, J.; LIU, M.; FAN, X.; SUN, Z.; LV, Z.; ZHOU, C.; GAO, Z. Application of suspension array for simultaneous detection of four different mycotoxins in corn and peanut. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 391-396, 2013.
- WANG, C.; LI, Z.; WANG, H.; QIU, H.; ZHANG, M.; LI, S.; LUO, X.; SONG, Y.; ZHOU, H.; MA, W.; ZHANG, T. Rapid biodegradation of aflatoxin B₁ by metabolites of *Fusarium* sp. WCQ3361 with broad working temperature range and excellent thermostability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, p. 1342-1348, 2016.
- WANG, C., LI, Z., WANG, H., QIU, H., ZHANG, M., LI, S., LUO, X.; SONG, Y.; ZHOU, H.; MA, W.; ZHANG, T. Rapid biodegradation of aflatoxin B₁ by metabolites of *Fusarium* sp. WCQ3361 with broad working temperature range and excellent thermostability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, p. 1342-1348, 2017.
- WILSON, N. M.; MCMASTER, N.; GANTULGA, D.; SOYARS, C.; MCCORMICK, S. P.; KNOTT, K.; SENGER, R. S.; SCHMALE, D. G. Modification of the mycotoxin deoxynivalenol using microorganisms isolated from environmental samples. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 141, 2017.
- WU, W.; FLANNERY, B. M.; SUGITA-KONISHI, Y.; WATANABE, M.; ZHANG, H.; PESTKA, J. J.. Comparison of murine anorectic responses to the 8-

- ketotrichothecenes 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, fusarenon X and nivalenol. **Food and chemical toxicology**, v. 50, p. 2056-2061, 2012.
- XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, v. 35, p. 7608-7614, 1996.
- XU, F.; SHIN, W.; BROWN, S. H.; WAHLEITHNER, J. A.; SUNDARAM, U. M.; SOLOMON, E. I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, p. 303-311, 1996.
- YAN, Q. J.; YANG, S. Q.; DUAN, X. J.; XU, H. B.; LIU, Y.; JIANG, Z. Q. Characterization of a novel hormone-sensitive lipase family esterase from *Rhizomucor miehei* with tertiary alcohol hydrolysis activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 76-84, 2014.
- YEHIA, R. S. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 127-134, 2014.
- YOUNG, J. C.; GAMES, D. E. Analysis of *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 663, n. 2, p. 211-218, 1994.
- 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, n. 1, p. 136-143, 2007.
- ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 51-61, 2010.
- ZAID, A. M. A. Biodegradation of aflatoxin by peroxidase enzyme produced by local isolate of *Pseudomonas* sp. **International Journal of Scientific Research and Management**, v. 5, n. 11, p. 7456-7467, 2017.
- ZAIN, M.E.. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.
- ZEINVAND-LORESTANI, H.; SABZEVARI, O.; SETAYESH, N.; AMINI, M.; NILI-AHMADABADI, A.; FARAMARZI, M. A. Comparative study of in vitro prooxidative properties and genotoxicity induced by aflatoxin B₁ and its laccase-mediated detoxification products. **Chemosphere**, v. 135, p. 1-6, 2015.
- ZHANG, Y.; HE, S.; SIMPSON, B. K. Enzymes in Food Bioprocessing---Novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current Opinion in Food Science**, 2018.
- ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 92-100, 2017.
- ZHAO, Z.; RAO, Q.; SONG, S.; LIU, N.; HAN, Z.; HOU, Z.; WU, A. Simultaneous determination of major type B trichothecenes and deoxynivalenol-3-glucoside in animal feed and raw materials using improved DSPE combined with LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 963, p. 75-82, 2014.
- ZHU, Y.; LI, J.; CAI, H.; NI, H.; XIAO, A.; HOU, L. Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. **Microbiological research**, v. 168, n. 9, p. 589-597, 2013.

