(11) Número de Publicação: **PT 107534 A**(51) Classificação Internacional:  
**A23L 1/015** (2006.01) **C12N 1/20** (2006.01)**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**(22) Data de pedido: **2014.03.21**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2015.11.25**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):

**UNIVERSIDADE DO MINHO**  
**LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA** PT  
**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO**  
**DOURO** PT

(72) Inventor(es):

**MARIA ARLETE MENDES FAIA** PT  
**LUÍS JOÃO ABRUNHOSA PEREIRA** PT  
**ARMANDO ALBINO DIAS VENÂNCIO** PT  
**ANTÓNIO FRANCISCO HENRIQUE INÊS** PT

(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **USO DE PEDIOCOCCUS PARVULUS PARA A DEGRADAÇÃO E DESTOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA OCRATOXINA A, RESPETIVO MÉTODO E KIT**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO CONSISTE NO USO DE NOVAS ESTIRPES DE PEDIOCOCCUS PARVULUS PARA A DEGRADAÇÃO E DESTOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA OCRATOXINA A QUE SE ENCONTRA EM ALIMENTOS OU BEBIDAS PARA CONSUMO HUMANO OU ANIMAL. ESTAS NOVAS ESTIRPES SEQ. ID Nº1, SEQ ID Nº2 E SEQ ID Nº3, TÊM A CAPACIDADE DE HIDROLISAR A OCRATOXINA A EM MENOS DE 20 HORAS. A PRESENTE INVENÇÃO DESCREVE TAMBÉM O RESPETIVO MÉTODO QUE CONSISTE, EM TERMOS GERAIS NA INCUBAÇÃO DAS ESTIRPES, FERMENTAÇÃO DAS MESMAS, PRODUÇÃO E RESPETIVA RECOLHA DE CÉLULAS VIÁVEIS, LIOFILIZAR AS MESMAS E POR FIM, ADICIONAR E MISTURAR AOS ALIMENTOS. NUMA REALIZAÇÃO, APRESENTA-SE AINDA UM KIT PARA UMA FÁCIL UTILIZAÇÃO DA INVENÇÃO.

## RESUMO

### "Uso de *Pediococcus parvulus* para a degradação e destoxificação biológica de ocratoxina A, respetivo método e kit"

A presente invenção consiste no uso de novas estirpes de *Pediococcus parvulus* para a degradação e destoxificação biológica da ocratoxina A que se encontra em alimentos ou bebidas para consumo humano ou animal. Estas novas estirpes SEQ. ID n.º 1, SEQ ID n.º 2 e SEQ ID n.º 3, têm a capacidade de hidrolisar a ocratoxina A em ocratoxina *a* em menos de 20 horas. A presente invenção descreve também o respetivo método que consiste, em termos gerais na incubação das estirpes, fermentação das mesmas, produção e respetiva recolha de células viáveis, liofilizar as mesmas e por fim, adicionar e misturar aos alimentos. Numa realização, apresenta-se ainda um kit para uma fácil utilização da invenção.

## DESCRIÇÃO

**"Uso de *Pediococcus parvulus* para a degradação e destoxificação biológica de ocratoxina A, respetivo método e kit"**

### Canmo da Invenção

A presente invenção refere-se ao uso de um microrganismo para a degradação e destoxificação biológica de micotoxinas, mais especificamente para a degradação da ocratoxina A em ocratoxina a. Concretamente, relaciona-se com o uso de *Pediococcus parvulus* para a destoxificação de alimentos e rações. Outro aspeto da presente invenção relaciona-se com o método de destoxificação e a sua aplicação a um kit. A invenção insere-se na área farmacêutica, alimentar e veterinária.

### Antecedentes da Invenção

As Bactérias do Ácido Láctico (BAL) são um grupo de bactérias gram positivas geralmente consideradas como microrganismos benéficos à saúde sendo amplamente estudadas devido às suas propriedades probióticas (Naidu et al., 1999). As BAL são frequentemente usadas na produção de produtos alimentares fermentados como o iogurte, queijo, leites fermentados, carne, peixe e legumes (chucrute e pickles), determinados tipos de cerveja e vinhos (Stiles, 1996). As BAL têm um estatuto GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Alguns pediococos têm sido amplamente utilizados na fermentação de alimentos para o Homem e rações para animais. No caso particular de *Pediococcus parvulus*, sabe-se que esta espécie está associada à produção de vegetais fermentados, carne, bebidas alcoólicas, produtos lácteos e silagem (Bennik et al., 1997; Holzapfel et al.,

2006; Li et al., 2008; Maifreni et al., 2004; Mesas et al., 2011; Simpson et al., 2002; Tohno et al., 2012). Várias estirpes desta espécie (*Pediococcus parvulus*) também têm propriedades probióticas importantes. Por exemplo, reduzem o colesterol uma vez que produzem exopolissacarídeos (Martensson et al., 2005), possuem propriedades imunomoduladoras de acordo com experiências *in vitro*, favorecem a resistência ao stress gastrointestinal e são capazes de aderir às células intestinais (Fernández de Palencia et al., 2009). Para além disso, estas bactérias têm efeitos inibitórios sobre microrganismos patogénicos, uma vez que produzem pediocinas (Immerstrand et al., 2010) e têm potencial para serem utilizadas no fabrico de alimentos funcionais (Garai-Ibábe et al., 2010). Uma estirpe de *Pediococcus parvulus* foi aplicada com sucesso em enchidos fermentados, contribuindo para melhorar a qualidade e higiene dos enchidos uma vez que inibiram outras bactérias que não as BAL (Li et al., 2008). Esta espécie também foi descrita como tendo um papel importante na fermentação de certas cervejas belgas ácidas (Martens et al., 1997) e tem mostrado possuir alguns efeitos antifúngicos (Magnusson et al., 2003). Uma característica benéfica adicional das BAL que é menos conhecida diz respeito à capacidade de algumas estirpes para controlar potenciais riscos ligados às micotoxinas e aos seus efeitos na saúde (Abrunhosa et al., 2010; Dalié et al., 2010; Salminen et al., 2010; Shetty e Jespersen, 2006).

As micotoxinas são metabolitos fúngicos secundários altamente tóxicos que podem ser encontrados em culturas agrícolas. Muitas são carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, neurotóxicas e imunossupressoras (Bennett e Klich, 2003), sendo por isso recomendável que os seus níveis em produtos alimentares e rações para animais sejam reduzidos tanto quanto tecnologicamente possível. Vários métodos físicos, químicos e biológicos estão presentemente disponíveis para controlar a

problemática das micotoxinas (Boudergue et al., 2009). No entanto, de forma a superar as limitações das tecnologias atuais existe a necessidade de desenvolver soluções inovadoras. Dentro deste âmbito, as tecnologias biológicas têm vindo a impor-se como alternativa aos tratamentos físicos e químicos, uma vez que são muito mais específicas, eficientes e menos agressivas para o ambiente, e ademais, porque garantem a preservação da qualidade nutritiva dos produtos tratados. As tecnologias biológicas usam microrganismos, que podem decompor, transformar ou adsorver micotoxinas para destoxificar produtos contaminados ou para evitar os efeitos tóxicos quando as micotoxinas são ingeridas.

A ocratoxina A (OTA) é uma das principais micotoxinas encontradas em produtos agrícolas. Ela é produzida por algumas espécies de *Penicillium* e de *Aspergillus*, sendo encontrada principalmente em cereais, grãos de café e cacau, uvas, passas de uva, vinho, figos, carne de porco ou especiarias. Esta micotoxina é nefrotóxica, hepatotóxica, imunotóxica, teratogénica e carcinogénica (categoria 2B) (Bennett e Klich, 2003). Para além disso, a OTA tem um tempo de semi-vida muito longo em humanos (35 dias), sendo considerada um composto tóxico cumulativo. Devido à sua toxicidade aguda, uma ingestão diária tolerável (IDA) de não mais que 17 ng OTA/kg de peso corporal/dia é recomendada pela Comissão Europeia. A OTA é quimicamente constituída por uma isocumarina (conhecida como ocratoxina a) e uma molécula de L-P-fenilalanina que estão ligadas por uma ligação amida (Fig. 1) (van der Merwe et al., 1965).

Esta ligação amida pode ser hidrolisada por microrganismos e enzimas com atividade peptídica, sendo a OTA convertida em ocratoxina a (OTa). A OTa é considerada não-tóxica e tem um tempo de semi-vida 10 vezes inferior ao da OTA (Li et al., 1997). Portanto, métodos e processos que fomentam a conversão

de OTA em OTa são considerados uma forma de destoxificação desta micotoxina.

Várias estirpes de BAL que destoxificam aflatoxinas (El-Nezami *et al.*, 1998), tricotecenos (El-Nezami *et al.*, 2002), zearalenona (El-Nezami *et al.*, 2002), ocratoxina A (Fuchs *et al.*, 2008) e patulina (Fuchs *et al.*, 2008) foram identificadas em experiências *in vitro*. NO entanto, nestes casos, comprovou-se que o mecanismo responsável pela destoxificação devia-se à adsorção das micotoxinas às paredes celulares das BAL, uma vez que células mortas removeram igualmente ou até mais micotoxina do que as células vivas. Os exopolissacarídeos e os peptidoglicanos são considerados a fonte mais plausível dos locais de ligação às micotoxinas (Dalié *et al.*, 2010). Presentemente, não são conhecidas ou estão descritas na literatura nenhuma BAL capazes de biodegradar ou biotransformar a OTA em OTa. No entanto, as BAL são conhecidas por produzir uma grande variedade de protéases e peptidases que, por exemplo, na indústria de laticínios, favorecem o desenvolvimento da textura e sabor de produtos lácteos fermentados (Mtshali *et al.*, 2013). A degradação de ocratoxina A por algumas protéases e peptidases é bem conhecida (Abrunhosa *et al.*, 2010). Por isso, dado serem uma potencial fonte de enzimas proteolíticas, estudaram-se bactérias do ácido láctico de forma a verificar a sua capacidade para biodegradar a OTA.

Atualmente conhecem-se várias bactérias, leveduras e fungos capazes de biodegradar e destoxificar a OTA (Abrunhosa *et al.*, 2010). No entanto, pertencem a espécies que não são tradicionalmente utilizadas na alimentação humana e animal, o que limita a sua aplicação para destoxificar micotoxinas em tais produtos. Para além disso, a sua utilização para fins de destoxificação não está a ser aplicada comercialmente.

Nesse sentido, apresenta-se uma nova solução eficaz de degradação e destoxificação da OTA em Ocratoxina a, não nociva para o ser Humano ou qualquer outro animal, recorrendo-se a um novo microrganismo.

### Descrição Geral

A presente invenção refere-se a um método para a degradação e destoxificação de ocratoxina A, utilizando *P. parvulus*, concretamente novas estirpes de *P. parvulus*, que são adequadas para biotransformar a ocratoxina A no composto não-tóxico ocratoxina a e, por conseguinte, para destoxificar essa micotoxina.

A presente invenção descreve também um kit que compreende estas bactérias em cultura pura ou em cultura mista e respetivos métodos para prevenir ou tratar alimentos, matérias-primas alimentares, bebidas, produtos agrícolas, colheitas, alimentação, alimentos e matérias-primas para rações ou forragens para animais que estão contaminadas ou suscetíveis à contaminação com a micotoxina ocratoxina.

De acordo com a presente invenção, as novas bactérias, foram isoladas de vinhos do Douro e identificadas como *P. parvulus* UTAD 168, *P. parvulus* UTAD 334 e *P. parvulus* UTAD 473. As estirpes foram depositados em cultura pura na Coleção de Culturas Tipo Espanhola (CECT), sob o número de depósito CECT 7950, CECT 7951 e CECT 7952, respetivamente. As novas bactérias também são definidas pelas suas sequências nucleotídicas do gene 16s RNA ribossomal, que foram depositadas no **National Center for Biotechnology Information** (NCBI), com os números de registo KF886568, KF886569 e KF886570, respetivamente. As sequências são mencionados na Lista de Sequências como SEQ ID n01, SEQ ID n02 e SEQ ID n03, e consistem, respetivamente, em:

**SEQ ID no 1:**

1 gcaagtcgaacgcactttcgttgaatgaattagaggtgcttgcaccgaagatgattttag  
61 ctataaagtgagtgccgaacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgccagaagtggggga  
121 taacacctggaaacagatgctaataccgcataacaaagtaaaccgcatggtttactttta  
181 aaagatggcttcggctatcacttctggatggacccgcgccgtattagctagttggtgaga  
241 taaaggctcaccaaggcagtgatacgtagccgacctgagagggtaatcggccacattggg  
301 actgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaaatcttccacaatggacg  
361 aaagtctgatggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttagggtcgtaaaactctggt  
421 gttggagaagaacgtgtgtgagagtaactgctcatgcagtgacggatccaaccagaaag  
481 ccacggctaactacgtgccagcagccgcggttaatacgtaggtggcaagcgttatccggat  
541 ttattgggcgtaaagcgagcgcagggcggctctttaaagtctaattgtgaaagccttcggctt  
601 aaccgaagaagtgcattggaaactggaagacttgagtgcagaagaggacagtggaactcc  
661 atgtgtagcggtgaaatgcgtagatataatggaagaacaccagtgccgaaggcggctgtct  
721 ggtctgtaactgacgctgaggctcgaaagcatgggtagcgaacaggattagataccctgg  
781 tagtccatgccgtaaacgatgaatgctaagtgttggaggggttccgcccttcagtgctgc  
841 agc

**SEQ ID n02:**

1 acatgcaagtcgaacgcactttcgttgaatgaattagaggtgcttgcaccgaagatgatt  
61 ttagctataaagtgagtgccgaacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgccagaagtgg  
121 gggataacacctggaacagatgctaataccgcataacaaagtaaaccgcatggtttact  
181 tttaaaagatggcttcggctatcacttctggatggacccgcgccgtattagctagttggt  
241 gagataaaggctcaccaaggcagtgatacgtagccgacctgagagggtaatcggccacat  
301 tgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaaatcttccacaatg  
361 gacgaaagtctgatggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttagggtcgtaaaactc  
421 tgttgttggagaagaacgtgtgtgagagtaactgctcatgcagtgacggatccaaccag  
481 aaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggttaatacgtaggtggcaagcgttatcc  
541 ggatttattgggcgtaaagcgagcgcagggcggctctttaaagtctaattgtgaaagccttcg  
601 gcttaaccgaagaagtgcattggaaactggaagacttgagtgcagaagaggacagtgga  
661 ctccatgtgtagcggtgaaatgcgtagatataatggaagaacaccagtgccgaaggcggct  
721 gtctggtctgtaactgacgctgaggctcgaaagcatgggtagcgaacaggattagatacc  
781 ctggtagtccatgccgtaaacgatgaatgctaagtgttggaggggttccgcccttcagtg  
841 ctgcagctaacgcattaagcatccgcctgggagacacc

**SEQ ID n03**

1 acatgcaagtcgaacgcactttcgttgaatgaatagaggtgcttgcaccgaagatgattt

**61** tagctataaagtgagtgggcgaacgggtgagtaacacgtgggtaacctgccagaagtggg  
**121** ggataacacctggaaacagatgctaataccgcataacaaagtaaaccgcatggtttactt  
**181** ttaaaagatggcttcggctatcacttctggatggacccgcggcgtattagctagttggtg  
**241** agataaaggctcaccaaggcagtgatacgtagccgacctgagagggtaatcggccacatt  
**301** **gggactgagacacggcccagactcctacggggaggcagcagtagggaatcttccacaatgg**  
**361** acgaaagtctgatggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttagggtcgtaaaactct  
**421** gttggttgagaagaacgtgtgtgagagtaactgctcatgcagtgacggtatccaaccaga  
**481** **aagccacggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcggttatccg;**  
**541** gattttattgggcgtaaagcgagcgcagggcgtcttttaagtctaattgtgaaagccttcgg  
**601** cttaacgaagaagtgcattggaaactggaagacttgagtgacagaagaggacagtggaac  
**661** tccatgtgtagcggtgaaatgcgtagatatatggaagaacaccagtgggcgaaggcggctg  
**721** **tctggctctgtaactgacgctgaggctcgaaagcatgggtagcgaacaggattagatacc;**  
**781** **tggtagtcctatgccgtaaacgatgaatgctaagtgttgagggtttccgcccttcagtgc;**  
**841** tgcagctaacgca

Conforme referido, a degradação metabólica de ocratoxina A é realizada por uma enzima que é capaz de efetuar a hidrólise de péptidos, libertando L-P-fenilalanina a partir de ocratoxina A e originando a ocratoxina a não tóxica conforme demonstrado na Figura 1. Esta reação hidrolítica ocorre a temperaturas entre 20 e 45 OC, de preferência a 30 OC ou a 37 OC e em menos de 20 h.

As estirpes de *P. parvulus* identificadas na SEQ. no 1, SEQ. no 2 e/ou SEQ. no 3, nomeadamente CECT 7950, CECT 7951 e/ou CECT 7952 respetivamente, com a capacidade para biodegradar a ocratoxina A e com atividades enzimáticas enológicas relevantes, tais como atividade malolática, atividade P-glicosídica, ausência da via deiminase da arginina e ausência de histidina e tirosina descarboxilases foram isoladas de vinhos da Região Demarcada do Douro. As múltiplas propriedades benéficas desta espécie e sua tradição de uso em alimentos e rações para animais permite a sua aplicação comercial para fins de destoxificação da ocratoxina A.

Estes microrganismos produzem uma enzima com atividade peptídica que pode hidrolisar ocratoxina A. A hidrólise da ocratoxina A ocorre na ligação amida que liga a molécula L-P-fenilalanina à ocratoxina a, porção não tóxica da ocratoxina A (Figura 1). Após a hidrólise, a L-P-fenilalanina e a ocratoxina a são libertadas, inativando os efeitos tóxicos da ocratoxina A. A reação é irreversível.

Em termos de produção destas estirpes, o método consiste em: as estirpes em culturas congeladas são ativadas em placas de Petri com MRS-agar ou outro meio adequado. As estirpes são cultivadas em MRS líquido, ou outro meio adequado, utilizando um processo de fermentação de forma a se produzir inóculo. Células viáveis das estirpes são produzidas num biorreator utilizando um meio de cultura que promove o crescimento das bactérias. As células viáveis são recolhidas por meio de centrifugação e desidratadas usando um liofilizador ou outra tecnologia adequada.

Para se conseguir a degradação de ocratoxina A em ocratoxina a, as células liofilizadas ou em meio de cultura são adicionadas a meios, soluções, produtos alimentares destinados a consumo Humano ou alimentos destinados a consumo animal.

Para a destoxificação da ocratoxina A, células liofilizadas ou células recém-cultivadas das estirpes de *P. parvulus*; conforme SEQ. nº 1, SEQ. nº 2 e/ou SEQ. nº 3, isto é CECT 7950, CECT 7951 e/ou CECT 7952 respetivamente, são adicionadas ao meio MRS (*Man Rogosa Sharpe*) suplementado com 0,01, 0,1 ou 1,0 µg OTA/mL e incubado a temperaturas entre 20 e 45 °C até 7 dias.

Estes microrganismos podem também ser adicionados ao vinho, mosto ou leite, ou a qualquer outro produto alimentar líquido destinado a consumo humano ou animal, bem como a matérias-primas suplementadas com ocratoxina A ou naturalmente

contaminados com ocratoxina A destinadas a consumo humano ou animal, com o objetivo de destoxificar essa micotoxina.

A hidrólise da ocratoxina A e a libertação da ocratoxina a ocorre quando as estirpes CECT 7950, CECT 7951 e/ou CECT 7952, com as SEQ. ID n01, SEQ. ID n02 e/ou SEQO ID no 3 entram em contacto com a ocratoxina A e de preferência quando a concentração de inóculo utilizado é igual ou superior a 10<sup>9</sup> UFC/mL e a temperatura entre 20 e 45 OC, preferencialmente a 30 ou 37 OC (Figura 2).

Numa realização, apresenta-se um kit para a destoxificação da ocratoxina A, que compreende as referidas novas estirpes de ***Pediococcus parvulus*** e um ou mais dos seguintes:

- a) um ou mais veículos para suportar/reter, suspender, diluir, aderir, revestir, cultivar, crescer, congelar/criopreservar, ou para produzir metabólitos ativos a partir das bactérias ou a própria bactéria;
- b) um ou mais dispositivos para a combinar ou formular as bactérias com um ou mais veículos de a);
- c) um ou mais dispositivos para tratar um produto alimentar destinado ao consumo humano ou animal com as bactérias ou com uma composição que compreende as bactérias, e
- d) instruções para o crescimento das bactérias, formulação das bactérias com um ou mais veículos, utilizando um ou mais dispositivos para o tratamento de um produto alimentar destinado ao consumo humano ou animal, ou uma combinação dos mesmos.

### Breve descrição das figuras

FIG. 1. Estruturas moleculares de (A) ocratoxina A; e (B) ocratoxina a.

FIG. 2. Efeito da concentração do inóculo na biodegradação de OTA pela estirpe *P. parvulus* CECT 7952 quando cultivada em meio MRS-OTA. (A) concentração de OTA e (B) concentração de OTa no meio de cultura ao longo do tempo. (●) 103 UFC/mL; (■) 106 UFC/mL; (▲) 109 UFC/mL.

FIG. 3. Cromatogramas obtidos mostrando a biodegradação de OTA com a estirpe *P. parvulus* CECT 7952 quando inoculada a 106 UFC/mL (a-h: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias).

FIG. 4. Confirmação da OTA e OTa por LC-MS/MS. (A) Cromatograma TIC para a estirpe *P. parvulus* CECT 7952 monitorizado dos 0 aos 20 min a m/z 255 e dos 20 a 40 min a m/z 402. (B) Espectro de massa após fragmentação do pico de OTa aos 3,38 min no cromatograma A. (C) Espectro de massa do pico de OTA aos 34,00 min no cromatograma A.

FIG. 5. Concentração de OTa detetada ao longo do tempo em (a) vinho, (■) mosto e (▲) leite suplementados com 1,0 pg de OTA/mL e inoculados com a estirpe *P. parvulus* CECT 7952.

### Descrição detalhada da invenção

A presente invenção consiste no uso de novas estirpes de *P. parvulus* que são adequados para biotransformar ocratoxina A

no composto não-tóxico, ocratoxina a e, por conseguinte, para destoxificar essa micotoxina, no método de destoxificação para a inativação de ocratoxina A e ainda num kit.

As características das bactérias descritas na invenção mostram que são estirpes Gram-positivas e catalase negativas que pertencem à família Lactobacillaceae; que são cocos não-móveis, não formadores de esporos e não encapsulados, que ocorrem em pares ou tétradas; e que são bactérias anaeróbias facultativas e estritamente homofermentativas.

De acordo com a invenção, a OTA foi biodegradada em OTa pelas estirpes *P. parvulus* CECT 7950, CECT 7951 e/ou CECT 7952, quando cultivadas em meio MRS suplementado com ocratoxina A. A conversão de ocratoxina A em ocratoxina a indica que a ligação amida da molécula de ocratoxina A foi hidrolisada por uma enzima. A ochratoxina a foi confirmada por Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

A velocidade da biodegradação de OTA depende da concentração do inóculo e da temperatura de incubação. Em condições ótimas, o tempo necessário para degradar 50 e 90% da ocratoxina A é de 6 e 19 h, respetivamente.

Outras BAL (*Lactobacillus plantarum* CECT 748T; *Oenococcus oeni* CECT 217T, *Pediococcus parvulus* CECT 7350T; *Lactobacillus plantarum* UTAD 346, 350, 460, 461; *Oenococcus oeni* UTAD 224, 228, 244, 279, 295, 296, 474, 602, 653) não demonstraram ter capacidade para biodegradar a ocratoxina A.

Os ensaios de adsorção com células mortas de *P. parvulus* isoladas de vinhos do Douro mostraram que apenas  $1,3\% \pm 1,0$  da ocratoxina A foi adsorvida pelas paredes celulares, o que exclui a influência desse mecanismo na eliminação da ocratoxina A por essas estirpes.

As bactérias foram capazes de degradar a ocratoxina A quando cultivadas em sumo de uva e leite.

De acordo com a invenção, as estirpes identificadas possuem um especial interesse para aplicações nos alimentos destinados a consumo humano e animal, uma vez que neutralizam os efeitos tóxicos da ocratoxina A, e uma vez que a espécie *P. parvulus* também possui algumas propriedades probióticas relevantes e é largamente utilizada na alimentação humana e animal.

### **Bactérias de acordo com a invenção**

As estirpes de BAL associadas às reivindicações foram obtidas da coleção de bactérias do ácido láctico da UTAD. Essa coleção tinha sido previamente isolada de vinhos tintos oriundos da região demarcada do Douro que sofreram fermentação malolática espontânea. Resumidamente, selecionaram-se estirpes Gram-positivas em forma de cocos e bacilos com reação negativa à catalase, tendo uma cultura pura de cada isolado sido armazenada a -80 OC em meio MRS com 15 a 20% de glicerol. Os isolados foram de seguida caracterizados usando abordagens fenotípicas e moleculares. A sua tipagem quimiotaxonómica e molecular foi efetuada com recurso a SDS-PAGE dos perfis totais de proteínas e fingerprinting genómico utilizando MSP-PCR com o primer csM13. Isto permitiu a identificação de várias espécies de *Lactobacillus*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus* e *Leuconostoc mesenteroides* (Inês, 2007). Entre outras, as enzimas da via da arginina desaminase,  $\beta$ -glicosidase, e histidina e tirosina descarboxilases foram pesquisadas em todos os isolados (Inês et al., 2008).

As seguintes 19 estirpes associadas às reivindicações foram escolhidas aleatoriamente a partir de diferentes géneros: 9 estirpes de *O. oeni*, 6 estirpes de *P. parvulus* e 4 estirpes de *L. plantarum* (listadas na Tabela 1). A identificação das

estirpes que têm capacidade para biodegradar a OTA foi efetuada utilizando a chave simplificada para a diferenciação fenotípica de espécies de BAL proposta por Holzapfel et al. (2006) e por sequenciação do rRNA 16s.

TABELA 1. OTA eliminada por estirpes quando cultivadas em MRS suplementado com 1 pg OTA/mL durante 7 dias a 30 °C. Os valores são a média de três ensaios independentes + desvio padrão. (\**P. parvulus* UTAD168, UTAD334 e UTAD473 estão depositados na Coleção Espanhola de Culturas Tipo com os seguintes respectivos códigos: *P. parvulus* CECT 7950, CECT 7951 e CECT 7952).

Espécie	Estirpe	OTA (p/mL)	OTa (p/mL)	OTA eliminada (%)
<b>Controls</b>	-	1.173 ± 0.033	o	o
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 74gT	1.013 ± 0.004	o	14 ± 0.4
<i>Oenococcus oeni</i>	CECT 217T	0.936 ± 0.034	o	20 ± 2.9
<i>Pediococcus parvulus</i>	CECT 7350T	0.986 ± 0.028	o	16 ± 2.4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	UTAD 346	1.051 ± 0.007	o	10 ± 0.6
	UTAD 350	1.023 ± 0.006	o	13 ± 0.5
	UTAD 460	1.059 ± 0.004	o	10 ± 0.4
	UTAD 461	1.041 ± 0.007	o	11 ± 0.6
<i>Oenococcus oeni</i>	UTAD 224	0.988 ± 0.004	o	16 ± 0.3
	UTAD 228	0.997 ± 0.003	o	15 ± 0.3
	UTAD 244	0.997 ± 0.006	o	15 ± 0.5
	UTAD 279	1.008 ± 0.009	o	14 ± 0.7
	UTAD 295	0.990 ± 0.009	o	16 ± 0.8
	UTAD 296	0.999 ± 0.005	o	15 ± 0.4
	UTAD 474	0.993 ± 0.005	o	15 ± 0.4
	UTAD 602	1.009 ± 0.006	o	14 ± 0.5
	UTAD 653	1.008 ± 0.010	o	14 ± 0.9
<i>Pediococcus parvulus</i>	UTAD 111B	0.328 ± 0.139	0.635 ± 0.117	72 ± 11.8
	UTAD 168*	0.133 ± 0.072	0.810 ± 0.051	89 ± 6.2
	UTAD 333	0.037 ± 0.007	0.949 ± 0.001	97 ± 0.6
	UTAD 334*	0.070 ± 0.059	0.863 ± 0.035	94 ± 5.1
	UTAD 335	0.025 ± 0.001	0.957 ± 0.007	98 ± 0.1
	UTAD 473*	o	0.922 ± 0.034	100 ± 0

Elaborou-se uma árvore filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 16s rRNA (497-836 nt), que mostra a posição taxonômica das estirpes que revelaram atividade mais

elevada na destoxificação da OTA. A árvore foi construída aplicando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980) e o método de agrupamento pelo vizinho mais próximo ('Neighbor Joining') (Saitou e Nei, 1987). A sequência de *Bifidobacterium bifidus* foi utilizada como *outgroup* na definição da raiz da árvore. Os valores *Bootstrap* foram calculados a partir de 1000 repetições (Felsenstein, 1985). As análises foram realizadas com o programa MEGA5 (Tamura et al., 2011).

As bactérias *P. parvulus* UTAD 168, *P. parvulus* UTAD 334 e *P. parvulus* UTAD 473 foram depositadas na Coleção de Culturas Tipo Espanhola (CECT, Universidade de Valência, Espanha) com os seguintes números de depósito: *Pediococcus parvulus* CECT 7950, CECT 7951 e CECT 7952, respetivamente. As estirpes de referência *Oenococcus oeni* CECT 217T, *Pediococcus parvulus* CECT 7350T e *Lactobacillus plantarum* CECT 748T foram utilizadas como controlos.

## **Métodos e uso de acordo com a invenção**

### **Estirpes e condições de cultivo**

As estirpes depositadas na Coleção de Culturas Tipo Espanhola (CECT) com o número de depósito *Pediococcus parvulus* CECT 7950, CECT 7951 e CECT 7952 foram utilizadas.

As estirpes *Lactobacillus plantarum* CECT 748T, *Oenococcus oeni* CECT 217T, *Pediococcus parvulus* CECT 7350T; *Lactobacillus plantarum* UTAD 346, 350, 460, 461; *Oenococcus oeni* UTAD 224, 228, 244, 279, 295, 296, 474, 602 e 653 foram também utilizadas.

O meio de cultura *Man-Rogosa-Sharpe* (MRS) com agar e líquido foram preparados para cultivar as bactérias. O MRS é composto por: peptona, 10 g/L; extrato de carne, 10 g/L; extrato de levedura, 4 g/L; glucose, 20 g/L; acetato de sódio, 5 g/L;

Tween 80, 1 g/L; dipotássio hidrogenofosfato, 2 g/L; citrato de triamônio, 2 g/L; sulfato de magnésio heptahidratado, 0,2 g/L; sulfato de manganês tetra hidratado, 0,05 g/L; agar (para meio sólido), 12,4 g/L; pH ajustado a 6,2.

As estirpes foram reativadas de culturas congeladas em placas de Petri com MRS-agar, incubando-as de preferência a 30 OC.

Os inóculos foram produzidos em 5 ml de MRS líquido a temperaturas entre 20 e 45 OC, preferencialmente a 30 OC. A concentração dos inóculos foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de MRS-agar por plaqueamento de diluições sucessivas.

#### **Biodegradação de OTA pelas bactérias**

Preparou-se meio de cultura MRS suplementado com ocratoxina A (MRS-OTA). Para cada estirpe, em triplicado, 5 mL de MRS-OTA foram inoculados com 0,1 ml de inóculo com concentração de células entre  $10^3$  e  $10^9$  UFC/mL. Três controios negativos foram também preparados utilizando 0,1 mL de MRS estéril em vez de inóculo. Os tubos foram então incubados preferencialmente a 30 °C durante 7 dias. Temperaturas de incubação entre 20 °C e 45 OC também podem ser utilizadas. Após o período de incubação, o meio de cultura em conjunto com as células das bactérias foram extraídos por adição de 5 mL de acetonitrilo/ácido acético (99/1, v/v) e por agitação vigorosa durante 1 min. Uma amostra de 2 mL foi então recolhida e filtrada para frascos de âmbar borossilicato de 2 mL usando filtros de seringa de polipropileno (PP) com 0,45 µm de porosidade e preservados a 4 OC até serem analisados por HPLC.

## **Caracterização da biodegradação de OTA**

A influência de três fatores na capacidade de *P. parvulus* CECT 7952 para biodegradar a OTA foi estudado. Os fatores avaliados foram: a concentração do inóculo (103, 106 e 109 UFC/mL), a concentração de OTA presente no meio MRS (0,01, 0,1 e 1,0 µg OTA/mL) e a temperatura de incubação (20, 30 e 37 OC). Para cada condição, sete experiências foram realizadas em triplicado, seguindo o procedimento descrito anteriormente com algumas modificações. Para avaliar o efeito da concentração do inóculo, tubos com 5 mL de MRS-OTA foram inoculados com 103, 106 e 109 UFC/mL e incubados preferencialmente a 30 OC. Para avaliar o efeito da concentração de OTA, tubos com 5 mL de MRS suplementado com 0,01, 0,1 e 1,0 µg OTA/mL foram inoculados com 109 UFC/mL e incubados preferencialmente a 30 OC. Para avaliar o efeito da temperatura, tubos com 5 mL de MRS-OTA foram inoculados com 109 UFC/mL e incubados preferencialmente a 22, 30 e 37 OC. A OTA e Ota foram determinadas ao longo do tempo através da extração destrutivamente de três tubos por dia como já referido atrás. As amostras foram conservadas a 4 OC até serem analisados por HPLC. Três controles negativos foram também preparadas para cada um dos parâmetros avaliados, utilizando 0,1 mL de MRS estéril em vez de inóculo. Estes foram extraídos após 7 dias de incubação.

## **Avaliação da adsorção de OTA às paredes celulares**

Para investigar se a OTA foi adsorvida pelas paredes celulares de *P. parvulus*, células mortas das estirpes CECT 7950, CECT 7951 e CECT 7952 foram utilizadas. O inóculo foi preparado como descrito anteriormente e, em seguida, os tubos autoclavados a 121 °C durante 15 min. Em triplicado, as células mortas foram adicionadas a 5 mL de MRS-OTA, de forma a obter-se uma concentração final equivalente a 109 UFC/mL. Os tubos

foram agitados no **vortex** durante 30 segundos e durante um período de 1 h, a mesma agitação foi repetido a cada 15 min. Finalmente, os tubos foram centrifugados (20 min a 9000 g) e o sobrenadante foi recolhido e filtrado para tubos limpos, utilizando filtros de seringa de PP com uma porosidade de 0,2 µm. A extração da ocratoxina A do sobrenadante foi realizada como referido anteriormente. As células sedimentadas também foram extraídas por adição de 2 mL de acetonitrilo/água/ácido acético (99/99/2, v/v/v) aos resíduos. Após agitação no **vortex** durante 1 min, os extratos foram filtrados para frascos de vidro e conservadas a 4 OC até serem analisados por HPLC.

### Técnicas analíticas

As amostras foram analisadas por HPLC com detecção por fluorescência tal como descrito em Abrunhosa e Venâncio (2007) mas com algumas modificações. Resumidamente, utilizou-se um sistema de HPLC constituído por uma bomba Varian Prostar 210, um amostrador automático Varian Prostar 410, um detetor de fluorescência Jasco FP-920 ( $\lambda_{exc}=333\text{nm}$  e  $\lambda_{em}=460\text{ nm}$ ; ganho=100) e um forno de colunas Jones Chromatography 7971 mantido a 30 OC. Os instrumentos e os dados cromatográficos foram, respetivamente geridos por um sistema de interface de dados Varian 850-MIB e pelo programa de gestão de dados cromatográficos Galaxie. A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna analítica C18 de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6 mm ID, 5 µm), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. Os compostos foram eluídos a um caudal de 0,8 mL/min ao longo de uma corrida isocrática de 21 min. O volume de injeção foi de 50 µL. A fase móvel utilizada consistia numa mistura de acetonitrilo/água/ácido acético (99/99/2, v/v/v), filtrada e desgaseificada com uma membrana de 0,2 µm. A OTA foi identificada por comparação do tempo de retenção dos picos nas amostras com padrões de referência. Os tempos de retenção registados para a OTa e OTA foram

aproximadamente 7,5 e 19,8 min, respectivamente. Padrões com 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 7,5 pg OTA/mL foram preparados por diluições sucessivas de uma solução inicial de OTA (25 pg/mL) e utilizados para a elaboração de uma curva de calibração, tendo esta sido verificada regularmente. A quantificação da OTA foi feita medindo a área dos picos e comparando-as com a respectiva curva de calibração. A OTA foi quantificada em equivalentes de OTA.

### **Confirmação da ocratoxina a**

As amostras tratadas com a estirpe *P. parvulus* CECT 7952 e descritas na Tabela 1 foram utilizados para confirmar a presença de OTA utilizando LC-MS/MS. As análises foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa linear de tipo ion trap (ThermoFinnigan LXQ) que se encontrava acoplado a um sistema HPLC Finnigan surveyor. A separação foi realizada numa coluna phenomex Hidro-RP 100A (100 x 3,0 mm I.D, 2,5 µm) utilizando uma mistura de acetonitrilo/água/ácido acético (40:60:1, v/v/v) a um caudal de 0,20 mL/min durante 40 min. Uma amostra de 20 µl foi injetada.

O modo de ionização por electropulverização negativa (ESI) foi utilizado para a preparação dos iões. As condições foram previamente determinadas através de um processo de ajustamento para otimizar a eficiência da análise. As condições de operação foram as seguintes: fluxo de gás de cortina, 10 lb/in<sup>2</sup>; fluxo de gás de varrimento, 30 lb/in<sup>2</sup>; fluxo de gás auxiliar, 30 lb/in<sup>2</sup>; voltagem da fonte, 5 kV; voltagem do capilar, -45,00 V; voltagem da lente, -95,87 V.

A análise por MS/MS foi realizada utilizando dois segmentos para os iões precursores de 255,5 e 402,0. Para identificar os compostos, os seguintes fragmentos foram monitorizados: m/z

402.0+358.0 para OTA e m/z 255.0-211.0 para OTa. A energia de colisão para os iões produzidos m/z 358,0 e 211,0 foi de 35 eV. As condições das análises de MS/MS foram as seguintes: Q, 0,25; tempo, 30 ms; tipo, CID.

Avaliação da biodegradação de OTA por *P. parvulus* CECT 7952 em matrizes alimentares

Para avaliar se as estirpes de *P. parvulus* isoladas de vinhos do Douro têm a capacidade de biodegradar a OTA em matrizes alimentares, utilizaram-se amostras de vinho, de mosto e de leite que foram suplementadas com 1,0 **pg** OTA/mL. A OTA foi adicionada tal como descrito anteriormente para o meio MRS líquido. Depois de autoclavadas, alíquotas de 30 mL das amostras foram transferidas para tubos falcon de 50 mL estéreis e foram inoculadas em triplicado com 10<sup>3</sup> UFC/mL de *P. parvulus* CECT 7952. De seguida, procedeu-se à incubação a 30 OC durante 7 dias. Diariamente, recolheram-se alíquotas de 1 mL de cada ensaio. As alíquotas de 1 mL foram submetidas a extração com 1 mL de acetonitrilo/ácido acético (99:1, v/v) e preparadas como anteriormente descrito para serem analisadas por HPLC. A OTA e OTa foram detetadas e quantificadas nas amostras também como descrito anteriormente.

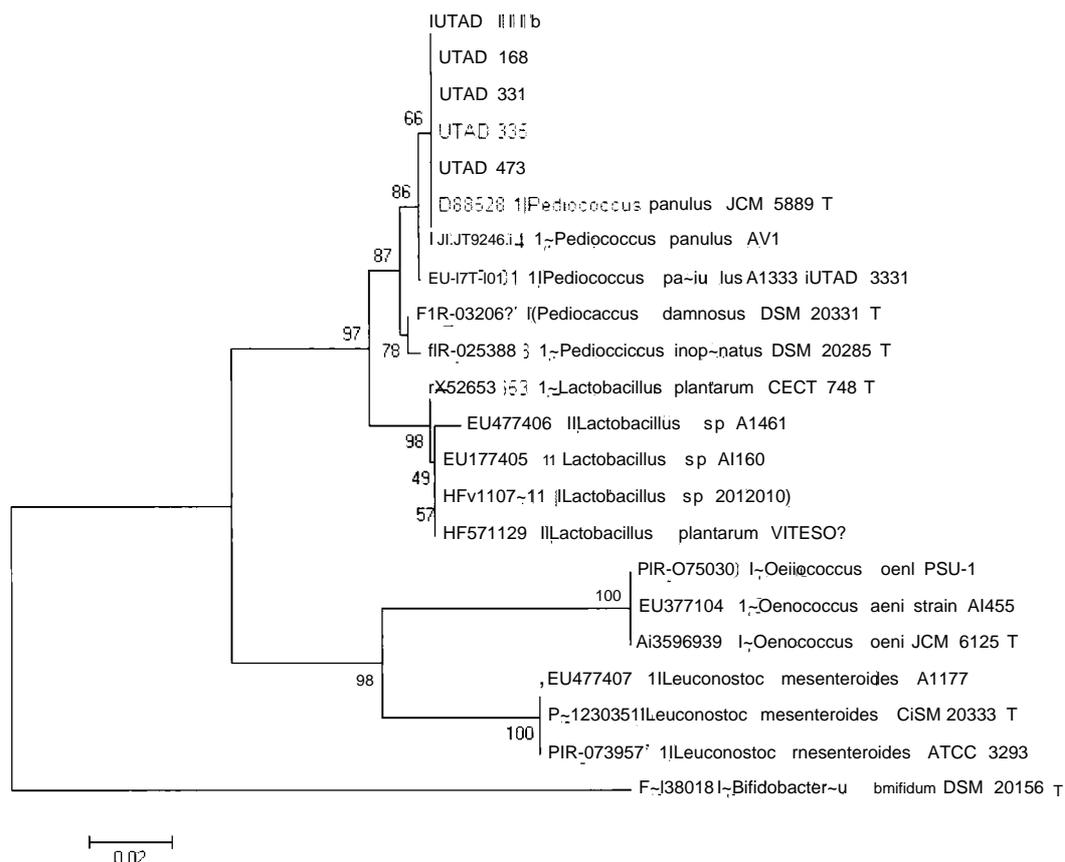
### **Exemplo de aplicação**

#### Isolamento, identificação e caracterização das BAL

As 19 estirpes avaliadas foram seleccionadas aleatoriamente, de entre diferentes géneros: 9 estirpes de *O. oeni*, 6 estirpes de *P. parvulus* e 4 estirpes de *L. plantarum* (listadas na Tabela 1). Estas estirpes foram escolhidas porque apresentavam atividades enzimáticas enológicas relevantes, tais como: atividade malolática, atividade P-glicosídica, ausência da via

da arginina desaminase e ausência das histidina e tirosina descarboxilases. As atividades foram verificadas fenotipicamente em meios de cultura adequados e foram confirmadas genotipicamente pela identificação dos genes que codificam as enzimas de interesse (Inês *et al.*, 2008; Inês, 2007).

As estirpes de *P. parvulus* isoladas do vinho do Douro foram as únicas estirpes que evidenciaram capacidade para biodegradar a OTA. A confirmação de que estes pediococos pertenciam à espécie *P. parvulus* foi realizada utilizando a chave simplificada para a diferenciação fenotípica das espécies dentro dos gêneros *Pediococcus* e *Tetragenococcus* proposta por Holzapfel *et al.* (2006). Todas as três estirpes de interesse são capazes de fermentar galactose, crescer a pH 7.0, crescer a 35 °C e não fermentam a lactose. A identificação foi validada também por uma análise BLAST às sequências parciais do gene 16s rRNA obtidas das três estirpes que apresentavam maior capacidade para destoxificar a OTA. Conforme a árvore filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 16s rRNA (497-836 nt), que se apresenta de seguida, mostra a posição taxonômica das estirpes que revelaram atividade mais elevada na destoxificação da OTA.



### Avaliação da biodegradação de OTA

A percentagem de OTA eliminada pelas estirpes após um período de crescimento de 7 dias em MRS-OTA é apresentada na Tabela 1. Verificou-se que a biodegradação de OTA em OTA foi apenas conseguida com as estirpes de *P. parvulus* isoladas dos vinhos do Douro. Em ensaios que envolveram outras estirpes, não foi detetada OTA, embora alguma OTA tivesse sido eliminada do meio de cultura (entre 11 e 20%, dependendo da estirpe). Para além disso, quando os cromatogramas referentes a essas estirpes foram comparados com os controlos (dados não apresentados), não foram detetados picos adicionais que possam resultar de uma via de metabolização alternativa. Esta ligeira eliminação de OTA deve-se, muito provavelmente, ao método de extração utilizado, que não foi capaz de solubilizar a OTA adsorvida às paredes celulares.

O melhor desempenho foi obtido com a estirpe *P. parvulus* CECT 7952, que eliminou completamente a OTA do meio de cultura. Curiosamente, a estirpe tipo *P. parvulus* CECT 7350T **só** eliminou 16% da OTA do meio de cultura, não tendo biotransformado a OTA em OTa. Conclui-se portanto, que a capacidade de biodegradação da OTA por *P. parvulus* **é** específica das estirpes isoladas dos vinhos do Douro. De seguida, estudou-se o efeito da concentração do inóculo, da concentração de micotoxina no meio de cultura, e o efeito da temperatura de incubação na capacidade da estirpe *P. parvulus* CECT 7952 para biodegradar a OTA. Para além disso, a adsorção de OTA às paredes celulares da estirpe *P. parvulus* CECT 7952 também foi avaliada.

#### Caracterização da biodegradação de OTA por *P. parvulus*

O efeito da concentração do inóculo na biodegradação da OTA está apresentado na Fig. 2. Pode observar-se que as taxas de conversão de OTA em OTa aumentam nitidamente quando a concentração do inóculo aumenta de 103 para 109 UFC/mL. Para além disso, os ensaios realizados com inóculo menos concentrado apresentaram uma fase lag mais longa tendo, portanto, levado mais tempo a iniciar a biodegradação da OTA e a atingir a sua total conversão em OTa. Isso pode ter ocorrido porque as células precisam de tempo para se adaptar ao meio MRS-OTA e sintetizar a enzima necessária para degradar a OTA. O efeito das diferentes concentrações de inóculo **é** também claro quando os parâmetros DT50 e DT90 (**o** tempo necessário para que 50% e 90% da OTA seja degradada) são comparados (Tabela 2), uma vez que se observa, respetivamente, um decréscimo de 92 e 81% nestes parâmetros quando as concentrações do inóculo foram aumentadas de 103 para 109 UFC/mL. Quando o inóculo mais concentrado foi utilizado, o tempo necessário para degradar 50 e 90% da OTA foi de 6 e 19 h, respetivamente. Alguns dos cromatogramas obtidos referentes

aos ensaios realizados com a estirpe *P. parvulus* CECT 7952 estão apresentados na Fig. 3, de forma a ilustrar a redução do pico da OTA ( $t_r = 19,8$  min) e o respetivo aumento do pico da OTa ( $t_r = 7,5$  min) que ocorreu ao longo do tempo.

TABELA 2. Efeito da concentração de inóculo, concentração de OTA e temperatura na capacidade da estirpe *P. parvulus* CECT 7952 para biodegradar a OTA. Expresso por DT50 e DT90 em horas.

	DT50 (h)	DT90 (h)
Concentração do Inoculum		
10 <sup>8</sup> CFU/mL	79	100
10 <sup>6</sup> CFU/mL	55	70
10 <sup>9</sup> CFU/mL	6	19
Concentração de OTA		
0.01 pg/mL	9	30
0.1 pglmL	6	25
10 pglmL	6	25
Temperatura		
22 °C	32	63
30 °C	9	31
37 °C	6	24

A partir da Tabela 2 também pode ser inferido que a biodegradação da OTA pela estirpe *P. parvulus* CECT 7952 depende da temperatura de incubação. Em particular, a 22 °C os valores obtidos para os DT50 e DT90 foram significativamente maiores do que os obtidos a 30 e a 37 °C, o que indica uma diminuição das taxas de biodegradação da OTA, provavelmente devido ao crescimento mais lento das células da bactéria. As

diferenças de DT50 e DT90 obtidos a 30 e 37 OC não foram tão grandes. No entanto, foi observada uma redução adicional destes parâmetros, o que indica uma degradação mais rápida da OTA a 37 OC. A esta temperatura os DT50 e DT90 foram de 6 e 24 h, respetivamente.

Em contraste com os fatores anteriores, a concentração de OTA nos meios de cultura não influenciou tanto as taxas de biodegradação da micotoxina. Observou-se apenas um ligeiro aumento dos DT50 e DT90 quando uma concentração de 0,01 pg OTA/mL foi utilizada. Por outro lado, obtiveram-se valores idênticos de DT50 e DT90 com 0,1 e 1,0 pg OTA/mL, tendo este sido de 6 e 25 h, respetivamente.

Relativamente aos ensaios realizados para avaliar a adsorção da OTA às células de *P. parvulus*, verificou-se que 98,7%  $\pm$  1,6 da OTA permaneceu no meio de cultura e que apenas 1,3%  $\pm$  1,0 da micotoxina adsorveu às paredes celulares. A influência deste mecanismo de eliminação da OTA por estas estirpes é, por isso, negligenciável.

#### Confirmação da ocratoxina a

A análise por LC-MS/MS da amostra de *P. parvulus* CECT 7952 revelou que o pico com tempo de retenção de 3,38 min tinha as mesmas características de transição de massa ( $m/z$  255.0-211.0) da OTA; e que o pico com tempo de retenção de 34.00 min tinha as mesmas características de transição de massa ( $m/z$  402.0-358.0) da OTA (Fig. 4). Estes dados identificam inequivocamente que a OTA é o metabolito que resulta da biodegradação da OTA pelas estirpes de *P. parvulus* isoladas de vinhos do Douro.

## Avaliação da biodegradação de OTA por *P. parvulus* CECT 7952 em matrizes alimentares

A biodegradação de OTA por *P. parvulus* CECT 7952 foi observada em sumo de uva (mosto) e em leite. A concentração de OTA detetada ao longo do tempo nestas matrizes alimentares é apresentada na Fig. 5. Após 7 dias de incubação, uma redução de 15% e 18% nos níveis de OTA foi observada no sumo de uva e no leite, respetivamente. No vinho, não se observou qualquer redução dos níveis de OTA. Os níveis de SO<sub>2</sub> do vinho, a concentração de etanol, ou baixo pH podem ter inibido o crescimento da estirpe *P. parvulus* CECT 7952, o que pode ter diminuído a hidrólise da OTA. Uma potencial estratégia para ultrapassar esse problema pode envolver a inoculação de vinhos com *P. parvulus* antes da fermentação alcoólica. É interessante notar que a estirpe CECT 7952 foi capaz de biodegradar a OTA no sumo de uva (mosto). A inoculação simultânea de vinhos com bactérias lácticas e leveduras tem sido defendida por alguns investigadores, uma vez que as bactérias têm uma melhor oportunidade para se adaptar ao meio e crescer, na ausência de etanol e quando os nutrientes são abundantes (Bou et al., 2005). Esta estratégia pode ser utilizada para as estirpes de *P. parvulus* que degradam a OTA, com o intuito de eliminara OTA durante o processo de vinificação.

### **Referências**

1. **Abrunhosa, L., R. R. M. Paterson, and A. Venâncio.** 2010. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* 2:1078-1099 .
2. **Abrunhosa, L. and A. Venâncio.** 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 29:1909-1914 .

3. **Bennett, J. W. and M. Klich.** 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16:497-516.
4. **Bennik, M. H. J., E. J. Smid, and L. G. M. Gorris.** 1997. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. Appl. Environ. Microbiol. 63:2074-2076.
5. **Bou, M., N. Brown, P. Costello, R. Degré, W. Dieterich, S. Gertsen-Briand, S. Kollar, S. Krieger, A. Kyne, P. Loubser, R. Morenzoni, A. Palacios, C. Powell, K. Specht, G. Specht, D. Theodore, and S. van Zandycke.** 2005. Malolactic Fermentation In Wine - Understanding the Science and the Practice. Lallemand Inc. Montréal, Canada.
6. **Boudergue, C., C. Burel, S. Dragacci, M.-C. Favrot, J.-M. Fremy, C. Massimi, P. Prigent, P. Debongnie, L. Pussemier, H. Boudra, D. Morgavi, I. Oswald, A. Perez, and G. Avantaggiato.** 2009. Scientific report submitted to EFSA (European Food Safety Authority). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/22e.htm>.
7. **Dalié, D. K. D., A. M. Deschamps, and F. Richard-Forget.** 2010. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food Control 21:370-380.
8. **El-Nezami, H., P. Kankaanpaa, S. Salminen, and J. Ahokas.** 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food Chem. Toxicol. 36:321-326.
9. **El-Nezami, H. S., A. Chrevatidis, S. Auriola, S. Salminen, and H. Mykkanen.** 2002. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. Food Addit. Contam. 19:680-686.
10. **El-Nezami, H., N. Polychronaki, S. Salminen, and H. Mykkanen.** 2002. Binding rather than metabolism may explain

the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3545-3549.

11. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence-limits on phylogenies - An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
12. **Fernández de Palencia, P., M. L. Werning, E. Sierra-Filardi, M. T. Duenas, A. Irastorza, A. L. Corbi, and P. Lopez.** 2009. Probiotic Properties of the 2-Substituted (1,3)- $\beta$ -D-Glucan-Producing Bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4887-4891.
13. **Fuchs, s., G. Sontag, R. Stidl, V. Ehrlich, M. Kundi, and S. Knasmuller.** 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *FoodChem. Toxicol.* 46:1398-1407.
14. **Garai-Ibabe, G., M. T. Dueñas, A. Irastorza, E. Sierra-Filardi, M. L. Werning, P. López, A. L. Corbí, and P. Fernández de Palencia.** 2010. Naturally occurring 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology* 101:9254-9263. doi:doi:10.1016/j.biortech.2010.07.050.
15. **Holzappel, W. H., C. M. A. P. Franz, W. Ludwig, W. Back, and L. M. T. Dicks.** 2006. The Genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*, p. 229-266. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Part 1 ed., vol. 4.* Springer US.
16. **Immerstrand, T., C. J. Paul, A. Rosenquist, S. Deraz, O. B. Martensson, A. Ljungh, A. Blucher, R. Oste, O. Holst, and E. N. Karlsson.** 2010. Characterization of the properties of

- Pediococcus parvulus* for probiotic or protective culture use. *J. Food Prot.* 73:960-966.
17. **Inês, A., T. Tenreiro, R. Tenreiro, and A. Mendes-Faia.** 2008. Screening enzymes with enological relevance in lactic acid bacteria isolated from Douro wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 59:330A-351A.
  18. **Inês, A. F. H.** 2007. Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
  19. **Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
  20. **Li, P., Q. Shen, Z. Liu, P. FUI and W. Zhou.** 2008. A newly isolated strain *Pediococcus parvulus* from Xuanwei ham, a traditional Chinese fermented meat product. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43:1387-1394.
  21. **Li, s., R. R. Marquardt, A. A. Frohlich, T. G. Vitti, and G. Crow.** 1997. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145:82-90.
  22. **Magnusson, J., K. Ström, S. Roos, J. Sjögren, and J. Schnürer.** 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:129-135.
  23. **Maifreni, M., M. Marino, and L. Conte.** 2004. Lactic acid fermentation of *Brassica rapa*: chemical and microbial evaluation of a typical Italian product (brovada). *European Food Research and Technology* 218:469-473.
  24. **Martens, H., D. Iserentant, and H. Verachtert.** 1997. Microbiological aspects of a mixed yeast-bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. *Journal of the Institute of Brewing* 103:85-91.

25. Martensson, O., M. Biörklund, A. M. Lambo, M. Duefias-Chasco, A. Irastorza, O. Holst, E. Norin, G. Welling, R. Öste, and G. Önning. 2005. Fermented, ropy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutrition Research* 25:429-442. doi:doi: 10.1016/j.nutres.2005.03.004.
26. Mesas, J. M., M. C. Rodríguez, and M. T. Alegre. 2011. Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Lett. Appl. Microbiol.* 52:258-268.
27. Mtshali, P., B. Divol, and M. Toit. 2013. Evaluating *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains for enzyme-encoding genes related to peptide and amino acid utilization in wine. *Ann Microbiol* 63:233-239.
28. Naidu, A. S., W. R. Bidlack, and R. A. Clemens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39:13-126.
29. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
30. Salminen, s., s. Nybom, J. Meriluoto, M. C. Collado, s. Vesterlund, and H. El-Nezami. 2010. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:157-167.
31. Shetty, P. H. and L. Jespersen. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci. Tech.* 17:48-55.
32. Simpson, P. J., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2002. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:765-771.

33. **Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 70:331-345.
34. **Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
35. **Tohno, M., H. Kobayashi, M. Nomura, M. Kitahara, M. Ohkuma, R. Uegaki, and Y. M. Cai.** 2012. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage. *Animal Science Journal* 83:111-120.
36. **van der Merwe, K. J., P. S. Steyn, and L. Fourie.** 1965. Mycotoxins. Part 11. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.* 7083-7088.

Vila Real, 11 de novembro de 2015

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de *Pediococcus parvulus* para a degradação e destoxificação biológica de ocratoxina A em ocratoxina *a*.
2. Uso de *P. parvulus*, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por as estirpes deste microrganismo serem escolhidas entre as estirpes CECT 7950, CECT 7951 e/ou CECT 7952, que contêm as sequências nucleotídicas do gene 16s rRNA mencionadas na Lista de Sequências como SEQ ID n01, SEQ ID n02 e SEQ ID n03, respectivamente.
3. Uso de *P. parvulus*, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a degradação biológica ocorrer pelo menos num produto alimentar.
4. Uso de *P. parvulus*, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por o produto alimentar ser destinado a consumo humano.
5. Uso de *P. parvulus*, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o produto alimentar ser destinado a consumo animal.
6. Uso de *P. parvulus*, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por o produto alimentar ser alimentos, produtos alimentares, bebidas, culturas agrícolas, produtos agrícolas, colheitas, alimentos para animais, rações ou forragens.
7. Método para a destoxificação de ocratoxina A, que compreende o uso das novas estirpes de *P. parvulus* conforme descritas nas reivindicações 1 a 6, caracterizado por compreender os seguintes passos:
  - a) Ativação de culturas congeladas de *P. parvulus* em placas de Petri com MRS agar ou outro meio adequado de incubação

a uma temperatura entre 20 °C a 45 °C, de preferência a 30 °C;

b) Produção de inóculo através do cultivo das células ativas e obtidas anteriormente em MRS ou outro meio adequado, utilizando um processo de fermentação em meio líquido;

c) Produção de células viáveis de *P. parvulus* transferindo o inóculo referido na alínea b) para um biorreator com um meio de cultura que promove o crescimento das bactérias;

d) Recolher as células viáveis através de um processo de centrifugação ou outro processo adequado;

e) Liofilizar as células das bactérias, utilizando um liofilizador ou outro processo adequado;

f) Adicionar e misturar as células liofilizadas ou as células ativas em meios de cultura a meios, soluções, alimentos para consumo humano ou consumo animal, de forma a se conseguir a degradação da ocratoxina A em ocratoxina a.

8. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por no passo f), a concentração de células liofilizadas a adicionar aos produtos alimentares estar entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL.

9. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a concentração de células liofilizadas ser preferencialmente  $10^8$  UFC/mL.

10. Método, de acordo com as reivindicações 7 e 9, caracterizado por a destoxificação da ocratoxina A em ocratoxina a ocorrer por meio de hidrólise.

11. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a hidrólise de ocratoxina A ocorrer na ligação amida que liga a molécula de L-P-fenilalanina a ocratoxina a porção

não tóxica da ocratoxina A, resultante da enzima das estirpes que possui atividade peptídica.

12. Método de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por a degradação e destoxificação total ocorrer em menos de 20 horas.
13. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por qualquer uma das estirpes degradarem 50 da ocratoxina A num período de 6h e degradar 90 num período de 19h.
14. Método de acordo com as reivindicações 7 a 13, caracterizado por ser usado em produtos naturais ou frescos, bem como em produtos processados, contaminados ou suscetíveis de serem contaminados pela micotoxina ocratoxina A ou organismos que produzem a micotoxina ocratoxina A.
15. Método para a destoxificação de ocratoxina A, utilizando novas estirpes de *Pediococcus parvulus* de acordo com as reivindicações 1 a 6 e o processo 7 a 14, caracterizado por prevenir a contaminação da ocratoxina A quando usado como aditivo em alimentos para consumo humano e animal.

Vila Real, 05 de agosto de 2015

# FIGURAS

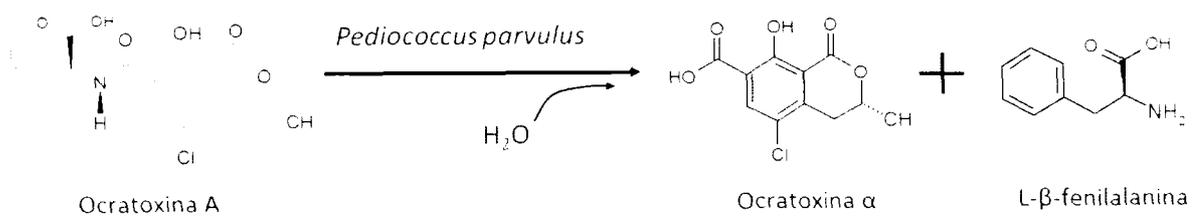


FIG. 1.

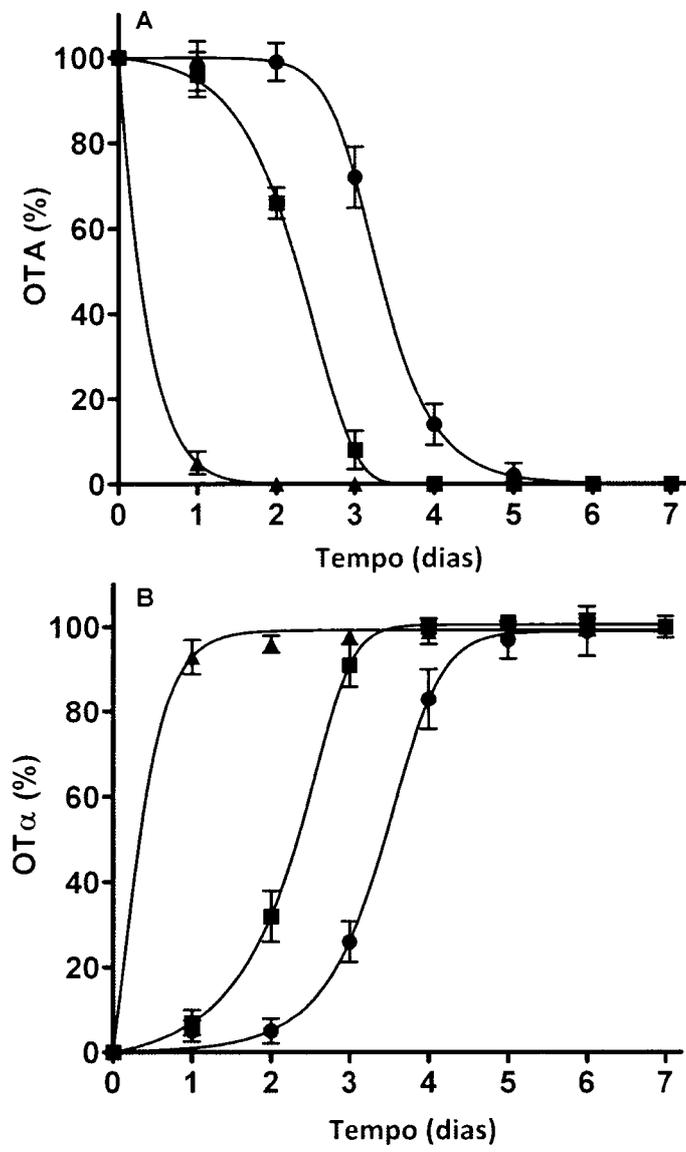


FIG. 2.

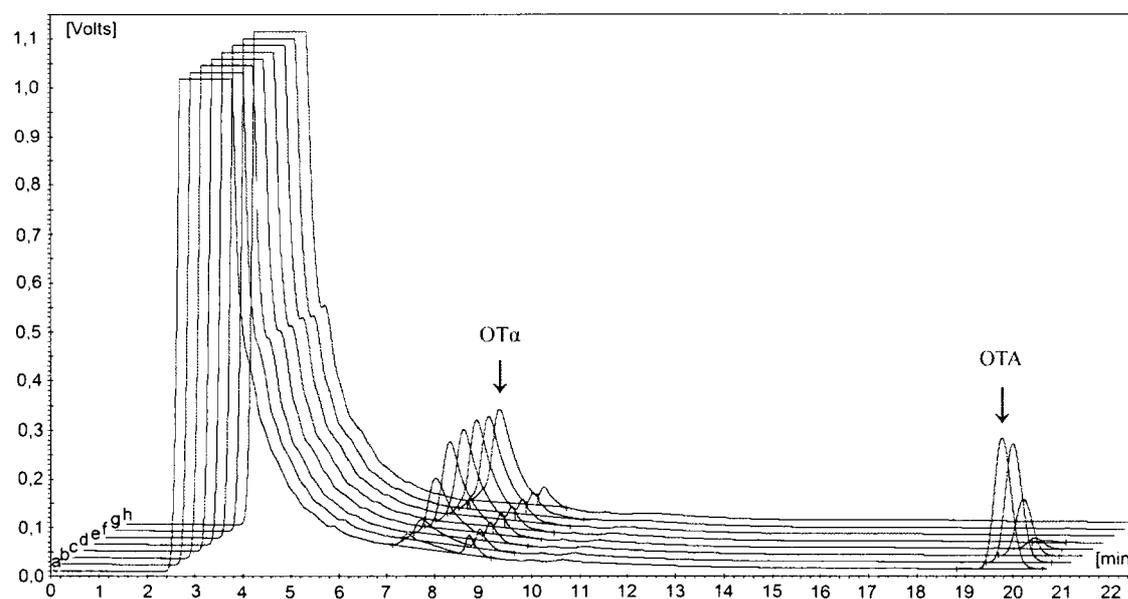
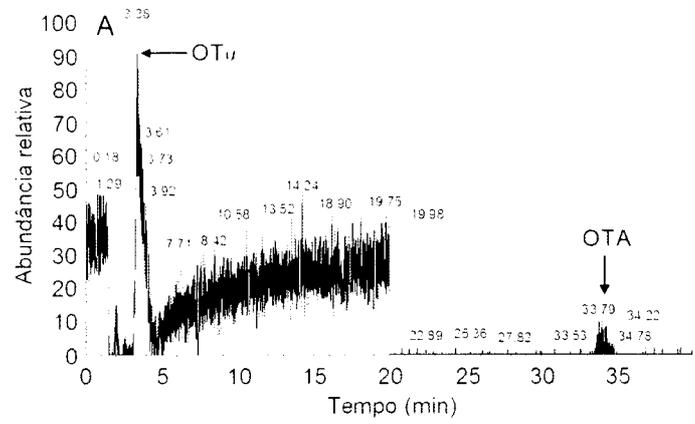


FIG. 3.



211.05

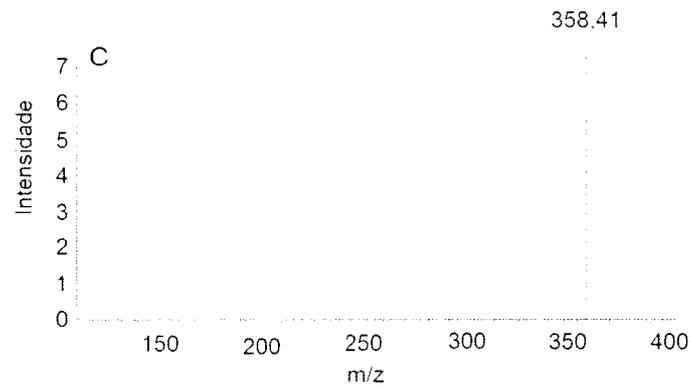
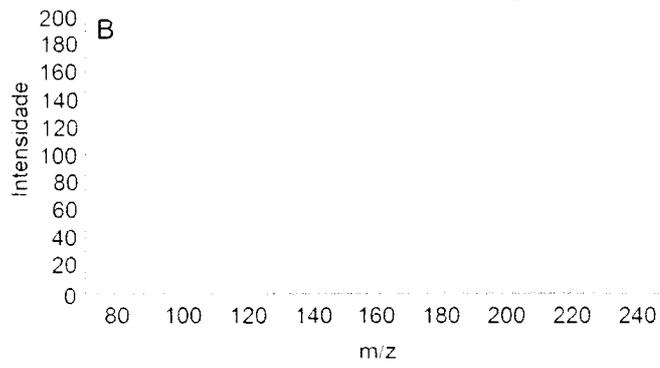


FIG. 4.

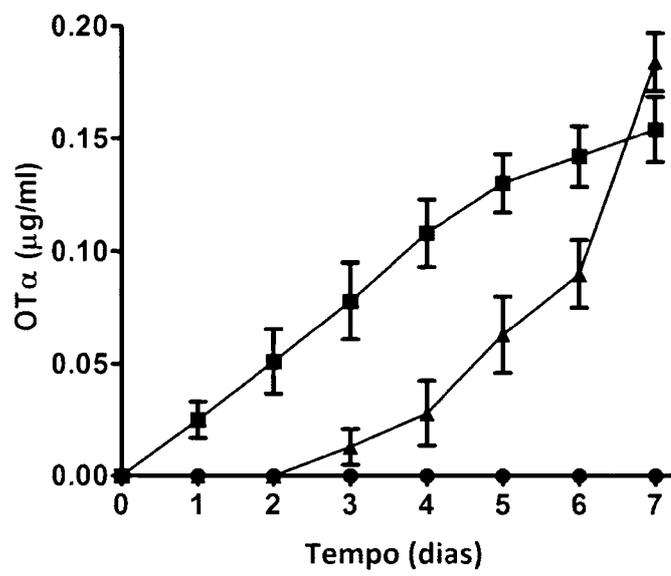


FIG. 5.