



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

DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A: ESTUDO DE PROCESSO E TOXICIDADE

Larine Kupski

Engenheira de Alimentos

Prof^ª. Dra. Eliana Badiale-Furlong – Orientadora

RIO GRANDE, RS

2015

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

DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A: ESTUDO DE PROCESSO E TOXICIDADE

Larine Kupski

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

Eliana Badiale Furlong
Orientador

RIO GRANDE,RS
2015

Dedico:

Aos meus pais, Cristina e Ronaldo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Cristina e Ronaldo**. Com certeza não estaria onde estou hoje se não fosse por vocês. Obrigada pelo amor, pela educação que me deram, por sempre estarem dispostos para me apoiar, ou seja, obrigada por existirem! Amo vocês mais que tudo! Essa conquista é para vocês!!!!

Aos meus irmãos, **Larisse e Lucas** (meu eterno bebê) por todo amor e carinho que sempre me deram, claro cada um do seu jeitinho...hhehehe!!! Amoo vocês!!!! Um obrigada especial para meu anjo da guarda, minha vó Loercira, que com certeza sempre esteve comigo!!!

Ao meu marido/namorado/companheiro **João Felipe (Kalled)** por todo o incentivo e amor.

Por ter me apoiado quando precisei me ausentar e por nunca deixar de estar aqui para mim!!! Nossa filhota nasceu!!! Mais uma etapa da nossa vida se finaliza e com certeza outras virão!!!! Sempre juntos!!! Amoo te

Aos meus amigos de sempre, **Gabriele, Leon, Maria Fernanda e Lis**: apesar da correria dos últimos anos, de cada um de nós ter seguido um caminho diferente, nunca nos afastamos por completo e nunca nos afastaremos!!!! Amizades verdadeiras são assim....a distância não destrói...só fortalece!!!! Amoo vocês!!!

À minha orientadora/amiga/mãe emprestada **Eliana**: não tenho nem palavras para dizer o quanto importante foste, és e sempre serás para mim!! Um exemplo de dedicação, de amor pelo trabalho e de sabedoria! Obrigada por tudo que fizeste por mim nesses 11 anos de convívio, todas as palavras de incentivo, todos os puxões de orelha, por me orientar sempre que precisei. Hoje sua doutoranda vai embora, mas a amiga e companheira para todas as horas continua para sempre!

Aos membros da banca, obrigado pela disponibilização para corrigir esta tese e por todos os ensinamentos que me deram ao longo dos anos! Muito Obrigada

À **Jaque**: e o medo que eu sentia se transformou em admiração e a admiração em amizade!!! Serei eternamente grata por tudo que me ensinaste e todo o apoio que sempre me deste!!!! Que nossa amizade continue sempre igual.....sem frescuras...kkkkk

À **Fer (girafona)**: minha “amizade à primeira vista”, mesmo longe continuou aturando minhas crises de existência, sempre me acalmando e me apoiando!!! “Existem pessoas que entram por acaso na nossa vida...mas não é por acaso que elas permanecem”!!! Obrigada por tudo!

Ao meu suporte de sempre: **Annie, Nathali, Anelise, Priscila e Taiana**. Sou muito grata por ter pessoas como vocês em minha vida. Pessoas que sei que sempre posso contar....seja para rir, seja para chorar!!! Com certeza vocês foram um presente que a FURG me deu...cada uma

com seu jeito único, mas todas especiais para mim!!!!Com certeza nossa amizade começou aqui e se estenderá para sempre!!!Amo muitoos vocês!!!! “Depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida”

Às minhas ajudantes de doutorado, **Chiara e Mariane**: obrigada pela ajuda nesses anos, e espero que eu tenha conseguido contribuir para carreira de vocês, assim como várias pessoas contribuíram para minha! À **Gutinhaa**, amor meuuu...com certeza terá um futuro brilhantee....me orgulho muito de ter tido a oportunidade de te ensinar um pouco que eu sei!!!!Vais arrasar sempre!!!

À minha família do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos: **Sabrina, Kelly, Bibis, Mi, Ana, Nara, Rosana, Rafael, Carols**. Obrigada por terem me acolhido de volta!!!Com certeza estar com vocês facilitou e muito tudo para mim!!!! Levarei a amizade de vocês para sempre!!! À todas as pessoas que ao longo desses 11 anos de FURG/LABORATÓRIO estiveram do meu lado!!! Vocês sempre foram minha segunda família!!!Obrigada por todo o carinho de sempre!!!

À prof **Eduarda Fernandes** por ter me recebido em seu laboratório e por todos os ensinamentos durante minha estada em Portugal! Com certeza guardarei com carinho todos os momentos bons que passamos nestes 9 meses!!Muito Obrigada!

Ao prof **Costa Lima** por ter me recebido tão bem no Porto, por ser a pessoa que és!!!Um verdadeiro exemplo de dedicação e bondade!!Pessoas como o senhor são raras hoje em dia!!!Obrigada!

Aos membros da FRAU, **Marisa, Dani, Diana, Renan, Alessandra**: obrigada por terem me ensinado o mundo das células, por terem me acolhido na FRAU, pelo carinho e amizade, pelas gargalhadas no corredor. Fico honrada de ter trabalhado e conhecido vocês!!! Vocês são MARAAAA!!!Já estou louca de saudadess!!Voltarei para visitá-los em breve!!!!

À minha família luso-brasileira, **Alessandra Braga, Dona Fátima, Alessandra Berto, Luise, Alexandre e Mamis Robs**. “É se dar sem esperar nada em troca dessa união. É ter alguém pra contar, na indecisão. Nunca se desesperar sempre ali pra estender a mão. Maior valor não há. É feito irmão!!” Com certeza nada teria sido igual sem vocês aí comigo!!!!Muito obrigada por serem minha família ai!! Amooo muitoos vocês!!!Nos encontraremos no BRASILLL!!!!

*“Um ciclo se encerra em minha vida. É mais um momento de despedida,
Mais uma batalha por mim foi vencida, Mas chegou o momento da ida
Não esquecerei o que aqui vivi, Os laços de amizade que estabeleci
Sinto, mas devo partir” Aillon Dias*

“Ter desafios é o que faz a vida ser interessante
e superá-los é o que faz a vida ter sentido”

(Joshua J. Marine)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
APRESENTAÇÃO	xiii
CAPÍTULO I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
2.1 GERAL	6
2.2 ESPECÍFICOS	6
CAPÍTULO II	7
3. REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 MICOTOXINAS	8
3.2 OCRATOXINAS	11
3.2.1 Toxicidade de ocratoxina A	14
3.2.2 Métodos analíticos para detecção de OTA	18
3.3 INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA EM ALIMENTOS	20
3.3.1 Ocratoxina em cereais e derivados	21
3.4 LEGISLAÇÃO	23
3.5 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA OCORRÊNCIA DE OTA E DESCONTAMINAÇÃO	24
CAPÍTULO III	28
ARTIGO 1. VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO POR FARINHA DE TRIGO	29
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 MATERIAIS	32
2.2 MÉTODOS	32
2.2.1 Caracterização físico-química	32

2.2.2 Método de QuEChERS para extração de OTA	33
2.2.3 Análise cromatográfica de OTA nos extratos	34
2.2.3.1 CCD	34
2.2.3.2 CLAE	35
2.2.4 Aplicação do método de QuEChERS em farinhas de trigo e estimativa do risco de exposição	35
2.2.5 Análise estatística.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	37
3.2 EFEITO DOS COMPONENTES DA MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE OTA	39
3.3 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE OTA EM FARINHA DE TRIGO	42
3.4 LEVANTAMENTO DE OCORRÊNCIA E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO.....	45
4. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ARTIGO 2. PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A PARA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A	52
RESUMO	53
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 MATERIAIS	55
2.2 MÉTODOS.....	55
2.2.1 Estudo das condições de extração da enzima carboxipeptidase A	55
2.2.2 Determinação de atividade e proteína solúvel.....	55
2.2.3 Degradação de ocratoxina A em meio reacional.....	56
2.2.4 Análise estatística.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE	57
3.2 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE OTA.....	58
4. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	60
ARTIGO 3. DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE OTA E OTA EM ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO <i>in vitro</i>	63

RESUMO.....	64
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1 MATERIAIS E MICRORGANISMOS.....	65
2.2 MÉTODOS	66
2.2.1 Validação de método para determinação de OTA e OTa	66
2.2.2 Ensaio de degradação <i>in vitro</i>.....	67
2.2.4 Análise estatística	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO	68
3.2 DEGRADAÇÃO DE OTA <i>in vitro</i>	70
4. CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	74
ARTIGO 4. COMPARAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE OCRATOXINA A E SEU METABÓLITO OCRATOXINA α EM NEUTRÓFILOS HUMANOS	79
RESUMO.....	80
1. INTRODUÇÃO	80
2. MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1 MATERIAL.....	82
2.2 MÉTODOS	83
2.2.1 Isolamento de neutrófilos humanos	83
2.2.2 Viabilidade celular	83
2.2.3 Avaliação da apoptose e necrose dos neutrófilos.....	83
2.2.3.1 Ensaio de Anexina-V e iodeto de propídio (PI)	83
2.2.3.2 Alterações citomorfológicas	84
2.2.4 Determinação dos níveis de ATP	84
2.2.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de neutrófilos	84
2.2.6 Avaliação do estresse oxidativo dos neutrófilos.....	85
2.2.7 Ca^{2+} intracelular	85
2.2.7.1 Determinação dos níveis de Ca^{2+} intracelular	85
2.2.7.2 Inibidores dos canais de Ca^{2+}	86
2.2.8 Análise estatística	86

3. RESULTADOS.....	86
3.1 VIABILIDADE CELULAR.....	86
3.2 APOPTOSE E NECROSE DOS NEUTRÓFILOS.....	87
3.3 DETERMINAÇÃO DE ATP.....	89
3.4 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$).....	90
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS.....	91
3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE Ca^{2+} INTRACELULAR.....	92
3.7 PAPEL DO INFLUXO DE Ca^{2+} EM ALTERAÇÕES DOS NEUTRÓFILOS INDUZIDOS POR OTA.....	92
4. DISCUSSÃO.....	94
5. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	100
ARTIGO 5. APLICAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A NA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A EM FARINHA DE TRIGO.....	106
RESUMO.....	107
1. INTRODUÇÃO.....	107
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	108
2.1 MATERIAIS.....	108
2.2 MÉTODOS.....	109
2.2.1 Fontes e extração enzimática.....	109
2.2.2 Caracterização enzimática.....	110
2.2.2.1 Temperatura ótima.....	110
2.2.2.2 pH ótimo.....	111
2.2.2.3 Concentração do tampão.....	111
2.2.2.4 Força iônica.....	111
2.2.2.5 Estabilidade térmica.....	111
2.2.2.6 Parâmetros cinéticos da carboxipeptidase A.....	112
2.2.3 Validação de método para determinação de OTA e OTα.....	113
2.2.4 Biodegradação em farinha de trigo.....	114
2.2.5 Análise estatística.....	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
3.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	115

3.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OTA e OT α EM FARINHAS DE TRIGO	120
3.3 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA.....	121
4. CONCLUSÃO.....	125
REFERÊNCIAS	126
CAPÍTULO IV.....	129
4. CONCLUSÃO.....	130
CAPÍTULO V	131
5. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	132
CAPÍTULO Vi.....	133
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
APÊNDICE 1	155
ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILO	156
APÊNDICE 2	157
DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE	158
APÊNDICE 3	159
Alterações citomorfológicas.....	160
APÊNDICE 4	161
DETERMINAÇÃO DE ATP.....	162
APÊNDICE 5	163
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	164

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1- Micotoxinas, produtos e microrganismos produtores em que podem ocorrer.....	10
Tabela 2- Resumo das condições para produção de OTA	12
Quadro 1- Métodos de determinação de OTA.....	20
Tabela 3- Limites máximos toleráveis (LMT) para ocratoxina A	23
Tabela 4- Métodos de detoxificação de ocratoxina A.....	25

CAPÍTULO III

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO POR FARINHA DE TRIGO

Tabela 1- Parâmetros de validação do método QuEChERS	38
Tabela 2- Composição química da amostra e recuperação de OTA em CCD e CLAE.....	40
Tabela 3- Ocorrência de OTA em farinhas de trigo.....	46

PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A PARA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A

Tabela 1- Condições testadas para a padronização da extração de carboxipeptidase A por banho ultrassônico.....	58
---	----

DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE OTA E OT α EM ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO *in vitro*

Tabela 1- Características cromatográficas de OTA e OT α	70
Tabela 2- Indicativos de mérito para o método de extração de OTA e OT α	70
Tabela 3- Degradação <i>in vitro</i> de ocratoxina A (1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	72

APLICAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A NA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A
EM FARINHA DE TRIGO

Tabela 1- Atividade de carboxipeptidase A na biomassa de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Trichoderma reesei</i> ao longo do intervalo de cultivo.....	115
Tabela 2- Efeito da temperatura na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas	116
Tabela 3- Efeito do pH na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas.....	117
Tabela 4- Efeito na força iônica na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas	118
Tabela 5- Efeito da concentração de tampão na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas	118
Tabela 6- Parâmetros cinéticos e termoestabilidade de carboxipeptidase A nas diferentes fontes de enzima	119
Tabela 7- Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-FL	120

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1- Interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos na cadeia produtiva de alimentos que afetam o desenvolvimento fúngico e produção micotoxicológica em produtos armazenados.....	9
Figura 2- Estrutura das ocratoxinas	11
Figura 3- Biosíntese de ocratoxina A.....	13
Figura 4- Ciclo de reações do citocromo P450 e envolvimento da OTA na formação de radicais livre.....	15
Figura 5- Fontes e consequências do aumento do cálcio citosólico na lesão celular. ATP: adenosina trifosfato; ATPase: adenosinatrifosfatases.....	17
Figura 6- Via enzimática de descontaminação de ocratoxina A.....	26

CAPÍTULO III

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO POR FARINHA DE TRIGO

Figura 1- (a) Imagem da placa cromatográfica com concentrações crescentes de ocratoxina A; b) Cromatograma obtido da imagem da placa cromatográfica.	38
Figura 2- Efeito dos componentes da matriz na extração por QuEChERS em CCD e CLAE	41
Figura 3- Efeito do solvente (a); adição de água (b) e composição de sais (c) na extração de OTA em farinha de trigo.....	44

PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A PARA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A

Figura 1- Degradação de ocratoxina por via enzimática	54
Figura 2- Taxa de hidrólise (a) e hidrólise específica (b) de OTA por ação enzimática em meio reacional.	59

DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE OTA E OT α EM ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO *in vitro*

Figura 1- Cromatograma de OTA e OT α em CLAE-FL.....	69
Figura 2- (A) Acompanhamento do crescimento fúngico em presença e ausência de ocratoxina A pelo conteúdo de glicosamina e microscopia eletrônica de varredura para <i>Rhizopus oryzae</i> (B) e <i>Trichoderma reesei</i> (C) em 96 horas de cultivo em presença de OTA.	71

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE OCRATOXINA A E SEU METABÓLITO OCRATOXINA α EM NEUTRÓFILOS HUMANOS

Figura 1- Estrutura química de OTA (A) e seu principal metabólito OT α (B).	81
Figura 2- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) na viabilidade dos neutrófilos humanos, segundo método de exclusão de azul tripano.	87
Figura 3- Citometria de neutrófilos incubados com OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M), usando o método de coloração com PI. Imagens representativas de preparações citocentrifugadas após coloração com Hemacolor®: controle (ausência de OT α ou OTA) (C) e OTA 300 μ M (D), após 8 horas de incubação, e controle (E), e OTA 300 μ M (F), OT α 300 μ M (G), após 20 horas de incubação.....	88
Figura 4- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) na depleção dos níveis de ATP em neutrófilos humanos	89
Figura 5- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) na alteração do $\Delta\Psi_m$ mediante análise em citometro de fluxo com JC-1. Imagens representativas de JC-1 em citômetro: controle (ausência de OTA ou OT α) (C) OTA 300 μ M (D) e OT α 300 μ M (E), após 12 horas de incubação.....	90
Figura 6- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-75 μ M) no estresse oxidativo em neutrófilos humanos medido com DCFH-DA.	91
Figura 7- Efeito da OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) nos níveis de Ca ²⁺ intracelular, medidos com FLUO-4/AM em citometria de fluxo.....	92
Figura 8- (A) Efeito de 2-APB (0-100 μ M) no influxo de Ca ²⁺ em neutrófilos tratados com OTA (300 μ M) durante 4 horas. (B) Efeito de 2-APB (0-100 μ M) na produção de espécies	

reativas em neutrófilos tratados com OTA (75 μM) durante 2 horas. (C) Efeito de 2-APB (0-100 μM) nos níveis de ATP em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 8 horas 94

Figura 9- (A) Efeito de BTP2 (0-10 μM) no influxo de Ca^{2+} em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 4 horas. (B) Efeito de BTP2 (0-10 μM) na produção de espécies reativas em neutrófilos tratados com OTA (75 μM) durante 2 horas. (C) Efeito de BTP2 (0-10 μM) nos níveis de ATP em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 8 horas 94

Figura 10- Mecanismo proposto para toxicidade de OTA em neutrófilos humanos 100

APLICAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A NA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A EM FARINHA DE TRIGO

Figura 1- Redução dos níveis de OTA (A) e produção de $\text{OTA}\alpha$ (B) por ação de diferentes carboxipeptidasas em farinhas de trigo contaminadas com dois níveis de OTA (Nível 1- 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; Nível 2- 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). 122

Figura 2- Análise de componentes principais para o estudo de degradação enzimática, utilizando diferentes extratos enzimáticos. 124

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu_{\text{máx}}$ - velocidade máxima de crescimento
2-APB- 2-aminoetóxidifenilborato
4-OH-OTA- 4-hidroxiocratoxina A
ACN- acetonitrila
ACP- Análise de componentes principais
AF- aflatoxinas
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
AR- açúcares redutores
AT- açúcares totais
ATP- adenosinatrifosfato
ATPases- adenosina trifosfatases
 a_w - atividade de água
BTP2- 4-metil-4'-[3,5-bis(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-1,2,3-tiadiazole-carboxanilida.
CCD- Cromatografia de camada delgada
CG- cromatografia gasosa
CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE- MS- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Massas
CLAE-FL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
CLAE-MS/MS- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Massas/Massas
CPA- carboxipeptidase A
CV – coeficiente de variação
DCFH-DA- 2,7 diclorodihidrofluoresceína diacetato
DiOC₆- iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina
DNS- dinitrossalicílico
DPI- cloreto de difenilidônio
EC- *European Commission*
EM- efeito de matriz
FAO- *Food and Agriculture Organization*
FES- fermentação em estado sólido
FSM- fermentação em estado submerso
FUMO- fumonisina
H-PHE- hipuril-L-fenilalanina
IAC- colunas de imunoafinidade
IARC – *International Agency of Research on Cancer*
ID- ingestão diária
IDA- ingestão diária aceitável
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
k – Fator de retenção
 k_d - constante da velocidade de desnaturação enzimática
 K_M - constante de Michaelis e Mentem
LD- Limite de Detecção
 LD_i – Limite de Detecção do instrumento
 LD_m – Limite de Detecção do método

LMT- Limite Máximo Tolerável
LQ- Limite de Quantificação
LQ_i – Limite de Quantificação do instrumento
LQ_m – Limite de Quantificação do método
MEV- microscopia eletrônica de varredura
MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OFAT- *one factor at a time*
OP-OA- ocratoxina A com anel aberto
OT- ocratoxinas
OTA- ocratoxina A
OTB- ocratoxina B
OTC- ocratoxina C
OTHQ- OTA hidroquinona
OT α - ocratoxina α
OT β - OTB sem fenilalanina
p – nível de significância
PBS- solução salina tamponada com fosfato, sem cloreto de cálcio e magnésio
PEPCK- fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI- iodeto de propídio
QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
SMPE- microextração em fase sólida
SOCE- *Store operated calcium entry*
SPE- extração em fase sólida
t_{1/2}- tempo de meia vida
v_{máx}- velocidade máxima
ZEA- zearalenona
 α – Fator de separação
 $\Delta\Psi_m$ - potencial de membrana mitocondrial

APRESENTAÇÃO

Para cumprimento dos objetivos desta tese as atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LAMCA) e Laboratório de Biotecnologia da Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Além disso, os experimentos de toxicidade de OTA e seu metabólito foram realizados na unidade *Free Radicals and Antioxidant Unit* (FRAU) do Laboratório de Química Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

O documento que reúne os experimentos e seus resultados foi organizado em capítulos:

I-RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

II- REVISÃO DA LITERATURA

III- DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

IV- CONCLUSÃO GERAL

V- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

VI- REFERÊNCIAS

CAPÍTULO I

Degradação de Ocratoxina A: Estudo de Processo e Toxicidade

RESUMO

A ocratoxina A (OTA), micotoxina encontrada em diferentes níveis e em diversas matrizes, apresenta efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos e teratogênicos. O desenvolvimento de métodos capazes de diminuir esta contaminação a níveis permitidos pela legislação é incentivado e os processos biológicos utilizados envolvem o uso de enzimas e/ou microrganismos para degradação da OTA e são preferenciais pela especificidade, bem como pelas condições brandas para a detoxificação. O objetivo do trabalho foi estudar a ação de carboxipeptidase A nos níveis e na toxicidade de OTA, visando aplicar a técnica para detoxificar farinhas de trigo. Primeiramente foi estimado o risco de exposição à ocratoxina A pelo consumo de farinhas de trigo. Para isso foram estabelecidas condições de determinação de OTA em farinhas de trigo, empregando técnicas de estatística multivariada para definir os principais interferentes na extração de OTA pelo método de QuEChERS e detecção em CLAE-FL. O método validado permitiu a avaliação da ocorrência natural em 20 amostras de farinha de trigo, estando estas contaminadas na faixa de 0,22 a 0,85 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, apresentando um valor de ingestão diária de 0,08 $\text{ng}_{\text{OTA}}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1}$ e uma disponibilidade de 94,4%. Em seguida foi realizada a padronização da extração de carboxipeptidase A em biomassa de *Rhizopus oryzae* que consistiu em agitação ultrassônica durante 30 minutos numa potência fixa de 150 W e 40 kHz e a triagem de agentes biológicos para degradação de OTA. Para o estudo da degradação *in vitro* de OTA, método de extração e detecção de OTA e OT α em CLAE-FL foi validado e o processo de degradação foi realizado com *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, obtendo-se uma redução máxima de 63,5% e 57,7%, respectivamente. A degradação apresentou uma correlação alta ($R>0,9$) e significativa ($p<0,05$) com a produção de OT α , indicando que ocorreu a produção de enzimas capazes de hidrolisar a micotoxina, por exemplo, a carboxipeptidase A. O estudo da toxicidade de OTA e seu metabólito OT α foi realizado em neutrófilos humanos, onde foi observado a ausência de efeito tóxico de OT α . Também foi determinado o mecanismo de toxicidade de OTA pelo aumento de Ca^{2+} intracelular pela liberação a partir das reservas internas. Esta liberação, subsequentemente, provoca uma cascata de eventos, nomeadamente: a produção de espécies reativas, depleção de ATP, perda de $\Delta\Psi\text{m}$, levando à morte por necrose. Para reduzir o risco de exposição à micotoxina pela ingestão de matéria prima contaminada, carboxipeptidase A extraída de diferentes fontes foi aplicada na hidrólise de OTA em farinha de trigo para posterior determinação do conteúdo residual de OTA e OT α , empregando método validado. O estudo mostrou uma redução de OTA entre 16,8 e 78,5% e produção de OT α entre 2 a 8,2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. As carboxipeptidases mais promissoras para degradação foram as provenientes de *Rhizopus* e *Trichoderma* e a carboxipeptidase comercial. Ficou demonstrado que se pode recomendar a aplicação de enzimas proteolíticas, tipo carboxipeptidase, para reduzir o risco de exposição à micotoxina quando utilizada matéria prima contaminada, por exemplo, farinha de trigo para diferentes processos. A transformação de OTA para OT α e seus efeitos na redução da toxicidade da micotoxina corroboram com esta afirmação.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Detoxificação. Carboxipeptidase A. Ocratoxina α .

Ochratoxin A degradation: Process and Toxicity Study

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA), a mycotoxin found in different levels in various matrices, has carcinogenic, nephrotoxic and teratogenic effects. The development of methods to reduce this contamination levels to the one allowed by the legislation is encouraged and biological methods which involve the use of enzymes and/or micro-organisms for OTA degradation are preferred due its specificity as well as the mild conditions for detoxification. The objective was to study the action of carboxypeptidase on OTA levels and toxicity in order to apply the technique to detoxify wheat flours. First we estimated the risk of exposure to ochratoxin A by the consumption of wheat flours. For that conditions to determinate OTA in wheat flours were established, using multivariate statistical techniques to define the main interfering in the extraction of OTA by the QuEChERS method and detection in HPLC-FL. The validated method allowed the evaluation of the naturally occurring on 20 wheat flour samples, these being contaminated in the range of 0.22 to 0.85 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, with a daily intake of 0.08 $\text{ngOTA}\cdot\text{day}^{-1}\cdot\text{kg}_{\text{bodyweight}}^{-1}$ and a digestibility of 94.4%. Then standardization of carboxypeptidase A extraction on *Rhizopus oryzae* biomass was carried out, which consisted of ultrasonic agitation for 30 minutes at 150 W and 40 kHz and the screening of biological agents to OTA degradation were assessed. To study the *in vitro* degradation of OTA a method for extraction and detection of OTA and OT α in HPLC-FL was validated and the degradation process was performed with *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*, encountering a reduction of 63.5% and 57.7%, respectively. The degradation showed a high ($R > 0.9$) and significant ($p < 0.05$) correlation with OT α production, indicating that a enzyme capable of hydrolyzing the mycotoxin was produced, for example, carboxypeptidase A. The study of OTA and its metabolite OT α toxicity was performed on human neutrophils, where it was observed the absence of OT α toxic effect. It was also determined OTA toxicity mechanism by the increase in the intracellular Ca^{2+} release from internal stores. This release subsequently triggers a cascade of events, namely: production of reactive species, ATP depletion, $\Delta\Psi\text{m}$ loss, leading to death by necrosis. To reduce the risk of exposure to mycotoxin by eating contaminated ray materials, carboxypeptidase A extracted from different sources was applied to the hydrolysis of OTA on wheat flour for subsequent determination of the residual content of OTA and OT α employing validated method. The study showed an OTA decrease between 16.8% and 78.5 and OT α production from 2 to 8.2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. The most promising carboxypeptidases for degradation were obtained from *Rhizopus* and *Trichoderma*, and the commercial carboxypeptidase. It was shown that it may be recommend the use of proteolytic enzymes, type carboxypeptidase, to reduce the risk of exposure to mycotoxin when contaminated raw material is used, for example, wheat flour for different processes. The transformation of OTA to OT α and its effect in reducing the mycotoxin toxicity corroborate with this statement.

Key-words: Enzymatic hydrolysis. Detoxification. Carboxypeptidase A. Ochratoxin α .

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são substâncias naturais de baixo peso molecular produzidas como metabólitos secundários por fungos filamentosos. Estes metabólitos são compostos biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas (que constituem o metabolismo secundário), mas que podem não afetar o desenvolvimento ou a sobrevivência do organismo (BENNET, 1987). A contaminação fúngica e micotoxicológica pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva: pré-colheita, entre a colheita e secagem e durante o armazenamento. De acordo com estimativas da FAO (Food and Agriculture Organization) aproximadamente 25% dos produtos agrícolas do mundo estão contaminados com micotoxinas em um determinado nível (KOPPEN et al., 2010).

Dentre as micotoxinas, destacam-se como as de maior significância na saúde pública e na agroeconomia as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e os alcaloides de ergot (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As ocratoxinas correspondem a um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos de dois gêneros: *Penicillium* e *Aspergillus*. Exceto pela ocratoxina α , elas compreendem uma dihidroisocumarina ligada pelo grupo 7-carboxilo a uma molécula de L- β -Fenilalanina, através de uma ligação amida. Neste grupo encontram-se a ocratoxina A (OTA), ocratoxina C, 4-hidroxiocratoxina A e ocratoxina B. Dentre estes a OTA é o membro mais tóxico e foi primeiramente isolada de *Aspergillus ochraceus*, e têm sido principalmente encontrada em cereais, bem como em outros produtos, como café, vinho, frutos secos, cerveja e suco de uva (RINGOT et al., 2006; ZAIN, 2011).

A prevenção do crescimento e produção micotoxicológica de fungos em plantas e alimentos é a melhor abordagem para impedir os efeitos nocivos das micotoxinas na saúde animal e humana. Porém, como esta condição é difícil de ser controlada a descontaminação de produtos agrícolas contaminados é outra possibilidade a ser explorada (VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000). Diferentes estratégias para este fim já vem sendo estudadas, sendo classificados como métodos físicos, químicos e (micro) biológicos (VARGA et al., 2005).

Na última década houve um crescente interesse nos métodos biológicos para o controle de OTA em alimentos, através do uso de leveduras, bactérias e fungos não toxigênicos capazes de inibir o crescimento de fungos toxigênicos, assim como diminuir os níveis de OTA aos aceitáveis pela legislação brasileira ($2-30 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (ABRUNHOSA;

VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2011; ANVISA, 2012; KAPETANAKOU, et al., 2012; VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000).

A principal via de degradação de OTA por microrganismos envolve a hidrólise da ligação amida que liga a porção isocumarina da OTA (ocratoxina α) a molécula de fenilalanina, mediante ação de enzimas proteolíticas intra ou extracelulares (ABRUNHOSA; VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2011). Neste contexto, encontram-se as carboxipeptidases que podem ser obtidas de leveduras, como *Phaffia rhodozyme* e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* (AMÉZQUETA et al., 2009). A consideração da perspectiva de descontaminação de micotoxinas por via enzimática parte da potencial necessidade de novas tecnologias que viabilizem a aplicação industrial, por exemplo, no processamento de alimentos para consumo humano e animal.

Além disso, pouco se sabe sobre o efeito dos compostos derivados da hidrólise de OTA. No entanto, mesmo adotando um processo de degradação enzimática é importante a elucidação do mecanismo de ação envolvidos, a fim de assegurar repetibilidade e efetivamente garantir a aplicabilidade da técnica de degradação e seu impacto na minimização dos riscos à saúde humana e animal.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar a ação de carboxipeptidase A para reduzir a toxicidade de ocratoxina A, visando aplicar a técnica para detoxificar farinhas de trigo.

2.2 ESPECÍFICOS

Validar método de extração e detecção de OTA e OT α em diferentes matrizes;

Estimar o risco de exposição de OTA pelo consumo de farinha de trigo;

Determinar a capacidade de agentes biológicos e suas enzimas para a degradação de OTA;

Comparar os efeitos tóxicos de OTA e seu metabólito OT α em neutrófilos humanos;

Aplicar carboxipeptidase A de diferentes fontes para degradação de OTA em farinhas de trigo.

CAPÍTULO II

3. REVISÃO DE LITERATURA

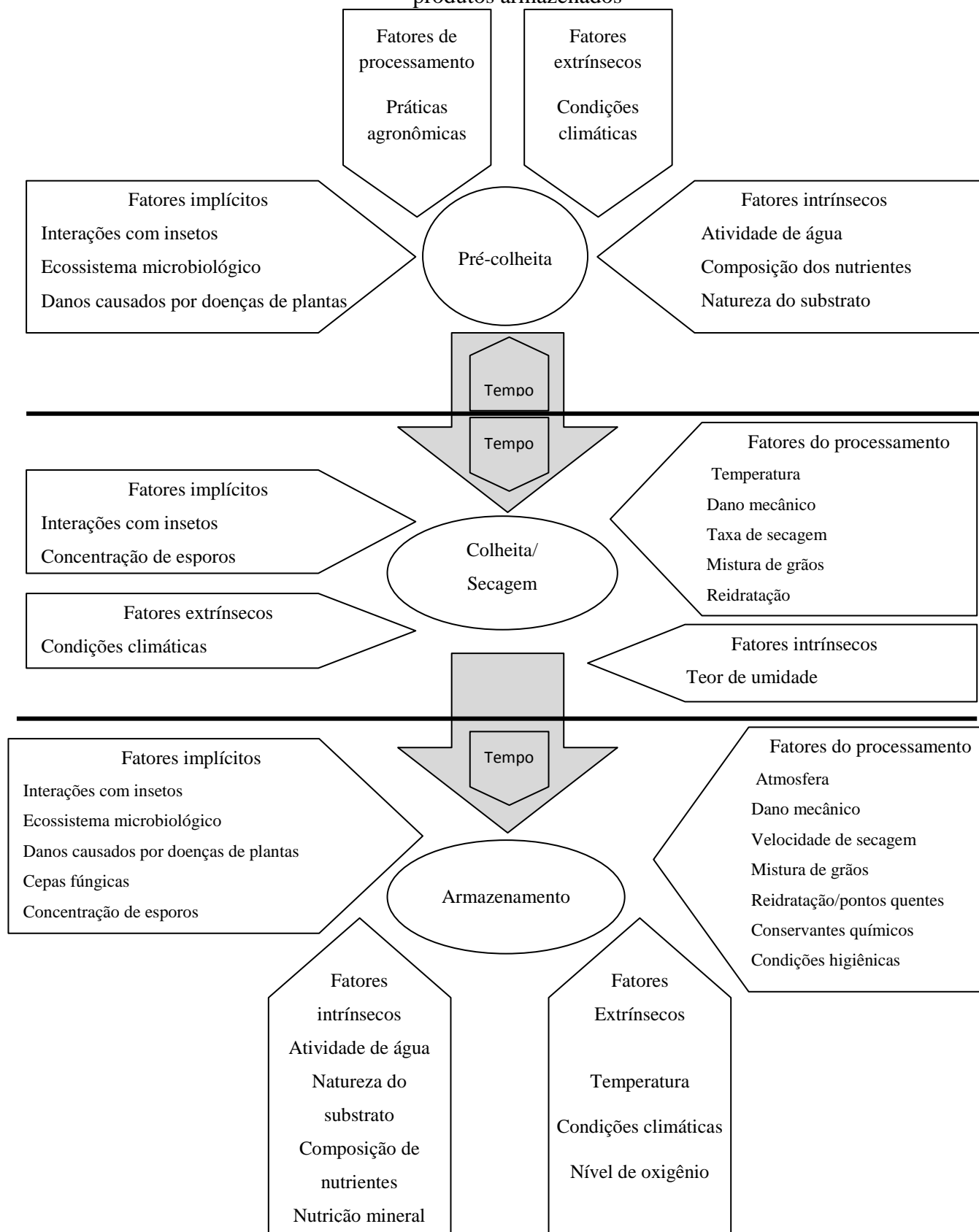
3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas constituem um grupo de estruturas diversas, geralmente de baixo peso molecular, produzidas principalmente pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, os quais sob condições de temperatura e umidade adequadas podem se desenvolver em vários alimentos e rações, causando sérios riscos para a saúde humana e animal (BENNET, 1987).

A contaminação fúngica e micotoxicológica pode ocorrer em qualquer estágio da cadeia produtiva: pré-colheita, entre a colheita e a secagem e durante o armazenamento (KÖPPEN et al., 2010). As micotoxinas podem ser produzidas no campo enquanto as colheitas agrícolas acontecem. Nestas situações são produzidas por fungos que possuem freqüentemente uma associação ecológica com a planta. Assim, é comum encontrar a ligação entre certas espécies de micotoxinas com determinados produtos agrícolas (*Aspergillus flavus*, aflatoxinas em amendoins (RUSTOM, 1997); *Penicillium expansum*, patulina em maçãs (HARWIG et al., 1973). Entretanto, as micotoxinas também podem ser formadas no período de pós-colheita, durante o seu transporte e armazenagem, especialmente se as condições representarem estresse ao microrganismo, como alterações de temperatura, atividade de água entre outros (MAGAN; ALDRED, 2007).

A produção de micotoxinas por fungos consiste em um complexo processo ainda não totalmente compreendido. Sabe-se que tanto o crescimento fúngico, quanto o seu potencial toxigênico são afetados por fatores ambientais como temperatura, atividade de água, pH, composição e disponibilidade de nutrientes (SHWAB; KELLER, 2008). Com relação às condições do campo, existem vários fatores que influenciam na produção micotoxicológica: clima, práticas agrícolas, planta hospedeira além da presença de outros microrganismos (KOKKONEN et al., 2010; XU; NICHOLSON; RITIENI, 2007). Os principais fatores que afetam esta produção nas diferentes etapas da cadeia produtiva de alimentos estão resumidos na Figura 1.

Figura 1- Interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos na cadeia produtiva de alimentos que afetam o desenvolvimento fúngico e produção micotoxicológica em produtos armazenados



Fonte: MAGAN; ALDRED (2007)

As micotoxinas de maior significância para saúde pública e para agroeconomia são as aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OT), tricotecenos, zearalenona (ZEA), fumonisinas, (FUMO), toxinas termogênicas e alcalóides de ergot. Essas toxinas geram perdas mundiais em torno de milhões de dólares por ano na área da saúde humana, animal e devido à contaminação de produtos agrícolas (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Estes metabólitos secundários podem entrar na cadeia alimentar humana direta ou indiretamente. Diretamente, através do consumo dos cereais, oleaginosas e derivados. Os animais que se alimentam com rações previamente contaminadas podem excretar micotoxinas no leite, carne e ovos, e conseqüentemente, constituir-se em fonte de contaminação indireta para os humanos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

O efeito de uma micotoxina depende da dose e da freqüência com que esta é ingerida, podendo ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápida, podendo levar à morte porque causa alterações irreversíveis resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. Podem ocorrer efeitos eméticos, diarreia, hemorragias e distúrbios gastrointestinais. Estudos sobre os efeitos crônicos relatam carcinogenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade, nefrotoxicidade e imunotoxicidade (RAWAL; KIM; COULOME, 2010). O efeito subagudo é o resultado de doses menores que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos animais ao longo de um intervalo maior de exposição (SHEPHARD, 2008). Na Tabela 1 estão descritas as principais micotoxinas encontradas em produtos alimentícios e os microrganismos produtores.

Tabela 1- Micotoxinas, produtos e microrganismos produtores em que podem ocorrer

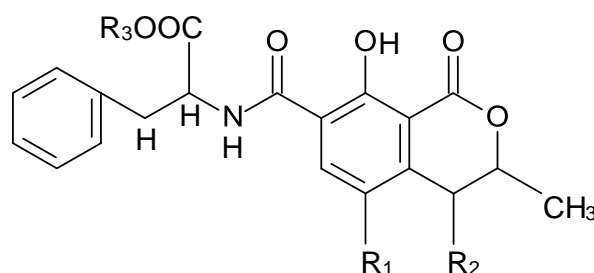
Micotoxina	Produto	Microrganismo
Aflatoxina	Milho, algodão, amendoim, nozes, leite	<i>Aspergillus flavus and A. parasticus</i>
Ocratoxina	Trigo, café, uva, passas de uva	<i>A. ochraceus, Penicillium viridicatum, P. cyclopium</i>
Zearalenona	Milho	<i>Fusarium culmorum, F. graminearum, F. sporotrichioides</i>
Deoxinivalenol	Milho, trigo, cevada	<i>F. culmorum, F. graminearum, F. sporotrichioides</i>
Fumonissina	Milho	<i>F. proliferatum, F. verticillioides</i>

Fonte: BULLERMAN; BIANCHINI (2007); HUSSEIN; BRASSEL (2001).

3.2 OCRATOXINAS

As ocratoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos de dois gêneros: *Aspergillus* e *Penicillium*. Com exceção da ocratoxina α (OT α), cuja diferença entre OTA é a ausência da fenilalanina, estas compreendem um derivado de policetídio com a porção diidroisocumarina ligada a L- β -fenilalanina através do grupo carboxil por uma ligação amida. Neste grupo encontram-se a ocratoxina A (OTA), seu éster metílico e éster etílico, conhecido como ocratoxina C (OTC); 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA); ocratoxina B (OTB), seus ésteres metílicos e etílicos (Figura 2) (RINGOT et al., 2006).

Figura 2- Estrutura das ocratoxinas



Ocratoxinas	R1	R2	R3
OTA	Cl	H	H
OTB	H	H	H
OTC	Cl	H	CH ₂ CH ₃
Ester metílico da OTA	Cl	H	CH ₃
Ester etílico da OTB	H	H	CH ₂ CH ₃
Ester metílico da OTB	H	H	CH ₃
4-OH-OTA	Cl	OH	H

OTA- ocratoxina A. OTB-ocratoxina B. OTC- ocratoxina C. 4-OH-OTA- 4-hidroxi-ocratoxina A

Fonte: RINGO et al. (2006)

Dentre as ocratoxinas, a componente mais tóxica e mais comumente encontrada é a OTA (DUARTE; PENA; LINO, 2010), produzida principalmente durante o armazenamento por diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, como por exemplo, *A.carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. nordicum*, *P. verrucosum*. Dentre as espécies de *Penicillium*, *P. nordicum* é um contaminante típico de alimentos secos e curados como

presunto italiano ou espanhol, salame, queijo salgado, apresentando alta taxa de produção de ocratoxinas. A outra espécie produtora, *P. verrucosum* apresenta baixa produção de OTA e ocorre normalmente em cereais (SCHMIDT-HEYDT et al., 2012).

Apesar dessas espécies se desenvolverem em diferentes condições ambientais, a síntese de metabólitos secundários é condicionada por vários fatores, como: temperatura; atividade de água (a_w), composição do meio, principalmente com relação a seus micronutrientes, pH e presença de agentes competitivos (ESTEBAN et al., 2006; KOKKONEN et al., 2005). De acordo com Mitchel et al. (2004), dentre os fatores citados destacam-se a atividade de água e a temperatura na germinação, crescimento, esporulação fúngica e conseqüentemente na produção de OTA, sendo ilustrado na Tabela 2 as condições ideais desses fatores para a produção de OTA por diferentes microrganismos.

Tabela 2- Resumo das condições para produção de OTA

	<i>P. verrucosum</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>
Temperatura mínima	4-10 °C	5-10 °C	5-15 °C	10-15 °C
Temperatura máxima	21-31 °C	30-40 °C	30-45 °C	35-41 °C
Temperatura ótima	24-25 °C	20-35 °C	15-30 °C	15-35 °C
a_w mínima	0,80-0,83	0,87-0,90	0,85-0,94	0,90-0,95
a_w ótima	0,95-0,99	0,95-0,99	0,95-0,99	0,95-0,99

Fonte: AMÉZQUETA et al. (2012)

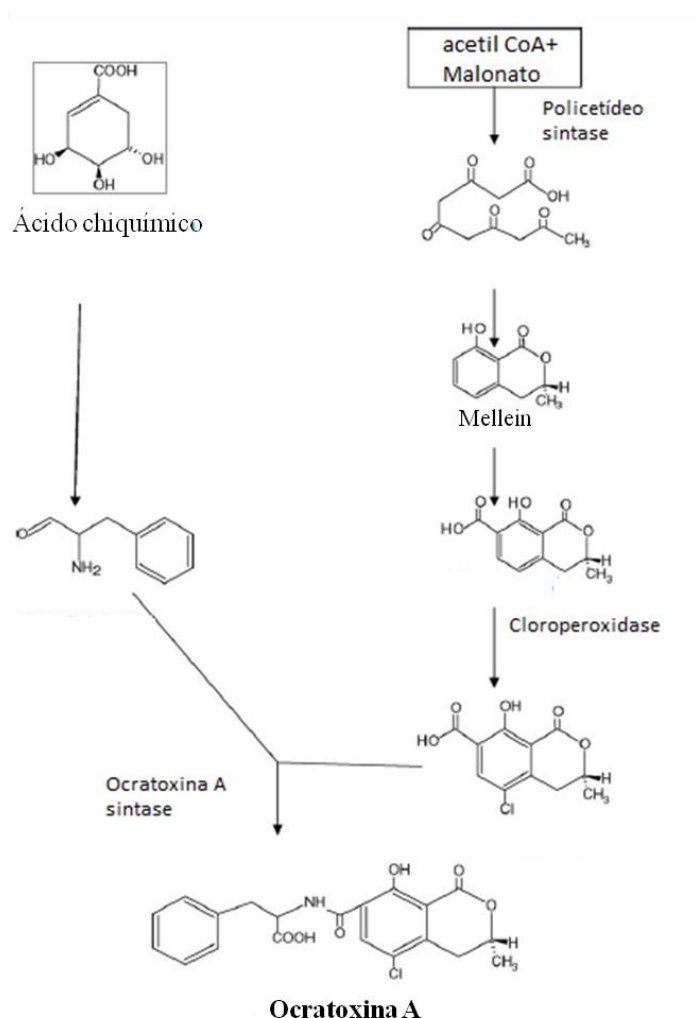
P. verrucosum e *A. ochraceus* produzem OTA em temperaturas mais baixas que *A. carbonarius* e *A. niger*. No entanto, *A. ochraceus* requer temperaturas mais altas que *P. verrucosum* para atingir uma taxa de produção de OTA ótima. Neste sentido, a origem da OTA em climas frios e temperados poderia ser atribuído a *P. verrucosum* e *A. ochraceus* enquanto que em zonas quentes, temperadas e tropicais ao *A. ochraceus* e *A. niger*, como sugerido por Zimmerli e Dick (1996).

A produção de OTA ocorre em níveis elevados de a_w (0,80 e 0,95), sendo a síntese ótima nas atividades de 0,95-0,99. Em conseqüência, para evitar essa toxina, as condições ambientais devem estar sob controle rigoroso durante o manuseio do produto em regiões úmidas (colheita, secagem, processamento, etapas de armazenamento e transporte) (AMÉZQUETA et al., 2012).

A biossíntese da OTA, apesar de não estar ainda completamente esclarecida, parece resultar do envolvimento de várias vias biossintéticas. Estudos realizados mostram

que a fração fenilalanina é originada pela via do chiquimato (a partir do ácido chiquimico) e a fração dihidro-isocumarina da via do pentacetídeo (Figura 3). O primeiro passo na síntese do policetídeo de isocumarina consiste na condensação de um acetato (acetil-CoA) a quatro malonatos, sendo esta etapa diferente entre as espécies *Penicillium* e *Aspergillus* (CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). Uma vez formada, a cadeia do policetídeo é modificada através da formação de um anel de lactona (síntese de *Mellein*) e a adição de um grupo carboxílico, originando-se a ocratoxina β . Subseqüentemente, um átomo de cloro é incorporado a molécula pela ação de cloroperoxidase, sintetizando a $OT\alpha$. Na última etapa, a enzima ocratoxina A sintetase catalisa a ligação entre $OT\alpha$ e fenilalanina, originando assim a ocratoxina A (RINGOT et al., 2006).

Figura 3- Biosíntese de ocratoxina A.



Fonte: RINGOT et al. (2006)

3.2.1 Toxicidade de ocratoxina A

A OTA é considerada nefrotóxica, hepatotóxica, genotóxica, teratogênica e imunotóxica a animais e seres humanos. Esta micotoxina tem sido relacionada com nefropatia endêmica dos Bálcãs, ao desenvolvimento de tumores no trato urinário de humanos e de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, está classificada como um possível carcinógeno humano (grupo 2B) (KHOURY; ATOUI, 2010; PATHARAJAN et al., 2011; SHEPHARD, 2008).

A principal via de contaminação de OTA é o trato gastrointestinal. Na maioria das espécies a absorção ocorre primariamente no estômago, como consequência de suas características ácidas e após em nível intestinal. No sangue ela encontra-se fortemente ligada às proteínas plasmáticas, determinante para a persistência da micotoxina no sangue e, portanto, para a sua toxicidade. A fração ligada a macromoléculas constitui um reservatório da micotoxina que permite libertá-la para os tecidos durante um longo período de tempo. Também a alta afinidade com as proteínas séricas retarda a eliminação da micotoxina pelo organismo, aumentando o seu tempo de meia-vida (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

A OTA é um composto tóxico cumulativo com absorção relativamente rápida e eliminação lenta. Em todas as espécies, ambas as excreções fecais e urinárias desempenham papéis importantes na depuração plasmática da toxina. A contribuição relativa de cada via de excreção é influenciada pela via de administração, a dose, o grau de ligação com o plasma, proteínas e com a circulação entero-hepática de OTA. Além das vias mencionadas acima, em mamíferos, a excreção desta micotoxina é verificada também no leite (RINGOT et al., 2006).

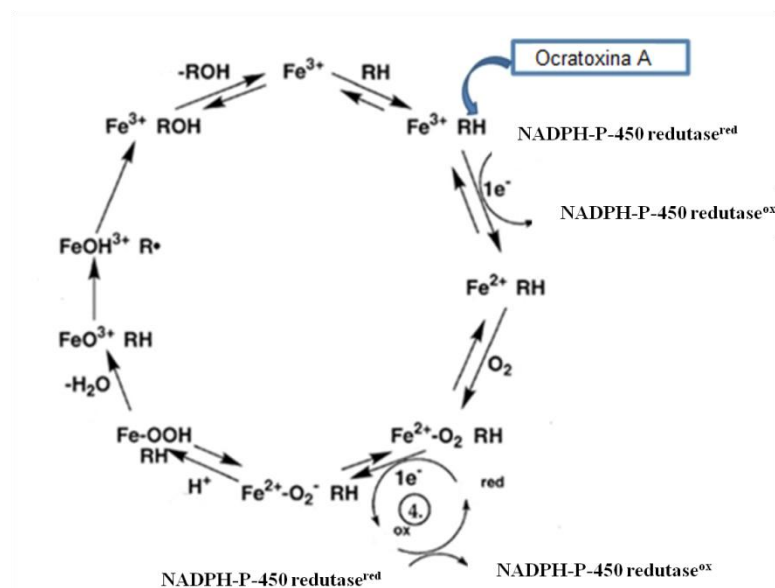
Além destes aspectos tóxicos, uma particularidade da OTA é a alta estabilidade. Esta micotoxina tem mostrado resistência a acidez e temperatura elevada. Assim, uma vez que os produtos alimentares são contaminados, é muito difícil remover totalmente esta molécula e evitar sua ação tóxica no organismo exposto (KHOURY; ATOUI, 2010).

De acordo com Marin-Kuan et al. (2008) e Bouaziz et al. (2008), a carcinogenicidade de OTA envolve uma rede de mecanismos epigenéticos, tendo como mecanismos de toxicidade: inibição da síntese protéica, disfunção mitocondrial, alteração da homeostase do cálcio, formação de adutos com o DNA e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Muitos estudos indicam que a inibição da síntese da proteína está envolvida na maioria dos efeitos tóxicos agudos de OTA (DIRHEIMER; CREPPY, 1991; SCHILTER et al., 2005). Essa inibição ocorre devido ao fato da OTA ser um análogo estrutural da fenilalanina e por consequência pode atuar em todos os sistemas metabólicos que envolvem este aminoácido. Dois principais mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar este comportamento: a inibição de fenilalanina-RNAt-sintetase e a inibição de fenilalanina hidroxilase. Além disso, uma vez que a OTA interrompe a síntese de proteínas, ela afeta indiretamente a atividade de várias enzimas celulares, como por exemplo, a atividade citosólica de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), uma enzima chave da via gliconeogênica. Portanto, uma consequência toxicológica indireta de OTA é a alteração das vias metabólicas dos carboidratos (MARIN-KUAN et al., 2008). Apesar de se atribuir os efeitos mais tóxicos de OTA à inibição da síntese proteica, somente esta inibição não explica a diversidade de seus efeitos, tais como a peroxidação lipídica, danos no DNA e perturbações da homeostase do cálcio (RINGOT et al., 2006).

Foi demonstrado que a OTA é responsável pela quelação dos íons Fe^{3+} presentes no citocromo P450 (CP450), facilitando a sua redução na presença do sistema NADPH-CP450 redutase (Figura 4). Desta forma, aumenta a produção de íons Fe^{2+} que, na presença de oxigênio, formam radicais livres (GUENGERICH, 2008).

Figura 4- Ciclo de reações do citocromo P450 e envolvimento da OTA na formação de radicais livres



Fonte: GUENGERICH (2008)

Esta produção está envolvida no dano de macromoléculas, incluindo peroxidação lipídica e lesão do DNA, podendo levar ao câncer. Além disso, o envolvimento da OTA no estresse oxidativo explicaria a redução de defesas celulares que se tornam incapazes de combater os oxidantes produzidos pelo metabolismo normal (OMAR et al., 1990; SCHILTER et al., 2005).

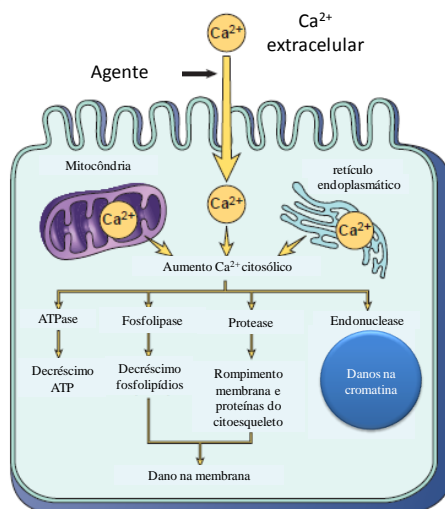
Estão disponíveis relatos de dano ocasionado por radicais livres produzidos pela OTA em células *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, um aumento na formação de malonaldeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica conhecido por reagir com guanina formando adutos de DNA, foi observado em ratos tratados oralmente com 120 mg.kg^{massacorpórea}⁻¹.dia⁻¹ de OTA durante 60 dias (PETRIK et al., 2003). Além disso, em culturas de células, o aumento de danos no DNA, tais como a formação de 8-oxoguanina, foi correlacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela OTA (ARBILLAGA et al., 2007; KAMP et al., 2005).

Khan et al. (1989) demonstraram que o aumento da peroxidação lipídica pela OTA afeta a permeabilidade da membrana plasmática para o Ca²⁺, prejudicando a homeostase do cálcio: aumentando o influxo de Ca²⁺, causando a liberação das reservas internas, e influenciando sobre os canais de cálcio.

O teor de cálcio citosólico livre é normalmente mantido por transportadores de cálcio dependentes de ATP em concentrações aproximadamente 10.000 vezes menor do que a concentração de cálcio extracelular ou da concentração de Ca²⁺ intracelular pelo sequestro da mitocôndria e do retículo endoplasmático (RE) (KUMAR et al., 2005). Além disso, de acordo com Hoelher et al. (1997), a acumulação intracelular de Ca²⁺ é um passo comum no desenvolvimento da citotoxicidade de OTA, pois as alterações dos mecanismos regulados por Ca²⁺ são os primeiros nas etapas de desenvolvimento da lesão celular.

De acordo com Kumar et al. (2005) isquemia e certas toxinas causam um aumento na concentração de cálcio citosólico, inicialmente devido à liberação de Ca²⁺ a partir das reservas internas e posteriormente pelo aumento do fluxo através da membrana plasmática. Este aumento de Ca²⁺ citosólico ativa enzimas, como por exemplo: fosfolipases, que causam danos na membrana; proteases, que hidrolisam as proteínas da membrana e do citoesqueleto; endonucleases, que são responsáveis pela fragmentação de DNA e cromatina e adenosina trifosfatase (ATPases) que aceleram a depleção de ATP (Figura 5).

Figura 5- Fontes e conseqüências do aumento do cálcio citosólico na lesão celular. ATP: adenosina trifosfato; ATPase: adenosinatrifosfatases



Fonte: KUMAR et al. (2005)

Em estudo realizado por Dopp et al. (1999) em fibroblastos embrionários de *hamster* sírio foi verificado que a OTA induziu um aumento do conteúdo de Ca^{2+} intracelular como um resultado da liberação das reservas internas, devido ao dano da membrana celular, com conseqüente aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular. O aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular também foi observado por Benesic, Mildenberger e Gekle (2000) em células imortalizadas epiteliais de rim humano (IHKE-1), bem como o aumento do conteúdo de Ca^{2+} intracelular em células de rim de macaco-verde africano tratadas com OTA (RAMYAA; PADMA, 2013).

Adicionalmente, o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular também pode resultar na indução de apoptose, por ativação direta de caspases e pelo aumento da permeabilidade mitocondrial (KUMAR et al., 2005)

A disfunção mitocondrial é considerada um evento precoce durante a toxicidade causada pela presença da OTA (ALEO et al., 1991). A despolarização da membrana, correlacionada com a depleção de ATP, tem sido considerada uma conseqüência da inibição do transporte de fosfato intramitocondrial inibindo competitivamente proteínas transportadoras situadas na membrana mitocondrial interna e/ou atuando diretamente sobre a cadeia de transporte de elétrons (ALEO et al., 1991; MEISNER; CHAN, 1974). Em células de rim embrionárias humanas (HEK 293) foi registrada uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial (YANG et al., 2014) e em hepatócitos humanos HepG2 (BENNOUR et al., 2009), atribuídos a presença de OTA.

Alterações celulares provocadas por OTA podem causar a morte das células, por necrose ou apoptose. Quando a lesão das membranas é grave, enzimas provenientes dos lisossomas migram para o citoplasma e digerem a célula, resultando em necrose celular. Quando esta é privada de fatores de crescimento ou DNA ou proteínas, é irreversivelmente danificada resultando em apoptose, morte celular programada de uma célula, caracterizada por dissolução nuclear sem perda completa da integridade da membrana (KUMAR et al., 2005).

A necrose é a principal via de morte celular por muitas lesões, tais como as que resultam da isquemia, exposição a toxinas, várias infecções e trauma. No entanto, a mesma toxina pode induzir a apoptose ou necrose. A indução da apoptose por OTA foi encontrada em células primárias de hepatócitos de rato (CHOPRA et al., 2010), linfócitos humanos (ASSAF; AZOURI; PALLARDY., 2004) e em hepatócitos humanos (BENNOUR et al., 2009); enquanto que a indução da necrose foi verificada em células renais humanas (MULLER et al., 2003) e células de carcinoma hepatocelular humano (BOUAZIZ et al., 2008).

3.2.2 Métodos analíticos para detecção de OTA

A frequente ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações e sua relação com patologias constituem uma preocupação global, fazendo com que estes contaminantes estejam incluídos em programas de monitoramento para minimizar os seus níveis em produtos contaminados. Por essa razão, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a identificação e quantificação confiável, bem como a detecção a baixo nível de concentração são necessários (FRENICH et al., 2011).

Em geral, amostras de alimentos não podem ser analisadas sem preparação de amostra preliminar pelo fato dos contaminantes estarem muito diluídos na matriz. Métodos de extração e limpeza são etapas críticas nos protocolos analíticos, pois eles determinam a adequacidade, recuperação e os limites de detecção desses procedimentos (HAYAT et al., 2012).

As micotoxinas são extraídas usando misturas de solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetato de etila, acetona, clorofórmio e diclorometano sob agitação (BETINA, 1985). Nesta etapa ocorre a separação da micotoxina de interesse dos demais componentes da amostra por solubilização com um solvente adequado (KAWASHIMA, 2004). Entre os métodos utilizados para extração de micotoxinas um vem ganhando

interesse por diminuir o uso de solventes e reagentes, o método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Este método consiste numa extração com acetonitrila acidificada seguida por uma partição líquido-líquido após a adição de sais (ANASTASSIADES et al., 2003).

Com relação aos métodos de limpeza, destacam-se a utilização de SPE (extração em fase sólida), SMPE (microextração em fase sólida) e IAC (colunas de imunoafinidade). SPE consiste na passagem de amostras aquosas por um adsorvente em uma coluna. Posteriormente o analito (OTA) é eluído do meio sólido com um solvente apropriado seguindo-se uma etapa de lavagem para remover interferentes. Fica evidente que nesse método a seleção do adsorvente é crítica e na maioria das vezes é empregado o C-18 com superfície modificada com sílica (HAYAT et al., 2012). SPME é uma técnica que utiliza uma fibra de sílica fundida revestida no lado de fora com uma fase estacionária apropriada, sendo o analito na amostra extraído diretamente do revestimento da fibra (KATAOKA; LORD; PAWLISZYN, 2000). De acordo com Hayat et al. (2012) o método de IAC é o mais eficiente para limpeza de matrizes complexas, como café, cerveja, vinho e que podem ser diretamente carregados em uma coluna IAC. Todos os compostos, exceto o analito são lavados com água ou um tampão aquoso, ocorrendo na sequência a eluição da toxina com metanol ou tampão de metanol. Para amostras sólidas, a etapa de purificação pode ser precedida por uma etapa de extração com solvente. Muitas colunas comerciais de imunoafinidade tem sido desenvolvidos para extração e posterior determinação de OTA (FABIANI; CORZANI; ARFELLI, 2010; HEURICH; KADIR; TOTHILL, 2011; MIKULÍKOVÁ et al., 2012; VECCHIO; MINEO; PLANETA, 2012;).

As técnicas mais utilizadas para separação de micotoxinas são basicamente cromatográficas como camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (CLAE) e gasosa (CG), além de imunoensaios. Para a detecção de ocratoxina, tem sido utilizado cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (FL), sensíveis e mais específicos para este tipo de composto. Esse sistema acoplado a espectrômetro de massas também tem sido empregado para esta micotoxina, pois proporciona resultados com alta precisão e confiabilidade (SAITO; IKEUCHI; KATOKA, 2012).

Colunas de fase reversa têm sido quase exclusivamente adotadas para a separação cromatográfica de OTA e entre os eluentes mais utilizados destacam-se acetonitrila, água e ácido acético (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002; ABRUNHOSA; VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2011; KUMAR et al., 2012; ; PAÍGA et al., 2012; PÉTERI et al., 2007; VARGA et al., 2005).

No Quadro 1 estão descritos alguns métodos utilizadas para determinação de OTA em diferentes matrizes alimentícias.

Quadro 1- Métodos de determinação de OTA

Matriz	Extração	Quantificação	Referência
Pão	QuEChERS	CLAE- FL	Paíga et al. (2012)
Vinho	Coluna Imunoafinidade	CLAE-FL	Mikulíková et al. (2012)
Café	Coluna Imunoafinidade	CLAE-FL	Vecchio, Mineo e Planeta (2012)
Farinho trigo Café Produto cereal	SPE	CLAE-FL	Wu et al. (2011a)
Nozes e grãos	SPME	CLAE-MS	Saito, Ikeuchi e Katoka (2012)
Ovos	QuEChERS	CLAE-MS/MS	Frenich et al. 2011

3.3 INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA EM ALIMENTOS

A OTA tem sido extensivamente encontrada como contaminante de uma ampla faixa de produtos, incluindo cereais (GONZALES et al., 2006) e seus derivados (DUARTE et al., 2010a; ZINEDINE et al., 2010), vinho (MURILLO-ARBIZU et al., 2010), café (VECCHIO; MINEO; PLANETA, 2012), cerveja (REINSCH et al., 2007), cacau (COPETTI et al., 2013), carne (DALL'ASTA et al., 2010) e temperos (FAZEKAS; TAR; KOVÁCS, 2005; OZBEY; KABAK, 2012). Estes produtos correspondem a aproximadamente 87% da exposição humana (DUARTE; PENA; LINO, 2009).

A ocorrência de OTA em cerveja resulta da utilização de malte e cereais contaminados para a elaboração do produto, e o armazenamento das matérias-primas possivelmente seja a etapa crítica para a produção de OTA. Mateo et al. (2007) realizaram um estudo onde a presença de ocratoxina foi relacionada a presença de fungos ocratoxigênicos na cevada e ou em seus adjuntos.

Em carnes, a ocorrência de OTA decorre da ingestão de rações contaminadas. A micotoxina, após absorção, é distribuída pelo sangue até o músculo e o rim (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006). No trabalho realizado por Dall'Asta et al. (2010) com presunto inteiro foi verificada uma concentração mais elevada na superfície devido ao crescimento de fungos, enquanto que a OTA ingerida pelo animal pouco influenciou nas concentrações no músculo e portanto no interior das peças de presunto a concentração de OTA foi menor.

Copetti et al. (2013) avaliaram 168 amostras de subprodutos de cacau e observaram presença de OTA em 158 amostras (94%). De acordo com os autores, manteiga de cacau foi o produto que apresentou menor contaminação ($0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$), em contraste com o encontrado no bolo de cacau ($0,97 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Esta observação sugere que, durante a etapa de prensagem hidráulica, a maioria da toxina permanece aderida à fração de cacau desengordurado.

Apesar da grande variedade de produtos passíveis de contaminação, os cereais demonstram ser a mais importante fonte dietética desta micotoxina, contribuindo com cerca de 50% da exposição (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

3.3.1 Ocratoxina em cereais e derivados

Os cereais têm sido utilizados em uma ampla variedade de alimentos, incluindo a utilização de diferentes métodos de processamento tecnológico, industrial ou domésticos/tradicional. O pão é um dos mais importantes produtos, especialmente se for feito com trigo, centeio e milho. Outros usos comuns de cereais são na produção de cereal matinal, assim como em produtos de panificação e na preparação de bebidas alcoólicas, como whisky e cerveja (cevada, sorgo, centeio), vodka (trigo), bourbon americano (centeio) e saquê japonês (arroz) (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

É especialmente nos países de clima quente e úmido (em particular os países da África do Sul, sul da Ásia e América do Sul) que o crescimento de fungos filamentosos toxigênicos é mais favorecido. Assim, arroz, milho e milheto, os alimentos básicos das populações desses países, estão muitas vezes contaminados principalmente por aflatoxinas e ocratoxinas (KHOURY; ATOUI, 2010). Devido a termoestabilidade da OTA, o processamento ou preparo domésticos não contribuem muito para diminuir o percentual de exposição pela dieta (50%) (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

A produção e ocorrência de OTA em grãos de cereais são dependentes, em primeiro lugar, da condição dos grãos no momento da colheita, do cuidado com que o grão é seco e a qualidade das instalações de armazenamento. Por exemplo, o arroz, uma das culturas mais importantes em todo o mundo, é uma planta aquática e normalmente é colhida em níveis de umidade muito elevados, entre 35 e 50% (ZINEDINE et al., 2007). Como resultado, fungos produtores de micotoxinas ou esporos podem contaminar culturas de arroz no campo e na colheita. Grãos infectados podem posteriormente contaminar os produtos já no armazenamento e OTA será produzida, se as condições ambientais forem favoráveis (PENA et al., 2005). Embora seja impossível eliminar completamente todas as fontes de infecção fúngica, é possível minimizar ou mesmo evitar algumas condições favoráveis ao crescimento de fungos. Em termos simples, o cereal deve ser seco abaixo de 15% de umidade (a_w 0,8) e mantidos a este nível durante o armazenamento (SCUDAMORE, 2005).

Albroch et al. (2012) avaliaram a co-ocorrência de aflatoxinas, citrinina, zearalenona e OTA em farinhas de trigo e milhos de pipoca destinados ao consumo humano e comercializados na Espanha. Entre as micotoxinas avaliadas, nas 30 amostras de farinha de trigo e milho de pipoca, OTA estava presente em 13% e 33%, enquanto as aflatoxinas foram detectadas em 46% e 6%, respectivamente, indicando que estas matrizes promovem risco para a saúde da população. Kumar et al. (2012) estudaram a ocorrência natural de OTA em farinhas de trigo na Índia e verificaram que 58% das amostras apresentavam contaminação, das quais 26% excederam o nível máximo permitido pela União Européia ($5 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Juan et al. (2008) avaliaram a ocorrência de OTA em cereais, orgânicos e convencionais, e em derivados de cereais da Espanha e de Portugal. Das amostras contaminadas, 72% corresponderam a cereais cultivados no sistema orgânico e 28% no convencional e entre as 18 amostras contaminadas, 6 apresentaram teores acima do máximo tolerável pela União Européia. Comportamento semelhante foi encontrado por Gonzáles et al. (2006), com contaminação superior em arroz orgânico (30%) em relação ao não-orgânico (7,8%).

A alta incidência de OTA em cereais reforça a necessidade de soluções para prevenir a ingestão humana desta micotoxina em alimentos e a necessidade de utilizar boas práticas para o cultivo, colheita, transporte, etapas de processamento e armazenamento de cereais para minimizar a concentração final de OTA nos grãos e derivados.

3.4 LEGISLAÇÃO

A ocorrência de OTA em uma variedade de produtos alimentares demonstra a exposição humana a esta micotoxina. Diversos países tem adotado regulamentação adequada de forma a estabelecer barreiras à comercialização de produtos contaminados com OTA acima de certos valores.

No Brasil está disponível a RDC nº 7, proposta pela ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) onde estão apresentados os limites máximos toleráveis (LMT) para diferentes micotoxinas em variados produtos alimentícios (ANVISA, 2012), dispostos na Tabela 3.

A ANVISA prorrogou para 1º de janeiro de 2017 o prazo para adequação dos limites estabelecidos pela RDC nº7, sendo esta descrita na Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União de 30 de dezembro de 2013 (ANVISA, 2013).

A implementação dessa legislação obriga os agentes econômicos a controlar a presença de certas micotoxinas em alguns alimentos e impedir a comercialização dos produtos contaminados com valores acima dos regulamentados, induzindo à busca de técnicas para diminuição desses teores aos estes níveis aceitáveis.

Tabela 3- Limites máximos toleráveis (LMT) para ocratoxina A

2011		2014	
Alimento	LMT ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Alimento	LMT ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
<i>Capsicum spp., Piper spp.</i>		Cereais para posterior	20,0
<i>Myristica fragrans, Zingiber officinale, Curcuma longa</i>	30,0	processamento, incluindo	
Alimentos a base de cereais para		grão de cevada	
alimentação infantil	2,0		
Produtos de cacau e chocolate	5,0		
Amêndoa de cacau	10,0		
Frutas secas e desidratadas	10,0		

Fonte: ANVISA (2011)

3.5 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA OCORRÊNCIA DE OTA E DESCONTAMINAÇÃO

Devido à toxicidade de OTA e tendo em vista assegurar a saúde humana e animal, esta micotoxina não deve estar presente em alimentos ou rações, pelo menos acima do máximo permitido pela legislação (AMÉZQUETA et al., 2009). A prevenção do crescimento de microrganismos produtores de OTA é a estratégia mais efetiva para controlar a entrada desta micotoxina na cadeia de alimentos e ração (PONSONE et al., 2011).

As medidas preventivas podem ser aplicadas no campo (estratégias pré-colheita) ou depois da colheita ter sido efetuada (estratégias pós-colheita). As medidas pré-colheita visam evitar a formação das micotoxinas através, por exemplo, da simples implementação de boas práticas agrícolas, da utilização de variedades resistentes a fungos micotoxigênicos ou de plantas geneticamente modificadas e aplicação de compostos antifúngicos. As medidas pós-colheita visam evitar a formação da micotoxina através, essencialmente, do correto armazenamento dos produtos agrícolas (MAGAN; ALFRED, 2007).

Apesar das medidas preventivas serem, idealmente, adequadas para controlar a presença de micotoxinas em alimentos, é frequente a existência de produtos agrícolas contaminados nos mercados mundiais (JUAN et al., 2008; ZINEDINE et al., 2007). Quando as micotoxinas estão presentes, certos processos de descontaminação ou de detoxificação podem ser aplicados de forma a remover ou reduzir os seus níveis a valores aceitáveis. Estas medidas podem ser divididas em métodos físicos, químicos ou biológicos.

As medidas mais adequadas devem cumprir alguns requisitos, como destruir, remover ou detoxificar efetivamente as micotoxinas, não dar origem a resíduos tóxicos que possam permanecer nos alimentos, não alterar as propriedades nutritivas dos alimentos e ser técnica e economicamente viáveis (AMÉZQUETA et al., 2009; QUINTELA et al., 2013). Na Tabela 4 estão resumidos alguns métodos de detoxificação de OTA e seu efeito nesta micotoxina.

Tabela 4- Métodos de detoxificação de ocratoxina A

Micotoxina	Agente descontaminante	Efeito
OTA	Peróxido de hidrogênio com aquecimento	Destruição
OTA	Tratamento alcalino (concentrado)	Destruição
OTA	Solução de amônia 2%	Redução
OTA	Aquecimento	Redução

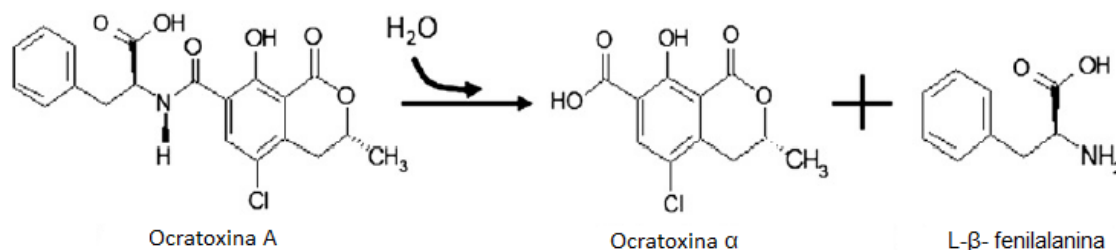
Fonte: GARDA; BADIALE-FURLONG (2003)

A degradação por métodos químicos compreende a utilização de reações químicas para a diminuição da concentração de micotoxinas. Entre os principais produtos químicos utilizados na remoção, redução e degradação de micotoxinas estão compostos como peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, amônia e de cálcio, acetato de etila, diclorometano, ácidos fórmico e clorídrico, cloro, bissulfito e carbonato de sódio, formaldeído e ozônio (AMÉZQUETA et al., 2009). Amézqueta et al. (2008) demonstraram que mais de 98% da OTA presente no cacau poderia ser eliminada por tratamento alcalino. No entanto, estas estratégias levam a uma perda significativa no valor nutritivo e na palatabilidade dos produtos descontaminados (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006).

O método físico está focado na remoção das micotoxinas por diferentes adsorventes, lavagem, irradiação com raios gama, além do emprego de aquecimento (SEKIYAMA; FERRARI; JUNIOR, 2007). Cacciamani et al. (2007) avaliaram a degradação física de OTA através de calor seco e úmido e constataram uma redução nos teores desta micotoxina abaixo dos limites de detecção.

Dentro os métodos físicos e biológicos encontrados para descontaminação de OTA, o último vem apresentando destaque em pesquisas por serem necessárias condições brandas de reação e pela diminuição da possibilidade de produção de derivados mais tóxicos.

Entre os métodos biológicos destacam-se os processos fermentativos, onde são empregados microrganismos não toxigênicos para descontaminação. O principal caminho pelo qual os microrganismos podem descontaminar OTA envolve a hidrólise da ligação amida que une a OT α à molécula de fenilalanina. Esta reação é mediada por proteases intra ou extracelulares que são produzidas por diferentes microrganismos e apresentam diferentes atividades de enzimas hidrolíticas de OTA (Figura 6) (ABRUNHOSA; VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2011).

Figura 6- Via enzimática de descontaminação de ocratoxina A

Fonte: ABRUNHOSA; VENÂNCIO; TEIXEIRA (2011).

Stander et al. (2001) avaliaram a hidrólise de OTA e seus derivados por carboxipeptidase A e confirmaram a capacidade hidrolítica desta enzima. Além disso, Pitout (1969) estudou diferentes substratos sintéticos para determinar a atividade de carboxipeptidase A e constatou que dentre estes, a OTA constitui o substrato mais indicado devido ao baixo valor de K_M encontrado, sugerindo a utilização desta enzima nos estudos para descontaminação enzimática de OTA.

A carboxipeptidase A (peptidil-L- aminoácido hidrolase) é uma exopeptidase produzida no pâncreas de animais superiores e apresenta no centro ativo Zn, essencial para sua atividade catalítica (WHITAKER, 1994). Os processos fermentativos suplementam a utilização de enzimas vegetais e animais devido à rápida produção e maior controle de processo. Particularmente, para produção de enzimas o processo de fermentação em estado sólido (FES) apresenta algumas vantagens com relação ao estado submerso (FSM) como maior produtividade, maior estabilidade enzimática e baixa demanda energética (SINGHANIA et al., 2010).

Processos de fermentação em estado sólido são geralmente mais simples e podem utilizar os resíduos agro-industriais como substratos para produção de enzima, tais como soja desengordurada, farelo de trigo, farelo de arroz, descartes de banana e outras porções não comestíveis de vegetais (UYAR; BAYSAL, 2004). No entanto, em escala industrial o processo de fermentação submersa é mais empregado por sua facilidade de controle e menor número de etapas para a recuperação enzimática.

Entre os microrganismos utilizados para FES destacam-se os fungos filamentosos, devido a sua capacidade de crescimento na forma de hifas que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas, sendo estes os mais adaptáveis aos processos fermentativos (GRAMINHA et al., 2008). Usando FES há relatos da produção de enzima proteolítica pelo microrganismo *Rhizopus oryzae* (AIKAT; BHATTACHARYYA, 2000; KUMAR et

al., 2005), enquanto que em processos de FSM destaca-se a produção por *Trichoderma reesei* (DIENES et al., 2007; HAAB et al., 1990).

De acordo com Amézqueta et al. (2012), as enzimas produzidas podem ser isoladas e empregadas para descontaminação de OTA ou a presença da micotoxina nos processos fermentativos pode induzir a produção enzimática e, conseqüentemente, causar a descontaminação dos substratos utilizados. Com relação à utilização da enzima como agente descontaminante a estabilidade é um dos aspectos característicos que pode afetar a eficiência da descontaminação, tornando-se necessário a busca de técnicas para o aumento da mesma, como por exemplo, a imobilização em suportes.

Em comparação às enzimas livres, as imobilizadas são mais resistentes às mudanças ambientais. Além disso, a heterogeneidade dos sistemas de enzima imobilizada permite fácil recuperação, múltipla reutilização, operação contínua dos processos enzimáticos, diminuição do tempo de reação e maior variedade de modelos de biorreatores (TAKIMOTO et al., 2008). Para carboxipeptidase estudos de imobilização em suportes de agarose já foram relatados, confirmando as vantagens descritas anteriormente (PEDROCHE et al., 2002).

A produção enzimática e descontaminação simultânea de OTA foi encontrada para a levedura *Phaffia rhodozyma*, com 90% de descontaminação (PÉTERI et al., 2007). Além disso, cepas de diferentes microrganismos apresentaram altos teores de descontaminação de OTA, em torno de 80% por fungos isolados de uvas (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002) e 95% por isolados de *Rhizopus* (VARGA et al., 2005). Esta capacidade descontaminante encontrada pelos autores foi atribuída à produção de carboxipeptidase, enzima capaz de hidrolisar a micotoxina OTA a OT α , conforme relatado na Figura 4.

Apesar de ser conhecido o caminho da descontaminação da OTA por via enzimática, não são conhecidos os efeitos destes compostos gerados no organismo humano. Para elucidar a eficiência dos processos de descontaminação tem se buscado métodos de avaliação toxicológica, principalmente modelos celulares, para assegurar que os metabolitos produzidos durante a biodegradação não apresentem efeitos nocivos.

CAPÍTULO III

ARTIGO 1. VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
OCRATOXINA A E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO POR FARINHA DE
TRIGO

Publicado: Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. *Food Chemistry*, 177 (2015) 354–360.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma abordagem inovadora para avaliar os efeitos da composição de cereais na extração de ocratoxina A por análise multivariada e aplicar o método validado para estimativa de risco de exposição à ocratoxina A pelo consumo de farinhas de trigo. A análise de componentes principais (ACP) foi aplicada para comprovar o efeito de componentes majoritários da matriz na recuperação de ocratoxina A pelo método QuEChERS em CCD e CLAE e para validar o método para determinação de ocratoxina A em farinhas por CLAE. As matrizes utilizadas, farelo de arroz, de trigo e farinha de trigo foram caracterizadas físico-quimicamente. A recuperação de OTA nessas matrizes foi altamente influenciada ($R=0,99$) pelo conteúdo de açúcares presente nas matrizes, tendo como menor interferente o conteúdo lipídico ($R=0,29$). A partir desses resultados, o método QuEChERS foi padronizado para extração de OTA utilizando ACN 1%:água (7:3) como solvente extrator e como sais, sulfato de magnésio seco e cloreto de sódio. Os valores de recuperação variaram de 97,6 a 105%. O método validado permitiu a avaliação da ocorrência natural de 20 amostras de farinha de trigo, estando estas contaminadas na faixa de 0,22 a 0,85 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, apresentando um valor de ingestão diária de 0,08 $\text{ng}_{\text{OTA}}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1}$ e uma disponibilização de 94,4%.

Palavras-chave: ACP, ocratoxina, QuEChERS, farinha de trigo, validação, risco de exposição.

1. INTRODUÇÃO

A determinação de contaminantes traços em matrizes complexas, como alimentos, muitas vezes requer extensa extração e preparação antes da análise instrumental. Nos últimos anos, pesquisadores têm procurado métodos analíticos que permitem a identificação, a quantificação e detecção de maneira confiável e de baixo custo. O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que consiste na extração inicial com acetonitrila, seguida de partição após a adição de sais e uma etapa de limpeza (ANASTASSIADES et al., 2003) tem sido amplamente explorado. Este método tem atraído a atenção pela minimização da utilização de solventes, menor tempo de análise e elevada recuperação de diferentes analitos, incluindo isoflavonas (BUSTAMANTE-RANGEL et al., 2013), herbicidas (LI et al., 2013; MEI; DU; CEN, 2011), pesticidas (TOMASINI et al., 2012) e micotoxinas de diferentes matrizes (FRENICH et al., 2011;

HACKBART et al., 2012; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; PAÍGA et al., 2012;).

Dentre as micotoxinas, destaca-se a ocratoxina A (OTA) que é produzida principalmente por diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* durante o armazenamento, e é encontrada em vários produtos em diferentes níveis. Considerando os efeitos nocivos da ingestão desta toxina e que a contaminação pela OTA é frequente, foram estabelecidos limites máximos toleráveis para as diferentes matrizes alimentícias, assim como limites de ingestão diária (EC, 2006a). Além disso, os consumidores estão cada vez mais conscientizados sobre a importância de ingerir alimentos seguros e que só pode ser alcançado se forem utilizados métodos mais sensíveis e confiáveis para identificação dos diferentes compostos tóxicos (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

O método QuEChERS foi empregado para a extração de ocratoxina A de diferentes matrizes, incluindo o pão (PAÍGA et al., 2012), vinho (FERNANDES; BARROS; CÂMARA, 2013), pipoca (FERREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2012), farelo de arroz (HACKBART et al., 2012), ração e misturas de cereais (LLORENT-MARTINEZ; ORTEGA-BARRALES; CORDOVA, 2013), seguido por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) ou imunoenaios. OTA é geralmente determinada por CLAE equipada com um detector de fluorescência (FL) que é uma técnica sensível e proporciona resultados mais precisos (SAITO; IKEUCHI; KATOKA, 2012).

As características inerentes de cada matriz empregada para extração pelo método de QuEChERS podem contribuir positiva ou negativamente para recuperação da micotoxina do meio devido ao efeito de supressão de alguns compostos na fluorescência do analito. Sendo assim, o emprego de técnicas multivariadas como a análise de componentes principais (ACP) é interessante quando se precisa adequar a extração de uma micotoxina em matrizes distintas. Esta análise está relacionada com a explicação da estrutura de covariância por meio de poucas combinações lineares das variáveis originais em estudo e ainda propicia a inferência da especialidade de condições de extração de um componente presente em matrizes distintas (SILVA et al., 2006). Não está relatado na literatura estudos quanto ao uso de ACP para elucidar interferências durante a extração de analitos do tipo micotoxinas. Este método de análise estatística torna-se uma alternativa interessante para o uso de planejamento experimental, pois é através da análise multivariada que se pode compreender matematicamente as principais alterações nos

dados, entendendo o que acontece nos resultados e quais os fatores devem ser manipulados para observar a melhora nos resultados.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos principais componentes de cereais (farelo de arroz, farelo de trigo e farinha de trigo) na extração de OTA por meio de análise multivariada, validar o método de QuEChERS para a determinação de OTA em cereais por diferentes procedimentos cromatográficos e empregá-lo na estimativa do risco de exposição à OTA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Acetonitrila (ACN) foi adquirida da Baker e o ácido acético da Merck. Água foi purificada em um sistema de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) usando membrana filtrante com diâmetro de poro de 0,45 μm . ACN e água Milli-Q foram desgaseificadas em banho ultrassônico a temperatura ambiente durante 30 minutos para serem usadas como fase móvel na etapa cromatográfica. O padrão de ocratoxina A com 98-99% de pureza foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e uma solução trabalho contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da micotoxina foi preparada em benzeno:ácido acético (99:1).

As amostras de farelo de trigo e farinha de trigo tipo I foram obtidas no comércio local, enquanto que o farelo de arroz engordurado foi fornecido por uma empresa beneficiadora da região de Pelotas/RS. Estas foram homogeneizadas e a granulometria foi padronizada a 0,5 mm passante para realização das determinações.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Caracterização físico-química

Os conteúdos protéicos e lipídicos das amostras foram determinados de acordo com métodos da AOAC (2000). O teor de açúcares redutores e totais foi determinado usando a redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

2.2.2 Método de QuEChERS para extração de OTA

A extração da micotoxina do farelo de arroz (FA), farelo de trigo (FT) e farinha de trigo (FAT) foi realizada conforme o método de QuEChERS adaptado por Hackbart et al. (2012). Para isso a 10 g de amostra foram adicionados 20 mL de água e 20 mL ACN acidificada a 1% com ácido acético. A homogeneização da amostra e da mistura extratora foi realizada em mesa agitadora orbital durante 10 minutos a 200 rpm seguido de adição de 1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio, com nova agitação durante 10 minutos a 200 rpm. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 3220 g e ao sobrenadante foram adicionados 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de celite, seguido de agitação em vortex durante 1 minuto e centrifugação durante 15 minutos a 3220 g. O sobrenadante foi seco a 60 °C e ressuspensão em 200 µL de benzeno para a determinação em cromatografia de camada delgada (CCD) e 1000 µL de fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A recuperação do método foi realizada fortificando amostras de farelo de arroz, trigo e farinha de trigo com 1 µg.g⁻¹ de OTA.

A validação de extração de OTA na farinha de trigo seguiu o método descrito por Paíga et al. (2012). Este consistiu em pesar 5 g de amostra e fortificar com 5 ng.g⁻¹ de OTA, adicionar 15 mL de ACN e a mistura de sais (12,3g MgSO₄, 1,5g NaCl, 2,1g de citrato sódio diidratado). A amostra e a mistura extratora foram homogeneizadas em vortex durante 5 minutos e centrifugadas a 3220 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi seco a 60 °C e ressuspensão em 1000 µL de fase móvel para análise em CLAE.

Neste trabalho foram avaliados os seguintes solventes extratores: ACN, ACN acidificada 1% com ácido acético e ACN:Metanol (1:1). A partir destes resultados, a adição de água (0 a 30%), o tempo de extração (5 e 10 minutos) e a mistura de sais, sendo estes sal A (12,3 g MgSO₄.7H₂O + 1,5 g acetato de sódio); sal B (8,18 g MgSO₄.7H₂O + 1g NaCl); sal C- (12,3 g MgSO₄.7H₂O+ 1,5 g NaCl + 2,1 g citrato sódio diidratado); sal D (4 g MgSO₄ seco + 1 g NaCl); sal E (4 g MgSO₄ seco); sal F (8,18 g MgSO₄.7H₂O), foram avaliadas. Estas variáveis foram escolhidas, pois constituem os pontos críticos durante recuperação do analito de interesse.

Para avaliar o efeito da matriz na determinação de OTA, foi realizada uma curva na matriz, adicionando-se as concentrações de OTA de 0,1 a 20 ng.mL⁻¹ a amostra relativa ao branco do melhor método de extração. O efeito de matriz foi calculado, conforme descrito na Equação 1 (MATUSZEWSKI et al., 2003) :

Onde:

B- Área da amostra fortificada.

A- Área do padrão.

A exatidão (recuperação) foi realizada utilizando extrato não fortificado do método de extração padronizado adicionando solução padrão de ocratoxina A, em três níveis de concentração (3, 5 e 10 vezes o LQ), em triplicata. Amostras fortificadas e não fortificadas foram deixadas em repouso durante 24 horas antes da extração, protegido da luz.

Para o estudo da repetibilidade foi realizada a extração pelo método de QuEChERS, adaptado neste trabalho em diferentes níveis de fortificação, em triplicata, e cada nível foi injetado três vezes. A partir das nove determinações foi calculado o CV (%).

2.2.3 Análise cromatográfica de OTA nos extratos

2.2.3.1 CCD

A eluição cromatográfica foi realizada em camada delgada de alto desempenho DC-Fertgfolien Alugram Xtra Sil G, tendo como fase móvel hexano, acetato de etila e ácido acético (18:4:1,5 v/v/v) (LIN et al., 1998). Após a eluição, os pontos foram revelados com solução de cloreto de alumínio 15% em metanol, e as foram secas a 130 °C durante 5 minutos. As manchas características da micotoxina foram observadas sob luz UV de alta intensidade de ondas curtas e longas (254 nm e 326 nm).

A quantificação de OTA nas amostras foi realizada pela análise da imagem fotográfica obtida em câmera digital 16 mega pixels, usando o programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A curva padrão de ocratoxina A foi avaliada com massa variando de 30; 50; 100; 150; 200; 250 e 300 ng. O limite de detecção (LD) foi determinado como o menor valor de fluorescência perceptível. O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir do valor mais baixo de massa medido com precisão.

2.2.3.2 CLAE

Os extratos secos foram ressuspensos em 1 mL da mistura de solventes que compõe a fase móvel (50% de Acetonitrila e 50% de água Milli-Q acidificada com ácido acético 1%) (KUMAR et al., 2012) e injetados no sistema cromatográfico. A corrida foi realizada em equipamento composto por uma bomba LC-10 AT, um desgaseificador DGU, um controlador CBM-20A, um detector de fluorescência SPD-20A, um software LC Solution-Shimadzu e uma coluna Kromasil C18 5 μ m 150 x 4,6 mm, com injetor manual de 20 μ L. A eluição cromatográfica foi realizada à 35 °C, com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ com detector de fluorescência (FL) nos comprimentos de onda de excitação e de emissão em 333 nm e 460 nm, respectivamente. As condições de temperatura e vazão foram estabelecidas neste trabalho, obtendo-se um tempo de retenção de 7,1 minutos para OTA em tempo total de 10 minutos.

A curva analítica foi construída através de solução do padrão de OTA, diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel, em concentrações crescentes (0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50 ng.mL⁻¹) em triplicata. Com isso, foram determinados a faixa de linearidade, os coeficientes de determinação e correlação e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Na determinação de LD e LQ foram realizadas injeções das soluções de OTA diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações decrescentes até obtenção de uma relação de 3:1 e 10:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

2.2.4 Aplicação do método de QuEChERS em farinhas de trigo e estimativa do risco de exposição

Para assegurar a aplicabilidade do método independentemente da variabilidade natural das amostras disponíveis no Sul do Brasil foram avaliadas diferentes marcas de farinha de trigo. Vinte amostras de farinhas de trigo de diferentes marcas foram coletadas em supermercados e cedidas por diferentes cooperativas. Para cada marca avaliada foram coletados 2 pacotes contendo 1 kg cada. Estas foram armazenadas à temperatura ambiente em sua embalagem original e no momento da análise, dois pacotes de cada marca foram misturados e as subamostras foram submetidas à extração de OTA usando o método validado.

A ingestão diária aceitável (IDA) representa a exposição humana admissível como resultado de ocorrência natural da substância em alimentos, sem danos à saúde do indivíduo. Para isso, os níveis estabelecidos por agências governamentais devem ser considerados. De acordo com o INMETRO, o consumo per capita de farinha de trigo é em torno de 53 kg por ano, ou seja, $0,15 \text{ kg.dia}^{-1}$ e para estimar o nível de ingestão diário de ocratoxina A por farinhas de trigo foi utilizada a Equação 2.

$$ID = \frac{[OTA].\text{Consumo}}{\text{Massa corpórea}} \quad (2)$$

Onde:

ID- ingestão diária

[OTA]- concentração média de micotoxina encontrada ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)

Consumo: consumo diário do produto (kg.dia^{-1})

Massa corpórea: Massa corpórea estimada para população (70 kg)

Para avaliar a exposição durante o consumo de farinhas de trigo contaminadas foi determinada a digestibilidade *in vitro* (SGARBIERI, 1996). Para isso, farinha de trigo isenta de contaminação foi fortificada com OTA (20 ng.g^{-1}), seguida de hidrólise com pepsina ($69 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$) a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas a 150 rpm. Após a ação da pepsina, o pH do meio foi ajustado para pH 7,0 com solução de NaOH 0,1M e foi realizada hidrólise com pancreatina ($61 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$) durante 24 horas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm. A mistura foi centrifugada durante 15 minutos a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 3220 g, sendo as frações digeridas (sobrenadante) e não digeridas (precipitado) utilizadas para determinação do teor de OTA, empregando o método validado.

2.2.5 Análise estatística

A estatística multivariada é uma técnica útil para identificar padrões comuns em conjuntos de dados multivariados. ACP é uma ferramenta para avaliação dos dados, que representa graficamente relações entre amostras e variáveis e fornece uma maneira de reduzir a dimensão dos dados. ACP foi realizado no software Past (folk.uio.no/ohammer/past), a fim de estabelecer as correlações entre os diferentes

componentes da matriz e a recuperação da OTA pelo método de QuEChERS (HACKBART et al., 2012) usando CCD e CLAE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

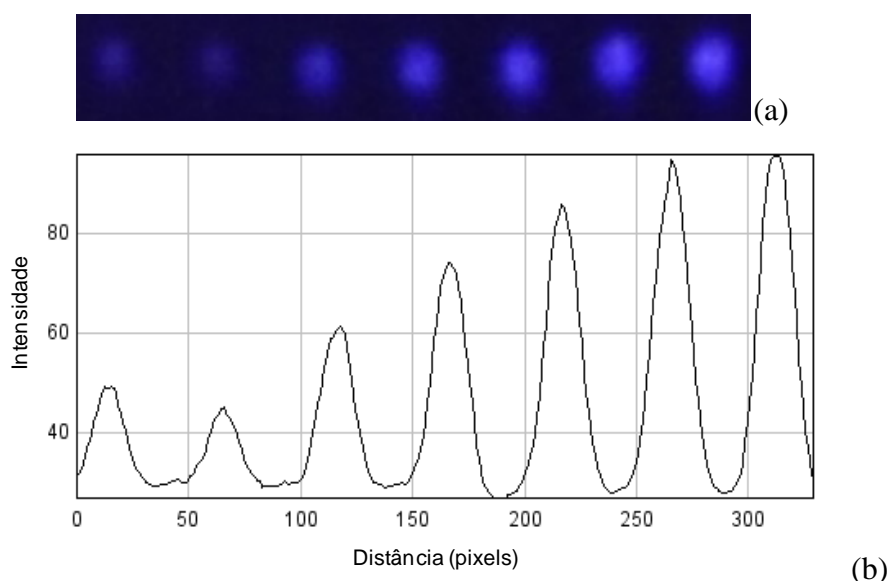
Duas técnicas foram utilizadas para determinação de ocratoxina A nos cereais, CCD e CLAE. Embora menos comum a técnica CCD junto com o software ImageJ não requer instrumentos analíticos caros, sendo acessível a laboratórios com infraestrutura simples. Adicionalmente, a imagem fotográfica diminui as percepções subjetivas. Apesar da técnica de CLAE permitir a detecção de níveis baixos de contaminação, ela exige infraestrutura mais sofisticada, resultando em custos mais elevados para análise (VALENTA, 1998).

Ambos os métodos seguem o mesmo princípio que é a eluição do composto pela fase móvel através de uma fase estacionária sólida, que é apolar em CLAE e moderadamente polar em CCD, diferindo no método de detecção da micotoxina.

Em CCD, após a eluição, as placas foram fotografadas em câmara de UV (366 nm) e a luminosidade foi determinada pelo software ImageJ. Em CLAE, a quantificação foi realizada por um detector de fluorescência nos comprimentos de onda de ocratoxina A ($\lambda_{\text{excitação}}$ 330 nm; $\lambda_{\text{emissão}}$ 460 nm), aumentando assim a sensibilidade do método (VALENTA, 1998).

Usando o software ImageJ foi gerado uma imagem do cromatograma resultante da eluição de diferentes massas de OTA em CCD (Figura 1).

Figura 1- (a) Imagem da placa cromatográfica com concentrações crescentes de ocratoxina A; b) Cromatograma obtido da imagem da placa cromatográfica.



Os parâmetros de validação das duas técnicas cromatográficas estão na Tabela 1. Em CLAE, o limite de detecção (LD) foi de $0,25 \text{ ng.g}^{-1}$ e o limite de quantificação (LQ) foi de $0,50 \text{ ng.g}^{-1}$. Através de análise de regressão linear foi determinada a linearidade ($R: 0,9985$) no intervalo de $0,1\text{-}20 \text{ ng.mL}^{-1}$. No que diz respeito ao CCD, o LD e LQ foram maiores em comparação com CLAE, com valores de $0,3 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ e $0,9 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente. A linearidade foi obtida entre $50\text{-}300 \text{ ng}$ ($R: 0,9970$). O software ImageJ provou ser uma ferramenta eficiente para a determinação quantitativa confiável de ocratoxina A por CCD, conforme relatado por Hoeltz et al. (2012).

Tabela 1- Parâmetros de validação do método QuEChERS

Parâmetros	CLAE	CCD
Equação da curva	$y = 9151,921x + 7663,58$	$y = 0,351x + 42,54$
Linearidade	$0,1\text{-}20 \text{ ng. mL}^{-1}$	$50\text{-}300 \text{ ng}$
Coefficiente de correlação	0,9985	0,9970
Coefficiente de determinação	0,9971	0,9940
LD _i	$0,05 \text{ ng.mL}^{-1}$	10 ng
LQ _i	$0,10 \text{ ng.mL}^{-1}$	30 ng
LD _m	$0,025 \text{ ng.g}^{-1}$	$0,30 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$
LQ _m	$0,050 \text{ ng.g}^{-1}$	$0,90 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$

LD_i - limite de detecção do instrumento; LQ_i- limite de quantificação do instrumento; LD_m - limite de detecção do método; LQ_m- limite de quantificação do método.

Ambos os métodos de detecção mostraram uma correlação significativamente elevada, com um coeficiente de correlação (R) igual a 0,99. No entanto, no que diz respeito aos limites de detecção e quantificação, a CLAE, como esperado, mostrou valores mais baixos e, assim, o cumprimento dos requisitos para baixos limites de detecção, sendo mais eficaz especialmente para estudos de degradação micotoxicológica.

Hoeltz et al. (2012) estudaram método de determinação de OTA em vinhos e obtiveram $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o limite de detecção e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o limite de quantificação pela técnica de CCD acoplado a detector de cargas. Hackbart et al. (2012) encontraram valores de 1 e $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para limites de detecção e quantificação na determinação de OTA em amostras de arroz, utilizando técnica de CLAE-FL. Com esta mesma técnica Afsah-Hejri, Jinap e Mirhosseini (2012) encontraram como limites de detecção e quantificação $0,02$ e $0,06 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivamente, para determinação de OTA em amendoins em CLAE-FL.

3.2 EFEITO DOS COMPONENTES DA MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE OTA

O método QuEChERS empregado neste trabalho deriva do método original de Anastassiades et al. (2003) adaptado por Hackbart et al. (2012) para farelo de arroz integral, comprovando a necessidade do estudo de condições ótimas para conferir simplicidade e agilidade de extração, além de boa aplicabilidade, alta recuperação e seletividade (PRESTES et al., 2009).

Relatos da influência de diferentes parâmetros na extração pelo método QueChERS, como solvente, granulometria, etapas de *clean up*, adição de sais e acidificação do meio estão bem salientados na literatura (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al. 2009). No entanto não foram encontrados relatos experimentais que demonstram a influencia da composição química da matriz na extração de ocratoxina A por este método, tornando necessária uma readequação completa para cada matriz.

Devido à susceptibilidade de diferentes matrizes para a contaminação por ocratoxina A (cereais, carnes, especiarias, bebidas, etc.) é fundamental o estudo dos componentes majoritários destas matrizes que podem afetar positivamente ou negativamente a extração e detecção de micotoxinas, evitando o reajuste exaustivo do método para cada matriz, uma vez que as alterações podem ser feitas de acordo com a presença ou ausência do componente de interesse.

A Tabela 2 mostra a caracterização físico-químicas dos grãos estudados, bem como a percentagem de recuperação encontrados pelo método QuEChERS em CCD e CLAE.

Tabela 2- Composição química da amostra e recuperação de OTA em CCD e CLAE

Matriz	Lipídio	Proteína	AR	AT	Recuperação	
	(%)	(%)	(mg.g ⁻¹)	(mg.g ⁻¹)	CCD (%)	CLAE (%)
FA	19,6(3,8)	15,9 (3,0)	1,9 (1,4)	8,2 (9,0)	102 (2,4)	51 (1,0)
FT	4,3 (2,2)	15,6 (4,0)	2,9 (0,6)	15,8(1,0)	86 (2,9)	43 (2,0)
FAT	7,4 (4,4)	11,7 (2,6)	1,3 (2,7)	4,0 (0,5)	113 (5,5)	61 (3,4)

FA- farelo de arroz; FT- Farelo trigo; FAT- farinha de trigo; AR- açúcar redutor; AT- açúcar total; Média (CV). n=3

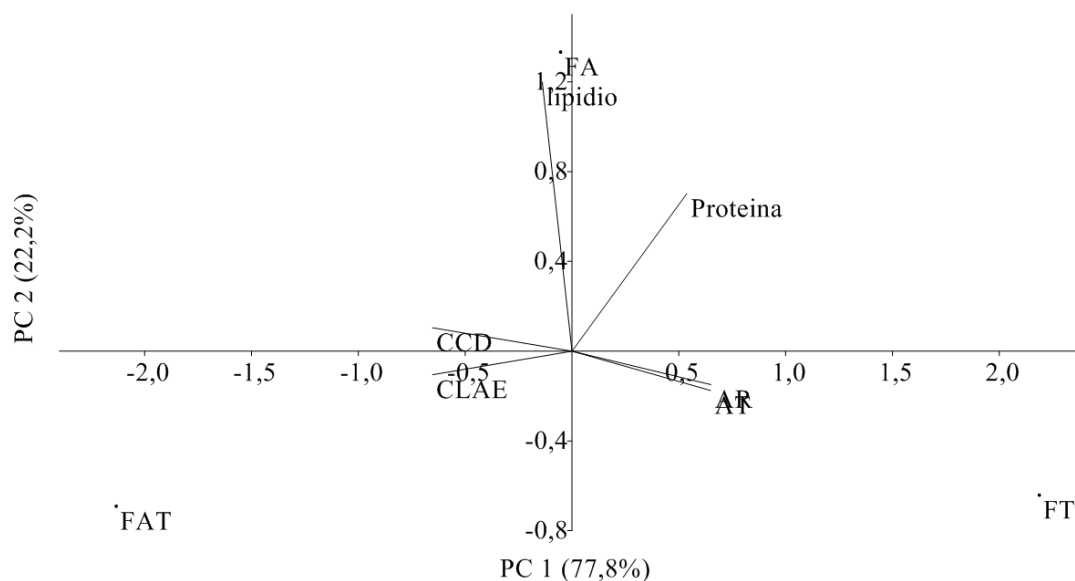
Conforme esperado, a determinação de OTA por CLAE foi a mais afetada pela composição das frações dos cereais, apesar da CCD ter apresentado valores superestimados do contaminante. O farelo de trigo, com o maior teor de açúcares totais, apresentou recuperação inferior pelas duas técnicas.

Neste trabalho foi utilizado a técnica da estatística multivariada (análise de componentes principais (ACP)) para determinar experimentalmente a influencia dos componentes da matriz na recuperação de ocratoxina A de cereais, pelo método de QueChERS modificado por Hackbart et al. (2012), o que facilita sua aplicação alterando apenas a etapa que se faz necessária para eliminar o efeito do interferente.

O adsorvente C₁₈ usado na etapa de *clean up* do método QuEChERS é recomendado para amostras contendo teores de gordura $\geq 2\%$, como por exemplo, arroz, cevada, trigo, óleos vegetais entre outras, devido aos teores lipídicos elevados de algumas porções dos grãos (Tabela 2), principalmente no farelo de arroz.

No entanto, este procedimento não foi eficaz para os outros cereais ou seus derivados uma vez que a recuperação foi superior a 100% em CCD e inferior a 70% em CLAE. Assim, para identificar o fator responsável pela resposta, os resultados na Tabela 2 foram submetidos à ACP (Figura 2).

Figura 2- Efeito dos componentes da matriz na extração por QuEChERS em CCD e CLAE



FA-farelo de arroz; FT-farelo de trigo; FAT-farinha de trigo; AR-açúcar redutor; AT-açúcar total; CCD-recuperação em cromatografia em camada delgada; CLAE- recuperação em cromatografia líquida de alta eficiência.

ACP tem como fundamento a geração de novas variáveis, denominadas componentes principais, para explicar a variabilidade dos resultados, além de evidenciar a correlação entre as diferentes variáveis estudadas. Neste trabalho, a variabilidade dos resultados foi simplificada para duas componentes: componente 1 que explica 77,8% e a componente 2 que explica 22,2%.

A distribuição das amostras no plano do gráfico de componentes demonstra a relação inversamente proporcional entre FAT e FT, que apresentaram os maiores e menores valores de recuperação da micotoxina, respectivamente (Figura 2). Com relação às variáveis: lipídios; proteínas; AR; AT e recuperação; observa-se que os lipídios apresentaram a menor influencia na recuperação de ocratoxina A, com uma correlação de 0,29. Este comportamento corrobora com o descrito por Prestes et al. (2009), “que a utilização de acetonitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra”. A utilização da C18 na etapa de *clean up*, conforme descrito anteriormente, também limitou o efeito dos lipídios na recuperação de OTA (ANASTASSIADES et al., 2003).

Os açúcares redutores (AR) e totais (AT) apresentaram alta correlação entre si (0,99), comportamento esperado devido ao método empregado para a quantificação, baseado no poder redutor dos açúcares presentes antes e após a hidrólise dos carboidratos. Tanto AR e AT apresentaram uma correlação de -0,99 com a recuperação de OTA por CCD, e -0,98 para CLAE. Esta interferência pode ser explicada, pois quando não se utiliza NaCl para a extração, compostos mais polares como os açúcares são extraídos em maior quantidade e conseqüentemente interferem na detecção do analito em estudo (ANASTASSIADES et al., 2003).

Entre as variáveis, os lipídios apresentaram maior correlação com a componente 2, (R:0,96) enquanto que proteína, AR, AT e recuperação apresentaram maior correlação com a componente 1, com valores de R de 0,79, 0,99, 0,99 e -0,99, respectivamente. Portanto, provavelmente a componente 1 está relacionada com interferentes polares, enquanto que a componente 2 está relacionada com compostos apolares.

Em geral, ambas as técnicas de extração são afetadas pelos componentes da matriz de uma forma semelhante e com a mesma intensidade, demonstrando a aplicabilidade de ambos os métodos cromatográficos, com uma correlação de 0,98 entre eles. Além disso, os fatores mais polares afetaram a extração de OTA pelo método QuEChERS, indicando que a composição de sal durante partição deve ser investigado para padronizar a extração em diferentes matrizes.

A técnica multivariada permitiu identificar a principal interferência na extração de OTA e assim fazer alterações no método para cada matriz, o que requereria maior número de determinações e pouca clareza quanto à interação dos efeitos usando técnicas de estatística univariada.

Visto que a contaminação por ocratoxina A ocorre principalmente durante o armazenamento e que produtos a base de farinha de trigo são amplamente consumidos, esta matriz foi escolhida para a padronização e validação do método cromatográfico para a detecção de OTA por CLAE-FL. Além disso, a farinha de trigo também apresentou as menores concentrações de açúcares redutores e açúcares totais, que são os compostos que afetam fortemente a recuperação de OTA da matriz.

3.3 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE OTA EM FARINHA DE TRIGO

A extração de OTA pode ser afetada por diferentes variáveis, incluindo o solvente de extração, o tempo de extração, a composição de sais e o tipo de matriz empregada.

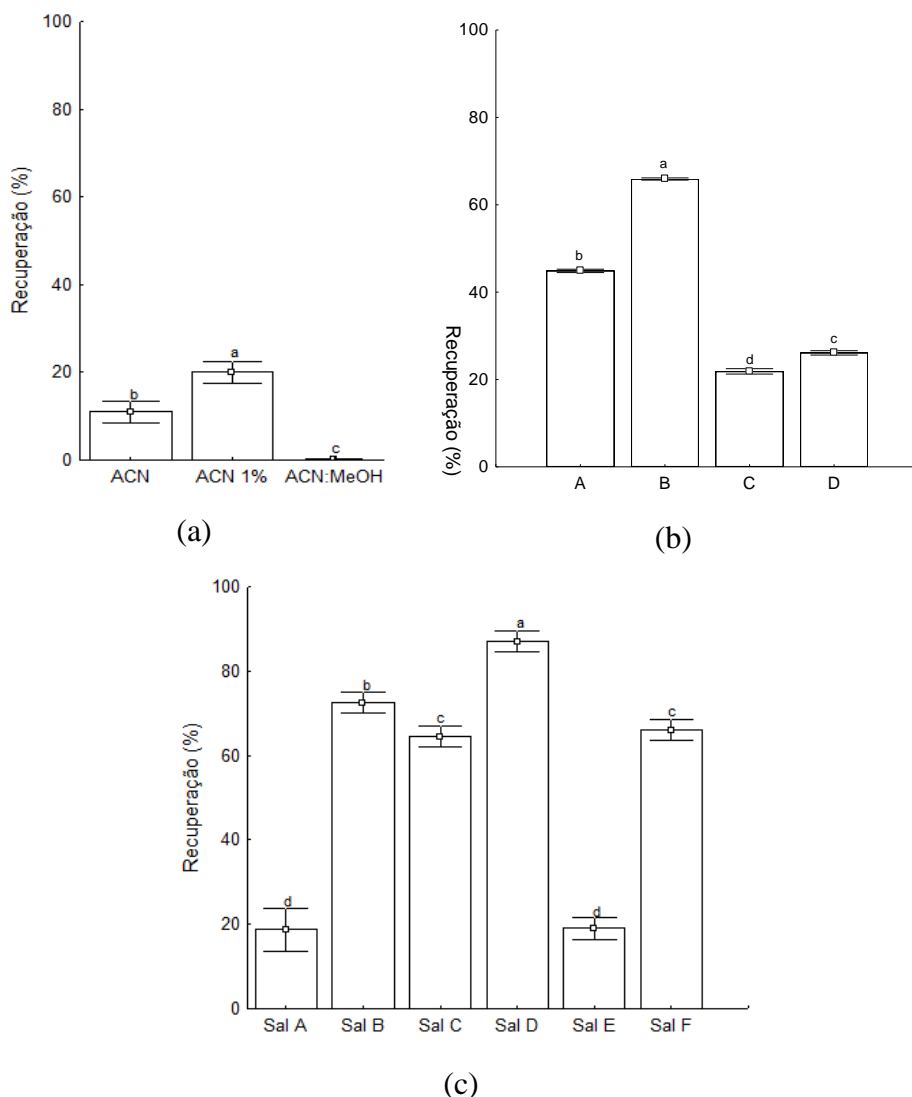
Entre os solventes avaliados (Figura 3a), o uso de ACN acidificada 1% aumentou em duas vezes a recuperação de OTA com relação à ACN e a mistura ACN:Metanol não possibilitou a extração. Frenich et al. (2011) também observaram o aumento da recuperação mediante acidificação do meio durante a extração de OTA em ovos. Este aumento pode estar relacionado com o aumento da estabilidade da micotoxina devido à acidificação do meio extrator (PRESTES et al., 2009).

A hidratação tem sido estudada para facilitar a migração do solvente de extração para o interior da matriz onde se encontra o analito (Figura 3b). Os resultados da recuperação variaram entre 22 e 66%. A adição de água provocou um aumento significativo de 2,3 vezes, e o aumento do tempo de extração de 5 para 10 minutos aumentou em 46% a recuperação de OTA com adição de 30% de água. Isto é devido ao poder de extração deste solvente ser negativamente afetado pela presença de açúcares na farinha. Portanto, o solvente de extração padronizado para o estudo foi H₂O:ACN acidificada 1% com ácido acético (30:70). Não foram investigados os efeitos de tempos de extração superiores a 10 minutos para não limitar a aplicabilidade da extração. Além disso, maiores quantidade de água poderiam impedir a separação da fase aquosa da fase orgânica.

Durante a extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa. Devido a importância dos sais, foram avaliadas diferentes combinações deles conforme o descrito por outros autores que empregaram o método de QuEChERS (Figura 3c) (ANASTASSIADES et al., 2003; PAÍGA et al., 2012; PRESTES et al., 2009).

Todas as misturas de sais tinham sulfato de magnésio na sua composição devido sua alta capacidade de remover água do sistema (PRESTES et al., 2009). O percentual de recuperação variou entre 18-87%, tendo como melhor resultado a mistura de sais D, que corresponde à do método original de QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003). O sulfato de magnésio foi seco a 500 °C durante 5 horas, conforme recomendado por Anastassiades et al. (2003), para eliminar os interferentes, como os fitalatos. O processo de secagem propiciou um aumento de 1,2 vezes na recuperação de OTA devido à eliminação de interferências, além de evitar a reação exotérmica que ocorre na hidratação de sulfato de magnésio (PRESTES et al., 2009).

Figura 3- Efeito do solvente (a); adição de água (b) e composição de sais (c) na extração de OTA em farinha de trigo



ACN- acetonitrila; ACN 1%- acetonitrila acidificada com ácido acético 1%; ACN:MeOH- acetonitrila:metanol; A- 30% água/5 min, B - 30% água/10 min; C - 0% água/5 min; D - 0% água/10 min. sal A (12,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 1,5 g acetato de sódio); sal B (8,18 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 1g NaCl); sal C- (12,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 1,5 g NaCl + 2,1 g citrato sódio diidratado); sal D (4 g $MgSO_4$ seco + 1 g NaCl); sal E (4 g $MgSO_4$ seco); sal F (8,18 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$); barras com a mesma letra não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

A presença de NaCl (quando se compara a mistura E e D) promoveu um aumento de 4,5 vezes na recuperação de OTA, evidenciando a importância do NaCl na etapa de extração, pois, os compostos polares são os maiores interferentes na extração em farinha de trigo e de outros cereais.

O método modificado para farinha de trigo com 87% de recuperação foi definido como: 5 g de farinha de trigo com 15 mL de ACN 1%:água (7:3), seguido pela adição de

sulfato de magnésio seco e cloreto de sódio sob agitação em vortex durante 10 min. Apesar da recuperação estar dentro dos limites aceitáveis (70-120%), o efeito da matriz sobre a extração de OTA foi avaliado, uma vez que uma menor recuperação por CLAE, em comparação com a CCD na primeira fase do presente estudo, indicam um efeito negativo no sinal dos compostos presentes nos cereais.

O efeito de matriz (EM) é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando basicamente, fenômenos de diminuição ($EM < 100\%$) ou ampliação ($EM > 100\%$) do sinal instrumental ou resposta instrumental (KRUIVE et al., 2008).

Nas concentrações de OTA estudadas na farinha de trigo, o efeito de matriz variou entre 15 e 50%. Devido a esta alta influencia na determinação da micotoxina, foi feita uma curva na matriz nas mesmas concentrações usadas para a curva do solvente, com linearidade entre 0,04 a 8 ng.g^{-1} e um coeficiente de correlação de 0,9968. Para a avaliação da exatidão do método, os cálculos foram realizados com a curva na matriz de forma a compensar este efeito. As recuperações do método foram de 98,7% (3x LQ); 97,6% (5x LQ) e 105% (10x LQ), com um CV de 11, 15 e 6%.

3.4 LEVANTAMENTO DE OCORRÊNCIA E ESTIMATIVA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO

O método desenvolvido empregado em amostras de farinha de trigo mostrou que todas estavam contaminadas com OTA (Tabela 3). Destas, 85% apresentavam contaminação na ordem de 0,2 e 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 15% entre 0,5 e 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, porém todas abaixo do limite da legislação nacional (RDC nº 7/2011) e pela União Européia (EC, 2006b). O método validado apresentou-se confiável para a avaliação de ocorrência, com um CV inferior a 20% para todas as amostras.

Khorasgani et al. (2012) avaliando a ocorrência natural de OTA em farinhas de trigo, encontraram 94% das amostras contaminadas com concentrações de 0,004 a 0,809 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Cabe salientar que apesar dos níveis serem inferiores ao limite recomendável, a exposição crônica é provável devido a frequência de ingestão de farinhas de trigo em diferentes produtos, constituindo um desafio para as autoridades em saúde pública, pois dificulta consideravelmente a adoção de estratégias para diminuir o risco de danos.

Tabela 3- Ocorrência de OTA em farinhas de trigo

Amostra	OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CV(%)
1	0,31	4,5
2	0,44	9,6
3	0,34	0,6
4	0,46	16,0
5	0,66	6,4
6	0,22	6,3
7	0,32	1,3
8	0,25	12,5
9	0,25	10,3
10	0,26	7,2
11	0,47	7,2
12	0,23	7,5
13	0,34	3,7
14	0,35	6,5
15	0,23	5,7
16	0,85	10,9
17	0,46	8,4
18	0,50	7,8
19	0,24	3,2
20	0,30	2,8

OTA-ocratoxina A; CV- coeficiente de variação

Valores de ingestão diária toleráveis para OTA foram propostos por diferentes órgãos e variam entre $5 \text{ ng}_{\text{OTA}}\cdot\text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ (THE NORDIC GROUP ON FOOD TOXICOLOGY AND RISK EVALUATION, 1991), $17 \text{ ng}_{\text{OTA}}\cdot\text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ (EFSA, 2006) e $14 \text{ ng}_{\text{OTA}}\cdot\text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ (JECFA, 2007). Considerando o valor de contaminação médio encontrado neste trabalho de $0,38 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, a ingestão diária estimada para uma pessoa de 70 kg é de $0,08 \text{ ng}_{\text{OTA}}\cdot\text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, pois há relatos que esta micotoxina é termoestável em diferentes processos para preparo de alimentos a base de farinha (VIDAL et al., 2015).

Coronel et al. (2009) avaliaram a estimativa de ingestão diária de OTA baseados em dados de consumo de 279 pessoas (132 homens e 147 mulheres) de 9 diferentes

localidades da província de Lleida- Espanha. Os alimentos foram classificados em diferentes grupos, tendo como principal fonte de contaminação os cereais e derivados ($0,76 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), seguido de frutas secas e derivados ($0,29 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), vinho ($0,35 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), café ($0,10 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), suco de uva ($0,07 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), cacau e derivados ($0,06 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) e cerveja ($0,04 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$). Os valores obtidos nas amostras do presente trabalho encontram-se abaixo do encontrado para cereais e derivados. No entanto, produtos derivados de farinha de trigo são consumidos em conjunto com outros produtos como sucos, café, cerveja, aumentando-se o risco de exposição à esta micotoxina.

Adicionalmente, através do estudo da digestibilidade *in vitro*, que consiste na simulação das condições gastrointestinais, verificou-se que 94,4% do conteúdo de OTA inicial foi encontrado na fração digerida (sobrenadante) e 8,3% permanece na fração não digerida, ou seja, somente esse percentual tem maior chance de ser excretado pelo organismo, o restante que fica solúvel pode estar relacionado com o fato que o rim é o principal alvo de toxicidade da OTA (MARIN-KUAN et al., 2008). É importante a busca de métodos para descontaminar matéria prima que possam ser adotados nas etapas de processamento, visto que praticamente todo o conteúdo de micotoxina ingerido fica disponível para a absorção no organismo.

4. CONCLUSÃO

A necessidade de adaptação do método QuEChERS para cada matriz utilizada ficou demonstrada, bem como a aplicabilidade da técnica de camada delgada empregando o *software* ImageJ para determinação de OTA. O método validado para determinação da micotoxina em farinha de trigo por CLAE-FL foi eficiente, apresentando recuperações de 98 a 105%.

A técnica multivariada permitiu elucidar que o principal interferente na determinação de ocratoxina A pelo método QuEChERS, tanto por CCD quanto por CLAE foram os compostos polares.

O emprego do método validado permitiu a estimativa do risco de exposição à ocratoxina A. Considerando-se um valor de ingestão diária de $0,08 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ há a disponibilização para absorção no organismo de 94% do conteúdo inicial da micotoxina. Esse resultado é importante tanto do ponto de vista

econômico, como da saúde do consumidor, norteando a busca por alternativas para redução dos níveis do contaminante em diferentes matrizes alimentícias.

REFERÊNCIAS

AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; MIRHOSSEINI, H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 113-119, 2012.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

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

BUSTAMANTE-RANGEL, M.; DELGADO-ZAMARREÑO, M.M.; PÉREZ-MARTÍN, L.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. QuEChERS method for the extraction of isoflavones from soy-based foods before determination by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 203-209, 2013.

CORONEL, M.B.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MARIN, S. Assessment of the exposure to ochratoxin A in the province of Lleida, Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2847-2852, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union, L229, p. 7-9, 2006a

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food, 2006.

FERNANDES, P.J.; BARROS, N.; CÂMARA, J.S. A survey of the occurrence of ochratoxin A in Madeira wines based on a modified QuEChERS extraction procedure combined with liquid chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 293-301, 2013.

FERREIRA, I.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography–mass spectrometry for

the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 188-193, 2012.

FRENICH, A.G.; ROMERO-GONZÁLES, R.; GÓMEZ-PÉREZ, M.L.; VIDAL, J.L.M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4349-4356, 2011.

HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M.M.; SCAGLIONI, P.T.; PRIMEL, E.G.; GARDABUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. The QuEChERS method for determination of ochratoxin a and citrinin in rice and rice bran. **Química Nova**, v. 35, n.9, p. 1733-1737, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M.M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G.C.; FAGUNDES, C.A. Determination of deoxynivalenol and zearalenone in natural and parboiled rice and their fractions using QuEChERS and CLAE/UV-FL, **Química Nova**, v. 35, n.9, p. 1244-1249, 2012.

HOELTZ, M.; MONEZZI, L.P.; MANFROI, V.; NOLL, I.B.; DOTTORI, H.A. Ochratoxin A: quality analysis of brazilian and imported wines. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 58-63, 2012.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, JECFA. In: 68th Meeting. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, WHO, Geneva, p. 208, 2007.

KHORASGANI, Z.N.; BEHFAR, A.; HYDARI, R. Occurrence of ochratoxin A in wheat flour factories in Ahvaz city, Iran. **Toxicology Letters**, v.211, p. S97, 2012.

KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1-2, p. 58-66, 2008.

KUMAR, R.; ANSARI, K.M.; SAXENA, N.; DWIVEDI, P.D.; JAIN, S.K.; Das, M. Detection of Ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control**, v. 26, n.1, p. 63-67, 2012.

LI, N.; LEI, L.; ZHANG, L.N.; WU, S.; REN, R.; WANG, Y.; ZHANG, H.; Yu, A. A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 105, p. 219-228, 2013.

LIN, L.; ZHANG, J.; WANG, P.; WANG, Y.; CHEN, J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 3-20, 1998.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; CÓRDOVA, M.L.F.; RUIZ-MEDINA, A. Quantitation of ochratoxin a in cereals and feedstuff using sequential injection analysis with luminescence detection. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 379-385, 2013.

MARIN-KUAN, M.; CAVIN, C.; DELATOUR, T.; SCHILTER, B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. **Toxicol**, v. 52, n. 2, p. 195-202, 2008.

MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MEI, M.; DU, Z.X.; CEN, Y. QuEChERS-Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Five Currently Used Herbicides. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1659-1664, 2011.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

PAÍGA, P.; MORAIS, S.; OLIVA-TELES, T.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C.; DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2522-2528, 2012.

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, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 36-53, 2007.

SAITO, K.; IKEUCHI, R.; KATOKA, H. Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, p. 1-6, 2012.

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

SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; MARTINS, R.C.; SEABRA, R.M.; Ferreira, M.A. Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) Jam. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 504-512, 2006.

THE NORDIC WORKING GROUP ON FOOD TOXICOLOGY AND RISK EVALUATION. **Health evaluation of ochratoxin A in food products**. In: Nordiske Seminar-og Arbejdsrapporter, v. 545, p. 5–26, 1991.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F.; CALDAS, S.S.; BUFFON, J.G.; DUARTE, F.A.; PRIMEL, E.G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 380-386, 2012.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 75–92, 1998.

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

ARTIGO 2. PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A PARA
DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A

Publicado: Application of carboxypeptidase from *Rhizopus* on ochratoxin A degradation. BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports, 2 (2013) 30-36.

RESUMO

Micotoxinas são produzidas por fungos filamentosos em diferentes etapas da cadeia produtiva de alimentos, destacando-se a ocratoxina A (OTA) por seus efeitos nefrotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos. O desenvolvimento de métodos capazes de diminuir esta contaminação a níveis permitidos pela legislação são incentivados e os processos biológicos, envolvendo o uso de enzimas e microrganismos para degradação da OTA são preferenciais pela especificidade e condições brandas de detoxificação. Neste trabalho, foram estabelecidas condições de extração de carboxipeptidase A a partir de biomassa fermentada por *Rhizopus oryzae* para empregá-la na degradação de OTA, tendo a pancreatina como controle. O método padronizado para extração enzimática consistiu em agitação ultrassônica durante 30 minutos numa potencia fixa de 150 W e 40 kHz. O extrato enzimático do microrganismo degradou 19,4% sendo 49% superior quando comparado com a pancreatina. Ficou demonstrada a vantagem da utilização de enzimas microbianas para processos de degradação de micotoxinas.

Palavras-chave: *Rhizopus oryzae*, hidrólise enzimática, pancreatina.

1. INTRODUÇÃO

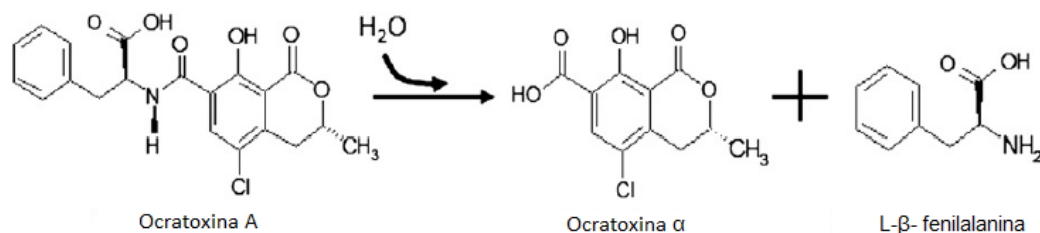
As micotoxinas são substâncias naturais de baixo massa molecular, produzidas por fungos filamentosos como metabólitos secundários em qualquer etapa da cadeia produtiva (KÖPPEN et al., 2010). A ocratoxina A (OTA), considerada cancerígena do grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993) pode ser produzida por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo encontrada em cereais e em produtos como café, vinho, frutos secos, cerveja e suco de uva (ZAIN, 2011).

Embora a prevenção do crescimento e produção de micotoxinas por fungos que colonizam plantas e alimentos é normalmente considerada como a melhor abordagem para impedir os efeitos nocivos destes contaminantes na saúde animal e humana, a descontaminação de produtos agrícolas é também uma medida importante. Diferentes estratégias para este fim já vem sendo estudadas e classificadas como métodos físicos, químicos e (micro) biológicos (VARGA et al., 2005).

Os tratamentos biológicos tem destaque por permitirem o uso de condições brandas de processo e por diminuir a possibilidade de produção de derivados mais tóxicos. Para isso, são utilizadas leveduras, bactérias e fungos não toxigênicos capazes de

inibir o crescimento de fungos toxigênicos e diminuir os níveis da toxina a valores aceitáveis pela legislação, 2-30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (EC, 2006a). A principal via de degradação de OTA por microrganismos envolve a hidrólise da ligação amida, entre a porção isocumarina com a molécula de fenilalanina, mediante ação de enzimas proteolíticas intra ou extracelulares, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1- Degradação de ocratoxina por via enzimática



Fonte: ABRUNHOSA; VENÂNCIO; TEIXEIRA (2011)

Para atuar desta forma as enzimas proteolíticas da classe das carboxipeptidases, que podem ser obtidas de leveduras, como *Phaffia rhodozyma* e fungos filamentosos (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002; AMÉZQUETA et al., 2009; STANDER et al., 2001; VARGA et al., 2005) são as mais adequadas. Uma espécie de *Rhizopus oryzae*, isolada da casca de arroz, depositada no Banco de Culturas da Fundação André Tosello (CCT 7560) e posteriormente identificada por técnicas moleculares, foi empregada para a produção de celulase (KUPSKI et al., 2014) e para disponibilização de nutrientes como proteínas e compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2010) durante processo fermentativo. No entanto, a utilização de enzimas como a carboxipeptidase A, extraídas desta linhagem selvagem, visando a aplicação em descontaminação de micotoxinas não esta descrita na literatura.

Neste trabalho, foram estabelecidas condições de extração de carboxipeptidase a partir de biomassa fermentada pela linhagem selvagem *Rhizopus oryzae* CCT 7560 para aplicação na degradação de OTA, comparando o efeito hidrolítico ao da pancreatina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A enzima pancreatina foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) sendo a partir dela preparada uma solução enzimática (2 mg.mL^{-1}) usando água destilada para aplicação nos experimentos.

A biomassa de *Rhizopus oryzae* foi cultivada em substrato farelo e casca de arroz (32 mesh) na proporção de 17,5 e 82,5%, respectivamente, em biorreatores do tipo bandeja (14 cm x 14 cm x 5,5 cm) durante 15 h a 30 °C, tendo como concentração inicial de esporos 4×10^6 esporos.g⁻¹ e umidade de 30% (KUPSKI et al., 2014).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Estudo das condições de extração da enzima carboxipeptidase A

Para este estudo foi utilizada a técnica OFAT (*one factor at a time*), avaliando diferentes fatores individualmente. O primeiro estudado foi a agitação: (i) banho ultrassônico de 40 kHz e (ii) agitação orbital a 150 rpm, ambos durante 30 minutos; seguido da frequência de ondas ultrassônicas (25, 37 e 40 kHz) com potencia fixa de 150 W e na melhor frequência os tempos de extração (15, 30, 45 e 60 minutos).

A extração foi realizada com água destilada na proporção 1:5 (p/v) em cada condição descrita anteriormente, seguida por centrifugação a 4 °C e 3220 g durante 10 minutos, obtendo-se assim o extrato bruto enzimático (P₀). Para purificação primária foi utilizada a precipitação com acetona na proporção 1:3 (v/v) a 0 °C permanecendo em repouso durante 24 horas (KUPSKI et al., 2012). Após a remoção do excesso de solvente, a proteína foi ressuspensa em água para quantificação de acordo com método de Lowry et al. (1951) e determinação de atividade enzimática (PEDROCHE et al., 2002).

2.2.2 Determinação de atividade e proteína solúvel

A atividade de carboxipeptidase A foi determinada utilizando como substrato hipuril-L-fenilalanina (H-PHE) 0,1 mM preparado em tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 0,5 M. O aumento na absorvância, medida a 254 nm, foi acompanhado

por 15 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade foi calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de $360 \text{ L}(\text{mol cm})^{-1}$ (PEDROCHE et al., 2002).

O teor de proteína solúvel foi determinado conforme método descrito por Lowry et al. (1951), empregando curva padrão de albumina ($0,05 - 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$). A atividade específica foi obtida considerando o teor de proteína solúvel dos extratos, conforme a Equação 1.

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Atividade (U)}}{\text{Proteína solúvel (mg)}} \quad (1)$$

Uma unidade de carboxipeptidase A foi definida como a quantidade de proteína necessária para liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido hipúrico por minuto a 25°C e pH 7,5.

2.2.3 Degradação de ocratoxina A em meio reacional

Para o ensaio de degradação OTA foi dissolvida em tampão tris HCl pH 7,5 25 mM contendo NaCl 0,5 M e quantificada a 380 nm (absortividade $7160 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (PITOUT, 1969).

A hidrólise de OTA foi acompanhada a 380 nm aos 30 e 60 minutos a 25°C , tendo como meio reacional 1 mL da solução da micotoxina ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 0,5 mL de tampão tris HCl pH 7,5 e 0,5 mL de pancreatina ou extrato parcialmente purificado (P_1) de *Rhizopus oryzae*. A atividade de degradação foi expressa em termos de hidrólise e hidrólise específica, determinadas de acordo com as Equações 2 e 3.

$$\text{Hidrólise} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Hidrólise específica} = \frac{\% \text{ hidrólise}}{\text{proteína solúvel (mg)}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

C_1 - concentração inicial de OTA;

C_2 - concentração de OTA após hidrólise;

2.2.4 Análise estatística

A análise estatística dos resultados de atividade específica, hidrólise e hidrólise específica foi realizada por ANOVA considerando as médias de triplicatas dos ensaios, seguida pelo teste de Tukey a um nível de 5 % ($p < 0,05$), utilizando o programa “Statistica” (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE

As condições de extração de carboxipeptidase (orbital ou ultrassônico) da biomassa fermentada com *R. oryzae* foram avaliadas. A agitação ultrassônica em ambos os extratos (bruto (P_0) e purificado (P_1)) apresentou valores de 5,0 (CV 2,0) e 35,5 (CV 16,6), melhorando o rendimento da extração (1,5 vezes) em relação à agitação orbital, que não apresentou atividade no P_0 e apresentou valores de 23,0 (CV 1,8). Fato que pode ser atribuído a maior eficiência das ondas ultrassônicas para romper a parede celular e liberar enzimas intracelulares da biomassa fúngica (MASON, 2003). O emprego de ultrassom como uma ferramenta para extração de metabólitos de origem vegetal e compostos bioativos de material vegetal ou animal (CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011) tem sido cada vez mais frequente, pois propicia maior recuperação sem a necessidade de aumento do volume de extrator, resultando em redução de resíduos para descarte no ambiente e da exposição do analista (KAPTUROWKA et al., 2012; SILVA et al., 2013).

A utilização de ultrassom pode melhorar o processo de extração (Tabela 1). O colapso de bolhas de cavitação leva a um melhor rompimento celular que permite uma melhor penetração do solvente, aumentando a transferência de massa do sistema (CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011). Esta técnica tem sido utilizada para a extração de diferentes compostos, como compostos fenólicos (RODRIGUES; PINTO; FERNANDES, 2008; WANG et al., 2008), compostos aromatizantes (PORTO; DECORCI; KIKIC, 2009) e compostos voláteis (CABREDO-PINILLOS et al., 2006).

A etapa de purificação primária com acetona aumentou em 7 vezes a atividade hidrolítica da enzima, comportamento esperado, visto que a mudança da constante dielétrica do meio ocasionada pela adição de acetona propicia a precipitação da proteína extraída e portanto a diminuição de interferentes do meio.

Tabela 1- Condições testadas para a padronização da extração de carboxipeptidase A por banho ultrassônico

Frequência (kHz)**	Atividade (mU.mg _{protein} ⁻¹)	Tempo (min)	Atividade (mU.mg _{proteína} ⁻¹)
25,0	S.A.	15	35,9 (3,5) ^c
37,0	22,3 (4,5) ^b	30	39,1 (0,1) ^a
40,0	39,5 (0,8) ^a	45	36,5 (0,6) ^b
		60	21,0 (4,8) ^d

* Resultados expressos como Média (CV). S.A. - sem atividade. P₀- Extrato bruto; P₁- Extrato parcialmente purificado. **-estudo realizado em 30 min. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

No presente trabalho, a melhor condição para a extração enzimática foi obtida na frequência de 40 kHz (Tabela 1), representando um aumento de 77% na atividade da carboxipeptidase A em relação à aplicação da frequência de 37 kHz. Em baixas frequências, as forças de cisalhamento geradas são muito fortes devido ao colapso mais entrópico da bolha, causando consequentemente a desnaturação protéica e decréscimo de atividade (CHANDRAPALA et al., 2012), como ficou demonstrado nos resultados.

O procedimento de extração adotado foi a utilização de banho ultrassônico na frequência de 40 kHz durante 30 minutos e a purificação primária do extrato com acetona (P₁) na proporção 1:3 (v:v).

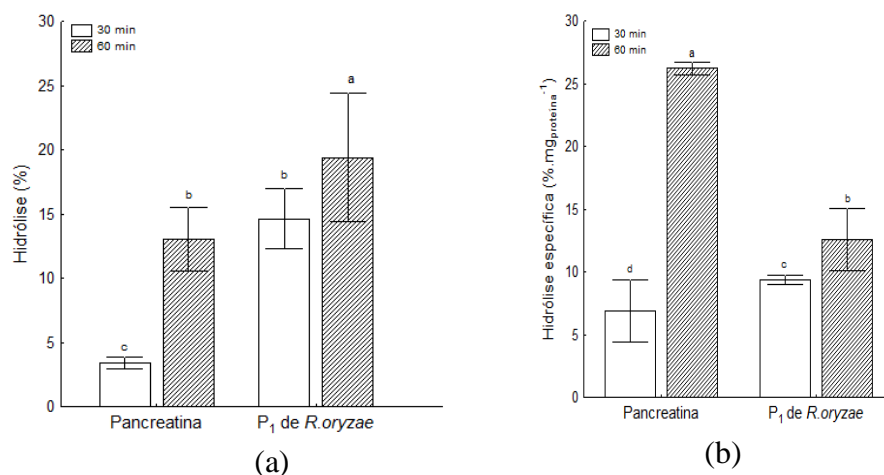
3.2 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE OTA

A alta incidência de OTA e seus efeitos nocivos em seres humanos e animais tem motivado a busca por métodos de degradação eficientes e não geradores de derivados tóxicos (AMÉZQUETA et al., 2009). O principal caminho pelo qual os microrganismos podem descontaminar OTA envolve a hidrólise da ligação amida que une a OTα à molécula de fenilalanina (ABRUNHOSA et al., 2002).

A diminuição do teor de ocratoxina A pela ação das diferentes enzimas, extrato P₁ de *R. oryzae* e pancreatina (240 mU.mg_{proteína}⁻¹) está demonstrada na Figura 2. A hidrólise de OTA (Figura 1a) aumentou significativamente com o tempo de reação tanto para pancreatina quanto para a enzima extraída de *R. oryzae*. A hidrólise de OTA promovida pela enzima fúngica foi 4 e 1,5 vezes superior a enzima de origem animal (pancreatina)

em 30 e 60 minutos, respectivamente. A solução de pancreatina, bem como do extrato da biomassa fúngica são constituídos por mistura de enzimas hidrolíticas incluindo a carboxipeptidase A. Portanto o efeito observado sobre a degradação de OTA demonstra que na biomassa fúngica as carboxipeptidases são mais ativas.

Figura 2- Taxa de hidrólise (a) e hidrólise específica (b) de OTA por ação enzimática em meio reacional.



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). (P1) extrato purificado de *Rhizopus oryzae*.

A hidrólise específica (Figura 1b) aumentou significativamente com o tempo reação. No entanto, comparando a ação das enzimas de diferentes fontes (fúngica e animal), aos 30 minutos de reação a hidrólise específica da enzima proveniente da biomassa de *Rhizopus oryzae* foi 37% maior que a da pancreatina, indicando uma maior especificidade da enzima fúngica a OTA.

A máxima hidrólise específica promovida pela pancreatina ocorreu nos 60 min de reação ($26,2\% \text{ (mg}_{\text{proteína}})^{-1}$), atribuído ao fato de que a pancreatina é uma enzima comercial purificada onde estão presentes várias enzimas proteolíticas além da carboxipeptidase A. Portanto, a enzima fúngica se mostra como alternativa a pancreatina para processos de degradação, especialmente quando se requer intervalos menores para degradação de OTA.

Vale ressaltar que a biomassa produzida por *Rhizopus oryzae* havia sido otimizada para produção de celulase e ficou demonstrado o potencial do microrganismo para produção de carboxipeptidases ativas contra a OTA. Este fato é bastante promissor, visto que o fungo produtor é de uma linhagem selvagem, no qual pode se realizar modificações

genéticas visando a maximização da produção da protease para emprego nos processos de descontaminação.

Os resultados encontrados corroboram com o obtido em estudo de Varga et al. (2005) avaliando a degradação de ocratoxina por diferente espécies de *Rhizopus*, encontrando uma redução de até 96,5% no conteúdo inicial de OTA no substrato com *R. stolonifer*. Relatos da ação da pancreatina na redução desta micotoxina não foram encontrados na literatura.

É importante salientar que na maioria dos estudos de degradação, não é usual aplicar a enzima extraída do microrganismo, mas sim o próprio microrganismo. Trata-se, portanto, de um aspecto inovador para processos de degradação, que pode se adaptar melhor a condições de purificação e disponibilização para fins comerciais.

4. CONCLUSÃO

A utilização de banho ultrassônico de 40 kHz durante 30 minutos foi a melhor condição para extração de carboxipeptidase A produzida com *Rhizopus oryzae*. O extrato enzimático contendo carboxipeptidase foi capaz de reduzir os níveis iniciais de OTA em até 20%, podendo ser empregado em processos para minimizar a contaminação no produto final. Além disso, o trabalho salienta a vantagem da utilização de enzimas microbianas para processos de degradação de micotoxinas.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.25, p. 7493-7496, 2002.

ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J.A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 351-355, 2011.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 326-333, 2009.

CABREDO-PINILLOS, S.; CDRON-FERNANDEZ, T.; GONZALES-BRIONGOS, M.; PUENTE-PASCUAL, L.; SAENZ-BARRIO, C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: optimisation of the method. **Talanta**, v. 69, n. 5, p. 123–1129, 2006.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975-983, 2012.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union, L229, p. 7-9, 2006a.

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. 489–599, 1993.

KAPTUROWSKA, A. U.; STOLARZWICZ, I. A.; KRZYCZKOWSKA, J.; BIALECKA-FLORJANCZYK, E. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarriwia lipilytica*. . **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 1, p. 186-191, 2012.

KÖPPEN, R.; KOCH, M.; SIEGEL, D.; MERKEL, S.; MAUL, R.; NEHLS, I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1595-1612, 2010.

KUPSKI, L., CIPOLATTI, E., ROCHA, M., OLIVEIRA, M.S.; SOUZA-SOARES, L.A., BADIALE-FURLONG, E. Solid-State fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 939-944, 2012.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Endoglucanase and Total Cellulase from Newly Isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, Characterization, and Thermal Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458-468, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MASON, T. J. Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 4-5, p. 175- 179, 2003.

OLIVEIRA, M.S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA- Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.

PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓN-GALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 711-718, 2002.

PITOUT, M.J. A rapid spectrophotometric method for the assay of carboxipeptidase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1829-1836, 1969.

PORTO, C.D.; DECORTI, D.; KIKIC, I. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: comparison of three different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 1072–1078, 2009.

ROGRIGUES, S.; PINTO, G.A.S.; FERNANDES, F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95–100, 2008.

SILVA, J.R.F.; CANTELLI, K.C.; TRES, M.V.; ROSA, C.D.; MEIRELLES, M.A.A.; SOARES, M.B.A.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 102-107, 2013.

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

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 321-328, 2005.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y., LI, X. Optimisation of ultrasounds-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804-810, 2008.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ARTIGO 3. DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE OTA E OT α EM ENSAIOS DE
DEGRADAÇÃO *in vitro*

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo validar um método de extração e detecção para a análise da OTA e do seu metabolito OT α em CLAE-FL para acompanhar a eficiência do processo de degradação realizado *in vitro*. Os microrganismos *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, com concentração inicial de 4×10^6 esporos.mL⁻¹ foram cultivados em meio Agar Batata Dextrose contendo OTA (1,5 μ g.mL⁻¹) durante 120 horas a 30 °C, com retirada de amostra no tempo zero e a cada 24 horas. A micotoxina e seu metabólito foram extraídos do meio de cultivo com HCl, partição com clorofórmio e quantificação em método validado por CLAE-FL. O crescimento fúngico foi avaliado pelo conteúdo de glicosamina após hidrólise ácida com HCl 6 N e por análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os valores máximos de degradação foram alcançados na fase exponencial de crescimento de ambos os microrganismos, nomeadamente 48 horas para *Rhizopus oryzae* (68% de redução) e 72 horas para *Trichoderma reesei* (57,7% de redução). A degradação encontrada para estes microrganismos apresentou uma correlação alta ($R > 0,9$) e significativa ($p < 0,05$) com a produção de OT α , indicando que ocorreu a produção de enzimas capazes de hidrolisar a micotoxina, por exemplo, a carboxipeptidase A. Dessa forma fica evidenciado que os microrganismos são promissores como agentes biológicos de descontaminação e podem ser empregados como fontes alternativas de enzimas para a degradação de ocratoxina A de matrizes alimentícias.

Palavras-chave: *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei*, degradação, Ocratoxina α

1. INTRODUÇÃO

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário, produzido principalmente por *Penicillium verrucosum* e diferentes espécies de *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* (SAMSON et al., 2004), de alta incidência como contaminante de uma ampla faixa de produtos, incluindo cereais (GONZÁLES et al., 2006) e seus derivados (DUARTE et al., 2010a; ZINEDINE et al., 2007), vinho (MURILLO-ARBIZU et al., 2010), café (VECCHIO; MINEO; PLANETA, 2012), cerveja (REINSCH et al., 2007), cacau (COPETTI et al., 2013) e carne (DALL'ASTA et al., 2010). A OTA apresenta efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos e cancerígenos, tendo como principais alvos de toxicidade o rim e o fígado (RINGOT et al., 2006).

Esses aspectos e os limites máximos toleráveis em diferentes matrizes alimentícias ainda são discutidos em vários países (MALIR; OSTRY; NOVOTNA, 2013). No Brasil, os níveis estão regulamentados pela RDC nº7 de fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011), variando de 2-20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo o prazo para adequação destes limites prorrogado para 1º de janeiro de 2017 pela RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013 (ANVISA, 2013). Visando atender esta demanda, métodos de degradação físicos (VAR; KABAK; ERGINKAYA, 2008), químicos (BELLÍ et al., 2005) e biológicos (PÉTERI et al., 2007) vem sendo propostos.

Os métodos biológicos se destacam em pesquisas por permitirem condições brandas de aplicação e por diminuírem a possibilidade de produção de derivados tóxicos (ZHU et al., 2015). São considerados métodos biológicos aqueles que fazem uso de enzimas, especialmente a carboxipeptidase A para a OTA (PÉTERI et al., 2007), bem como cepas de microrganismos não toxigênicos (VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000), especialmente os produtores de carboxipeptidase A que atua hidrolisando a ligação amida que une a molécula de fenilalanina a OT α , sendo este o produto de detoxificação da micotoxina (MUÑOZ; BLASZKEWICZ; DEGEN, 2010).

Para demonstrar a eficiência de um protocolo de descontaminação é necessário dispor de métodos de extração e detecção do analito e seus derivados de maneira rápida e eficiente. No caso específico da ocratoxina A, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência (FL) é a mais indicada pelo uso de colunas de alta resolução, sensibilidade dos detectores de fluorescência, rapidez e potencial para automatização (AFSAH-HEJRI; JINAP; MIRHOSSEINI, 2012).

Este trabalho teve como objetivo validar um método de extração e detecção para a análise da OTA e do seu metabolito OT α em CLAE-FL para acompanhar a eficiência do processo de degradação realizado *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS E MICRORGANISMOS

Acetonitrila (ACN) foi adquirida da Baker e o ácido acético da Merck. Água foi purificada em um sistema de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) usando membrana filtrante com diâmetro de poro de 0,45 μm . ACN e água Milli-Q foram desgaseificadas em banho ultrassônico a temperatura ambiente durante 30 minutos para serem utilizadas

como fase móvel na etapa cromatográfica. O padrão de ocratoxina A com 98-99% de pureza foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Uma solução trabalho contendo $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da micotoxina foi preparada em benzeno:ácido acético (99:1). O padrão de OT α foi preparado pela hidrólise ácida com HCl 6 N sob refluxo (72 h) do padrão de OTA (VAN DER MERWE; STEYN; FOURIE, 1965).

Rhizopus oryzae CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9444 foram adquiridos da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello e mantidos em meio Ágar Batata Dextrose a 4 °C com repique mensal.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Validação de método para determinação de OTA e OT α

A extração da micotoxina e seu metabólito do meio de cultivo foi realizada conforme método descrito por Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002), adaptada para este trabalho. Para isso em 10 g de meio de cultivo foram adicionados 2 mL de HCl 2 N e 10 mL de clorofórmio seguido de agitação em vórtex (durante 1 minuto) e centrifugação (3220 g durante 10 minutos). A partição com clorofórmio foi repetida três vezes e após centrifugação (3220 g durante 10 minutos) a fração clorofórmica foi evaporada para posterior análise em CLAE-FL.

Os extratos foram ressuspensos em 1 mL da mistura de solventes que compõem a fase móvel (50% de Acetonitrila e 50% de água Milli-Q acidificada 1% com ácido acético) e injetados no sistema cromatográfico. A eluição cromatográfica pela coluna Kromasil C18 (5 μm 150x4,6 mm) foi realizada à 35 °C, com vazão de 0,6 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ com detector de fluorescência padronizado com comprimentos de onda de excitação e emissão de 333 nm e 460 nm, respectivamente. A separação de OTA e OT α foi avaliada em termos do fator de retenção (k) (Equação 1) e fator de separação (α) (Equação 2). O método foi validado conforme os indicativos de mérito, linearidade, LQ, LD, recuperação.

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

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Onde:

t_R - tempo de retenção do analito

t_M - tempo de retenção do solvente

A curva analítica foi realizada usando soluções dos padrões de OTA e OT α diluídos na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações crescentes (0,05 -20 ng.mL⁻¹) e em triplicata. Com isso, foram determinados a faixa de linearidade, os coeficientes de determinação e correlação e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Na determinação de LD e LQ foram realizadas injeções das soluções de OTA e OT α diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações decrescentes até obtenção de uma relação de 3:1 e 10:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

A exatidão (recuperação) foi realizada após fortificação de amostras brancas com solução padrão de OTA e OT α , em três níveis de concentração (3, 5 e 10 vezes o LQ), em triplicata. Para fortificação do meio de cultivo a solução com a micotoxina foi adicionada aguardando a solidificação do meio para posterior extração.

2.2.2 Ensaio de degradação *in vitro*

O inóculo dos microrganismos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9414, foi obtido cultivando os fungos em placas de petri contendo 15 mL de meio Agar Batata Dextrose e suspensão de esporos (4x10⁶ esporos.mL⁻¹) durante 7 dias a 30 °C até a esporulação.

Para o experimento de degradação a solução de OTA foi adicionada a 15 mL de meio Agar Batata Dextrose (concentração inicial de 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubada com solução de esporos de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 ou *Trichoderma reesei* QM 9414 (4.10⁶ esporos.mL_{meio}⁻¹) a 30 °C durante 120 horas.

Os reatores foram retirados no tempo zero e a cada 24 horas para o acompanhamento do desenvolvimento da biomassa fúngica, através da determinação de glicosamina e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e para a determinação do conteúdo de OTA e OT α , conforme método validado (descrito no item 2.1). Um controle (sem presença de OTA) foi realizado para cada intervalo de experimento para corrigir a possível interferência na detecção de OTA e seu metabólito.

O desenvolvimento microbiano foi determinado através da estimativa do teor de glicosamina, conforme Aiddo, Hendry e Wood (1981), que consistia em adicionar 5 mL de HCl 6 N à biomassa, seguido de aquecimento a 100 °C durante 2 horas. Ao extrato obtido era adicionada uma solução de acetil-acetona seguida de aquecimento em banho de água fervente por 20 minutos. Após o resfriamento foi adicionado etanol e o reagente de Erlich (2,67 g DAB- p-dimetilaminobenzaldeído dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL de ácido clorídrico), mantendo-se a 65 °C em estufa durante 10 minutos. A estimativa da concentração de n-acetilglicosamina foi realizada empregando as unidades de absorvância em espectrofotômetro a 530 nm com curva padrão de glicosamina (0,8-17,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) localizado na Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Para tal 5-10 mm do micélio dos cultivos foram mantidos durante 48 horas a 4 °C em solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8. As amostras foram lavadas com água destilada e desidratadas com etanol em diferentes concentrações (30, 50, 70 e 95%), permanecendo durante 20 minutos em cada concentração e após em etanol absoluto durante 45 minutos. As amostras foram secas no ponto crítico com dióxido de carbono líquidas, colocadas em *stubs* usando adesivo “Double-*stik*” e cobertas com ouro-paládio (recobrimento durante 120 s). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM- 661-LV) com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) (Thermo Scientific, USA) a 25 kV e com magnitude de 1000 a 5000x (TAO; JIA; ZHOU, 2014)

2.2.4 Análise estatística

A análise estatística da significância da redução de OTA e produção de OT α foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

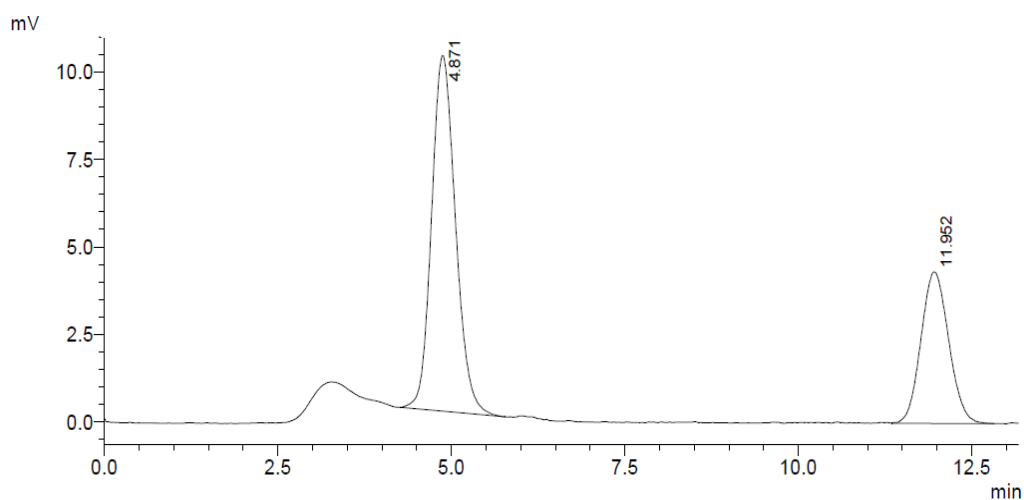
3.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Na primeira etapa do estudo foram estabelecidas as condições cromatográficas para a separação da OTA e OT α em CLAE-FL. As condições de temperatura e vazão descritas no item 2.2.1 propiciaram a separação dos analitos conforme ilustra a Figura 1.

Para a eluição de OT α foram necessários 4,8 minutos e para OTA 11,9 minutos. Os fatores de retenção (k) e separação (α) foram $k_{OT\alpha}=0,9$, $k_{OTA}=3,6$ e $\alpha=4$.

Cabe mencionar que quanto maior o tempo de retenção na coluna maior é o seu fator de retenção (parâmetro k). No caso destes analitos os valores de k foram de 0,9 e 3,6, portanto dentro da faixa recomendável para a obtenção de separações satisfatórias (0,5 e 20) (HARRIS, 2003). O fator de separação (α) mede a seletividade de um sistema cromatográfico, sendo que quanto maior o valor de α , melhor é a separação entre os dois componentes. Neste caso, o valor foi maior que 1, conforme recomendado para a boa separação de dois picos adjacentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 1- Cromatograma de OTA e OT α em CLAE-FL



Com a separação de OTA e OT α concluída, foram construídas as curvas analíticas dos padrões e a estimativa dos indicadores de eficiência da relação quantitativa concentração *versus* sinal (Tabela 1).

Para OTA, o limite de detecção (LD) foi de 0,013 ng.g⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) foi de 0,025 ng.g⁻¹. Através de análise de regressão linear foi determinada a linearidade ($R=1,000$) no intervalo de 0,1-10 ng.mL⁻¹. No que diz respeito à OT α , o LD e o LQ foram de 0,006 ng.g⁻¹ e 0,013 ng.g⁻¹, respectivamente. A linearidade para OT α variou de 0,05-20 ng.mL⁻¹ ($R=1,000$).

Os resultados mostraram que o procedimento cromatográfico foi adequado para quantificação da micotoxina e seu metabólito, uma vez que seus indicadores cumprem as recomendações de análise de confiabilidade, conforme a ANVISA (2003) e o INMETRO (2003).

Tabela 1- Características cromatográficas de OTA e OT α

Parâmetros	OTA	OTα
Equação da curva	$y = 11874,62x + 1208,54$	$y = 24435,41x + 2762,62$
Linearidade	0,1- 10 ng.mL ⁻¹	0,05- 20 ng.mL ⁻¹
Coefficiente de correlação	1,000	1,000
Coefficiente de determinação	0,998	0,998
LD _i	0,05 ng.mL ⁻¹	0,025 ng.mL ⁻¹
LQ _i	0,10 ng.mL ⁻¹	0,05 ng.mL ⁻¹

LD_i - limite de detecção do instrumento; LQ_i- limite de quantificação do instrumento

A extração da OTA e OT α do meio de cultivo foi realizada através do método descrito no item 2.2.1, obtendo-se os limites de detecção e quantificação, recuperação e coeficiente de variação, descritos na Tabela 2. Eles mostram que o método pode ser empregado para acompanhar o efeito dos processos de degradação de OTA e produção de OT α , apresentando valores de recuperação dentro do limite recomendado para OTA em concentrações inferiores a 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (50-120%) (EC, 2006b).

Tabela 2- Indicativos de mérito para o método de extração de OTA e OT α

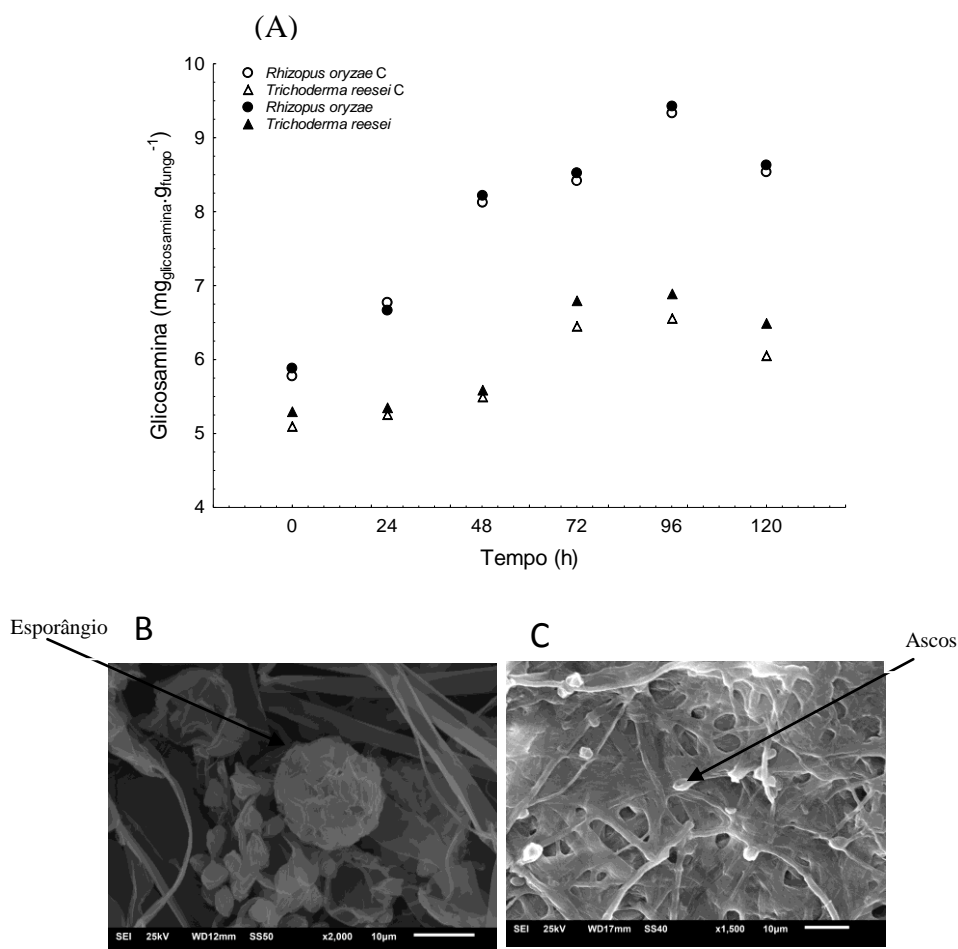
Parâmetro	OTA	OTα
LD _m	0,013ng.g ⁻¹	0,006 ng.g ⁻¹
LQ _m	0,025ng.g ⁻¹	0,013ng.g ⁻¹
Recuperação	80%	102%
CV	10%	6%

LD_m - limite de detecção do método; LQ_m- limite de quantificação do método; CV-coeficiente de variação

3.2 DEGRADAÇÃO DE OTA *IN VITRO*

No experimento de degradação de OTA usando os microrganismos o desenvolvimento da biomassa fúngica foi acompanhado pelo conteúdo de glicosamina e por microscopia eletrônica de varredura (Figura 2).

Figura 2- (A) Acompanhamento do crescimento fúngico em presença e ausência de ocratoxina A pelo conteúdo de glicosamina e microscopia eletrônica de varredura para *Rhizopus oryzae* (B) e *Trichoderma reesei* (C) em 96 horas de cultivo em presença de OTA.



Rhizopus oryzae e *Trichoderma reesei* C- cultivo na presença de OTA; *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*- cultivo na ausência de OTA

A curva de crescimento microbiano não foi afetada pela presença da micotoxina, conforme ficou demonstrado pelo gráfico das fases características (SCHMIDELL et al., 2001), sendo a fase de adaptação (*lag*) superior para o *Trichoderma reesei*. Além disso, a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) encontrada para *Rhizopus oryzae* foi $0,008 \text{ h}^{-1}$ enquanto que para *Trichoderma reesei* foi de $0,004 \text{ h}^{-1}$. Comportamento semelhante foi encontrado por Kupski et al. (2014) ao empregar ambos microrganismos para produzir celulase durante fermentação em estado sólido.

Em função da classe de cada microrganismo e conforme ilustrado pela Figura 2B e 2C ocorreu um comportamento típico da espécie. *Rhizopus oryzae* é um fungo

zigomiceto, que possui hifas cenocíticas que facilitam sua multiplicação pois o micélio se espalha sobre o substrato, produzindo ocasionais esporângios na extremidade de algumas hifas que se elevam verticalmente. Quando os esporângios se rompem (Figura 2B), os esporos se dispersam no ambiente e germinam sobre novos substratos. *Trichoderma reesei* é um ascomiceto e o fato de seus esporos sexuais ficarem armazenados em células (ascos) que são formados após a fusão das hifas (Figura 2C), ocasionando uma menor taxa de esporulação (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; GRIFFIN, 1993;).

Como ilustra a Tabela 3 os percentuais de redução dos níveis de OTA encontrados para cada microrganismo foi distinto, bem como o teor de metabólito formado.

Tabela 3- Degradação *in vitro* de ocratoxina A ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*

Tempo (h)	<i>Rhizopus oryzae</i>		<i>Trichoderma reesei</i>	
	Redução OTA (%)	Produção OT α (ng.g $^{-1}$)	Redução OTA (%)	Produção OT α (ng.g $^{-1}$)
0	N.D	N.D	N.D	N.D
24	63,5(15,9) ^a	36,0 (9,9) ^a	36,8 (7,8) ^c	N.D
48	68,0 (9,2) ^a	38,7(10,0) ^a	46,8 (2,6) ^b	40,7(18,0) ^c
72	49,6 (5,2) ^b	33,8(14,4) ^a	57,7 (8,7) ^a	179,6(15,0) ^a
96	51,5 (8,4) ^b	30,4(15,0) ^a	53,2(5,6) ^a	149,0(2,0) ^b
120	51,0 (2,0) ^b	31,0(15,0) ^a	52,6(10) ^a	147,0(6,0) ^b

N.D- não detectado. Resultados expressos com Média (CV). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Embora ambos os microrganismos tenham se mostrado capazes de metabolizar OTA à OT α , o cultivo com *Rhizopus oryzae* promoveu uma redução máxima de 68% da concentração de OTA em 48 horas, seguida de redução significativa ($p < 0,05$) após este período. A produção de OT α foi verificada a partir de 24 horas com um valor máximo de $38,7 \text{ ng}_{\text{OT}\alpha}\cdot\text{g}_{\text{meio}}^{-1}$ em 48 horas. No entanto, este não diferiu estatisticamente dos outros tempos de estudo. O cultivo do *Trichoderma reesei* promoveu uma redução máxima de OTA de 57,7% em 72 horas, mantendo-se praticamente constante após este período. A produção de OT α foi verificada a partir de 48 horas de estudo, apresentando valor máximo de concentração de $179,6 \text{ ng}_{\text{OT}\alpha}\cdot\text{g}_{\text{meio}}^{-1}$ em 72 horas. Apesar de apresentarem picos de degradação e produção em tempos diferentes, ambos microrganismos

apresentaram uma correlação alta entre a produção de OT α , para *Trichoderma reesei* R:-0,958 e para *Rhizopus oryzae* R: -0,938 e significativa ($p < 0,05$) com a concentração de OTA.

Os tempos necessários para ocorrer a máxima redução de OTA com a produção de OT α estão relacionados ao perfil de crescimento ilustrado na Figura 1A, sendo que para ambos os microrganismos este foi verificado na fase de crescimento exponencial. Nela, o microrganismo atinge a sua velocidade máxima de crescimento e muitas enzimas atuam em maior atividade nesse período (SCHMIDELL et al., 2001).

Apesar da redução de OTA ocasionada por *Trichoderma reesei* ser inferior (10%) à de *Rhizopus oryzae* (Tabela 3), a produção de OT α foi superior (4,6 vezes) nas condições ótimas para cada microrganismo, 48 e 72 h, respectivamente. De acordo com Abrunhosa, Venâncio e Teixeira (2011) a transformação de OTA em OT α durante processo de degradação biológica ocorre pela ação de proteases, especialmente carboxipeptidase A. No entanto, a literatura menciona outras enzimas que apresentam capacidade de degradação de OTA sem a obrigatoriedade de formação de OT α , como por exemplo, as lipases (STANDER et al., 2000); cuja produção por *Rhizopus oryzae* vem sendo amplamente relatada (HIOL et al., 2000; MINNING et al., 2001). Além disso, há menções que pode ocorrer adsorção de micotoxinas na superfície de microrganismos (BEJAOUÏ et al., 2005; PÉTERÏ et al., 2007; PIOTROWSKA; ZAKOWSKA, 2000;), podendo ser outro fator dessa variabilidade de resultado.

Diferentes microrganismos foram identificados como possíveis agentes de detoxificação de OTA. Varga et al. (2005) avaliaram diferentes fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e *Mucor* em relação a sua habilidade de degradar OTA (7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Dentre estes, isolados de *Rhizopus*, nomeadamente *Rhizopus stolonifer* e *Rhizopus microsporus*, apresentaram ação degradadora que reduziu 95% em 16 dias os teores de OTA quando o cultivo se realizava em meio YES (2% de extrato de levedura e 15% de sacarose). Os resultados, apesar de superiores aos apresentados neste trabalho, foram obtidos em tempos maiores e com uma espécie diferente da utilizada.

Patharajan et al. (2011) avaliaram seis cepas de leveduras. Dentre estas, 3 cepas apresentaram potencial de degradação (*Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guillimonodii* e *Rhodococcus erythropolis*) e foram utilizadas no estudo de biodegradação *in vitro*, na sua temperatura ótima de ação, sobre a concentração de OTA variando entre 5-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo encontrado percentuais de redução de 7,5-81%.

Porém, nenhum dos produtos de degradação como OT α ou fenilalanina foram encontradas durante o estudo *in vitro*.

Abrunhosa et al. (2014) empregaram diferentes cepas de *Pediococcus parvulus* isoladas do vinho do Douro e obtiveram taxas de redução que variaram de 50-90% em cultivo MRS contendo uma concentração inicial de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Adicionalmente, os autores confirmaram por CLAE/MS-MS a produção de OT α (0,6-0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Cabe ressaltar que estes autores avaliaram condições ótimas de atuação, enquanto que nesta etapa do presente trabalho está sendo realizada uma triagem de agentes biológicos capazes de degradar OTA em seu metabólito (OT α).

Antes de confirmar a potencialidade de aplicação destes sistemas, são necessários estudos para confirmar se o metabólito não apresenta ação tóxica e não há formação de muitos compostos secundários. Estas informações podem subsidiar trabalhos que busquem fontes alternativas de enzimas para a degradação de micotoxinas em matrizes alimentícias.

4. CONCLUSÃO

O método de extração e detecção validado em CLAE-FL foi eficiente para detecção de OTA e OT α em meio de cultivo, com a percentagem de recuperação entre 80-102%.

O estudo de degradação *in vitro* com *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* apresentou resultados de redução de OTA de 68% e 57,7%, respectivamente, com produção do metabólito OT α de 38,7 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ e 179,6 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Sendo assim, eles podem constituir uma fonte de enzimas que podem ser utilizadas para a desintoxicação de OTA de produtos agrícolas contaminados.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; INÊS, A.; RODRIGUES, A.I.; GUIMARÃES, A.; PEREIRA, V.L.; PARPOT, P.; MENDES-FALA, A.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 45-52, 2014.

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, 2002.

ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J.A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 351-355, 2011.

AFFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; MIRHOSSEINI, H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 113-119, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Guide for validation of analytical and bioanalytical methods]. RDC No 899, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC nº7 fevereiro de 2010. Disponível em: <http://brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/102985-7.html> . Acesso em nov 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 59, de 26 de fevereiro de 2013. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, n. 252, ISSN 1677-7042, 2013.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 6-9, 1981.

ALEXOPOULOS, G.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, John Wiley and Sons, New York, 1996.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Conidia of black aspergilli as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8224–8229, 2005.

BELLÍ, N.; RAMOS, A.; CORONAS, I.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 839-844, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 456, 2006.

COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T.; NESTER, M.A.; EFRAIM, P.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 100-104, 2013.

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

DUARTE, S.C.; BENTO, J.; PENA, A.; LINO, C.M.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; ALVES, M.R.; PEREIRA, J.A. Influencing factors on Bread-derived exposure of ochratoxin A: Type, origin and composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2139-2147, 2010a.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union, L229 p. 7-9, 2006

GONZÁLES, L.; JUAN, C.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 223-227, 2006.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. Segunda Edição, Wiley-Liss, 1993.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, p.876, 2003.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 421-430, 2000.

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

KUPSKI, L.; SILVELLO, M.A.C.; FONTES, M.R.V.; LIMA, T.S.; TREICHEL, H.; BADIALE-FURLONG, E. *Rhizopus oryzae* Cellulases: A New Approach to Degrading Lignocellulosic Material. **Journal of Food Biochemistry**, v.39, n. 2, p. 129-138, 2015.

MALIR, F.; OSTRY, V.; NOVOTNA, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. **Toxin reviews**, v. 32, n. 2, p. 19-33, 2013.

- MINNING, S.; SERRANO, A.; FERRER, P.; SOLÁ, C.; SCHMID, R.D.; VALERO, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 59-70, 2001.
- MUÑOZ, K.; BLASZKEWICZ, M.; DEGEN, G.H. Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 27, p. 2623-2629, 2010.
- MURILLO-ARBIZU, M.T.; AMÉZQUETA, S.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; CERAIN, A.L. Occurrence of ochratoxin A in southern Spanish Generous wines under the denomination of origin “ Jerez-Xérès-Sherry and ‘Manzanilla’ Sanlúcar de Barrameda”. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1054-1064, 2010.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K.R.N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 290-296, 2011.
- PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C.; VARGA, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 205-210, 2007.
- PIOTROWSKA, M.; ZAKOWSKA, Z. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. **Food Biotechnology**, v. 17, p. 307–310, 2000.
- REINSCH, M.; TÖPFER, A.; LEHMANN, A.; NEHLS, I.; PANNE, U. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 312-317, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1 p. 18-46, 2006.
- SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61, 2004.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia industrial-Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo:Edgard Blucher Ltda, 2001.

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

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265-271, 2014.

VAN DER MERWE K. J.; STEYN P. S.; FOURIE L. Mycotoxins Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Journal of Chemical Society**, p. 7083-7088, 1965.

VAR, I.; KABAK, B.; ERGINKAYA, Z. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. **Food Control**, v. 19, n. 6, p. 592-598, 2008.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 321-328, 2005.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n 1-2, p. 1-7, 2000.

VECCHIO, A.; MINEO, V.; PLANETA, D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 220-223, 2012.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.M.; JUAN, C.; MOJEMMI, B.; MOLTÓ, J.C.; BOUCLOUZE, A.; CHERRAH, Y.; IDRISSE, L.; EL AOUAD, R.; MAÑES, J. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 3, p. 285-291, 2007.

ARTIGO 4. COMPARAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE OCRATOXINA
A E SEU METABÓLITO OCRATOXINA α EM NEUTRÓFILOS HUMANOS

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Química Aplicada da Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto

RESUMO

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos filamentosos em produtos alimentares, possui efeitos cancerígenos, teratogênicos e nefrotóxicos e um alto tempo de meia-vida no sangue humano. Apesar dos recentes esforços para descontaminar OTA em seu metabólito OT α , há poucos relatos na literatura que comparam os efeitos tóxicos delas. Assim, propõe-se, pela primeira vez, o estudo e a comparação dos efeitos tóxicos de OTA e do seu metabólito OT α em neutrófilos humanos, bem como a elucidação do mecanismo de toxicidade. Os resultados obtidos demonstram que a OTA induz o estresse oxidativo nos neutrófilos humanos, além da depleção dos níveis de ATP e alterações no potencial mitocondrial levando à morte celular por necrose, enquanto OT α não induziu efeitos tóxicos significativos. O mecanismo de toxicidade da OTA foi atribuído à elevação dos níveis de Ca²⁺ intracelulares, especialmente, através da liberação das reservas internas.

Palavras-chave: ocratoxina A, ocratoxina α , estresse oxidativo, depleção de ATP, necrose, Ca²⁺ intracelular.

1. INTRODUÇÃO

Ocratoxinas são micotoxinas produzidas por diferentes espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Entre os diferentes tipos de ocratoxinas a ocratoxina A (OTA) é a mais comumente encontrada (AMÉZQUETA et al., 2012). Ela é um derivado de policetídio com a porção diidroisocumarina ligada por uma ligação amida com a porção carboxila da fenilalanina. O seu nome deriva do *Aspergillus ochraceus*, o fungo a partir do qual foi isolada pela primeira vez (VAN DER MERWE et al., 1965).

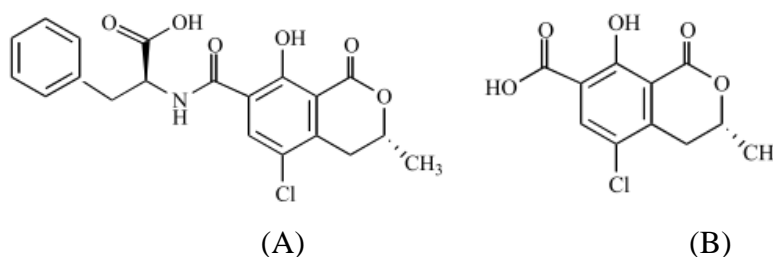
OTA é comumente encontrada em cereais e seus derivados (ZINEDINE et al., 2010), uvas (MITCHELL et al., 2004), café (VECCHIO et al., 2012), cacau (COPETTI et al., 2013), cerveja (REINSCH et al., 2007); carne (DALL'ASTA et al., 2010) e especiarias (OZBEY; KABAK, 2012). A exposição humana à OTA é frequente e pode ocorrer por duas vias: exposição direta devido ao consumo de produtos vegetais contaminados, ou devido à exposição indireta através do consumo de produtos de origem animal, contendo quantidades residuais da micotoxina ingerida pelos animais (DUARTE; PENA; LINO, 2009).

Os efeitos tóxicos de OTA descritos são a inibição da síntese proteica (CREPPY et al, 1983), danos oxidativos, aumento da peroxidação lipídica (RAHIMTULA et al. 1988), ligação à proteínas do DNA, alteração da homeostase do cálcio (KHAN et al. 1989), diminuição de reações de oxidação mitocondrial (MEISNER; CHAN, 1974) e indução de apoptose em diversos tipos de células (BOUAZIZ et al, 2008; RINGOT et al, 2006). Os dados epidemiológicos humanos são escassos, sendo o significado de segurança de OTA em alimentos limitado aos dados em animais, onde a toxicidade renal e a carcinogenicidade são considerados os principais efeitos (MARIN-KUAN et al., 2008).

Existem vários relatos na literatura sobre a transformação de OTA em diferentes metabólitos, como ocratoxina B (OTB), ocratoxina A com anel aberto (OP-OA), OTA 4-hidroxilada, OTA 10-hidroxilada, OTA sem fenilalanina ($OT\alpha$), OTB sem fenilalanina ($OT\beta$), OTA hidroquinona (OTHQ) e ocratoxina A decolorada (WU et al., 2011b). Alguns destes, como OTHQ e OP-OA, são muito mais tóxicos que OTA (XIAO et al., 1996). $OT\alpha$ é o principal metabólito obtido durante a biodegradação de OTA por microrganismos, mediante hidrólise com carboxipeptidase A, que consiste numa estratégia promissora e economicamente viável para o controle dos níveis de OTA em alimentos e rações (ABRUNHOSA et al., 2011).

Apesar dos esforços para transformar OTA (Figura 1A) em seu metabólito $OT\alpha$ (Figura 1B), são poucos os relatos na literatura comparando o efeito tóxico dessas toxinas. Xiao et al. (1996) avaliaram a toxicidade de OTA e seu metabólito em ratos com seis semanas. Os autores observaram uma taxa de morte entre 30 e 90% quando os ratos foram tratados durante 72 horas com OTA nas concentrações de 20 e 50 mg.kg⁻¹, respectivamente; enquanto que para $OT\alpha$ nenhum efeito foi observado. O menor efeito tóxico de $OT\alpha$ também foi observado por Müller et al. (2003) em células humanas THP-1.

Figura 1- Estrutura química de OTA (A) e seu principal metabólito $OT\alpha$ (B).



É importante ressaltar que a OTA é frequentemente encontrada no sangue humano e, após uma única dose oral permanece em circulação durante aproximadamente 35 dias, devido à cinética de eliminação renal desfavorável (SORRENTI et al., 2013; REDDY; BHOOLA, 2010). Devido ao contato direto e permanência no sangue humano, é importante estudar o efeito toxicológico da OTA e do seu metabolito em células sanguíneas humanas uma vez que na literatura são poucos os relatos sobre esta questão (LIU et al., 2012). Os neutrófilos humanos são um interessante modelo *in vitro* para estudar o comportamento de OTA e OT α , uma vez que são o tipo mais comum de células brancas do sangue, compreendendo cerca de 50-70%, e são a primeira linha de defesa do organismo. Durante os processos inflamatórios, os neutrófilos produzem uma variedade de espécies reativas, entre outros mediadores, que atuam em conjunto para reverter um processo inflamatório. No entanto, uma produção descontrolada desses mediadores provoca danos irreversíveis (CHEN et al., 2014). Assim, propõe-se aqui, pela primeira vez, estudar o e comparar os efeitos toxicológicos de OTA e do seu metabolito OT α em neutrófilos humanos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os seguintes reagentes foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA): RPMI 1640, soro bovino fetal, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), cloreto de difeniliodônio (DPI), solução salina tamponada com fosfato, sem cloreto de cálcio e magnésio (PBS), 4-metil-4'-[3,5-bis (trifluorometil) -1H-pirazol-1-il]-1,2,3-tiadiazole-carboxanilida (BTP2), 2-aminoetóxi difenilborato (2-APB), solução de azul de tripano, luciferina, luciferase. *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* foi obtido da Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha) e *BD™ MitoScreen Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit* foi adquirido na BD Biosciences (San Diego, EUA). *DC Protein Assay* foi adquirido na Bio-Rad (Califórnia, EUA). FLUO-4/AM foi obtido na Life Technologies (Califórnia, EUA). Os tubos de vácuo com K₃EDTA foram adquiridos da Vacutainer (UK). Os compostos empregados no presente estudo, OTA e OT α , foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e KareBay™ Biochem, Inc. (Nova Jersey, EUA), respectivamente.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Isolamento de neutrófilos humanos

Após consentimento, foi coletado sangue venoso de voluntários saudáveis por punção venosa antecubital em tubos de vácuo com K₃EDTA. O isolamento de neutrófilos humanos foi realizado pelo método de centrifugação com gradiente de densidade, conforme descrito por Freitas et al. (2008). As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 [(pH 7,4) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 0,1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina] (APÊNDICE 1). As incubações com OTA e OT α foram sempre realizadas a 37 °C em câmara umidificada com 5% de CO₂.

2.2.2 Viabilidade celular

Os neutrófilos isolados (4x10⁶ células.mL⁻¹) foram incubados com OTA e OT α (0-300 μ M) durante 8 a 24 horas. Os neutrófilos em suspensão foram adicionados a um volume igual à solução de azul de tripano 0,4% em microtubo e suavemente misturados. Depois de 2 minutos em banho de gelo, o número de neutrófilos e a viabilidade (células viáveis com exclusão do azul de tripano) foram contadas.

2.2.3 Avaliação da apoptose e necrose dos neutrófilos

2.2.3.1 Ensaio de Anexina-V e iodeto de propídio (PI)

Os neutrófilos isolados (4x10⁶ células.mL⁻¹) foram incubados com OTA e OT α (0-300 μ M) durante 4 a 20 horas. Após incubação, as células apoptóticas e necróticas foram analisadas por citometria de fluxo, após coloração simultânea com anexina-V marcada com fluoresceína e PI (FREITAS et al., 2014), utilizando kit comercial de Annexin-V-FLUOS Staining, de acordo com as instruções do fabricante. Os sinais de fluorescência foram coletados em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (APÊNDICE 2). Um polígono foi definido de acordo com propriedades de dispersão de luz dos neutrófilos (em um gráfico de dispersão lateral vs. frontal), excluindo os detritos celulares e outras células do sangue, restringindo a análise aos neutrófilos. Pelo menos 10.000 células foram

recolhidas e o seu sinal de fluorescência detectado e os dados analisados utilizando o software BD Accuri™C6. A fluorescência verde devido a Anexina-V foi seguida no canal 1 (FL1) e representada como um histograma de coloração FL1. Fluorescência devido à incorporação do PI foi seguida em canal 3 (FL3).

2.2.3.2 Alterações citomorfológicas

Os neutrófilos isolados (4×10^6 células.mL⁻¹) foram incubados com OTA e OT α (0-300 μ M) durante 2 a 24 horas. Após incubação, as amostras foram citocentrifugadas (28 g, 5 minutos), coradas com Hemacolor® (APÊNDICE 3), e contadas por microscopia óptica (100x) para determinar a proporção de células com alterações citomorfológicas (FREITAS et al., 2014).

2.2.4 Determinação dos níveis de ATP

Os neutrófilos isolados (4×10^6 células.mL⁻¹) foram incubados com OTA e OT α (0-300 μ M) durante 4 a 20 horas. Após a incubação, as células foram acidificadas até uma concentração final de 5% de HClO₄ e centrifugadas a 1600 g, 4 °C, durante 1 min. Os níveis de ATP foram determinados após a reação de 100 μ L de sobrenadante neutralizado com uma solução de luciferina/luciferase. Padrões de ATP (0-10 μ M) foram preparados em 5% HClO₄ (COSTA et al., 2007). O sedimento foi ressuspenso em NaOH 0,4 M e a quantificação protéica foi realizada em leitor de microplacas utilizando o kit DC Protein Assay de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como depleção de ATP em relação ao controle (APÊNDICE 4).

2.2.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de neutrófilos

Os neutrófilos isolados (4×10^6 células.mL⁻¹) foram incubados com OTA e OT α (0-300 μ M) durante 2 a 24 horas. Após este período, a alteração no $\Delta\Psi_m$ foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o kit BD™ MitoScreen Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection, de acordo com as instruções dos fabricantes. Os sinais de fluorescência foram coletados por um citometro de fluxo BD Accuri™ C6 (APÊNDICE 5). JC-1 é um corante catiônico que exibe potencial de membrana dependente da

acumulação nas mitocôndrias, indicado por uma mudança de emissão de fluorescência de verde (FL1) para vermelho (FL2). Quando JC-1 emite fluorescência no canal FL-1 e carece de fluorescência no canal FL-2 é indicativo de despolarização da membrana (COSSARIZZA; SALVIOLI, 2001).

2.2.6 Avaliação do estresse oxidativo dos neutrófilos

Os neutrófilos isolados (6×10^6 células.mL⁻¹) foram pré-incubados durante 30 minutos com DCFH-DA 100 µM. As células foram então lavadas com PBS e centrifugadas a 870 g, 20 °C, durante 5 minutos (RAMYAA; PADMA, 2013). Após, o número de células foi ajustado para 4×10^6 células.mL⁻¹ em meio RPMI 1640 e incubadas com OTA ou OTα (0-75 µM) durante 2 a 8 horas. A intensidade de fluorescência foi medida em leitor de microplaca a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. Para garantir a eliminação de possíveis interferências no sinal de fluorescência, um ensaio contendo OTA ou OTα e DPI (15 µM) foi realizado simultaneamente. Os valores foram expressos como o aumento da produção de espécies reativas (% do controle) (Equação 1).

$$\text{Produção de espécies reativas} = \left\{ \left[\left(\frac{\text{FL}_{\text{OTA/OT}\alpha} - \text{FL}_{\text{Controle}}}{\text{FL}_{\text{Controle}}} \right) \times 100 \right] - \left[\left(\frac{\text{FL}_{\text{DPI}} - \text{FL}_{\text{Controle}}}{\text{FL}_{\text{Controle}}} \right) \times 100 \right] \right\} \quad (1)$$

Onde:

FL_{OTA/OTα}- Fluorescência na presença de OTA ou OTα.

FL_{DPI}- Fluorescência na presença de OTA ou OTα e DPI.

FL_{Controle}- Fluorescência na ausência de OTA ou OTα.

2.2.7 Ca²⁺ intracelular

2.2.7.1 Determinação dos níveis de Ca²⁺ intracelular

Os neutrófilos isolados (6×10^6 células.mL⁻¹) foram pré-incubados durante 30 minutos com Fluo 4 /AM 2 µM. As células foram lavadas com PBS, e centrifugadas a 870 g, 20 °C, durante 5 minutos. O número de células foi ajustado para 4×10^6 células.mL⁻¹ e incubadas com OTA ou OTα (0-300 µM) de 4 a 20 horas recolhendo-se os sinais de

fluorescência em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. Um polígono foi definido de acordo com propriedades de dispersão de luz dos neutrófilos (em um gráfico de dispersão lateral vs. frontal), excluindo os detritos celulares e outras células do sangue, restringindo a análise para neutrófilos. Pelo menos 10.000 células foram recolhidas e seu sinal de fluorescência detectado, no modo logarítmico e os dados foram analisados usando o software BD Accuri™ C6. A fluorescência verde foi seguida no canal 1 (FL1). Os resultados foram expressos como aumento de Ca^{2+} intracelular em comparação com o controle.

2.2.7.2 Inibidores dos canais de Ca^{2+}

O efeito de inibidores de canais de Ca^{2+} na determinação dos níveis de Ca^{2+} intracelular, ATP, e na indução estresse oxidativo foi avaliado. Para este fim, os inibidores em estudo, 2-APB (0, 10 e 100 μM) e BTP2 (0, 1 e 10 μM), foram adicionados 15 minutos antes da incubação dos neutrófilos com OTA, seguindo o protocolo descrito nos pontos 2.2.7.1, 2.2.6 e 2.2.5, para medir a concentração de Ca^{2+} , níveis de ATP e estresse oxidativo, respectivamente.

2.2.8 Análise estatística

A estatística foi calculada usando GraphPad Prism™ (versão 6.0; GraphPad Software). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), a partir de pelo menos três ensaios individuais. A comparação estatística entre grupos foi estimada usando a análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Bonferroni.

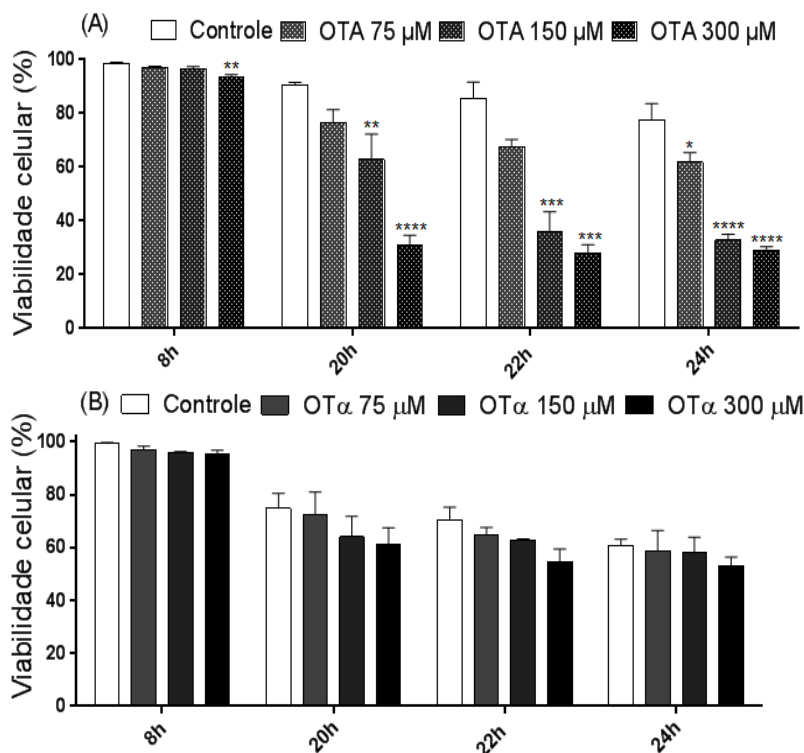
3. RESULTADOS

3.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade dos neutrófilos foi avaliada pelo método de azul de tripano após exposição à OTA e seu metabólito (Figura 2). OTA mostrou redução significativa na viabilidade celular dependente da concentração e do tempo de exposição a micotoxina. Por exemplo, depois de 20 horas de incubação com 300 μM de OTA, a viabilidade dos

neutrófilos diminuiu para aproximadamente 70%. Em contraste, não houve diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos neutrófilos tratados com OT α nas mesmas condições.

Figura 2- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) na viabilidade dos neutrófilos humanos, segundo método de exclusão de azul tripano.



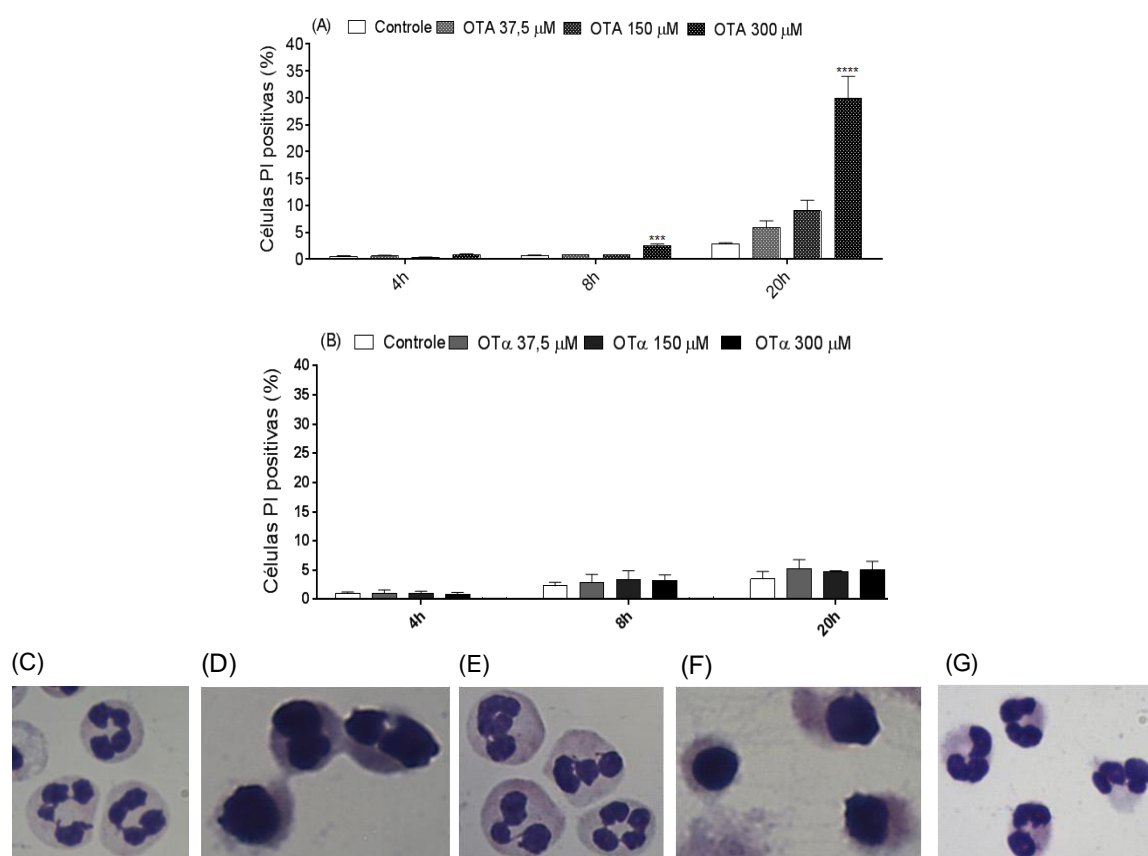
Resultados estão expressos como percentual de viabilidade celular. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$, quando comparados com o controle (ausência de OTA ou OT α). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 5$).

3.2 APOPTOSE E NECROSE DOS NEUTRÓFILOS

O efeito de OTA e OT α na indução de apoptose e necrose em neutrófilos humanos foi determinado pelo ensaio de Anexina-V e PI. A OTA e OT α não induziram a apoptose dos neutrófilos nas concentrações e nos tempos de exposição testados (*dados não apresentados*). No que diz respeito à necrose, medidas como células PI positivas, o comportamento mudou. A OTA induziu necrose celular variando de forma dependente da concentração e do tempo (Figura 3). Como exemplo, depois de 20 horas de incubação, as células necróticas aumentaram em 35% quando comparado com o controle (sem OTA). O metabólito não alterou o percentual de células PI positivas quando comparado com o controle (sem OT α). Estes resultados estão coerentes com a observação da citomorfologia

celular. A Figura 3C mostra imagens representativas onde é possível observar que 8 horas de incubação com 300 μM de OTA (Figura 3D) induz alterações morfológicas graves, enquanto que o controle (sem OTA) (Figura 3C) apresentou característica normal, com o núcleo segmentado, e a presença de 3-5 lóbulos ligados por heterocromatina. Após 20 horas de incubação (Figura 3F), foi claramente demonstrado que 300 μM de OTA induzia alterações citomorfológicas mais pronunciadas, onde os neutrófilos apresentam um núcleo fundido e transformado em uma grande estrutura escura. A Figura 3G demonstra que OT α após 20 horas de incubação causou alterações morfológicas menos pronunciadas quando comparado com OTA, o que está de acordo com os resultados obtidos com o método de coloração de PI.

Figura 3- Citometria de neutrófilos incubados com OTA (A) e OT α (B) (0-300 μM), usando o método de coloração com PI. Imagens representativas de preparações citocentrifugadas após coloração com Hemacolor®: controle (ausência de OT α ou OTA) (C) e OTA 300 μM (D), após 8 horas de incubação, e controle (E), e OTA 300 μM (F), OT α 300 μM (G), após 20 horas de incubação.

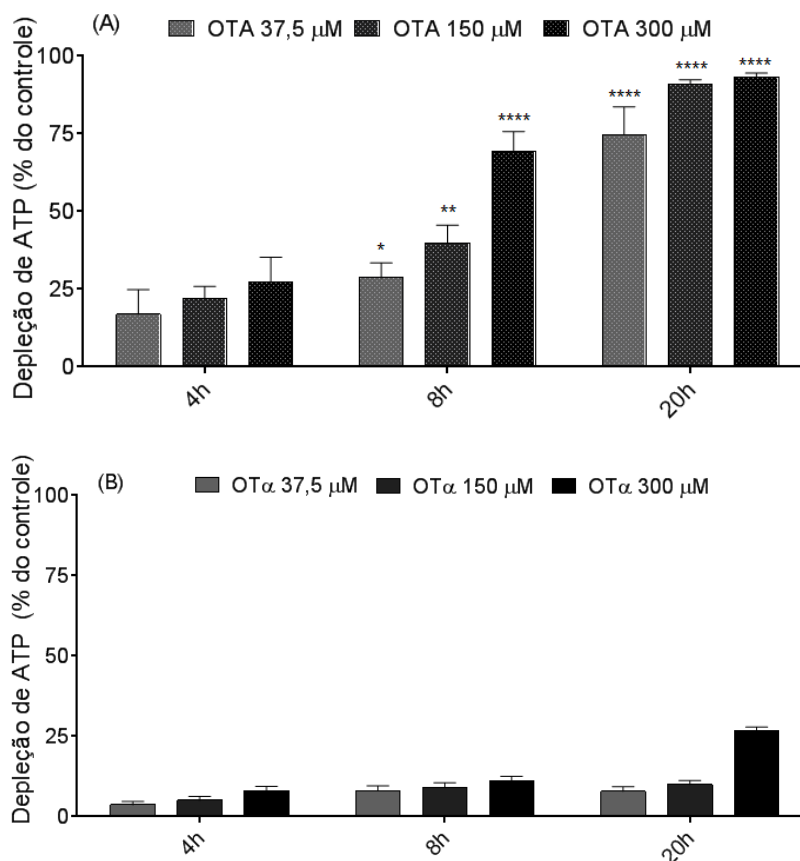


Resultados são expressos como percentual de células PI positiva. *** $p \leq 0.001$, e **** $p \leq 0.0001$, quando comparados com o controle (ausência de OTA ou OT α). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 5$).

3.3 DETERMINAÇÃO DE ATP

O efeito de OTA e OT α sobre os níveis de ATP estão representados na Figura 4. Corroborando com os resultados acima mencionados, o efeito de OTA foi mais pronunciado quando comparado com o seu metabólito. Assim, 8 horas de incubação com OTA 37,5 μ M foram suficientes para originar uma depleção significativa de ATP (Figura 4A). Além disso, OTA nas concentrações de 150 e 300 μ M ocasionou quase a depleção total de níveis de ATP, após 20 horas de incubação. Em contraste, nenhum efeito para OT α foi encontrado nas mesmas condições experimentais.

Figura 4- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) na depleção dos níveis de ATP em neutrófilos humanos

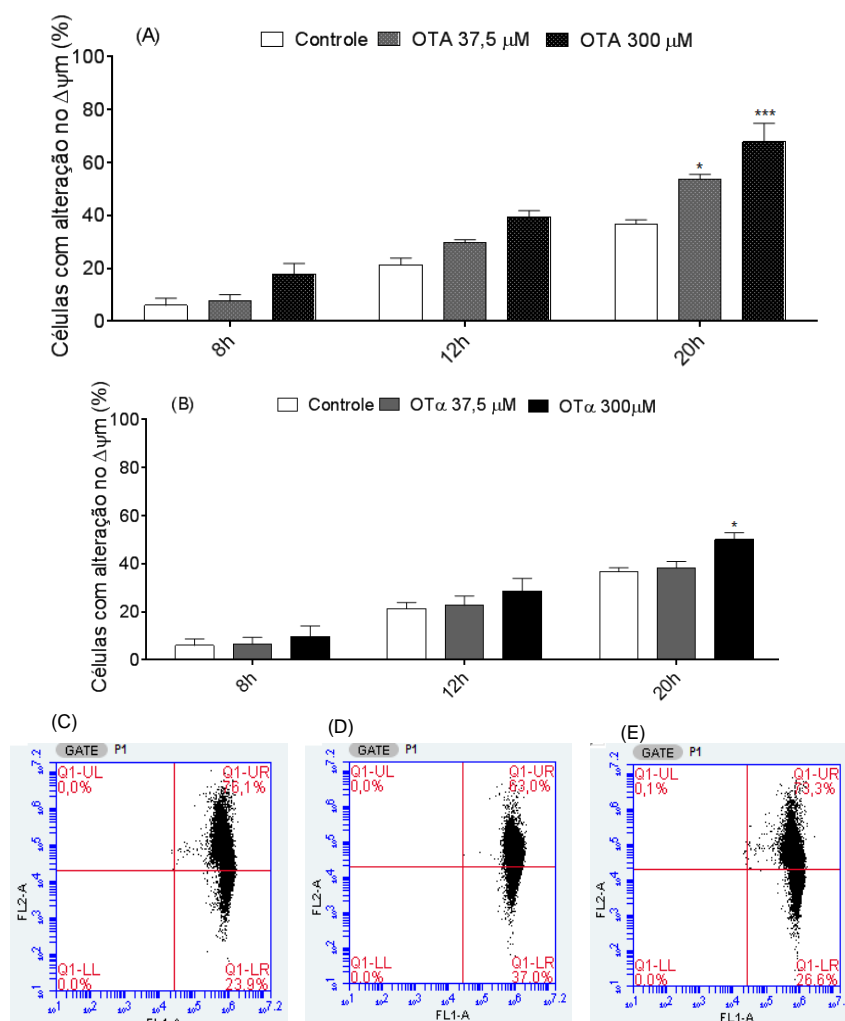


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$, quando comparado com o controle (ausência de OTA ou OT α). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 5$)

3.4 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

Os resultados obtidos mostraram que OTA e OT α induziram uma perda de $\Delta\Psi_m$, bem indicado pela diminuição da fluorescência avermelhada mudando para um aumento na fluorescência verde (como visto nas proporções dos canais FL-1/FL-2 (Figura 5C e 5D). Novamente, o efeito de OTA foi maior do que o de OT α . Como exemplo, depois de 20 h de incubação com 300 μ M de OTA, a percentagem de células com alteração no $\Delta\Psi_m$ foi de 70%, enquanto que para OT α na mesma concentração foi de 50%.

Figura 5- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-300 μ M) na alteração do $\Delta\Psi_m$ mediante análise em citômetro de fluxo com JC-1. Imagens representativas de JC-1 em citômetro: controle (ausência de OTA ou OT α) (C) OTA 300 μ M (D) e OT α 300 μ M (E), após 12 horas de incubação



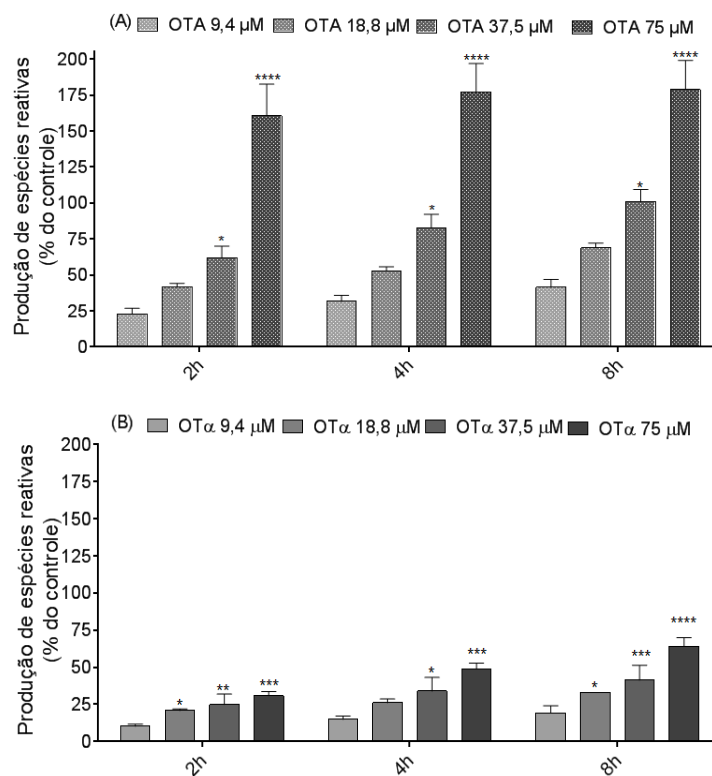
Resultados expressos como percentual de células com alteração no $\Delta\Psi_m$. * $p \leq 0.05$ e *** $p \leq 0.001$, quando comparado com o controle (ausência de OTA ou OT α). Os valores estão apresentados como média \pm SEM

($n \geq 3$)

3.5 ESTRESSE OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS

A sonda DCFH-DA foi utilizada para detectar o efeito de OTA e OT α na indução do estresse oxidativo em neutrófilos humanos (Figura 6A e 6B). Ambos os compostos, OTA e OT α , induziram a produção de espécies reativas em neutrófilos. No entanto, houve diferença significativa entre o efeito dos compostos testados. A ativação do estresse oxidativo desencadeada por OT α foi aproximadamente 80% menor do que a ativação desencadeada por OTA, em todas as condições testadas. Como exemplo, depois de 6 horas de incubação, a concentração mais elevada de OTA (75 μ M) induziu 160% de ativação dos neutrófilos, quando comparado com o ensaio de controle (sem OTA); nas mesmas condições, OT α induziu 60%. O uso de DPI (um inibidor da enzima NADPH-oxidase) garante que a indução da produção de espécies reativas por OTA e OT α ocorre através da ativação da NADPH-oxidase, devido à redução do sinal de fluorescência na presença do inibidor.

Figura 6- Efeito de OTA (A) e OT α (B) (0-75 μ M) no estresse oxidativo em neutrófilos humanos medido com DCFH-DA.

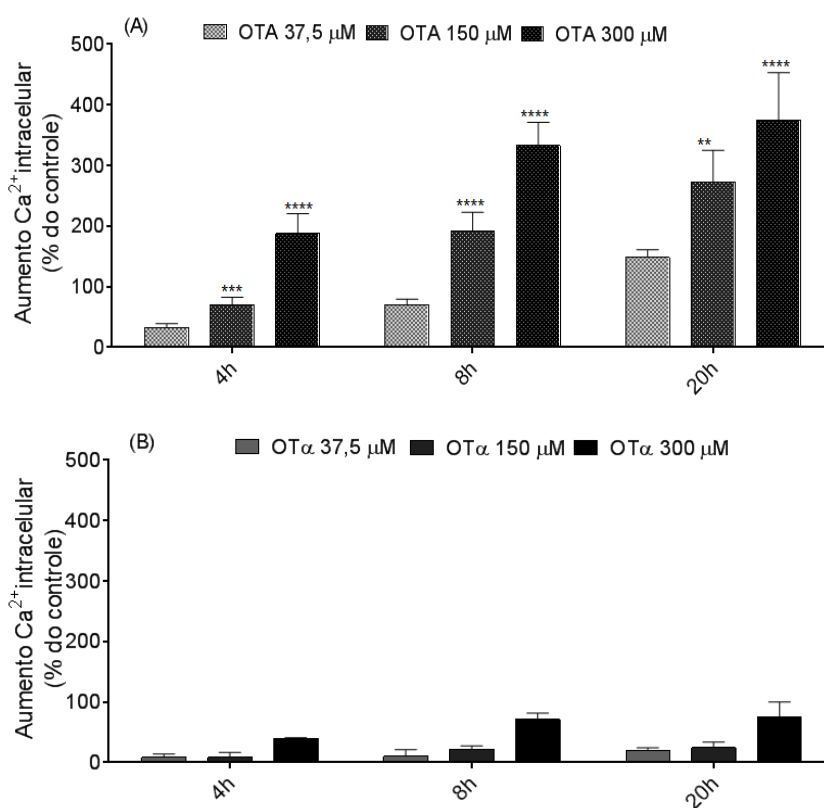


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ quando comparado com o controle (ausência de OTA ou OT α). Resultados expressos como fluorescência relativa (%) comparada com o ensaio com DPI (OTA e Ota com DPI). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 5$)

3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE Ca^{2+} INTRACELULAR

O uso de Fluo-4/AM permite a determinação dos níveis de Ca^{2+} intracelular. A Figura 7 mostra o efeito de OTA e $OT\alpha$ nos níveis intracelulares de Ca^{2+} em neutrófilos humanos. Foi demonstrado que a OTA induziu um aumento do Ca^{2+} intracelular de forma dependente da concentração e tempo. Mais uma vez, os resultados obtidos com $OT\alpha$ diferem significativamente dos obtidos com OTA, uma vez que nenhuma alteração na homeostase de Ca^{2+} foi detectada nas condições testadas para $OT\alpha$.

Figura 7- Efeito da OTA (A) e $OT\alpha$ (B) (0-300 μ M) nos níveis de Ca^{2+} intracelular, medidos com FLUO-4/AM em citometria de fluxo.



*** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ quando comparados com o controle (ausência de OTA ou $OT\alpha$). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 5$).

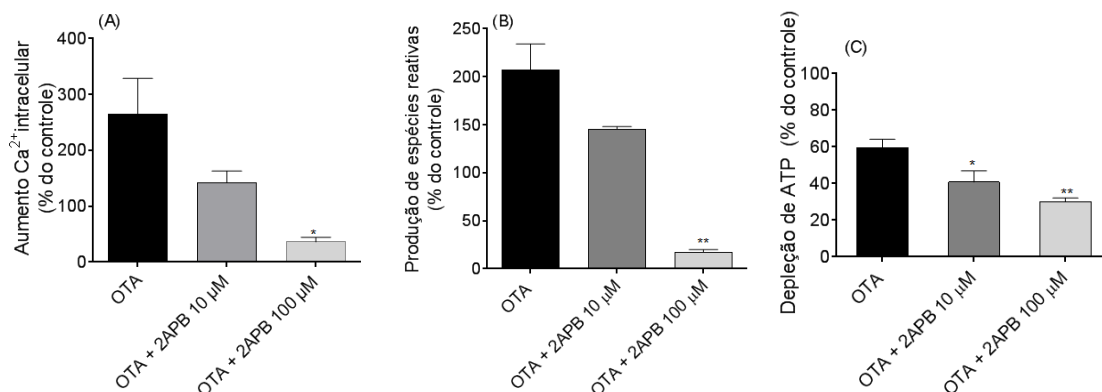
3.7 PAPEL DO INFLUXO DE Ca^{2+} EM ALTERAÇÕES DOS NEUTRÓFILOS INDUZIDOS POR OTA

Foi demonstrado que a OTA induziu um aumento dos níveis do Ca^{2+} intracelular em neutrófilos humanos. Portanto, para compreensão do papel do influxo de Ca^{2+} na

toxicidade induzida por OTA, foram adotadas duas diferentes estratégias de bloqueio. Na primeira, foi utilizado o 2-APB que bloqueia a liberação das reservas internas e o influxo de Ca^{2+} por SOCE (entrada de cálcio “store-operated”) (ANDERSON et al., 2005), e na segunda, BTP2 que é um inibidor específico da SOCE (STEINCKWICH et al., 2007). O efeito dos inibidores dos canais de Ca^{2+} foi avaliado sobre as alterações causadas pela OTA nos níveis de Ca^{2+} intracelular (Figura 8A), estresse oxidativo (Figura 8B) e nos níveis de ATP (Figura 8C). Estes estudos foram avaliados nas concentrações e nos tempos de incubação em que a micotoxina mostrou uma alteração significativa, nomeadamente: 300 μM em 4 horas para Ca^{2+} intracelular, 75 μM em 2 horas para o estresse oxidativo e 300 μM em 8 horas para os níveis de ATP.

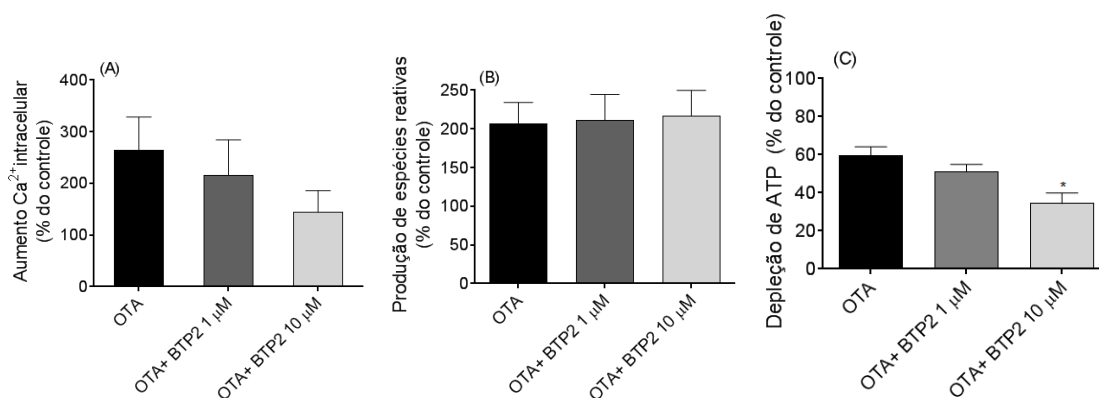
O aumento de Ca^{2+} intracelular induzido pela OTA foi reduzido na presença de 2-APB e BTP2, de modo dependente da concentração de inibidor (Figura 8A e 9A). No que diz respeito ao estresse oxidativo, como pode ser visto na Figura 8B, o inibidor 2-APB, na maior concentração testada, reduziu significativamente a produção de espécies reativas induzidas por OTA, de 200% para 17%. Por outro lado, a utilização de BTP2 não alterou significativamente o estresse oxidativo em neutrófilos humanos induzido por OTA (Figura 9B). Em relação aos níveis de ATP, quando as células foram tratadas com ambos os inibidores, 2-APB (Figura 8C) e BTP2 (Figura 9C), foi observada uma menor depleção de ATP, cerca de 30% para a maior concentração de APB e 35% para BTP2, quando comparado com o ensaio sem o inibidor que apresentava 60% de depleção de ATP em relação ao controle. Estes resultados sugerem que o aumento de Ca^{2+} intracelular provoca as alterações na atividade de neutrófilos induzida por OTA.

Figura 8- (A) Efeito de 2-APB (0-100 μM) no influxo de Ca^{2+} em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 4 horas. (B) Efeito de 2-APB (0-100 μM) na produção de espécies reativas em neutrófilos tratados com OTA (75 μM) durante 2 horas. (C) Efeito de 2-APB (0-100 μM) nos níveis de ATP em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 8 horas



* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparados com o ensaio com OTA (sem 2-APB). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 3$)

Figura 9- (A) Efeito de BTP2 (0-10 μM) no influxo de Ca^{2+} em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 4 horas. (B) Efeito de BTP2 (0-10 μM) na produção de espécies reativas em neutrófilos tratados com OTA (75 μM) durante 2 horas. (C) Efeito de BTP2 (0-10 μM) nos níveis de ATP em neutrófilos tratados com OTA (300 μM) durante 8 horas



* $p < 0.05$ quando comparado com ensaio com OTA (sem BTP2). Os valores estão apresentados como média \pm SEM ($n \geq 3$)

4. DISCUSSÃO

Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na indução de toxicidade por micotoxinas é crucial para prever, prevenir e tratar os seus efeitos nocivos na saúde humana. Neste estudo foram investigados os efeitos tóxicos da OTA e do seu metabolito,

OT α , em neutrófilos humanos, por meio da análise dos principais mecanismos celulares envolvidos na lesão celular. Ficou claro que OT α , o principal metabólito obtido durante a degradação de OTA através de métodos biológicos, foi menos tóxica que a OTA; e que seus efeitos tóxicos foram dependentes do aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular.

O estudo foi iniciado pela avaliação da morte dos neutrófilos induzida por OTA pelo método de exclusão de azul de tripano, que é um dos métodos mais comumente utilizados para testar a viabilidade celular. O método baseia-se na capacidade das células viáveis de excluir o corante azul de tripano. Quando a integridade da membrana das células está comprometida, estas se tornam permeáveis ao corante, permitindo sua entrada (LOUIS; SIEGEL, 2011). De acordo com o método de exclusão de azul de tripano, nenhuma das concentrações testadas de OTA (0-300 μ M) causou efeito até 8 horas enquanto que para OT α o mesmo foi observado até 24 horas de incubação. Por sua vez, depois de 8 horas, OTA induziu uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular. O efeito citotóxico de OTA (pelo método de exclusão de azul de tripano) também foi observado por Kamp et al. (2005) em células V79 de *hamster* chinês (células de fibroblastos do pulmão) incubadas durante 24 horas com concentrações que variam entre 2,5 μ M e 10 μ M, e por Klaric et al. (2007), após 24 horas de exposição em células PK15 (rim de porco) para a OTA, na maior concentração de 12,5 μ M. Arbillaga et al. (2007) estudaram o efeito de OTA (50-800 μ M) em células HK-2 (células renais humana) pelo método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os autores concluíram que a viabilidade das células HK-2 não foi afetada pela OTA, em concentrações até 400 μ M, após 3 horas de incubação. No entanto, após 6 horas de incubação, a viabilidade diminuiu significativamente, atingindo 50% quando OTA 800 μ M foi usada.

O método de exclusão de azul de tripano, apesar de ser um teste de viabilidade mais comumente utilizado, oferece uma abordagem subjetiva, uma vez que requer a contagem manual. Neste sentido, e para determinar o mecanismo exato da morte de neutrófilos induzido pela OTA, ou seja, para distinguir a apoptose de necrose, foi realizada análise de citometria de fluxo (JUAN-GARCIA et al., 2013). Anexina-V liga-se fortemente e especificamente à superfície celular de fosfatidilserina e é sensível para as medições de apoptose precoce. Por sua vez, o PI se intercala com o DNA, marcando as células necróticas, ou seja, com a perda da integridade da membrana (JUAN-GARCIA et al., 2013). Os resultados mostraram que nem OTA nem OT α induziram a apoptose dos neutrófilos nas concentrações e tempos de exposição testados (*dados não apresentados*).

Por outro lado, as células necróticas aumentaram consideravelmente quando os neutrófilos humanos foram incubados com OTA na maior concentração testada (300 μM). $\text{OT}\alpha$ não induziu o aumento significativo no número de células necróticas, corroborando com o obtido pelo método de exclusão de azul de tripano. O ensaio citomorfológico confirmou o efeito necrótico de OTA em neutrófilos humanos. Ficou claro que a maior concentração testada de OTA, causou uma mudança significativa na morfologia dos neutrófilos, especialmente após 8 horas de incubação. As células tratadas com OTA foram incapazes de manter a integridade da membrana, e também causaram vazamento do conteúdo nuclear, tornando quase impossível a visualização das células em 20 horas. Por conseguinte, estes resultados demonstram claramente que a OTA é um potente indutor de necrose em neutrófilos humanos. Os resultados do presente trabalho foram coerentes com o reportado por Bouaziz et al. (2008), que avaliaram os efeitos necróticos de OTA nas células HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano) por método de coloração com PI. Após 48 horas, o número de células necróticas aumentou significativamente, atingindo um valor de 20% para a concentração de 100 μM . Müller et al. (2003) avaliaram os efeitos necróticos de OTA em células de rim humano também por método de PI. Após 15 dias de incubação com OTA, e para a concentração mais elevada avaliada (2,5 μM), células PI positivas aumentaram até 15%. No que diz respeito à $\text{OT}\alpha$, nenhum relato na literatura foi encontrada em relação ao estudo da indução de necrose ou apoptose em quaisquer linhas celulares.

Sabe-se que os níveis de energia intracelulares são dissipados durante a necrose, mas não durante a apoptose das células neuronais (ANKARCRONA et al., 1995). Este aspecto é coerente com as conclusões deste trabalho. Foram avaliados os níveis de ATP durante a exposição de neutrófilos humanos à OTA e $\text{OT}\alpha$. O efeito encontrado para a OTA foi dependente do tempo e da concentração: nenhum efeito foi evidente ao fim de 4 horas, por sua vez, foi observada após 8 horas de incubação uma depleção significativa, e quase depleção total de ATP foi alcançada após 20 horas. Nas condições estudadas, $\text{OT}\alpha$ não induziu alterações significativas nos níveis de ATP, como esperado pelos resultados que estavam sendo obtidos. Poor et al. (2014) estudaram o efeito de OTA (15 μM) nos níveis de ATP em células MDCK (células imortalizadas de rim). Após 24 horas de incubação, os autores observaram uma diminuição considerável (mais de 30%) dos níveis de ATP. De acordo com Nasr et al. (2003), perda de ATP resultante da insuficiência de energia leva a uma incapacidade para manter as bombas de íons, resultando em despolarização da membrana, que norteou o estudo do efeito de OTA no $\Delta\Psi\text{m}$.

Para avaliar a alteração no $\Delta\Psi_m$, foi utilizado o método de coloração de JC-1. As células tratadas com OTA, especialmente após 20 horas, mostraram um aumento na fluorescência verde, indicando a perda de potencial da membrana. Assaf et al. (2004) avaliaram as mudanças promovidas pela OTA no $\Delta\Psi_m$ das células mononucleares do sangue periférico, utilizando iodeto de 3,3'- dihexiloxacarbocianina (DiOC₆), um fluorocromo que é incorporado nas células pela alteração do $\Delta\Psi_m$. OTA (10 μM) provocou uma diminuição do $\Delta\Psi_m$, atingindo 70% de células com alteração de $\Delta\Psi_m$ após 48 horas de exposição. O mesmo resultado foi alcançado em células HepG2 após 48 horas de exposição à 100 μM de OTA (BOUAZIZ et al., 2008). De acordo com Brookes et al. (2004), a disfunção mitocondrial pode ser desencadeada pela combinação do aumento de Ca^{2+} com a produção de ROS, e estes efeitos já foram correlacionados com a toxicidade de OTA (RINGOT et al., 2006).

O estresse oxidativo em neutrófilos humanos promovido pela OTA foi avaliado usando 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Este composto se difunde através da membrana da célula e é hidrolisada enzimaticamente por esterases intracelulares para a diclorodihidrofluoresceína não fluorescente, que pode ser rapidamente oxidada para um diclorofluoresceína altamente fluorescente verde na presença de espécies reativas (H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, $\cdot\text{NO}$, ONOO^-) (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005). Considerando os resultados obtidos no estudo de morte celular, a produção de espécies reativas foi avaliada durante 8 horas, sendo observado um aumento dependente da concentração e do tempo na indução do estresse oxidativo dos neutrófilos por OTA e OT α , sendo o último menos pronunciado. Arbillaga et al. (2007) também utilizaram DCFH-DA para estudar a produção de espécies reativas em células HK-2 tratadas com OTA (50-800 μM) durante 6 horas. Os autores observaram um aumento dependente da concentração na produção de espécies reativas, atingindo apenas 20%, para 800 μM , quando comparado com o controle. Boesch-Saadatmandi et al. (2008) estudaram a produção de espécies reativas de células LLC-PK1 (células tubulares do rim de porco) após o tratamento com OTA (0,5-2,5 μM) durante 1,5 horas. Os resultados mostraram um aumento nos níveis de espécies reativas, de um modo dependente da concentração, em até 100%, quando comparado com o controle. A geração de espécies reativas também foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico humano após exposição à OTA (5, 10 e 20 μM) durante 24 horas, mostrando um aumento de 50%, quando comparado com o controle (LIU et al., 2012). A produção de espécies reativas pelos neutrófilos humanos foi geralmente mais elevada do que a relatada por diferentes

autores em diferentes linhas celulares. É importante salientar que não existem relatos na literatura sobre o efeito de OT α sobre a produção de espécies reativas.

De acordo com Ermak e Davies (2001), o estresse oxidativo culmina com uma interrupção de vias fisiológicas normais e causa morte celular, sendo este aspecto em grande parte mediada pela sinalização de Ca²⁺. Para medir as alterações intracelulares dos níveis de Ca²⁺ um éster de acetoximetil não fluorescente (FLUO 4-AM) que é clivado no interior da célula originando Fluo-4 fluorescente, que reage com Ca²⁺ livre foi utilizado (GEE et al., 2000; JUAN-GARCIA et al., 2013). Os resultados mostram claramente que a OTA induziu um aumento significativo no Ca²⁺ intracelular em neutrófilos humanos, enquanto que para OT α não foram observadas alterações significativas. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com Ramyaa e Padma (2013), uma vez que os autores observaram um aumento (seis vezes) do Ca²⁺ intracelular, usando Fura-2, em células Vero (células de rim de macaco africano) tratadas com OTA (10 μ M) durante 15 minutos.

Devido os efeitos tóxicos da OTA demonstrados neste estudo e o fato da perda de homeostase de Ca²⁺ ser um evento precoce e importante no desenvolvimento de lesão tóxica (MARIN-KUAN et al., 2008), foi investigado se o mecanismo envolvido na toxicidade de OTA é mediado pelas alterações de Ca²⁺ intracelular. Este estudo não foi realizado para OT α visto que o metabólito não mostrou efeitos tóxicos em neutrófilos humanos.

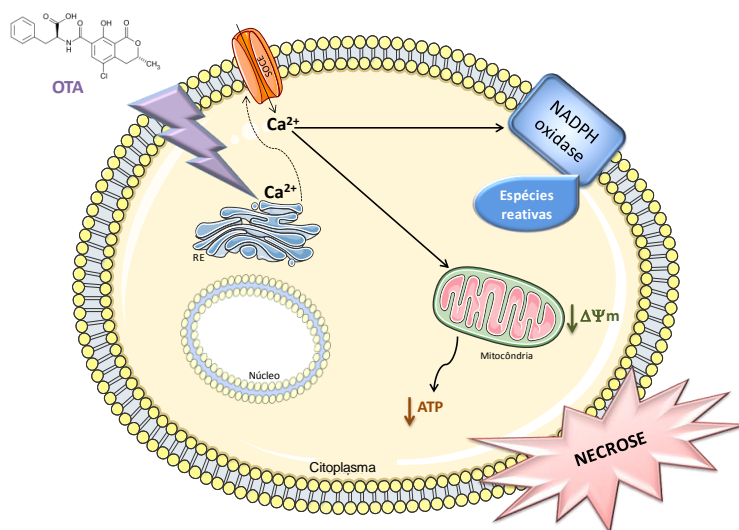
A mobilização de Ca²⁺ é um dos primeiros eventos que ocorrem com a ativação de neutrófilos. Após a ativação, ocorre a ligação aos receptores de superfície provocando um aumento imediato nos níveis de Ca²⁺ citosólico livre, como um resultado da liberação de Ca²⁺ intracelular a partir das reservas internas. Esta resposta rápida é seguida por um efeito mais prolongado devido o influxo de Ca²⁺ a partir do meio extracelular, que para os neutrófilos ocorre principalmente via SOCE (canais “stored-operated”) (BRECHARD; TSCHIRHART, 2008; VAN EEDEN et al., 1999; VANOVERBERGHE et al., 2003). Neste trabalho foi observado que mesmo na ausência de Ca²⁺ extracelular, OTA causou um aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular (*dados não apresentados*), sendo este aumento atribuído devido à liberação de Ca²⁺ das reservas internas.

Para confirmar se OTA provoca necrose nos neutrófilos humanos, mediante o aumento dos níveis de Ca²⁺ foram utilizadas duas estratégias de bloqueio dos canais de Ca²⁺: 2-APB, que é descrito como um bloqueador da liberação de Ca²⁺ das reservas internas e por SOCE (ANDERSON et al., 2005) e BTP2, que é inibidor específico de SOCE (BROOKES et al., 2004;. STEINCKWICH et al., 2007).

Ambos os inibidores, na mesma concentração (10 μM), mostraram uma redução do aumento de Ca^{2+} intracelular induzido pela OTA (cerca de 46%). Ambos os inibidores foram capazes de diminuir o efeito da OTA nos níveis de Ca^{2+} , nortendo a investigação de quanto as alterações observadas na produção de espécies reativas e na depleção dos níveis de ATP que foram causados pela OTA e dependentes de Ca^{2+} . O aumento de Ca^{2+} intracelular desempenha um papel central na morte da célula devido à depleção de ATP (DONG et al., 1998). Este aspecto foi confirmado, uma vez que a utilização dos bloqueadores reduziu a depleção de ATP induzida por OTA em 50%. É importante notar que a depleção de ATP durante a lesão da célula envolve um mecanismo independente de Ca^{2+} que envolve a perda de glicina associada a células (DONG et al., 1998). Este fato poderia explicar a redução incompleta da depleção de ATP, após a ação dos bloqueadores de Ca^{2+} utilizados no presente estudo.

A indução do estresse oxidativo por OTA mostrou resultados diferentes para os dois inibidores estudados. 2-APB praticamente impediu a produção de espécies reativas nos neutrófilos tratados com OTA (91%), enquanto BTP2 não teve efeito, quando comparado com o controle (ausência de inibidor). Estes resultados indicam que o influxo de Ca^{2+} via SOCE não causa a ativação da NADPH oxidase, visto que quando somente o influxo via SOCE foi bloqueado (BTP2) não foi observada diferença na produção de espécies reativas (BRÉCHARD et al., 2008).

Os resultados sugerem que a toxicidade de OTA em neutrófilos humanos começa com a liberação de Ca^{2+} das reservas internas, levando a um aumento de Ca^{2+} citosólico livre. Este aumento no Ca^{2+} intracelular desencadeia a produção de espécies reativas através da ativação da NADPH-oxidase. Estas espécies reativas, por sua vez, provocam uma alteração no $\Delta\Psi\text{m}$ e, conseqüentemente, uma diminuição dos níveis de ATP causando assim a morte por necrose (Figura 10).

Figura 10- Mecanismo proposto para toxicidade de OTA em neutrófilos humanos

5. CONCLUSÃO

Um estudo comparativo da OTA e $\text{OT}\alpha$ e a proposta do mecanismo de toxicidade da OTA em neutrófilos humanos foram demonstrados pela primeira vez. OTA induziu morte celular por necrose, através do aumento de Ca^{2+} intracelular pela liberação a partir das reservas internas. Esta liberação, subsequentemente, provocou uma cascata de eventos, nomeadamente: a produção de espécies reativas, depleção de ATP, perda de $\Delta\Psi_m$, levando à morte por necrose. Por outro lado, o metabólito $\text{OT}\alpha$ não apresentou efeitos tóxicos. Os aspectos aqui indicados são importantes para promover o desenvolvimento de métodos para a metabolização de OTA, contribuindo assim para diminuir o risco de ingestão da OTA e os seus consequentes efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; VENANCIO, A.; TEIXEIRA, J.A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 351-355, 2011.
- AMÉZQUETA, S.; SCHORR-GALINDO, S.; MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GUIRAUD, J.P. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 259-268, 2012.
- ANDERSON, R.; STEEL, H.C.; TINTINGER, G. R. Inositol 1,4,5-triphosphate-mediated shuttling between intracellular stores and the cytosol contributes to the sustained

elevation in cytosolic calcium in FMLP-activated human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1567-1575, 2005.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; Nicotera, P. Glutamate induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 961-973, 1995.

ARBILLAGA, L.; AMÉZQUETA, A.; EZPELETA, O.; DE CERAIN, A.L. Oxidative DNA damage induced by ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 35-42, 2007.

ASSAF, H.; AZOURI, H.; PALLARDY, M. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-x(L). **Toxicological Sciences**, v. 79, n. 2, p. 335-344, 2004.

BOESCH-SAADATMANDI, C.; LOBODA, A.; JOZKOWICZ, A.; HUEBBE, P.; BLANK, R.; WOLFFRAM, S.; DULAK J.; RIMBACH, G. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells. **Food Chemical and Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2665-2671, 2008.

BOUAZIZ, C.; EL DEIN, O. S.; EL GOLLI, E.; ABID-ESSEFI, S.; BRENNER, C.; LEMAIRE, C.; BACHA, H. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. **Toxicology**, v. 254, n. 1-2, p. 19-28, 2008.

BRÉCHARD, S.; MELCHIOR, C.; PLANÇON, S.; SCHENTEN, V.; TSCHIRHART, E.J. Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. **Cell Calcium**, v. 44, n. 5, p. 492-506, 2008.

BRECHARD, S; TSCHIRHART, E.J. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 5, p. 1223-1237, 2008.

BROOKES, P.S., YOON, Y.S.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. C817-C833, 2004.

CHEN, C.Y.; LIAW, C.C.; CHEN, Y.H.; CHANG, W.Y.; CHUNG, P.J.; HWANG, T.L. A novel immunomodulatory effect of ugonin U in human neutrophils via stimulation of phospholipase C. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, p. 222-231, 2014.

COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T.; NESTER, M.A.; EFRAIM, P.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 100-104, 2013.

COSSARIZZA, A.; SALVIOLI, S. Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1. **Current Protocols in Cytometry**, Chapter 9: Unit 9 14, 2001.

COSTA, V.M.; SILVA, R.; FERREIRA, L.M.; BRANCO, P.S.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, R.A.; CARVALHO, M.; REMIAO, F. Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: Formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 8, p. 1183-1191, 2007.

CREPPY, E.E.; KERN, D.; STEYN, P.S.; VLEGGAR, R.; OSCHENTHALER, R.R.; DIRHEIMER, G. Comparative study on the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-t-RNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. **Toxicology Letters**, v.19, n. 3, p. 217-224, 1983.

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

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; GRIESS, G.A.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Intracellular Ca^{2+} thresholds that determine survival or death of energy-deprived cells. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 1, p. 231-240, 1998.

DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. Ochratoxin A non-conventional exposure sources - A review. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 2, p. 115-120, 2009.

ERMAK, G.; DAVIES, J.A.K. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 10, p. 713-721, 2001.

FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytical Chimica Acta**, v. 649, n. 1, p. 8-23, 2009.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 7-8, p. 570-575, 2008.

FREITAS, M.; RIBEIRO, D.; TOME, S.M.; SILVA, A.M.S.; FERNANDES, E. Synthesis of chlorinated flavonoids with anti-inflammatory and proapoptotic activities in

human neutrophils. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 153-164, 2014.

GEE, K.R.; BROWN, K.A.; CHEN, W.-N.U.; BISHOP-STEWART, J.; GRAY, D.; JOHNSON, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. **Cell Calcium**, v. 27, n. 2, p. 97-106, 2000.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, p. 45-80, 2005.

JUAN-GARCIA, A.; MANYES, L.; RUIZ, M.J.; FONT, G. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 40-59, 2013.

KAMP, H.G.; EISENBRAND, G.; SCHLATTER, J.; WURTH, K.; JANZOWSKI, C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, n. 3, p. 413-425, 2005.

KHAN, S.; MARTIN, M.; BARTSH, H.; RAHIMTULA, A.D. Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n.1, p. 67-72, 1989.

KLARIC, M. S.; PEPELJNJAK, S.; DOMIJAN, A.M.; PETRIK, J. Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B(1), beauvericin and ochratoxin A. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 100, n. 3, p. 157-164, 2007.

LIU, J.; WANG, Y.; CUI, J.F.; XING, L.X.; SHEN, H.T.; WU, S.; LIAN, H.G.; WANG, J.L.; YAN, X.; ZHANG, X.H. Ochratoxin A induces oxidative DNA damage and G1 phase arrest in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 2, p. 164-171, 2012.

LOUIS, K.S.; SIEGEL, A.C. **Cell viability analysis using trypan blue: Manual and automated methods. Mammalian cell viability: Methods and protocols.** M. J. Stoddart. New York, Human Press: 240, 2011.

MARIN-KUAN, M.; CAVIN, C.; DELATOUR, T.; SCHILTER, B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 195-202, 2008.

MEISNER, H.; CHAN, S. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. **Biochemistry**, v. 13, n. 14, p. 2795-2800, 1974.

- MITCHELL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 439-445, 2004.
- MULLER, G.; ROSNER, H.; ROHRMANN, B.; ERLER, W.; GESCHWEND, G.; GRAFE, U.; BURKERT, B.; MOLLER, U.; DILLER, R.; SACHSE, K.; KOHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. **Toxicology**, v. 184, n. 1, p. 69-82, 2003.
- MÜLLER, G.; ROSNER, H.; ROHRMANN, B.; ERLER, W.; GESCHWEND, G.; GRÄFE, U.; BURKERT, B.; MÖLLER, U.; DILLER, R.; SACHSE, K.; KÖHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. **Toxicology**, v. 184, n. 1, p. 69-82, 2003.
- NASR, P.; GURSAHANI, H.I.; PANG, Z.; BONDADA, V.; LEE, J.W.; HADLEY, R.W.; GEDDES, J.W. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 2, p. 89-99, 2003.
- OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 354-361, 2012.
- POOR, M.; VERES, B.; JAKUS, P.B.; ANTUS, C.; MONTSKO, G.; ZRINYI, Z.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S.; PETRIK, J.; KOSZEGI, T. Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. **Journal of Photochemistry & Photobiology B**, v. 132, p. 1-9, 2014.
- RAHIMTULA, A.D.; BEREZIAT, J.C.; BUSSACCHINNI-GRIOT, V.; BARTSH, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 23, p. 4469-4477, 1988.
- RAMYAA, P.; PADMA, V.V. Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin - Modulation by Nrf2. **Food Chemical and Toxicology**, v. 62, p. 205-216, 2013.
- REDDY, L.; BHOOLA, K. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 771-779, 2010.
- REINSCH, M.; TOPFER, A.; LEHMANN, A.; NEHLS, I.; PANNE, U. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 312-317, 2007.

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

SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; ACQUAVIVA, R.; BARBAGALLO, I.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A Review. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1742-1766, 2013.

STEINCKWICH, N.; FRIPPIAT, J.P.; STASIA, M.J.; ERARD, M.; BOXIO, R.; TANKOSIC, C.; DOIGNON, I.; NUSSE, O. Potent inhibition of store-operated Ca²⁺ influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 4, p. 1054-1064, 2007.

VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON, J.J. Ochratoxin A a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1132, 1965.

VAN EEDEN, S.F.; KLUT, M.E.; WALKER, B.A.M.; HOGG, J.C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, n. 1-2, p. 23-43, 1999.

VANOVERBERGHE, K.; MARIOT, P.; ABEELE, F.V.; DELCOURT, P.; PARYS, J.B.; PREVARSKAYA, N. Mechanism of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. **Cell Calcium**, v. 34, n. 1, p. 75-85, 2003.

VECCHIO, A.; MINEO, V.; PLANETA, D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 220-223, 2012.

WU, Q.H.; DOHNAL, V.; HUANG, L.L.; KUCA, K.; WANG, X.; CHEN, G.Y.; YUAN, Z.H. Metabolic pathways of ochratoxin A. **Current Drug Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2011b.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.R.; LI, S.Z.; VODELA, J.K.; FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 182-192, 1996.

ZINEDINE, A.; BLESAS, J.; MAHNINE, N.; EL ABIDI, A.; MONTESANO, D.; MANES, J. Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. **Food Control**, v. 21, n. 2, p. 132-135, 2010.

ARTIGO 5. APLICAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASE A NA DEGRADAÇÃO DE
OCRATOXINA A EM FARINHA DE TRIGO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a extração e caracterização de diferentes fontes de carboxipeptidase A (vegetal, animal e microbiana) e aplicação na degradação de OTA em farinha de trigo. As fontes microbianas, *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* (4×10^6 esporos.mL⁻¹) foram cultivados em Agar Batata Dextrose a 30 °C durante 48 e 72 horas, respectivamente e farelo de soja (fonte vegetal) teve sua granulometria ajustada a 0,5 mm passante. A extração de carboxipeptidase A foi realizada com água em banho ultrassônico durante 30 minutos, seguido de purificação com acetona (1:3 v/v). Pancreatina e carboxipeptidase A comercial (CPA) foram preparadas em soluções tamponantes e utilizadas como fonte animal. Os extratos foram caracterizados quanto a temperatura, pH, concentração de tampão e concentração salina ótimas, parâmetros cinéticos e termoestabilidade para aplicação em processo de degradação. Farinha de trigo foi contaminada em 20 µg.kg⁻¹ (nível legislado) e 200 µg.kg⁻¹ e submetida à hidrólise enzimática durante 30 e 60 minutos sob condições ótimas para cada extrato: CPA (25 °C pH 7,5); soja (30 °C pH 7,5); *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei* e pancreatina (50 °C e pH 7,5), mantendo a proporção de proteína:OTA (1 µg:2 ng). Após a hidrólise, a OTA e OTα foram extraídas da farinha de trigo com clorofórmio e os extratos foram analisados por CLAE-FL utilizando método previamente validado. Todos os tratamentos enzimáticos foram capazes de reduzir os níveis de OTA nas farinhas (16,8-78,5%) e produzir OTα (2 a 8,2 ng.g⁻¹) tendo como extratos mais promissores os provenientes de *Rhizopus* e *Trichoderma* e carboxipeptidase A comercial. Ficou demonstrada a possibilidade de redução dos níveis de contaminantes em alimentos, uma vez que foram necessários apenas 30 minutos e condições suaves para reduzir significativamente a concentração de OTA em uma matriz que é altamente utilizada na indústria alimentícia, além de estudos toxicológicos terem apontado a ausência de toxicidade do metabolito formado (OTα).

Palavras-chave: *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei*, carboxipeptidase A, detoxificação.

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são substâncias naturais de baixa massa molecular produzidas como metabólitos secundários por fungos filamentosos. Uma das micotoxinas mais

importantes é a ocratoxina A (OTA), considerada teratogênica, hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica (PÉTERI et al., 2007). OTA é produzida por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e encontrada em diferentes matrizes, como alimentos, ração e bebidas (CORONEL et al., 2009), sendo os cereais considerados como a maior fonte de ingestão diária de OTA, aproximadamente 58% (MALIR et al., 2013). Dentre os cereais, destaca-se a farinha de trigo, utilizada para diferentes formulações, cuja ocorrência de ocratoxina A já foi evidenciada (KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2015).

Várias estratégias estão disponíveis para a detoxificação de OTA. Estas podem ser divididas em métodos físicos, químicos e biológicos (VARGA; TÓTH, 2005). Os biológicos tem se destacado pelo seu menor impacto ambiental e por propiciarem o emprego de condições operacionais moderadas. A via de degradação de OTA mais frequentemente identificada em microrganismos é a hidrólise da ligação amida que liga a porção isocumarina (OT α) com a molécula de fenilalanina, promovida por enzimas proteolíticas intra ou extracelulares. Tem sido identificados vários microrganismos produtores de enzimas capazes de detoxificar OTA, incluindo bactérias (FUCHS et al., 2008; MATEO et al., 2010), leveduras (BEJAOUI et al., 2004; PATHARAJAN et al., 2011) e fungos filamentosos (ABRUNHOSA et al., 2002; KUPSKI et al., 2013; VARGA et al., 2005). Algumas enzimas, como a carboxipeptidase A (PITOUT, 1969), lipase (STANDER et al., 2000) e algumas proteases comerciais (ABRUNHOSA et al. 2006), também foram identificadas por catalisarem esta reação (PÉTERI et al., 2007).

A utilização de enzimas para reduzir o teor de micotoxinas em rações e alimentos é uma estratégia importante no pós-colheita para proteger a saúde dos consumidores, uma vez que OTA é encontrada regularmente em muitas matérias primas e produtos, apesar de todas as estratégias de prevenção aplicadas para evitar a sua presença (ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2007).

Este trabalho teve como aplicar a carboxipeptidase A de diferentes fontes (vegetal, animal e microbiana) na degradação de OTA em farinha de trigo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Acetonitrila (ACN) foi adquirida da Baker e o ácido acético da Merck. Água foi purificada em um sistema de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) usando membrana

filtrante com diâmetro de poro de 0,45 μm . ACN e água Milli-Q foram desgaseificadas em banho ultrassônico a temperatura ambiente durante 30 minutos para serem utilizadas como fase móvel na etapa cromatográfica. O padrão de ocratoxina A com 98-99% de pureza foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Uma solução trabalho contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da micotoxina foi preparada em benzeno:ácido acético (99:1). O padrão de OT α foi preparado pela hidrólise ácida com HCl 6 N sob refluxo (72 h) do padrão de OTA (VAN DER MERWE; STEYN; FOURIE, 1965). Carboxipeptidase A isolada do pâncreas bovino (CPA) e pancreatina foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e preparadas em solução tamponante. *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9444 foram adquiridos da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello e mantidos em meio Agar Batata Dextrose a 4°C com repique mensal; farinha de trigo e farelo de soja foram obtidos no comércio local de Rio Grande/RS.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Fontes e extração enzimática

Como fontes microbianas foram utilizadas os microrganismos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9444. Os microrganismos foram cultivados em placas de petri contendo meio Agar Batata Dextrose e suspensão de esporos (4×10^6 esporos. mL^{-1}) durante 7 dias a 30 °C, com retirada de placas no tempo zero e a cada 24 horas, para posterior extração enzimática.

Como fonte vegetal foi utilizada o farelo de soja. O farelo foi moído em moinho de facas e teve sua granulometria padronizada a 0,5 mm passante para realização da extração.

Como fonte animal foram utilizadas os padrões comerciais pancreatina e carboxipeptidase A comercial (CPA).

A extração foi realizada com água destilada (1:5 p/v) sob agitação em banho ultrassônico de 40 kHz durante 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 3220 g 4°C durante 10 minutos e ao sobrenadante foi adicionada acetona (1:3 v/v) para precipitação protéica *overnight*. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão tris-HCl (pH 7,5 25 mM com NaCl 0,5 M) (KUPSKI et al, 2013).

A atividade de carboxipeptidase A foi determinada utilizando como substrato hipuril-L-fenilalanina (H-PHE) 0,1 M, preparado em tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo

NaCl 0,5 M. O aumento na absorvância, medida a 254 nm, foi acompanhado por 15 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade foi calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de $360 \text{ L} \cdot (\text{mol cm})^{-1}$ (PEDROCHE et al., 2002).

O teor de proteína solúvel foi determinado conforme método descrito por Lowry et al. (1951), empregando curva padrão de albumina ($0,05 - 0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Para determinação da atividade específica, a atividade foi correlacionada com o teor de proteína solúvel dos extratos, conforme a Equação 1.

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Atividade (U)}}{\text{Proteína solúvel (mg)}} \quad (1)$$

Uma unidade foi definida como a quantidade de proteína necessária para liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido hipúrico por minuto a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7,5.

2.2.2 Caracterização enzimática

A caracterização enzimática (Temperatura, pH, força iônica e concentração do tampão) foi realizada nas carboxipeptidases A provenientes das fontes microbiana, vegetal e da pancreatina. Os parâmetros cinéticos (K_M e $v_{\text{máx}}$) e a termoestabilidade foram realizados para todas as fontes.

2.2.2.1 Temperatura ótima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da determinação da atividade de carboxipeptidase A, em tampão tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 0,5 M, nas temperaturas de 30, 40, 50 e $60 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme o item 2.2.1. Os resultados foram expressos como atividade relativa, conforme Equação 2.

$$\text{Atividade relativa} = \frac{A_e}{A_{e_{\text{máx}}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

A_e : atividade específica em cada condição

$A_{e_{\text{máx}}}$: atividade específica na melhor condição

2.2.2.2 pH ótimo

A influência do pH na atividade carboxipeptidase A foi avaliada na temperatura ótima de cada extrato enzimático, utilizando tampão tris HCl 25 mM contendo NaCl 0,5 M em pH 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 8,5. Os diferentes tampões foram utilizados tanto para ressuspender a enzima precipitada quanto para determinar a atividade, conforme o item 2.2.1. Os resultados foram expressos como atividade relativa, conforme Equação 2.

2.2.2.3 Concentração do tampão

A influência da concentração do tampão na atividade carboxipeptidase A foi avaliada na temperatura ótima e no pH ótimo de cada extrato enzimático, utilizando tampão tris HCl nas concentrações entre 5 e 50mM, mantendo-se fixa a concentração de NaCl 0,5 M. Os diferentes tampões foram utilizados tanto para ressuspender a enzima precipitada quanto para determinar a atividade, conforme o item 2.2.1. Os resultados foram expressos como atividade relativa, conforme Equação 2.

2.2.2.4 Força iônica

A influência da força iônica na atividade de carboxipeptidase A foi avaliada na temperatura, pH e concentração de tampão ótimos de cada extrato enzimático, variando-se a concentração de NaCl entre 0 a 2 M. Os diferentes tampões foram utilizados tanto para ressuspender a enzima precipitada quanto para determinação de atividade, conforme o item 2.2.1. Os resultados foram expressos como atividade relativa, conforme Equação 2

2.2.2.5 Estabilidade térmica

O estudo da estabilidade térmica de carboxipeptidase A foi realizado incubando-se os extratos enzimáticos nas temperaturas ótimas de ação. A atividade residual foi medida nas condições ótimas de temperatura e pH para reação até o esgotamento da atividade enzimática.

Assumindo-se que a cinética de desnaturação enzimática segue uma cinética de primeira ordem, tem-se:

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (3)$$

Onde:

t- tempo

E- atividade enzimática no tempo t

E₀- atividade enzimática no tempo zero

k_d- constante da velocidade de desnaturação enzimática

Graficando-se $\ln(E/E_0)$ em função do tempo, determina-se o valor de k_d , constante da velocidade de desnaturação enzimática. Com este resultado, calcula-se o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas, definido como sendo o tempo necessário para reduzir 50% de sua atividade inicial, conforme a Equação 4.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d} \quad (4)$$

2.2.2.6 Parâmetros cinéticos da carboxipeptidase A

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$, a atividade de carboxipeptidase A foi avaliada em diferentes concentrações iniciais de substrato H-PHE (0,1 μ M- 3mM). O efeito da concentração do substrato na atividade pode ser descrito pelo modelo de Michaelis- Mentem (Equação 5)

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

Linearizando-se a equação de Michaelis- Mentem, obtêm-se a Equação 6:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} \quad (6)$$

Através dos coeficientes angular e linear da Equação 6, foram obtidos os valores de K_M e $v_{m\acute{a}x}$, respectivamente. O valor de K_M corresponde à concentração de substrato

necessária para atingir metade da velocidade máxima enzimática (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

2.2.3 Validação de método para determinação de OTA e OT α

A extração da micotoxina e seu metabólito das farinhas de trigo foi realizada conforme método descrito por Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002), adaptada para este trabalho. Para isso, 5g de farinha foram pesados, adicionados 2 mL de HCl 2N e 10 mL de clorofórmio seguido de agitação em vórtex (durante 1 minuto) e centrifugação (3220 g durante 10 minutos). A partição com clorofórmio foi repetida três vezes e após centrifugação (3220 g durante 10 minutos) a fração clorofórmica foi evaporada para posterior análise em CLAE-FL.

Os extratos foram ressuspensos em 1 mL da mistura de solventes que compõe a fase móvel (50% de Acetonitrila e 50% de água Milli Q acidificada 1% com ácido acético) e injetados em CLAE-FL. A eluição pela coluna Kromasil C18 (5 μ m 150x4,6 mm) foi realizada à 35 °C, com vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e detector de fluorescência padronizado com comprimentos de onda de excitação e de emissão 333 nm e 460 nm, respectivamente. Nessas condições foram necessários 4,8 minutos e 11,9 minutos para eluição de OT α e OTA, respectivamente.

Foram construídas duas curvas analíticas, uma para cada analito, sendo preparadas através de soluções dos padrões de OTA e OT α , diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel, em concentrações crescentes (0,05 - 20 ng.mL⁻¹). Também foram construídas duas curvas na matriz, para isso, extratos provenientes do método de extração foram fortificadas nos mesmos níveis da curva no solvente, e foram posteriormente quantificadas por CLAE-FL. Com isso, foram determinados a faixa de linearidade, os coeficientes de determinação e correlação e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para OTA e OT α .

Na determinação de LD e LQ foram feitas injeções das soluções de OTA e OT α diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações decrescentes até obtenção de uma relação de 3:1 e 10:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

A exatidão (recuperação) foi realizada após fortificação de amostras brancas com solução padrão de OTA e OT α , em três níveis de concentração (3, 5 e 10 vezes o LQ), em triplicata.

Para o estudo da repetibilidade foi realizada a extração pelo método adaptado neste trabalho em diferentes níveis de fortificação, em triplicata, e cada nível foi injetado três vezes. A partir das nove determinações foi calculado o CV (%).

2.2.4 Biodegradação em farinha de trigo

Para o ensaio de degradação foi realizada uma simulação do processo de produção de massa utilizada em panificação. Para isso farinha de trigo foi contaminada inicialmente com OTA em dois níveis ($20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e submetida ao processo de hidrólise. Para hidrólise enzimática foram utilizados 5g de farinha de trigo e 3 mL de extrato enzimático (na proporção 1:2 (proteína:OTA)). Após a homogeneização e formação da massa, estas foram acondicionadas nas condições ótimas de ação (pH e temperatura) para cada carboxipeptidase A sendo a hidrólise realizada em 30 e 60 minutos sob agitação orbital a 100 rpm. Um controle (sem presença de OTA) foi conduzido para cada intervalo de experimento para posterior correção dos interferentes na detecção de OTA e seu metabólito. A extração de OTA e OT α foi realizada conforme método validado, descrito no item 2.2.3.

2.2.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados de caracterização enzimática, degradação de OTA e produção de OT α foi realizada por ANOVA considerando as médias de triplicatas dos ensaios, seguida pelo teste de Tukey a um nível de 5 % ($p < 0,05$), utilizando o programa “Statistica” (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA). A estatística multivariada é uma técnica útil para identificar padrões comuns em conjuntos de dados multivariados. ACP é uma ferramenta para avaliação dos dados, que representa graficamente relações entre amostras e variáveis e fornece uma maneira de reduzir a dimensão dos dados. ACP foi realizado no software Past (folk.uio.no/ohammer/past), a fim de estabelecer as correlações entre a hidrólise enzimática e a degradação de OTA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi dividido em três etapas, primeiramente foi realizado o estabelecimento das condições de atuação enzimática (fontes e caracterização), seguido

de padronização de método de detecção de OTA e OT α em farinhas de trigo e estudo da degradação enzimática.

3.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para definição do tempo de cultivo ideal para realizar a produção enzimática por *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* primeiramente foi acompanhada a atividade ao longo das 120 horas de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1- Atividade de carboxipeptidase A na biomassa de *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* ao longo do intervalo de cultivo.

Tempo (h)	Atividade relativa (%)	
	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
24	99,1 (2,6) ^a	38,2 (5,3) ^c
48	100,0 (2,0) ^a	32,4 (6,3) ^c
72	70,8 (2,8) ^b	100,0 (1,0) ^a
96	39,6 (5,2) ^b	63,2 (3,2) ^b
120	17,7 (11,8) ^c	61,8 (3,3) ^b

Resultados expressos com Média (CV). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa (p<0,05)

A maior atividade foi encontrada em 24-48 horas para *Rhizopus oryzae* e 72 horas para *Trichoderma reesei*. Os tempos encontrados coincidem com o encontrado para produção de outras enzimas hidrolíticas empregando os mesmos microrganismos (KUPSKI et al., 2015).

Portanto, os experimentos posteriores de caracterização e degradação enzimática foram realizados com os extratos enzimáticos obtidos em 48 e 72 horas, para *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, respectivamente.

As condições ótimas de temperatura (Tabela 2), pH (Tabela 3), força iônica (Tabela 4) e concentração do tampão (Tabela 5) foram avaliadas para todos os extratos enzimáticos, com exceção da carboxipeptidase A comercial, cujas condições ótimas foram estabelecidas pelo fornecedor (SIGMA ALDRICH).

Tabela 2- Efeito da temperatura na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas

Temperatura (°C)	Fonte enzimática			
	Farelo de soja	Pancreatina	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
30	100,0(2,5) ^a	19,1(2,9) ^b	32,0(2,3) ^b	85,7(11,0) ^b
40	56,3(5,6) ^b	20,6(10,0) ^b	31,7(2,7) ^b	40,5(5,9) ^c
50	56,3(11,1) ^b	100,0(2,5) ^a	100,0(1,5) ^a	100,0(4,8) ^a
60	SA	16,2(2,0) ^b	27,5(2,9) ^b	17,1(11,1) ^d

SA-sem atividade. Resultados expressos com Média (CV). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

As reações enzimáticas têm sua velocidade aumentada pelo acréscimo da temperatura dentro da faixa em que a enzima é estável e mantém sua atividade integral, enquanto que a temperatura ótima corresponde aquela na qual o efeito do aumento da temperatura na proporção de quebra do complexo ES é exatamente contrabalançado pela desnaturação da enzima (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002). As temperaturas ótimas encontradas para carboxipeptidase A de *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei* e pancreatina foram de 50 °C, enquanto para o farelo de soja foi de 30 °C. Em todas as fontes, temperaturas acima da ótima causaram redução significativa na atividade de carboxipeptidase A, indicando a prevalência das reações de desnaturação.

O pH influencia a atividade enzimática propiciando que os grupamentos do centro ativo fiquem na forma química adequada para reagirem com o substrato e na estabilidade da conformação espacial da enzima (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002). Entre as enzimas estudadas, as extraídas de *Trichoderma reesei* e soja apresentaram menor sensibilidade a variação de pH, não apresentando diferença estatística entre pH 6,5 e 8,5 para as obtidas de *Trichoderma reesei* e pH 6,5 e 7,5 para as do farelo de soja. Em contrapartida, as enzimas provenientes da pancreatina e do *Rhizopus oryzae* apresentaram redução significativa de atividade quando submetidas a valores de pH diferentes do pH ótimo (pH 7,5).

Tabela 3- Efeito do pH na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas

pH	Fonte enzimática			
	Farelo de soja	Pancreatina	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
3,5	38,9(14,3) ^c	5,7(1,8) ^f	7,6(1,3) ^f	25,1(4,0) ^d
4,5	44,4(12,3) ^{bc}	18,1(5,5) ^e	10,2(1,0) ^e	85,4(0,7) ^b
5,5	55,6(10,0) ^b	22,5(0,4) ^d	12,9(1,6) ^d	47,6(4,2) ^c
6,5	88,9(4,8) ^a	31,3(3,2) ^c	41,1(2,4) ^b	99,0(5,5) ^a
7,5	100(1,6) ^a	100,0(0,1) ^a	100,0(0,1) ^a	100,0(0,1) ^a
8,5	38,9(11,2) ^c	41,0(2,4) ^b	19,9(0,5) ^c	97,4(1,0) ^a

Resultados expressos com Média (CV). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa (p<0,05)

Bradley et al. (1994) avaliaram a temperatura ótima e pH ótimo de CPA de avestruz e encontraram como temperatura ótima 40 °C, acima da qual já era evidenciado a redução da atividade relativa, assim como no presente trabalho, e pH ótimo a faixa de 8-8,5. Vértesi et al.(1999) realizaram a caracterização de carboxipeptidase A isolada de pâncreas bovino e encontraram para temperatura ótima a faixa de 30-35 °C e como pH ótimo 7,5-8,0, fato que também norteou os intervalos dos parâmetros estudados em nossos experimentos.

A presença de sais altera a solubilidade das enzimas. Quanto maior a força iônica, mais espécies se ligarão à molécula, aumentando a solubilidade da enzima (efeito *salting in*). No entanto, em concentrações salinas elevadas ocorre o fenômeno *salting out*, com precipitação da enzima e consequente perda de atividade. Assim como no pH e na temperatura, há uma concentração salina ótima para a ação enzimática (Tabela 4), sendo estas de 0,5 M para *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei* e pancreatina e de 1,0 M para a enzima extraída do farelo de soja.

Tabela 4- Efeito na força iônica na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas

Força iônica (M)	Fonte enzimática			
	Farelo de soja	Pancreatina	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
0,0	17,5(5,7) ^d	72,7(1,4) ^d	SA	SA
0,1	27,5(3,6) ^c	32,2(0,6) ^f	23,7(4,2) ^d	94,4(1,1) ^b
0,5	50,0(10,0) ^c	100,0(0,1) ^a	100,0(0,1) ^a	100,0(0,1) ^a
1,0	100,0(0,1) ^a	88,4(0,5) ^b	35,0(2,9) ^b	94,9(1,1) ^b
1,5	67,5(1,5) ^b	63,9(1,6) ^e	20,9(4,8) ^e	85,3(1,2) ^c
2,0	25,0(0,8) ^c	85,2(1,2) ^c	28,1(0,4) ^c	40,4(2,5) ^d

SA-sem atividade. Resultados expressos com Média (CV). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Assim como a força iônica do tampão, sua concentração também deve ser padronizada (Tabela 5). Com relação às carboxipeptidases estudadas obteve-se como concentração ótima 25 mM, com exceção da enzima extraída de *Rhizopus oryzae* que foi de 5 mM.

Tabela 5- Efeito da concentração de tampão na atividade de carboxipeptidase A dos extratos enzimáticos das diferentes fontes enzimáticas

Concentração de tampão (mM)	Fonte enzimática			
	Farelo de soja	Pancreatina	<i>Rhizopus</i>	<i>Trichoderma</i>
5	52,5(1,0) ^c	84,6(1,2) ^c	100,0(0,1) ^a	30,1(3,3) ^g
10	98,0(0,1) ^a	74,0(2,7) ^e	58,9(1,7) ^d	48,0(2,1) ^e
20	75,0(2,7) ^b	94,8(1,1) ^b	34,7(2,9) ^f	85,7(1,2) ^b
25	100,0(0,1) ^a	100,0(0,1) ^a	68,2(1,5) ^c	100,0(0,1) ^a
30	12,5(4,0) ^e	92,7(1,1) ^b	74,7(2,7) ^b	38,3(2,6) ^f
40	55,0(1,8) ^c	78,9(1,3) ^d	71,9(1,4) ^b	56,8(1,8) ^d
50	40,0(2,5) ^d	83,1(2,4) ^c	50,7(1,4) ^e	74,6(2,7) ^c

Resultados expressos com Média (CV). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

A determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $v_{m\acute{a}x}$ foi realizada nas condições ótimas de reação para cada extrato enzimático e o estudo da termoestabilidade enzimática na temperatura ótima de ação dos diferentes extratos foi realizado para garantir a manutenção da atividade enzimática durante o processo de degradação (Tabela 6).

Tabela 6- Parâmetros cinéticos e termoestabilidade de carboxipeptidase A nas diferentes fontes de enzima

Fonte	$v_{m\acute{a}x}$ (U.mg _{proteína} ⁻¹)	K_M (mM)	$t_{1/2}$ (minutos)
Pancreatina	0,74	0,015	75*
<i>Rhizopus oryzae</i>	0,36	0,019	120*
<i>Trichoderma reesei</i>	0,25	0,001	169*
Soja	0,23	0,002	124**
CPA	50,0	0,010	277***

* 50 °C; ** 30 °C; *** 25 °C. CPA- carboxipeptidase A comercial.

Conforme a equação de Michaelis e Mentem o K_M corresponde à concentração de substrato necessária para obter a metade da velocidade máxima, podendo também ser utilizado como medida da afinidade de determinada enzima pelo substrato (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

O K_M obtido para carboxipeptidase de *Rhizopus oryzae*, comercial e pancreatina foram superiores ao encontrado (0,019; 0,015; 0,010 mM, respectivamente) para as extraídas do farelo de soja e *Trichoderma reesei* (0,002 e 0,001, respectivamente), indicando menor afinidade pelo substrato utilizado. No entanto, o valor encontrado para todos os extratos é inferior ao reportado para carboxipeptidase extraída do pâncreas bovino (1 mM) por Véteri et al. (1999).

Os resultados de termoestabilidade mostram que entre as fontes utilizadas para temperatura de 50 °C, as carboxipeptidases provenientes dos microrganismos mostraram um tempo de meia vida superior (duas vezes) a enzima de origem animal. Vértesi et al. (1999) realizaram a termoestabilidade de carboxipeptidase A isolada de pâncreas bovino entre 45 e 60°C e a 55°C a enzima foi praticamente inativada em 30 minutos de reação.

Foram adotados 30 e 60 minutos como tempos reacionais para o ensaio de degradação.

3.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OTA E OT α EM FARINHAS DE TRIGO

As curvas analíticas para OTA e OT α , bem como seus parâmetros, estão na Tabela 7. Os dados mostram que o procedimento foi adequado para a quantificação dos dois analitos, uma vez que seus indicadores cumprem as recomendações de análise de confiabilidade, tendo em vista que a ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. Além disso, as linearidades das curvas apresentaram ampla faixa de aplicação, sendo que as curvas da matriz apresentam a vantagem de carregar consigo os interferentes inerentes ao extrato na amostra.

Tabela 7- Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-FL

Parâmetros	OTA	OTα
Curva no solvente	$y = 11874,62x + 1208,54$	$y = 24435,41x + 2762,62$
Linearidade	0,1- 10 ng.mL ⁻¹	0,05- 20 ng.mL ⁻¹
Coeficiente de correlação	1,000	1,000
Coeficiente de determinação	1,000	1,000
LD _i	0,05 ng.mL ⁻¹	0,025 ng.mL ⁻¹
LQ _i	0,10 ng.mL ⁻¹	0,05 ng.mL ⁻¹
Curva na matriz	$y = 9697,250x - 1481,975$	$y = 12259,090x + 5.882,94$
Linearidade	0,04- 7,5 ng.g ⁻¹	0,025- 5 ng.g ⁻¹
Coeficiente de correlação	1,000	0,998
Coeficiente de determinação	1,000	0,996
LD _m	0,025 ng.g ⁻¹	0,013ng.g ⁻¹
LQ _m	0,04 ng.g ⁻¹	0,025 ng.g ⁻¹

LD_i - limite de detecção do instrumento; LQ_i- limite de quantificação do instrumento; LD_m - limite de detecção do método; LQ_m- limite de quantificação do método

As recuperações do método foram de 80,0% (3x LQ); 90,6% (5x LQ) e 86,6% (10x LQ), com um CV de 2, 4 e 10%, para OTA; e 112,0% (3x LQ); 97,7% (5x LQ) e

97,9% (10x LQ), com um CV de 8, 12 e 15%, para OT α . Segundo a diretriz da Comissão Europeia que faz recomendações específicas para desempenho de ensaios de recuperação de micotoxinas (2006/401/EC), para a OTA utilizada em níveis de concentração menores que 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o valor de recuperação recomendado é entre 50 e 120% (EC, 2006b). Portanto, o método validado pode ser empregado com confiabilidade para o acompanhamento da degradação enzimática de OTA e produção de OT α em farinhas de trigo.

Brera et al. (2011) estudaram o método de determinação de OTA e aflatoxina em *baby foods* e encontraram para limite de quantificação o valor de 0,02 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ e recuperação do analito entre 77-86%.

Kupski e Badiale-Furlong (2015) desenvolveram método de QuEChERS para análise de OTA em farinhas de trigo e encontraram como limite de quantificação de 0,05 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ e recuperação entre 97,6 e 105%.

Coronel et al. (2011) desenvolveram método de determinação de OTA e OT α em amostras de urina por CLAE-FL e obtiveram como limites de detecção e quantificação para OTA 0,034 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,112 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para OT α 0,023 e 0,076 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Os ensaios de recuperação estudados apresentaram valores médios de 71,3% e 70,8% para OTA e OT α , respectivamente.

3.3 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

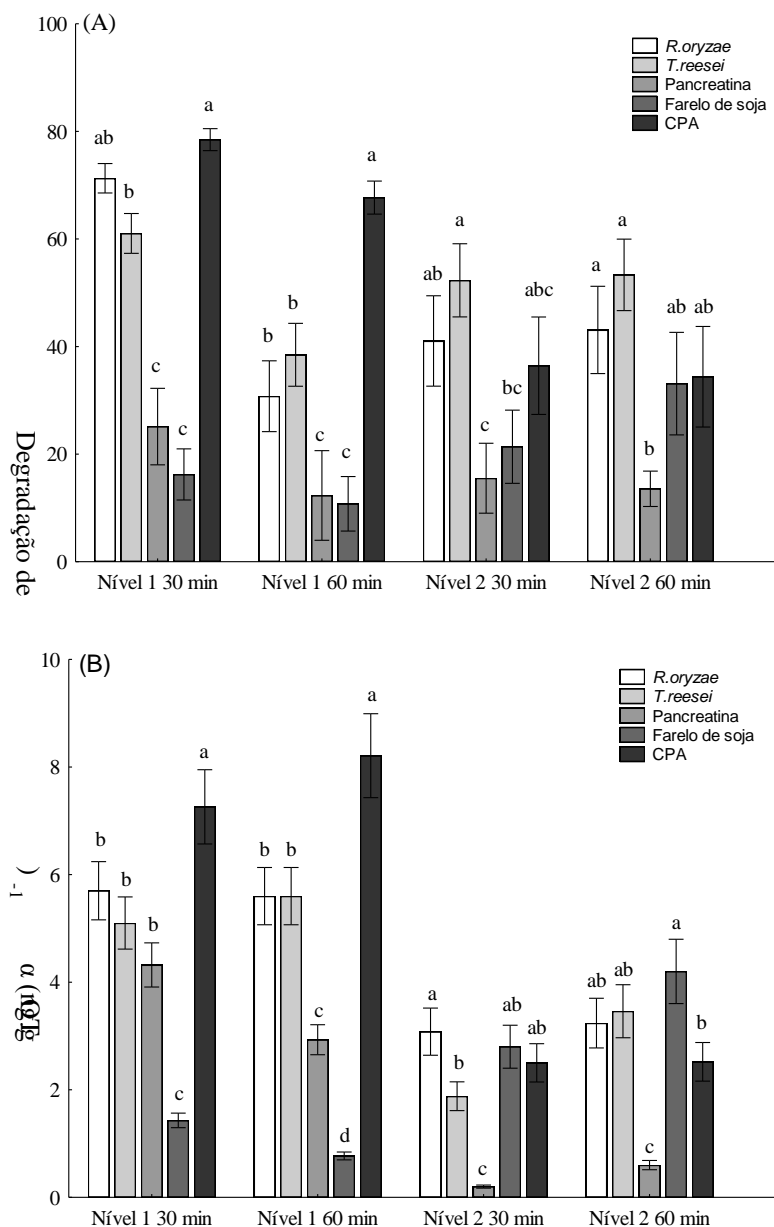
As carboxipeptidases provenientes de fontes animal (pancreatina (1 $\text{U}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$) e CPA (50 $\text{U}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$)), vegetal (farelo de soja (0,3 $\text{U}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$) e microbiana (*Rhizopus oryzae* (0,4 $\text{U}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$) e *Trichoderma reesei* (0,3 $\text{U}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$)) foram aplicadas em farinhas de trigo contaminadas artificialmente com OTA no nível legislado (20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e acima do nível legislado (200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), com o intuito de reduzir os níveis da micotoxina e avaliar a produção do metabólito OT α (Figura 1).

De acordo com Abrunhosa, Venâncio e Teixeira (2011) o principal caminho pelo qual ocorre a descontaminação de OTA envolve a hidrólise da ligação amida que une a OT α à molécula de fenilalanina. Esta reação é mediada por proteases intra ou extracelulares, especialmente a carboxipeptidase A.

Este aspecto foi confirmado no estudo de degradação enzimática visto que as carboxipeptidases A utilizadas apresentaram uma correlação negativa e significativa da

redução de OTA com a produção de OT α , nomeadamente: carboxipeptidase A de *Rhizopus oryzae* (-0,995 $p < 0,05$), carboxipeptidase A de *Trichoderma reesei* (-0,913 $p < 0,05$), CPA (-0,989 $p < 0,05$) e pancreatina (-0,952 $p < 0,05$); com exceção da carboxipeptidase A do farelo de soja (-0,246 $p > 0,5$).

Figura 1- Redução dos níveis de OTA (A) e produção de OT α (B) por ação de diferentes carboxipeptidases em farinhas de trigo contaminadas com dois níveis de OTA (Nível 1- 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; Nível 2- 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).



CPA-carboxipeptidase A comercial. Letras diferentes em cada nível indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

O estudo do tempo de ação enzimática indicou que todas as carboxipeptidases utilizadas apresentaram maior ação hidrolítica no intervalo de 30 minutos, fator

interessante do ponto de vista econômico, pois o intuito é desenvolver um procedimento aplicável em processos industriais para redução da contaminação de produtos agrícolas.

A carboxipeptidase de farelo de soja e a solução de pancreatina apresentaram menor degradação de OTA, com média de 17,8% e 16,8%, respectivamente; e conseqüentemente menor produção de OT α com média de 2,3 e 2 ng.g⁻¹. Para a pancreatina este efeito pode ser explicado devido ao tempo de meia vida na temperatura de ação, visto que sua ação para redução dos níveis de OTA já foi relatada (KUPSKI et al., 2013). No que diz respeito ao farelo de soja, a carboxipeptidase A pode não estar tão ativa quanto às outras estudadas ou outros tipos de enzimas degradativas estão presentes, justificando também a baixa correlação entre degradação de OTA e OT α .

As carboxipeptidases mais eficientes foram as provenientes dos microrganismos e da CPA (enzima comercial), com degradação variando de 30 a 71% para a carboxipeptidase de *Rhizopus oryzae*, 38,5 a 61,0% para a de *Trichoderma reesei*, 36,4 a 78,5% para CPA. A produção de OT α variou entre 3,1 e 5,6 ng.g⁻¹ para *Rhizopus oryzae*, 1,9 e 5,1 ng.g⁻¹ para *Trichoderma reesei* e 2,5 e 8,2 ng.g⁻¹ para CPA. Os resultados colaboram para busca de fontes enzimáticas de origem microbiana e enfatizam que não são necessárias muitas etapas de purificação para obtenção de níveis satisfatórios de degradação, uma vez que os resultados foram próximos ao obtido por carboxipeptidase comercial.

É importante salientar que entre os níveis testados, o nível acima do limite legislado (200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) não apresentou resultados tão satisfatórios como o nível legislado (20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), pois a redução dos percentuais de degradação foi observada nas carboxipeptidases A das diferentes fontes estudadas. Este comportamento também se deve a estratégia adotada de conservar a proporção de enzima e substrato que possivelmente não seja suficiente para manter o mesmo equilíbrio na cinética de degradação. Portanto, estudos para otimizar a degradação em diferentes níveis de contaminação precisam ser conduzidos.

O estudo de degradação enzimática para contaminação nos níveis da dose máxima tolerada pela legislação, 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ANVISA, 2013), mostra a eficiência de hidrólise que varia de 7,3 a 51,3%, tendo os melhores resultados utilizando a CPA (51,3%) e as carboxipeptidases provenientes de *Rhizopus* (37,3%) e *Trichoderma* (35,7%).

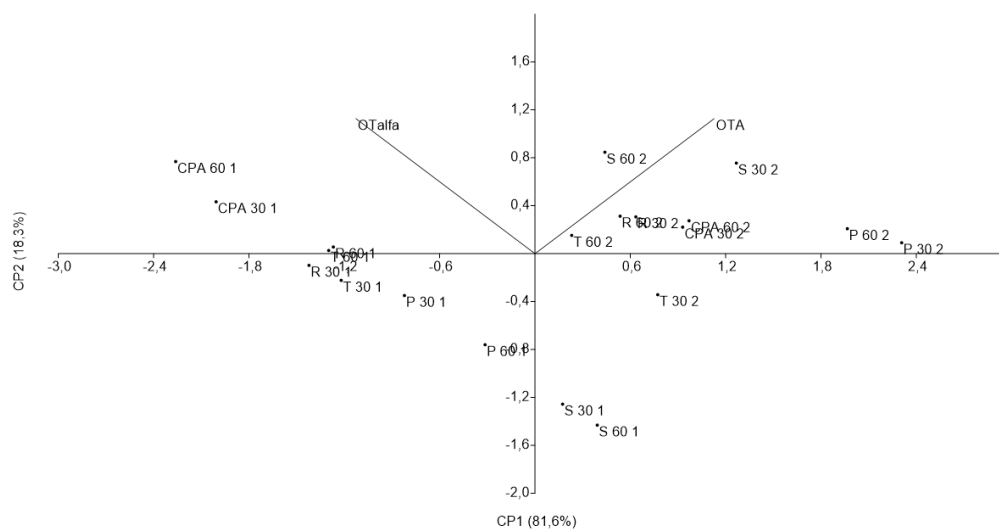
Estudos *in vitro* reportam a ação de diferentes enzimas na degradação de OTA e produção de OT α , por exemplo, carboxipeptidase Y, isolada de *S.cerevisiae* que apresentou uma conversão após 6 dias de 52% de OTA em OT α (ABRUNHOSA;

PATERSON; VENÂNCIO, 2010), o que do ponto de vista de aplicação em processo é um intervalo operacional muito elevado. Stander et al. (2000) realizaram um *screening* de diferentes enzimas hidrolíticas comerciais para degradação de OTA e produção de OT α , e dentre estas a lipase de *A.niger* apresentou 100% de conversão de OTA em OT α em 120 minutos, porém o mecanismo para tal redução e os outros produtos formados não foram demonstrados.

Cabe ressaltar que os autores avaliaram a ação enzimática *in vitro* e não foram encontrados relatos na literatura do emprego de enzimas em matrizes complexas para acompanhar a redução de OTA e produção de OT α , somente há relatos sobre indicativos de ação de carboxipeptidases, como no acompanhamento da diminuição de OTA na fabricação de pães (MELANIA et al., 2014) ou durante fermentação de vinhos (MECA; BLAIOTTA; RITIENI, 2010).

Para explicar a variabilidade dos resultados encontrados foi realizada uma análise multivariada de componentes principais (ACP) (Figura 2).

Figura 2- Análise de componentes principais para o estudo de degradação enzimática, utilizando diferentes extratos enzimáticos.



CP-componente principal; CPA- carboxipeptidase A comercial; P- pancreatina; S- carboxipeptidase A de farelo de soja; R- carboxipeptidase A de *Rhizopus oryzae*; T- carboxipeptidase A de *Trichoderma reesei*; 30- 30 minutos de hidrólise; 60- 60 minutos de hidrólise; 1- nível 1; 2-nível 2

ACP tem como fundamento a geração de novas variáveis, denominadas componentes principais, para explicar a variabilidade dos resultados, além de evidenciar a correlação entre as diferentes variáveis estudadas. Neste trabalho, a variabilidade dos

resultados foi simplificada para duas componentes: componente 1 que explica 81,6% e a componente 2 que explica 18,3%.

A distribuição no plano do gráfico das amostras de farinha submetidas ao processo de degradação enzimática confirmam a eficiência da ação das enzimas microbianas e da CPA, apresentando maior correlação com o teor de OT α . Adicionalmente, considerando-se a diferença estrutural dos dois analitos avaliados, pode-se estimar que o componente 1 está relacionada com a presença de fenilalanina, enquanto que a componente 2 está relacionada a fração isocumarina, pois OTA e OT α apresentam mesma relação positiva com a componente 2 (presença de isocumarina) e relação inversa com a componente 1 (positiva para OTA (presença de fenilalanina) e negativa para OT α (ausência de fenilalanina)).

Além disso, o comportamento de todas as carboxipeptidases extraídas é similar e pode indicar pouca geração de outros metabólitos. Sendo assim, observando os resultados do estudo toxicológico realizado para OTA e OT α em neutrófilos humanos (*dados não apresentados*) pode-se recomendar a aplicação de carboxipeptidases em processamento de alimentos, especialmente em processos de panificação (simulados neste trabalho) justificando que a ação delas causa uma redução significativa da toxicidade da matriz, diminuindo assim o risco de exposição à micotoxina quando matéria prima contaminada é utilizada, por exemplo, farinha de trigo para diferentes processos.

4. CONCLUSÃO

O método validado em CLAE-FL foi eficiente para detecção de OTA e OT α em farinhas de trigo, com a percentagem de recuperação média de 85,7% e 102,5%, respectivamente.

O estudo de degradação enzimática de OTA em farinhas de trigo, apresentou resultados de redução de OTA entre 16,8 e 78,5% e produção de OT α entre 2 a 8,2 ng.g⁻¹ tendo como extratos mais promissores os provenientes de *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* e carboxipeptidase comercial.

Mesmo que os limites máximos toleráveis (LMT) estejam contemplados, o risco de exposição crônica pode ser reduzido, especialmente considerando a frequência de consumo de produtos a base de farinhas de trigo.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, 2010.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 231-242, 2006.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, 2002.
- ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1909–1914, 2007.
- ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J.A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 351-355, 2011
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Guide for validation of analytical and bioanalytical methods]. RDC No 899, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC N° 59, de 26 de fevereiro de 2013. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, n. 252, ISSN 1677-7042, 2013.
- BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1038-1044, 2004.
- BRADLEY, G.; NAUDÉ, R.Y.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; OELOFSEN, W. Ostrich (*Struthio camelus*) carboxypeptidase A: purification, kinetic properties and characterization of the pancreatic enzyme. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 555-564, 1994.
- BRERA, C.; DEBEGNACH, F.; SANTIS, B.D.; PANNUNZI, E.; BERDINI, C.; PRANTERA, E.; GREGORI, E.; MIRAGLIA, M. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxins A in baby foods and paprika by HPLC with fluorescence detection: A single-laboratory validation study. **Talanta**, v. 83, n. 5, p.1442-1446, 2011.

CORONEL, M.B.; MARIN, S.; TARRAGÓ, M.; CANO-SANCHO, G.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1436-1442, 2011.

CORONEL, M.B.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MARIN, S. Assessment of the exposure to ochratoxin A in the province of Lleida, Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2847-2852, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. OJ L 70, p. 12, 2006b.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

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

KUPSKI, L.; ALVES, C.L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase from *Rhizopus* on ochratoxin A degradation. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 30-36, 2013.

KUPSKI, L.; SILVELLO, M.A.C.; FONTES, M.R.V.; LIMA, T.S.; TREICHEL, H.; BADIALE-FURLONG, E. *Rhizopus oryzae* cellulases: a new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129-138, 2015.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLON, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food Chemistry**, v. 177, n. 1, p. 354-360, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 3.ed, 2002.

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

MALIR, F.; OSTRY, V.; NOVOTNA, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. **Toxin reviews**, v. 32, n. 2, p. 19-33, 2013.

MATEO, E.M.; MEDINA, Á.; MATEO, R.; JIMÉNEZ, M. Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 935-941, 2010.

- MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 579-583, 2010.
- MELANIA, M.F.; ERSILIA, A.; MARIANA, P.; RAMONA, G.; IOAN, C.; RENATA, S. The possibility to reduce OTA contamination in the flour milling and baking industries. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. S84, 2014.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K.R.N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 290-296, 2011.
- PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓN-GALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels: A practical example in the hydrolysis of casein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 711-718, 2002.
- PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C.; VARGA, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 205-210, 2007.
- PITOUT, M.J. A rapid spectrophotometric method for the assay of carboxipeptidase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1829-1836, 1969.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- STANDER, M.A.; BORNSCHEUER, U.T.; HENKE, E.; STEYN, P.S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5736-5739, 2000.
- VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON, J.J. Ochratoxin A a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1132, 1965
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 321-328, 2005.
- VARGA, J.; TÓTH, B. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A Review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 53, n. 2, p. 189-203, 2005.
- VÉRTESI, A.; SIMON, L.M.; KISS, I.; SZAJÁNI, B. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1-2, p.73-79, 1999.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÃO

A necessidade de adaptação do método QuEChERS para cada matriz utilizada ficou demonstrada neste trabalho através de técnica multivariada, assim como a aplicabilidade da técnica de camada delgada empregando o software ImageJ para determinação de OTA para monitorar a ocorrência nos níveis adotados na legislação brasileira. O método validado para determinação da micotoxina em farinhas de trigo por CLAE-FL foi eficiente, apresentando recuperações de 97,6 a 105%.

O emprego do método validado permitiu a estimativa do risco de exposição à OTA, com um valor de ingestão diária de $0,08 \text{ ng}_{\text{OTA}} \cdot \text{kg}_{\text{massacorpórea}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e disponibilização para absorção no organismo de 94,4% do conteúdo inicial da micotoxina. Esse resultado é importante tanto do ponto de vista econômico como da saúde do consumidor, norteador a busca por alternativas para redução dos níveis do contaminante em diferentes matrizes alimentícias.

O estudo de degradação *in vitro* com *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, apresentou resultados de redução de OTA de 63,5% e 57,7%, respectivamente, com produção do metabólito OT α . Sendo assim, eles podem constituir uma fonte de enzimas que possam ser usadas para a degradação de OTA a OT α em produtos agrícolas contaminados.

O estudo de degradação enzimática de OTA em farinhas de trigo mostrou que a OTA pode ser reduzida entre 16,8 e 78,5% resultando no seu derivado OT α (2 a 8,2 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$) sendo as carboxipeptidases A provenientes de *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* as mais promissoras, bem como a carboxipeptidase comercial.

Foi confirmada a ausência de toxicidade no metabólito OT α através do estudo comparativo da toxicidade de OTA e OT α em neutrófilos humanos. Ficou elucidado que mecanismo de ação de OTA ocorre pelo aumento de Ca^{2+} intracelular liberado a partir das reservas internas, com consequente produção de espécies reativas, depleção de ATP, perda de potencial de membrana mitocondrial, levando à morte por necrose.

Os estudos de degradação e toxicidade de OTA e OT α permitem estimar que a aplicação de enzimas carboxipeptidases em processamento de alimentos causa uma redução significativa da toxicidade da matriz, diminuindo assim o risco de exposição à micotoxina quando matéria prima contaminada é utilizada, reduzindo inclusive o risco de exposição crônica.

CAPÍTULO V

5. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Otimizar as condições de hidrólise para as carboxipeptidases obtidas pelos microrganismos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9414;

Consolidar a eficiência do processo de degradação em farinhas de trigo através da análise toxicológica na matriz;

Aplicar extratos enzimáticos em processo de panificação e acompanhar o efeito de redução micotoxicológica e de toxicidade.

Desenvolver sensor enzimático utilizando carboxipeptidase A para detecção de OTA em matrizes alimentícias.

CAPÍTULO VI

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L.; INÊS, A.; RODRIGUES, A.I.; GUIMARÃES, A.; PEREIRA, V.L.; PARPOT, P.; MENDES-FALA, A.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus pavulus* isolated from Douro wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 45-52, 2014.

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, 2010.

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

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.25, p. 7493-7496, 2002.

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

ABRUNHOSA, L.; VENANCIO, A.; TEIXEIRA, J.A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 351-355, 2011.

AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; MIRHOSSEINI, H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 113-119, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC nº7 fevereiro de 2010. Disponível em: <http://brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/102985-7.html> . Acesso em nov 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 59, de 26 de fevereiro de 2013. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, n. 252, ISSN 1677-7042, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Guide for validation of analytical and bioanalytical methods]. RDC No 899, 2003.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 6-9, 1981.

AIKAT, K.; BHATTACHARYYA, B.C. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 907-914, 2000.

ALBORCH, L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 97-103, 2012.

ALEO, M.D.; WYAT, R.D.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules, **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 107, n. 1, p. 73-80, 1991.

ALEXOPOULOS, G.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, John Wiley and Sons, New York, 1996.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLES-PEÑA, E.; LIZARRAGA, T.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A.L. A simple chemical method reduces ochratoxin A in contaminated cocoa shells. *Journal of Food Protection*, v. 71, n. 7, p. 1422-1426, 2008.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 326-333, 2009.

AMÉZQUETA, S.; SCHORR-GALINDO, S.; MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GUIRAUD, J.P. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 259-268, 2012.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDERSON, R.; STEEL, H.C.; TINTINGER, G. R. Inositol 1,4,5-triphosphate-mediated shuttling between intracellular stores and the cytosol contributes to the sustained elevation in cytosolic calcium in FMLP-activated human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1567-1575, 2005.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; Nicotera, P. Glutamate induced neuronal death: a

succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 961-973, 1995.

ARBILLAGA, L.; AMÉZQUETA, A.; EZPELETA, O.; DE CERAIN, A.L. Oxidative DNA damage induced by ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 35-42, 2007.

ASSAF, H.; AZOURI, H.; PALLARDY, M. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-x(L). **Toxicological Sciences**, v. 79, n. 2, p. 335-344, 2004.

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

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Conidia of black aspergilli as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8224–8229, 2005.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1038-1044, 2004.

BELLÍ, N.; RAMOS, A.; CORONAS, I.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 839-844, 2005.

BENESIC, A.; MILDENBERGER, S.; GEKLE, M. Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signaling in immortalized human kidney epithelial cells. **Pflugers Archives-European Journal of Physiology**, v. 439, n. 3, p. 278-287, 2000.

BENNET, J. W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. **Mycopathologia**, v. 100, p. 3-5, 1987.

BENNOUR, E.E.G.; BOUAZIZ, C.; LADJIMI, M.; RENAUD, F.; BACHA, H. Comparative Mechanisms of Zearalenone and Ochratoxin A Toxicities on Cultured HepG2 cells: Is Oxidative Stress a Common Process? **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 6, p.538-48, 2009.

BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 334, n. 3, p. 211-276, 1985.

BOESCH-SAADATMANDI, C.; LOBODA, A.; JOZKOWICZ, A.; HUEBBE, P.; BLANK, R.; WOLFFRAM, S.; DULAK J.; RIMBACH, G. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase

in cultured kidney tubulus cells. **Food Chemical and Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2665-2671, 2008.

BOUAZIZ, C.; EL DEIN, O. S.; EL GOLLI, E.; ABID-ESSEFI, S.; BRENNER, C.; LEMAIRE, C.; BACHA, H. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. **Toxicology**, v. 254, n. 1-2, p. 19-28, 2008.

BRADLEY, G.; NAUDÉ, R.Y.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; OELOFSEN, W. Ostrich (*Struthio camelus*) carboxypeptidase A: purification, kinetic properties and characterization of the pancreatic enzyme. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 555-564, 1994.

BRÉCHARD, S.; MELCHIOR, C.; PLANÇON, S.; SCHENTEN, V.; TSCHIRHART, E.J. Store-operated Ca^{2+} channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. **Cell Calcium**, v. 44, n. 5, p. 492-506, 2008.

BRECHARD, S; TSCHIRHART, E.J. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 5, p. 1223-1237, 2008.

BRERA, C.; DEBEGNACH, F.; SANTIS, B.D.; PANNUNZI, E.; BERDINI, C.; PRANTERA, E.; GREGORI, E.; MIRAGLIA, M. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxins A in baby foods and paprika by HPLC with fluorescence detection: A single-laboratory validation study. **Talanta**, v. 83, n. 5, p.1442-1446, 2011.

BROOKES, P.S., YOON, Y.S.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. C817-C833, 2004.

BULLERMAN, L.B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, 2007.

BUSTAMANTE-RANGEL, M.; DELGADO-ZAMARREÑO, M.M.; PÉREZ-MARTÍN, L.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. QuEChERS method for the extraction of isoflavones from soy-based foods before determination by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 203-209, 2013.

CABREDO-PINILLOS, S.; CDRON-FERNANDEZ, T.; GONZALES-BRIONGOS, M.; PUENTE-PASCUAL, L.; SAENZ-BARRIO, C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: optimisation of the method. **Talanta**, v. 69, n. 5, p. 123–1129, 2006.

CACCIAMANI, J.L.M.; PERES, G.L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **Boletim do Centro de pesquisa e processamento de alimentos**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

CALLAGHAN, J.O.; CADDICK, M.X.; DOBSON, A.D. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, v. 149, p. 3485–3491, 2003.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975-983, 2012.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEN, C.Y.; LIAW, C.C.; CHEN, Y.H.; CHANG, W.Y.; CHUNG, P.J.; HWANG, T.L. A novel immunomodulatory effect of ugonin U in human neutrophils via stimulation of phospholipase C. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, p. 222-231, 2014.

CHOPRA, M.; LINK, P.; MICHELS, C.; SCHRENK, D. Characterization of ochratoxin A-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 239-254, 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 456, 2006.

COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T.; NESTER, M.A.; EFRAIM, P.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 100-104, 2013.

CORONEL, M.B.; MARIN, S.; TARRAGÓ, M.; CANO-SANCHO, G.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1436-1442, 2011.

CORONEL, M.B.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MARIN, S. Assessment of the exposure to ochratoxin A in the province of Lleida, Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2847-2852, 2009.

COSSARIZZA, A.; SALVIOLI, S. Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1. **Current Protocols in Cytometry**, Chapter 9: Unit 9 14, 2001.

COSTA, V.M.; SILVA, R.; FERREIRA, L.M.; BRANCO, P.S.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, R.A.; CARVALHO, M.; REMIAO, F. Oxidation

process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: Formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 8, p. 1183-1191, 2007.

CREPPY, E.E.; KERN, D.; STEYN, P.S.; VLEGGAR, R.; OSCHENTHALER, R.R.; DIRHEIMER, G. Comparative study on the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-t-RNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. **Toxicology Letters**, v.19, n. 3, p. 217–224, 1983.

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

DIENES, D.; BORJESSON, J.; HAGGLUND, P.; TJERNELD, F.; LIDÉN, G.; RÉCZEY, K.; STALBRAND, H. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1087-1094, 2007.

DIRHEIMER, G.; CREPPY, E.E. Mechanism of action of ochratoxin A. **IARC Scientific Publication**. v. 115, p. 171-186, 1991.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; GRIESS, G.A.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Intracellular Ca^{2+} thresholds that determine survival or death of energy-deprived cells. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 1, p. 231-240, 1998.

DOPP, E.; MÜLLER, J.; HAHNEL, C.; SCHIFFMANN, D. Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in Syrian hamster embryo (SHE) Fibroblasts caused by ochratoxin A. **Food Chemical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 713–721, 1999.

DUARTE, S.C.; BENTO, J.; PENA, A.; LINO, C.M.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; ALVES, M.R.; PEREIRA, J.A. Influencing factors on Bread-derived exposure of ochratoxin A: Type, origin and composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2139-2147, 2010a.

DUARTE, S.C.; BENTO, J.; PENA, A.; LINO, C.M.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; ALVES, M.R.; PEREIRA, J.A. Influencing factors on Bread-derived exposure of ochratoxin A: Type, origin and composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2139-2147, 2010b.

DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 187-188, 2010.

DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. Ochratoxin A non-conventional exposure sources - A review. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 2, p. 115-120, 2009.

ERMAK, G.; DAVIES, J.A.K. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 10, p. 713-721, 2001.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 634-640, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. OJ L 70, p. 12, 2006b.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union, L229, p. 7-9, 2006a.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food, 2006.

FABIANI, A.; CORZANI, C.; ARFELLI, G. Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect ochratoxin A in wine. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 281-285, 2010.

FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁCS, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. **Food Additives Contamination**, v. 22, n. 9, p. 856-863, 2005.

FERNANDES, P.J.; BARROS, N.; CÂMARA, J.S. A survey of the occurrence of ochratoxin A in Madeira wines based on a modified QuEChERS extraction procedure combined with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 293-301, 2013.

FERREIRA, I.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 188-193, 2012.

FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytical Chimica Acta**, v. 649, n. 1, p. 8-23, 2009.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 7-8, p. 570-575, 2008.

FREITAS, M.; RIBEIRO, D.; TOME, S.M.; SILVA, A.M.S.; FERNANDES, E. Synthesis of chlorinated flavonoids with anti-inflammatory and proapoptotic activities in human neutrophils. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 153-164, 2014.

FRENICH, A.G.; ROMERO-GONZÁLES, R.; GÓMEZ-PÉREZ, M.L.; VIDAL, J.L.M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4349-4356, 2011.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

GARDA, J.; BADIALE-FURLONG, E. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. **Revista vetor**, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2003.

GEE, K.R.; BROWN, K.A.; CHEN, W.-N.U.; BISHOP-STEWART, J.; GRAY, D.; JOHNSON, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. **Cell Calcium**, v. 27, n. 2, p. 97-106, 2000.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, p. 45-80, 2005.

GONZÁLES, L.; JUAN, C.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 223-227, 2006.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. Segunda Edição, Wiley-Liss, 1993.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2008.

HAAB, D.; HAGSPIEL, K.; SZAKMARY, K.; KUBICEK, C.P. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulose degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3-4, p.187-198, 1990.

HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M.M.; SCAGLIONI, P.T.; PRIMEL, E.G.; GARDABUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. The QuEChERS method for determination of ochratoxin a and citrinin in rice and rice bran. **Química Nova**, v. 35, n.9, p. 1733-1737, 2012.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, p.876, 2003.

HARWIG, J.; CHEN, Y-K.; KENNEDY, B.P.C.; SCOTT, P.M. Occurrence of Patulin and Patulin-Producing Strains of *Penicillium expansum* in Natural Rots of Apple in Canada. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.6, n.1, p. 22-25, 1973.

HAYAT, A.; PANIEL, N.; RHOUATI, A.; MARTY, J.L.; BARTHELMEBS, L. Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 401-415, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H.C.S.; SOUZA, M.M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G.C.; FAGUNDES, C.A. Determination of deoxynivalenol and zearalenone in natural and parboiled rice and their fractions using QuEChERS and CLAE/UV-FL, **Química Nova**, v. 35, n.9, p. 1244-1249, 2012.

HEURICH, M.; KADIR, M.K.A.; TOTHILL, I.E. An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 156, n. 1, p. 162-168, 2011.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 421-430, 2000.

HOEHLER, D.; MARQUARDT, R.R.; MCINTOSH, A.R.; HATCH, G.M. Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1357, n. 2, p. 225-233, 1997.

HOELTZ, M.; MONEZZI, L.P.; MANFROI, V.; NOLL, I.B.; DOTTORI, H.A. Ochratoxin A: quality analysis of brazilian and imported wines. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 58-63, 2012.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

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

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. 489–599, 1993.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, JECFA. In: 68th Meeting. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, WHO, Geneva, p. 208, 2007.

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

JUAN-GARCIA, A.; MANYES, L.; RUIZ, M.J.; FONT, G. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 40-59, 2013.

KAMP, H.G.; EISENBRAND, G.; SCHLATTER, J.; WURTH, K.; JANZOWSKI, C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, n. 3, p. 413-425, 2005.

KAPETANAKOU, A.E.; KOLLIAS, J.N.; DROSINOS, E.H.; SKANDAMIS, P.N. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 91-99, 2012.

KAPTUROWSKA, A. U.; STOLARZWICZ, I. A.; KRZYCZKOWSKA, J.; BIALECKA-FLORJANCZYK, E. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 1, p. 186-191, 2012.

KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 35-62, 2000.

KAWASHIMA, L. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil. **Tese** (Doutor em Ciência de Alimentos), Campinas, 2004.

KHAN, S.; MARTIN, M.; BARTSCH, H.; RAHIMTULA, A.D. Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 67-72, 1989.

KHAN, S.; MARTIN, M.; BARTSH, H.; RAHIMTULA, A.D. Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n.1, p. 67–72, 1989.

KHORASGANI, Z.N.; BEHFAR, A.; HYDARI, R. Occurrence of ochratoxin A in wheat flour factories in Ahvaz city, Iran. **Toxicology Letters**, v. 211, p. S97, 2012.

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

KLARIC, M. S.; PEPELJNJAK, S.; DOMIJAN, A.M.; PETRIK, J. Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B(1), beauvericin and ochratoxin A. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 100, n. 3, p. 157-164, 2007.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 207-214, 2005.

KOKKONEN, M.; OJALA, L.; PARIKKA, P.; JESTOI, M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1-2, p. 17-25, 2010.

KÖPPEN, R.; KOCH, M.; SIEGEL, D.; MERKEL, S.; MAUL, R.; NEHLS, I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1595-1612, 2010.

KRUVE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1-2, p. 58-66, 2008.

KUMAR, R.; ANSARI, K.M.; SAXENA, N.; DWIVEDI, P.D.; JAIN, S.K.; Das, M. Detection of Ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control**, v. 26, n.1, p. 63-67, 2012.

KUMAR, S.; SHARMA, N.S.; SAHARAN, M.R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

KUPSKI, L., CIPOLATTI, E., ROCHA, M., OLIVEIRA, M.S.; SOUZA-SOARES, L.A., BADIALE-FURLONG, E. Solid-State fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 939-944, 2012.

KUPSKI, L.; ALVES, C.L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase from *Rhizopus* on ochratoxin A degradation. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 30-36, 2013.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLON, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food Chemistry**, v. 177, n. 1, p. 354-360, 2015.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Endoglucanase and Total Cellulase from Newly Isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, Characterization, and Thermal Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458-468, 2014.

KUPSKI, L.; SILVELLO, M.A.C.; FONTES, M.R.V.; LIMA, T.S.; TREICHEL, H.; BADIALE-FURLONG, E. *Rhizopus oryzae* cellulases: a new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129-138, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 3.ed, 2002.

LI, N.; LEI, L.; ZHANG, L.N.; WU, S.; REN, R.; WANG, Y.; ZHANG, H.; Yu, A. A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 105, p. 219-228, 2013.

LIN, L.; ZHANG, J.; WANG, P.; WANG, Y.; CHEN, J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 3-20, 1998.

LIU, J.; WANG, Y.; CUI, J.F.; XING, L.X.; SHEN, H.T.; WU, S.; LIAN, H.G.; WANG, J.L.; YAN, X.; ZHANG, X.H. Ochratoxin A induces oxidative DNA damage and G1 phase arrest in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 2, p. 164-171, 2012.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; CÓRDOVA, M.L.F.; RUIZ-MEDINA, A. Quantitation of ochratoxin a in cereals and feedstuff using sequential

injection analysis with luminescence detection. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 379-385, 2013.

LOUIS, K.S.; SIEGEL, A.C. **Cell viability analysis using trypan blue: Manual and automated methods. Mammalian cell viability: Methods and protocols.** M. J. Stoddart. New York, Human Press: 240, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 131-139, 2007.

MALIR, F.; OSTRY, V.; NOVOTNA, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. **Toxin reviews**, v. 32, n. 2, p. 19-33, 2013.

MARIN-KUAN, M.; CAVIN, C.; DELATOUR, T.; SCHILTER, B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 195-202, 2008.

MASON, T. J. Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 4-5, p. 175- 179, 2003.

MATEO, E.M.; MEDINA, Á.; MATEO, R.; JIMÉNEZ, M. Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 935-941, 2010.

MATEO, R.; MEDINA, A.; MATE, E.M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 79-83, 2007.

MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 579-583, 2010.

MEI, M.; DU, Z.X.; CEN, Y. QuEChERS-Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Five Currently Used Herbicides. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1659-1664, 2011.

MEISNER, H.; CHAN, S. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. **Biochemistry**, v. 13, n. 14, p. 2795–2800, 1974.

MEISNER, H.; CHAN, S. Ochratoxin A, na Inhibitor of mitochondrial transport systems. **Biochemistry**, v. 13, n. 14, p. 2795-2800, 1974.

MELANIA, M.F.; ERSILIA, A.; MARIANA, P.; RAMONA, G.; IOAN, C.; RENATA, S. The possibility to reduce OTA contamination in the flour milling and baking industries. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. S84, 2014.

MIKULÓKOVÁ, R.; BELÁKOVÁ, S.; BENSOVÁ, K.; SVOBODA, Z. Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 55-59, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

MINNING, S.; SERRANO, A.; FERRER, P.; SOLÁ, C.; SCHMID, R.D.; VALERO, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 59-70, 2001.

MITCHELL, E.; PARRA, D.; ADRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 439-445, 2004.

MULLER, G.; ROSNER, H.; ROHRMANN, B.; ERLER, W.; GESCHWEND, G.; GRAFE, U.; BURKERT, B.; MOLLER, U.; DILLER, R.; SACHSE, K.; KOHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. **Toxicology**, v. 184, n. 1, p. 69-82, 2003.

MUÑOZ, K.; BLASZKEWICZ, M.; DEGEN, G.H. Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 27, p. 2623-2629, 2010.

MURILLO-ARBIZU, M.T.; AMÉZQUETA, S.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; CERAIN, A.L. Occurrence of ochratoxin A in southern Spanish Generous wines under the denomination of origin “ Jerez-Xérès-Sherry and ‘Manzanilla’ Sanlúcar de Barrameda”. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1054-1064, 2010.

NASR, P.; GURSAHANI, H.I.; PANG, Z.; BONDADA, V.; LEE, J.W.; HADLEY, R.W.; GEDDES, J.W. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron

death induced by 3-nitropropionic acid. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 2, p. 89-99, 2003.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e conseqüentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, v. 12, p. 69-75, 2006.

OLIVEIRA, M.S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA- Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.

OMAR, R. F.; HASINOFF, B. B.; MEJILLA, F.; RAHIMTULA, A. D. Mechanism of ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 1183-1191, 1990.

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 354-361, 2012.

PAÍGA, P.; MORAIS, S.; OLIVA-TELES, T.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C.; DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2522-2528, 2012.

PATHARAJAN, S.; REDDY, K.R.N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 290-296, 2011.

PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓN-GALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels: A practical example in the hydrolysis of casein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 711-718, 2002.

PENA, A.; CEREJO, F.; LINO, C.; SILVEIRA, I. Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 1288-1293, 2005.

PÉTERI, Z.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C.; VARGA, J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 205-210, 2007.

PETRIK, J.; ZANIC-GRUBISIC, T.; BARISIC, K.; PEPELJNJAK, S.; RADIC, B.; FERENCIC, Z.; CEPELAK, I. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 12, p. 685-693, 2003.

- PIOTROWSKA, M.; ZAKOWSKA, Z. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. **Food Biotechnology**, v. 17, p. 307–310, 2000.
- PITOUT, M.J. A rapid spectrophotometric method for the assay of carboxipeptidase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1829-1836, 1969.
- PONSONE, M.L.; CHIOTTA, M.L.; COMBINA, M.; DALCERO, A.; CHULZE, S. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section Nigri in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 70-77, 2011.
- POOR, M.; VERES, B.; JAKUS, P.B.; ANTUS, C.; MONTSKO, G.; ZRINYI, Z.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S.; PETRIK, J.; KOSZEGI, T. Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. **Journal of Photochemistry & Photobiology B**, v. 132, p. 1-9, 2014.
- PORTO, C.D.; DECORTI, D.; KIKIC, I. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: comparison of three different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 1072–1078, 2009.
- 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, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- QUINTELA, S.; VILLARÁN, M.C.; ARMENTIA, I.L.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A removal in wine: A review. **Food Control**, v. 30, n. 3, p. 439-445, 2013.
- RAHIMTULA, A.D.; BEREZIAT, J.C.; BUSSACCHINNI-GRIOT, V.; BARTSH, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 23, p. 4469–4477, 1988.
- RAMYAA, P.; PADMA, V.V. Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin - Modulation by Nrf2. **Food Chemical and Toxicology**, v. 62, p. 205-216, 2013.
- RAWAL, S.; KIM, J.E.; COULOME, R.J. Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 325-331, 2010.
- REDDY, L.; BHOOLA, K. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 771-779, 2010.

- REINSCH, M.; TOPFER, A.; LEHMANN, A.; NEHLS, I.; PANNE, U. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 312-317, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; Smith, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 36-53, 2007.
- RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1 p. 18-46, 2006.
- ROGRIGUES, S.; PINTO, G.A.S.; FERNANDES, F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95–100, 2008.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- SAITO, K.; IKEUCHI, R.; KATOKA, H. Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, p. 1-6, 2012.
- SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61, 2004.
- SCHILTER, B.; MARIN-KUAN, M.; DELATOUR, T.; NESTLER, S.; MANTLE, P.; CAVIN, C. Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 1, p.88-93, 2005.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia industrial-Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo:Edgard Blucher Ltda, 2001.
- SCHMIDT-HEYDT, M.; GRAF, E.; STOLL, D.; GEISEN, R. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 233-241, 2012.
- SCUMADORE, K.A. Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animals feeds. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. sup1, p. 17-25, 2005.

- SEKIYAMA, B.L.; FERRARI, G.; JUNIOR, M.M. Processos de descontaminação de rações contendo micotoxinas. **Revista Analytica**, v. 26, p. 64-67, 2007.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, degradações, modificações**, São Paulo: Livraria varela, 1996.
- SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.
- SHWAB, E.K.; KELLER, N.P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, v. 112, p. 225-230, 2008.
- SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; MARTINS, R.C.; SEABRA, R.M.; Ferreira, M.A. Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga Miller*) Jam. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 504-512, 2006.
- SILVA, J.R.F.; CANTELLI, K.C.; TRES, M.V.; ROSA, C.D.; MEIRELLES, M.A.A.; SOARES, M.B.A.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 102-107, 2013.
- SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.
- SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; ACQUAVIVA, R.; BARBAGALLO, I.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A Review. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1742-1766, 2013.
- STANDER, M.A.; BORNSCHEUER, U.T.; HENKE, E.; STEYN, P.S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5736-5739, 2000.
- STANDER, M.A.; BORNSCHEUER, U.T.; HENKE, E.; STEYN, P.S. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 11, p. 5736-5739, 2000.
- STANDER, M.A.; STEYN, P.S.; VAN DER WESTHUIZEN, F.H.; PAYNE, B.E. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 302-304, 2001.
- STEINCKWICH, N.; FRIPPIAT, J.P.; STASIA, M.J.; ERARD, M.; BOXIO, R.; TANKOSIC, C.; DOIGNON, I.; NUSSE, O. Potent inhibition of store-operated Ca²⁺ influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by

the pyrazole derivative BTP2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 4, p. 1054-1064, 2007.

TAKIMOTO, A.; SHIOMI, T.; INO, K.; TSUNODA, T.; KAWAI, A.; MIZUKAMI, F.; SAKAGUCHI, K. Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, n 1-3, p. 601-606, 2008.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265-271, 2014.

THE NORDIC WORKING GROUP ON FOOD TOXICOLOGY AND RISK EVALUATION. **Health evaluation of ochratoxin A in food products**. In: Nordiske Seminar-og Arbejdsrapporter, v. 545, p. 5–26, 1991.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F.; CALDAS, S.S.; BUFFON, J.G.; DUARTE, F.A.; PRIMEL, E.G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 380-386, 2012.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1893-1898, 2004.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 75–92, 1998.

VAN DER MERWE K. J.; STEYN P. S.; FOURIE L. Mycotoxins Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Journal of Chemical Society**, p. 7083-7088, 1965.

VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON, J.J. Ochratoxin A a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1132, 1965

VAN EEDEN, S.F.; KLUT, M.E.; WALKER, B.A.M.; HOGG, J.C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, n. 1-2, p. 23-43, 1999.

VANOVERBERGHE, K.; MARIOT, P.; ABEELE, F.V.; DELCOURT, P.; PARYS, J.B.; PREVARSKAYA, N. Mechanism of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. **Cell Calcium**, v. 34, n. 1, p. 75-85, 2003.

- VAR, I.; KABAK, B.; ERGINKAYA, Z. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. **Food Control**, v. 19, n. 6, p. 592-598, 2008.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 321-328, 2005.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n 1-2, p. 1-7, 2000.
- VARGA, J.; TÓTH, B. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A Review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 53, n. 2, p. 189-203, 2005.
- VECCHIO, A.; MINEO, V.; PLANETA, D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 220-223, 2012.
- VÉRTESI, A.; SIMON, L.M.; KISS, I.; SZAJÁNI, B. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1-2, p.73-79, 1999.
- VIDAL, A., SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MARÍN, S. Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. **Food Chemistry**, v. 178, p. 276-286, 2015.
- WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y., LI, X. Optimisation of ultrasounds-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804-810, 2008.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.
- WU, Q.H.; DOHNAL, V.; HUANG, L.L.; KUCA, K.; WANG, X.; CHEN, G.Y.; YUAN, Z.H. Metabolic pathways of ochratoxin A. **Current Drug Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2011b.
- WU, X.; HU, J.; ZHU, B.; LU, L.; HUANG, X.; PANG, D. Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7341-7346, 2011a.
- XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.R.; LI, S.Z.; VODELA, J.K.; FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 182-192, 1996.

- XU, X.; NICHOLSON, P.; RITIENI, A. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 67-71, 2007.
- YANG, Q.; SHI, L.; HUANG, K.; XU, W. Protective effect of N-acetylcysteine against DNA damage and S-phase arrest induced by ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK-293). **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p.40-47, 2014.
- ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.
- ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.
- ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 6, p. 665-668, 1996.
- ZINEDINE, A.; BLESIA, J.; MAHNINE, N.; EL ABIDI, A.; MONTESANO, D.; MANES, J. Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. **Food Control**, v. 21, n. 2, p. 132-135, 2010.
- ZINEDINE, A.; SORIANO, J.M.; JUAN, C.; MOJEMMI, B.; MOLTÓ, J.C.; BOUCLOUZE, A.; CHERRAH, Y.; IDRISSE, L.; EL AOUAD, R.; MAÑES, J. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 3, p. 285-291, 2007.

APÊNDICE 1

ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILO

- Em tubo de centrífuga (15 mL) colocar 3 mL de histopaque 1119 seguido de 3 mL de histopaque 1077 (lentamente, verificando a formação do anel);
- Adicionar ao mesmo tubo cerca de 5 mL de sangue, adicionando lentamente (pelas paredes) para evitar a mistura com as soluções histopaque;
- Centrifugar 30 minutos a temperatura ambiente (20-22°C) a 890 g;
- Separar as camadas que se encontram acima dos granulócitos (plasma, células monucleadas e histopaque 1077) e transferir a camada correspondente aos granulócitos para outro tubo de centrífuga;
- Adicionar ao tubo contendo granulócitos PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (quase até a máxima capacidade, 13 mL);
- Centrifugar a 870 g por 5 minutos a 4°C;
- Remover o sobrenadante e adicionar ao precipitado 1250 μL de PBS tendo o cuidado de ressuspender as células com a ponteira;
- Adicionar, 5250 μL de água, pressionando o cronômetro no momento em que efetua a adição. Esse passo tem como objetivo promover a lise dos eritrócitos, para eficaz isolamento de neutrófilos. Deixar de 2-4 minutos;
- No fim do tempo adicionar 2200 μL de NaCl a 3%;
- Centrifugar a 870 g por 5 minutos a 4°C;
- Se o sedimento ainda estiver avermelhado, proceder desde o passo da adição de 1250 μL de PBS;
- Remover o sobrenadante e ao precipitado adicionar uma quantidade de tampão Tris-glicose pH 7,4, ressuspendendo as células com pipeta;
- Adicionar ao eppendorf 20 μL das células + 20 μL de azul tripano;
- Contar neutrófilos viáveis (transparentes) em microscópio ótico.

APÊNDICE 2

DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE

- Incubar em microplacas 750 μL células (4×10^6 células. mL^{-1}) e 250 μL de OTA/OT α ;
- Incubar em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante o período de estudo;
- Recolher para eppendorf cônico e centrifugar a 400 g durante 5 minutos a 20 °C;
- Rejeitar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 1 mL de PBS;
- Centrifugar a 200 g durante 5 minutos a 20 °C;
- Rejeitar o sobrenadante e ressuspender em 100 μL da solução de anexina e PI (1 mL de *buffer* do kit + 20 μL de anexina + 20 μL de PI);
- Incubar 15 minutos no escuro;
- Adicionar 500 μL de *buffer* e ler em citômetro de fluxo.

APÊNDICE 3

ALTERAÇÕES CITOMORFOLÓGICAS

- Colocar 960 μL de neutrófilos (4×10^6 células. mL^{-1}) e 40 μL de OTA/OT α numa placa de 24 poços e incubar na estufa durante o período de tempo pretendido;
- Retirar 200 μL do conteúdo de cada um dos poços e colocar no funil do sistema constituído pela lâmina, filtro, funil e suporte;
- Colocar o sistema na citocentrífuga e centrifugar a 500 rpm durante 5 minutos a 25 °C;
- Desmontar o sistema e recolher as lâminas;
- Corar as lâminas com hemacolor: mergulhar cada uma das lâminas 5 s no fixador, 3 s no corante laranja e 6 s no corante azul escuro e lavar 20 s com água milliQ (importante respeitar esta ordem entre os tempos)
- Deixar secar as lâminas ao ar e contar ao microscópio óptico na objetiva de 100x (contar um mínimo de 400 células).

APÊNDICE 4

DETERMINAÇÃO DE ATP

- 250 μL células ($CF\ 4.10^6\ \text{cel/mL}$) + 125 μL Tris + 125 μL OTA/OT α em microplaca;
- Incubar em estufa a 37 °C com 5% CO_2 durante período de estudo;
- Retirar o conteúdo da placa para eppendorf cônico
- Centrifugar a 870 g por 5 minutos a 4°C;
- Ressuspender o precipitado com 200 μL de HClO_4 5%;
- Agitar em vórtex por 10 s;
- Centrifugar a 16000 g por 1 minuto a 4°C;
- Retirar 150 μL e reservar em eppendorf cônico;
- Retirar o resto do sobrenadante e guardar o precipitado (para proteína);
- Utilizar os 150 μL de suspensão celular em ácido perclórico 5% previamente reservados;
- Neutralizar com 150 μL de KHCO_3 ;
- Centrifugar 10 seg (1 min no máximo) a 16000 g a 4 °C;
- Acondicionar no gelo até o momento da análise.

Numa placa branca e opaca:

- 100 μL de amostra (Retirar pelas paredes para evitar aspirar bolhas);
- 100 μL de luciferina-luciferase (a solução deve estar à temperatura ambiente e protegida com papel de alumínio; adição com multicanal no máximo 6 poços por vez);
- Leitura imediata da bioluminescência em leitor de microplaca a 500 nm.

KIT PROTEÍNA MICROPLACA

- Ressuspender as amostras em 500 μL de NaOH 0,4 M;
- Adicionar 20 μL de reagente S para cada mL do reagente A que será necessário para corrida;
- Se as amostras não contiverem detergente usar somente o reagente A;
- Preparar 3-5 diluições de albumina (no reagente que dissolver a amostra);
- Pipetar 5 μL do padrão e das amostras em uma placa;
- Adicionar 25 μL de A' ou A;
- Adicionar 200 μL do reagente B;
- Incubar 5 s no leitor para agitar ou mexer cuidadosamente (se formar bolha tirar com a ponta da agulha);
- Esperar 15 minutos e ler a absorvância a 750 nm em leitor de microplaca.

APÊNDICE 5

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Nota: Fazer dois Brancos, um irá ter JC-1 *Work Solution* e outro não (*Assay buffer 1x*).

- Incubar 350 μL de neutrófilos (4×10^6 células. mL^{-1}) e 125 μL de OTA/OT α ;
- Colocar o conteúdo de cada poço (500 μL) em falcon de 15 mL;
- Centrifugar 400 g por 5 min a temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 500 μL de JC-1 *Work solution/Assay buffer 1x*, e ressuspender;
- Incubar 15 minutos em banho-maria a 37°C;
- Adicionar 2 mL de *Assay buffer 1x*, e ressuspender;
- Centrifugar 400 g por 5 min a temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 1 mL de *Assay buffer 1x*, e ressuspender;
- Centrifugar 400 g por 5 min a temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 500 μL de *Assay buffer 1x*, e ressuspender;
- Fazer a leitura no citômetro de fluxo.

JC-1 Stock solution

- Adicionar 125 μL de DMSO a um vial (rende aproximadamente 25 testes)
- Dividir em alíquotas de aproximadamente 35 μL .
- Conservar no congelador, ao abrigo da luz (máximo de 6 meses).

Assay Buffer 1x

- Diluir 10x o Assay Buffer 10x em água miliQ, de acordo com a quantidade a ser usada;
- Agitar em vórtex por 5 minutos e conservar em geladeira (máximo de 7 dias);
- Aquecer sempre a 37 °C antes de usar, aproximadamente 30 min antes de acabar o tempo de incubação.

JC-1 Work Solution

- Preparar aproximadamente 30 min antes de acabar o tempo de incubação, com *Assay buffer 1x* a 37°C
- Diluir 100x o JC-1 *Stock Solution* em *Assay Buffer 1x*, de acordo com a quantidade a ser usada;
- Agitar em vortex;
- As partículas em suspensão não interferem, mas se tiver muitas, recomendam centrifugar a 13000 g por 3 min ou 1000 g por 15 min a temperatura ambiente.