

EFEITO DA PRESENÇA DE DEOXINIVALENOL NA PORCAO PROTEICA DURANTE FERMENTACAO SUBMERSA COM *Aspergillus oryzae*

Jaqueline Garda*, Roger Junges da Costa, Juliana Lorenz, Eliana Badiale Furlong

Laboratório de Micotoxinas, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

**Email: jaquelinegarda@yahoo.com.br*

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da presença de DON na atividade de enzimas oxidativas e proteínas solúveis durante fermentação submersa. Este efeito foi avaliado utilizando planejamento experimental com o fim de verificar variáveis significativas para o processo. A contaminação de DON variou de 0 a 1,71µg/g de farelo de arroz e trigo usados como fonte de carbono. A fermentação submersa utilizou como microrganismo *Aspergillus oryzae*, sendo coletadas amostras a cada 24 horas até tempo final de 144 horas a 30°C. Nestas foram realizadas análises de atividade enzimática de polifenoloxidase e peroxidase utilizando catecol e guaiacol como substrato, proteínas solúveis através do método de fenol em meio alcalino e quantificação em espectrofotometro. Como resultado, para peroxidase, as variáveis que mais frequentemente foram significativas foram fonte de carbono, sacarose, ocasionando efeito antagônico, e pH, efeito sinérgico. Já para polifenoloxidase foram pH e esporos ocasionando efeito sinérgico. Para a contaminação em relação a proteínas solúveis, nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas, o aumento da contaminação da toxina no farelo ocasionou uma diminuição das proteínas solúveis, exceto em 24 horas de fermentação. Para o efeito na atividade enzimática, em 48 horas de fermentação para as duas enzimas oxidativas houve um efeito significativo antagônico, o aumento da concentração ocasiona a diminuição da atividade enzimática. Já em 24 horas para peroxidase e 144 horas para polifenoloxidase o efeito foi inverso, o aumento da concentração ocasionou um aumento da atividade. Portanto, a contaminação de DON em farelos utilizados para fermentação submersa diminuiu significativamente a quantidade de proteína solúvel no meio. Para a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase, em 48 horas de fermentação ocorre a diminuição da atividade e em 24 e 144 um aumento respectivamente. Palavras-chave: tricoteceno, deoxinivalenol, fermentação submersa, *Aspergillus oryzae*.

1 INTRODUÇÃO

Compostos tóxicos, chamados de micotoxinas, são metabólitos fúngicos secundários caracterizados pela capacidade de induzir mudanças patológicas e anormalidades fisiológicas em humanos e animais. A manifestações toxicológicas são variadas, isto conforme a espécie fúngica produtora (D'MELLO, MACDONALD, 1997; SANCHIS, VINAS, 1994).

Os tricotecenos são um grupo de compostos sesquiterpenóides produzidos por várias espécies fúngicas como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticillium* e *Stachybotrys* (MELLO et al., 1999; SCHAPIRA et al., 1989; UENO, 1986, 1983). Esta classe de micotoxinas é caracterizada por contaminar grãos de cereais, em pré e pós colheita, em temperaturas entre 0 e 35°C e umidade relativa entre 80 e 90%. Estes cereais contaminados são as principais fontes de tricotecenos não macrocíclicos nos alimentos e rações (YOSHIZAWA, 2001).

O deoxinivalenol (DON) é o tricoteceno mais frequentemente detectado em levantamentos realizados em diferentes produtos e países desde os anos setenta. Esta toxina é relativamente estável aos principais processos de produção de alimentos e dificilmente são removidos dos grãos (BARAJ, 2000; SCOTT, 1984; UENO, 1986). Sendo assim há possibilidade de ocorrência destas micotoxinas em diferentes produtos obtidos a partir de grãos ou insumos contaminados.

A descontaminação desta toxina tem sido amplamente estudada por vários autores como Scott (1993 e 1984), Bennet e Richard (1996) entre outros. A detoxificação empregando procedimentos ou processos físicos, químicos ou microbiológicos podem exercer seu efeito em destruir, modificar ou absorver estas micotoxinas reduzindo ou eliminando os efeitos tóxicos.

Outra forma de descontaminação são os processos que empregam microrganismos e dentre estes estão os processos fermentativos para a produção de alimentos (SCOTT, 1984). Durante o processo fermentativo utilizado na produção de pães a partir de grãos de trigo contaminados com deoxinivalenol, ficou demonstrada

uma redução dos níveis, sendo que esta descontaminação se deve além da fermentação ao processo térmico ao qual o produto é submetido.

Scott (1992) mencionou experimentos de fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* com mosto contaminado com deoxinivalenol e zearalenona, onde os resultados após 7-9 dias de fermentação mostraram que DON é estável ao processo.

Segundo Bennett e Richard (1996), DON como também zearalenona e fumonisina não são completamente destruídas pelo processo de fermentação alcoólica, sendo detectado em altos níveis tanto no resíduo sólido como no líquido fermentado. Isto sugere que outros procedimentos como separação por densidade, tratamentos com reagentes químicos ou ainda lavagens com água devem ser realizados nos grãos utilizados como matéria-prima para a fermentação e ainda estudos quanto ao efeito da fermentação na descontaminação devem ser melhor avaliados.

Tendo em vista estes aspectos este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da presença de DON na atividade de enzimas oxidativas e proteínas solúveis durante fermentação submersa, já que se utilizou farelo de trigo e arroz contaminado como fonte de carbono. Este efeito foi avaliado utilizando planejamento experimental com o fim de verificar variáveis significativas para o processo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e marca Merck Chemical Co. para anidrido trifluoro acético e Sigma Chemical Company para toxinas.

A solução estoque da micotoxina foi preparada em benzeno:acetonitrila (95:5) resultando em concentração de 100 µg/ml. A solução trabalho foi obtida por diluição correspondendo a uma concentração de 50 µg/ml.

A amostragem foi realizada a cada 24 horas de fermentação perfazendo um total de 144 horas.

2.1.2 Métodos

As análises realizadas foram proteína solúvel, atividade enzimática da polifenoloxidase e peroxidase.

A determinação de proteínas solúveis seguiu o procedimento para amostras líquidas utilizando fenol de Folin em meio alcalino e quantificação em espectrofotômetro a 660nm.

Para atividade enzimática de peroxidase e polifenoloxidase foram utilizados guaiacol e catecol como substrato respectivamente e quantificação por espectrofotometria a 470nm.

Para avaliação das variáveis significativas foi utilizado inicialmente o planejamento experimental para triagem de variáveis Plackett-Burman $2^{(7-4)}$ originando 8 experimentos e com adição de 6 pontos centrais pela presença de variáveis nominais. As variáveis independentes foram pH, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, quantidade de esporos, contaminação por DON, granulometria da amostra e adição de sacarose como fonte alternativa de carbono como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Níveis de variáveis codificadas.

Níveis	Variáveis independentes						
	Ph	Fonte de N	Fonte de C	Esporos	DON	Granulometri a	Sacarose
1	-1 (4,5)	-1 (7g/L)	-1 (FT)*	1 (4.10 ⁷)	1 (1,71ppm)	1(amostra)	-1(0g/L)
2	1,0 (5,5)	-1 (7g/L)	-1 (FT)	-1(4.10 ⁵)	-1(0 ppm)	1(amostra)	1 (50g/L)
3	-1 (4,5)	1 (10,5g/L)	-1 (FT)	-1(4.10 ⁵)	1(1,71ppm)	-1(32 mesh)	1 (50g/L)
4	1 (5,5)	1 (10,5g/L)	-1 (FT)	1 (4.10 ⁷)	-1(0 ppm)	-1(32 mesh)	-1(0g/L)
5	-1 (4,5)	-1 (7g/L)	1 (FA)**	1 (4.10 ⁷)	-1(0 ppm)	-1(32 mesh)	1 (50g/L)
6	1 (5,5)	-1 (7g/L)	1 (FA)	-1(4.10 ⁵)	1(1,71ppm)	-1(32 mesh)	-1(0g/L)
7	-1 (4,5)	1 (10,5g/L)	1 (FA)	-1(4.10 ⁵)	-1 (0 ppm)	1 (amostra)	-1(0g/L)
8	1 (5,5)	1 (10,5g/L)	1 (FA)	1 (4.10 ⁷)	1(1,71ppm)	1(amostra)	1(50g/L)
9 (C)	0 (5,0)	0 (14g/L)	0 (FT)	0 (4.10 ⁶)	0(0,85 ppm)	0(32 mesh)	0 (25g/L)
10 (C)	0 (5,0)	0 (14g/L)	0 (FT)	0 (4.10 ⁶)	0(0,85 ppm)	0(32 mesh)	0 (25g/L)
11 (C)	0 (5,0)	0 (14g/L)	0 (FT)	0 (4.10 ⁶)	0(0,85 ppm)	0(32 mesh)	0 (25g/L)
12 (C)	0 (5,0)	0 (14g/L)	0 (FA)	0 (4.10 ⁶)	0(0,85 ppm)	0(amostra)	0 (25g/L)
13 (C)	0 (5,0)	0 (14g/L)	0 (FA)	0 (4.10 ⁶)	0 (0,85 ppm)	0(amostra)	0 (25g/L)
14 (C)	0 (5,0)	0 (14g/L)	0 (FA)	0 (4.10 ⁶)	0(0,85 ppm)	0(amostra)	0 (25g/L)

* FT – Farelo de trigo 50g/L

**FA – Farelo de arroz 50g/L

2.1.3. Processo Fermentativo

O processo fermentativo foi realizado em shaker de bancada a 30⁰C e 200 rpm em reator de 500 mL contendo um volume de 250 mL de meio tendo como microorganismo *Aspergillus oryzae*.

2.2 Resultados e Discussão

Quanto a significância das variáveis, para as enzimas oxidativas, peroxidase, as variáveis que mais freqüentemente foram significativas foram fonte de carbono, sacarose, ocasionando efeito antagônico, e pH, efeito sinérgico. Já para polifenoloxidase foram pH e esporos ocasionando efeito sinérgico. Assim estas variáveis devem ser estudadas.

Por se tratar de processo com microrganismos e compostos detectados em traços, admitimos intervalos de confiança de 70%. Os dados da análise estatística estão apresentados na Tabela 2.

Como resultado da avaliação através da análise do planejamento experimental, para proteínas solúveis, nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas, o aumento da contaminação de DON no farelo ocasionou uma diminuição das proteínas solúveis, exceto em 24 horas de fermentação. O efeito ocorrido de 48 a 120 horas pode ser uma associação da toxina com proteínas solúveis pela sua estrutura espacial ou pelo fato de DON ser conhecido como inibidor de síntese protéica

Em 24 horas de fermentação o efeito significativo foi inverso, maior concentração de DON causa um aumento de proteínas solúveis.

Para o efeito na atividade enzimática, em 48 horas de fermentação para as duas enzimas oxidativas houve um efeito significativo antagônico, o aumento da concentração ocasiona a diminuição da atividade desta enzima. Já em 24 horas para peroxidase e 144 horas para polifenoloxidase o efeito foi inverso, o aumento da concentração ocasionou um aumento da atividade. Para o tempo de 48 horas de fermentação o efeito é explicado pela possibilidade de combinação do composto com outro inibidor presente, inibição de outra enzima com maior afinidade que interfere na atividade enzimática. Já para o tempo inicial e final de fermentação, por diversas alterações no meio fermentativo, a toxina pode ter apresentado toxicidade à enzima diminuindo assim sua atividade ou ainda possibilidade de interação com a mesma.

Tabela. Média, desvio padrão e efeito significativo das respostas obtidas nos diferentes tempos de fermentação.

Tempo (horas)	Variáveis independentes					
	Peroxidase		Polifenoloxidase		Proteínas Solúveis	
	Média (desvio padrão)	Efeito significativo (horas)	Média (desvio padrão)	Efeito significativo (horas)	Média (desvio padrão)	Efeito significativo (horas)
0	0,768 (0,622)		0,061 (0,047)		3,945 (1,990)	
24	0,836 (0,890)	N (+) C (-) Sacarose (-) pH (+) Contaminação (+)	0,304 (0,201)	Contaminação (-) pH (+) Esporos (+)	15,184 (7,257)	pH (+) Contaminacao (+)
48	0,354 (0,368)	Contaminação (-)	0,197 (0,115)	Granulometria (+) pH (+) esporos (+) N (+) Contaminacao (-)	15,793 (5,484)	Contaminação (-) C (+)
72	0,811 (1,081)		0,371 (0,170)		19,074 (6,279)	Granulometria (-) Contaminação (-) pH (-) Contaminação (-)
96	0,413 (0,568)	C (-) Sacarose (-) pH (+)	0,333 (0,224)	Granulometria (+) pH (+) Esporos (+)	25,603 (13,642)	C (+) N (-) Sacarose (+) C (+) pH (-) N (-) Esporos (+) Contaminação (-) Granulometria (-)
120	0,300 (0,335)		0,188 (0,140)	Todas variáveis (+)	14,712 (5,067)	
144	0,099 (0,182)	Sacarose (-) C (-) N (+) pH (+)	7,419 (27,22)		6,489 (4,222)	

3 CONCLUSÃO

A contaminação de DON em farelos utilizados para fermentação submersa diminui significativamente a quantidade de proteína solúvel no meio.

Para a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase, em 48 horas de fermentação ocorre a diminuição da atividade e em 24 e 144 um aumento respectivamente.

4 REFERÊNCIAS

- BARAJ, E. Interferência dos tricotecenos no processo fermentativo. **Dissertação** – Mestrado de Engenharia de Alimentos/FURG, 2000
- BENNETT, G.A., RICHARD, J.L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, p. 235-238, May 1996.
- BENNETT, G.A. and RICHARD, J.L., Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technol.**, 1996, v. 50, n. 5, p. 235-238.
- MELLO, J. P. F., & MACDONALD, A.M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.
- MELLO, J. P. F. et al. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science technology**, v.. 80, p. 183-205, 1999.
- SANCHIS, V. and VIÑAS, I., Mycotoxin research in Spain. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 34, n. 2, p. 134-144, 1994.
- SCHAPIRA, S.F.D., WHITEHEAD, M.P., FLANNIGAN, B. Effects of the mycotoxins diacetoxyspenol and deoxynivalenol on malting characteristics of barley. **J. Inst. Brew.**, v. 95, p. 415-417, November-December, 1989.
- SCOOT, P.M. Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. **Mycotoxin Research**, v. 8, p. 58-66, 1992.
- SCOTT, P. M et al. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography - mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n.4, p. 381-389, 1993.
- SCOTT, P. M. Effects of Food Processing on Mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 6, p. 489-499, 1984.
- SCOTT, P. M et al. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography - mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n.4, p. 381-389, 1993.
- YOSHISAWA, T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course**, p. 283, 2001, Japão.
- UENO, Y. **Trichothecene as environmental toxicants In: Reviews in Environmental Toxicology 2**. Ernest Hodgson (ed). Elsevier, Amsterdam, N.York, Oxford, 1986.
- UENO, Y. **Trichothecene: Chemical, Biological e Toxicological Aspects**. In: UENO, Y (ed).