



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIMICOTOXINAS DE EXTRATOS
DE FARELO DE ARROZ, CEBOLA E MICROALGA CHLORELLA**

MICHELE MORAES DE SOUZA

Prof^a Dr.^a Eliana Badiale Furlong

Orientadora

RIO GRANDE, RS

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIMICOTOXINAS DE EXTRATOS
DE FARELO DE ARROZ, CEBOLA E MICROALGA CHLORELLA**

MICHELE MORAES DE SOUZA

Eng^a de Alimentos

Dissertação apresentada para
a obtenção do título de Mestre
em Engenharia e Ciência de
Alimentos

Prof^a. Dr^a. ELIANA BADIALE-FURLONG

ORIENTADORA

RIO GRANDE – RS

2008

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha mãe, Eliana, minha grande companheira, obrigada pela compreensão, dedicação nos cuidados com a Camila, pelo amor incondicional e pelo apoio constante nos momentos mais difíceis. Ao meu pai, Reginaldo, e aos meus irmãos: Nando, César e Ticia, obrigada pelo apoio, amor e carinho. Sem a contribuição de todos vocês este trabalho não teria sido possível.

Ao Marcelo, por estar sempre presente, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo apoio, carinho, incentivo, amor e esforços realizados para a minha formação profissional, eternamente grata.

À minha querida filha Camila, que mesmo sem saber a importância do trabalho que foi realizado, entendeu os meus momentos de ausência, a ela o meu obrigado pela compreensão e o meu pedido de desculpas pelas minhas faltas nestes dois anos, te amo.

À Professora Dra. Eliana Badiale Furlong, pela incansável orientação, dedicação, incentivo, paciência e amizade, sem os quais este trabalho não seria possível.

À doutoranda Melissa e a graduanda Meritaine, pelo auxílio, dicas, dedicação e companheirismo durante todo o trabalho, e, acima de tudo, pela amizade, muito obrigada.

Às grandes amigas e companheiras do Laboratório: Maria de Jesus, Vânia, Paula, Jaque, Gini, Cris, Vivian, Eliane, Larine, Luciana e Helen, muito obrigada. Sem vocês e sem o incentivo de todas com certeza a caminhada teria sido muito mais difícil.

À EMATER – RS, pelas cebolas doadas e pela disponibilidade no apoio técnico necessário para a realização deste trabalho.

À Islanda por todos os serviços prestados.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação Universidade Federal do Rio Grande e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do Curso de Mestrado, onde pude contar com a colaboração de todos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa-CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
CAPÍTULO II.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 FUNGOS.....	17
2.1.1 Gênero <i>Rhizopus</i>	18
2.1.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	18
2.1.3 Gênero <i>Fusarium</i>	19
2.1.4 Contaminação dos alimentos por fungos.....	20
2.2 MICOTOXINAS	23
2.2.1 Aflatoxinas.....	25
2.2.2 Determinação de micotoxinas.....	25
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	27
2.4 AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	31
2.5 ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	32
2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAR A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	34
2.7 MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS INIBIDORES DO CRESCIMENTO FUNGICO	36
2.8 FARELO DE ARROZ	36
2.9 CEBOLA	38
2.9.1 Legislação comercial da cebola.....	39
2.10 MICROALGA <i>CHLORELLA</i>	40
2.11 ESTUDOS RELATIVOS AO TEMA DESCONTAMINAÇÃO DESENVOLVIDOS NO LABORATÓRIO DE MICOTOXINAS DA FURG.....	42
CAPÍTULO III	46

ARTIGO 1	47
OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NA CEBOLA ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	48
RESUMO	48
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 <i>Procedimentos experimentais gerais</i>	51
2.2 <i>Amostras</i>	51
2.3 <i>Planejamento para estudo das condições de Extração de fenóis</i>	51
2.4 <i>Preparação dos extratos nas condições otimizadas</i>	51
2.5 <i>Determinação de fenóis totais nos extratos</i>	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 <i>Indicativos de Mérito para o Método de Folin Ciocalteu</i>	55
4. CONCLUSÃO	56
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ARTIGO 2	59
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE CEBOLA, FARELO DE ARROZ E MICROALGA CHLORELLA	60
RESUMO	60
ABSTRACT	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 <i>Material vegetal</i>	63
2.2 <i>Caracterização físico-química das amostras</i>	63
2.3 <i>Avaliação da atividade antifúngica</i>	64
2.3.1 <i>Teste de atividade antifúngica</i>	64
2.4 <i>Análise estatística</i>	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 <i>Caracterização das amostras</i>	65
3.2 <i>Atividade antifúngica</i>	68
4. CONCLUSÃO	72
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ARTIGO 3	76
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA E ANTIMICOTOXIGÊNICA DE EXTRATOS DE CEBOLA, FARELO DE ARROZ E CHLORELLA.....	77
RESUMO	77
ABSTRACT.....	77
1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1 Tecidos Vegetais.....	80
2.2 Determinação de umidade	80
2.3 Preparo dos extratos vegetais.....	80
2.5 Fungos.....	81
2.6 Efeito <i>in vitro</i> de extratos vegetais sobre o desenvolvimento fúngico.	81
2.7 Efeito <i>in vitro</i> de extratos vegetais sobre a produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i>	82
2.8 Análise Estatística.....	83
3. RESULTADOS E DISCUSSAO	83
3.1 Caracterização das amostras.....	83
3.2 Efeito Antifúngico dos extratos fenólicos.....	84
3.3 Efeito dos extratos fenólicos sobre a produção de aflatoxina B ₁ e B ₂ por <i>Aspergillus flavus</i>	92
4. CONCLUSÃO	95
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS GERAL.....	95
CAPÍTULO IV	99
4. CONCLUSÃO GERAL.....	100
CAPÍTULO V	101
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS.....	116
ANEXO 1 - TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 1	117
ANEXO 2 - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E TABELAS ESTATÍSTICAS DO ARTIGO 2	123
ANEXO 3 – TABELAS ESTATÍSTICAS DO ARTIGO 3	136

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II – Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Fungos deteriorantes de alimentos e produtos tipicamente afetados	21
Tabela 2: Principais espécies de fungos toxigênicos e suas micotoxinas	22
Tabela 3: Aspectos econômicos e toxicológicos das principais micotoxinas	24
Tabela 4: Classificação comercial da cebola quanto às dimensões do bulbo.....	40

CAPITULO III – Artigo 2

Tabela 1: Composição Centesimal em diferentes Classes de Cebolas Comerciais	66
Tabela 2: Composição centesimal do farelo de arroz e da microalga chlorella	66
Tabela 3: Resultados dos Fenóis Totais presentes nos extratos estudados	67
Tabela 4: Diâmetros médios de crescimento do <i>Rhizopus sp</i> em presença dos extratos de fenólicos de cebola, farelo de arroz e chlorella.	69

CAPITULO III – Artigo 3

Tabela 1: Resultados de Umidade (%) e Fenóis Totais presentes nas matrizes estudadas.....	83
Tabela 2: Inibição fúngica dos extratos contra <i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> e <i>F. graminearum</i>	87
Tabela 3: Inibição da produção de aflatoxina B ₁ e B ₂ pelo <i>Aspergillus flavus</i> na presença dos extratos fenólicos de vegetais.....	93

ANEXOS – Artigo 1

Tabela 1: Valores de conteúdo de fenóis (μg fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial 2 ⁴ e 6 pontos centrais.....	117
Tabela 2: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico.....	118
Tabela 3: Valores de conteúdo de fenóis (μg fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial 2 ³ e 3 pontos centrais.....	118
Tabela 4: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico.....	119
Tabela 5: Coeficiente de regressão para as variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico.....	119
Tabela 6: Dados de ANOVA para planejamento experimental avaliando rotação, tempo e interação da rotação com o tempo.....	119
Tabela 7: Conteúdo de fenóis totais em cebola nas diferentes classes.....	120
Tabela 8: Teste de Tukey entre as variações médias dos fenóis extraídos com metanol nas diferentes classes de cebola.....	120

ANEXOS – Artigo 2

Tabela 1: Procedimento da curva padrão de quercetina	128
Tabela 2: Procedimento da curva padrão de ácido ferúlico	130
Tabela 3: Procedimento da curva padrão de tirosina	132
Tabela 4: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de proteínas nas diferentes classes de cebola.	133
Tabela 5: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de umidade nas diferentes classes de cebola.	133
Tabela 6: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de fibra bruta nas diferentes classes de cebola.	134
Tabela 7: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de cinzas nas diferentes classes de cebola.	134
Tabela 8: Teste de Tukey entre as variações médias de pH nas diferentes classes de cebola.	134
Tabela 9: Teste de Tukey entre as variações médias nos teores de carboidratos nas diferentes classes de cebola.	135
Tabela 10: Teste de Tukey entre as variações médias nos teores de lipídios nas diferentes classes de cebola.	135
Tabela 11: Teste de Tukey entre as variações médias nos teores de acidez nas diferentes classes de cebola.	135

ANEXOS – Artigo 3

Tabela 1: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus oryzae</i> em presença dos extratos vegetais no 3° dia de incubação.....	136
Tabela 2: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus oryzae</i> em presença dos extratos vegetais no 5° dia de incubação.....	137
Tabela 3: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus oryzae</i> em presença dos extratos vegetais no 7° dia de incubação.....	138
Tabela 4: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus oryzae</i> em presença dos extratos vegetais no 14° dia de incubação.....	139
Tabela 5: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> em presença dos extratos vegetais no 3° dia de incubação.....	140
Tabela 6: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> em presença dos extratos vegetais no 5° dia de incubação.....	141

Tabela 7: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> em presença dos extratos vegetais no 7° dia de incubação.....	142
Tabela 8: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> em presença dos extratos vegetais no 14° dia de incubação.....	143
Tabela 9: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Fusarium graminearum</i> em presença dos extratos vegetais no 3° dia de incubação.....	144
Tabela 10: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Fusarium graminearum</i> em presença dos extratos vegetais no 5° dia de incubação.....	145
Tabela 11: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Fusarium graminearum</i> em presença dos extratos vegetais no 7° dia de incubação.....	146
Tabela 12: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do <i>Fusarium graminearum</i> em presença dos extratos vegetais no 14° dia de incubação.....	147

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II – Revisão Bibliográfica

Figura 1: Estrutura química dos compostos fenólicos presentes no arroz (TIAN et al., 2005) ... 30

CAPITULO III – Artigo 2

Figura 1: Halos de crescimento fúngico nos meios contendo extrato metanólico de cebola (A), cebola aquoso (B), cebola aceto-etílico (C), farelo de arroz metanólico (D), chlorella metanólico (E)..... 70

CAPITULO III – Artigo 3

Figura 1: Acompanhamento do crescimento fúngico do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos vegetais..... 84

Figura 2: Acompanhamento do crescimento do *Aspergillus flavus* em presença dos extratos vegetais 85

Figura 3: Acompanhamento do crescimento do *Fusarium graminearium* em presença dos extratos vegetais..... 86

Figura 4: Efeito inibitório dos extratos naturais sobre o crescimento do *Aspergillus oryzae* a) após 7 dias e b) 14 dias de incubação..... 89

Figura 5: Efeito inibitório dos extratos naturais sobre o crescimento do *Aspergillus flavus* a) após 7 dias e b) 14 dias de incubação..... 90

Figura 6: Efeito inibitório dos extratos naturais sobre o crescimento do *Fusarium graminearium* a) após 7 dias e b) 14 dias de incubação..... 91

ANEXOS – Artigo 1

Figura 1: Superfície de resposta (a) e curva de contorno para Fenóis (b)..... 121

Figura 2: Cinética de rendimento de extração de fenóis por tempo..... 122

RESUMO

A contaminação fúngica acarreta alterações na qualidade nutricional e no valor econômico dos produtos alimentícios podendo causar danos patológicos em plantas, animais e humanos. A identificação da atividade antifúngica e antimicotoxinas, em extratos de diferentes fontes que exibem propriedades de inibir naturalmente o crescimento de fungos e subsequente produção de micotoxinas (metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos), abre a perspectiva de empregar de forma mais eficiente os tecidos vegetais empregando-os como conservadores naturais. Entre os compostos com propriedades inibidoras de crescimento fúngico e produção de micotoxinas, naturalmente presentes em alimentos, destacam-se os compostos fenólicos, que por sua estrutura química dificultam a atividade de enzimas metabólicas de microrganismos. As matérias-primas escolhidas foram: o farelo de arroz, a cebola e a microalga *Chlorella phyrenoidosa*. Aos três tecidos são atribuídas propriedades funcionais, sendo que os dois primeiros são abundantes na região sul e comercializados com baixo valor agregado. A *Chlorella* é empregada em dietas especiais como fonte de compostos bioativos especialmente aminoácidos essenciais e compostos antioxidantes. Este trabalho teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos, a atividade antifúngica sobre o desenvolvimento dos fungos dos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, e *Fusarium graminearum* e a atividade antimicotoxinas sobre o fungo *Aspergillus flavus*, em extratos de farelo de arroz, cebola e *Chlorella*. Os compostos fenólicos da cebola foram extraídos em três sistemas solventes: aquoso, metanólico e acetato de etila. Os compostos fenólicos do farelo de arroz e da *Chlorella* foram extraídos com metanol, sendo quantificados colorimetricamente com reagente de Folin-Ciocalteu. O conteúdo de fenóis totais nos vegetais variou de 68 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{g}^{-1}$ em extrato aceto-etílico de cebola a 3012 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{g}^{-1}$ em extrato aquoso de cebola. Os extratos foram triados sobre os fungos *Rhizopus sp* e *Aspergillus oryzae* que foram os modelos para estimar a inibição de crescimento fúngico. Esporos de *Aspergillus flavus* foram utilizados para estudar o efeito inibidor da produção de aflatoxina B₁ e B₂. Os extratos testados apresentaram algum grau de inibição do desenvolvimento fúngico, sendo a *Chlorella* a que apresentou maior inibição em relação aos outros extratos, em todos os fungos testados, chegando a 31% de inibição/ $\mu\text{g}_{\text{fenol total}}$. Após o 7^o, 14^o e 21^o dia de incubação foram realizadas extrações de micotoxinas do meio de crescimento pelo método adaptado de TANAKA et al., (2000). O extrato fenólico de *Chlorella* inibiu totalmente a produção de micotoxinas em relação ao controle. Estes resultados mostram que a ação antifúngica está naturalmente presente em alguns tecidos vegetais e que encontrar a forma de extraí-los e aplicá-los como conservadores de alimentos é muito promissor para agregar valor aos alimentos, principalmente aqueles de baixo valor comercial.

Palavras-chave: antifúngico, fenóis, micotoxinas.

ABSTRACT

The fungal contamination cause alterations in nutritional quality and economic value of food products and can cause pathological damages in plants, animals and humans. The identification of the antifungal activity and antimycotoxin in extracts of sources different that show properties of naturally inhibiting the fungal growth and subsequent mycotoxins production (metabolites secondary produced by toxic fungal), open the perspective of employing in the more efficient form the vegetable tissue employing them like natural conservatives. Between compounds with properties inhibiting of fungal growth and mycotoxins production, naturally present in foods, stand out the phenolics, what for your chemical structure make difficult the activity of metabolic enzymes of microorganisms. The chosen raw materials were: the rice bran, the onion and the microalga *Chlorella phyrenoidosa*. To three tissues functional properties are attributed being that two first ones are abundant in the south region and marketed with low collected value. The *Chlorella* is employed in special diets like source of bioactives compounds and antioxidant compounds. This objective study was determine the tenor of phenolics compounds, the antifungal activity on the development of the fungal *Rhizopus sp*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* and antimycotoxin activity on the fungal *Aspergillus flavus*, in extracts of bran of rice, onion and *Chlorella*. The phenolic compounds of the onion were extracted in three solvent systems: aqueous, methanolic and ethyl acetate. The phenolic compounds of the bran of rice and of the *Chlorella* were extracted with methanol, and quantified with reagent of Folin-Ciocalteu. The total phenolics levels in vegetables ranged between 68 µgphenolic g⁻¹ in aceto-ethylic extract of onion and 3012 µgphenolic g⁻¹ in aqueous extract of onion. The extracts was used in antifungal tests against strains of *Rhizopus sp* and *Aspergillus oryzae* that were the models to appreciate the inhibition of fungal growth. Spores of *Aspergillus flavus* were used to study the inhibiting effect of the aflatoxins B₁ and B₂ production. The tested extracts presented some degree of inhibition of the fungal development, being the *Chlorella* Who presented tested bigger inhibition regarding other extracts, in all the fungal, is reaching 31% of inhibition/µgphenolic . After 7°, 14 and 21° Day of incubation were carried out extractions of mycotoxins from growth medium were determined by TANAKA et al., method (2000). The phenolic extract of chlorella inhibited totally the mycotoxins production regarding the control. These results show that the antifungal activity is present naturally in some vegetable tissues and that to find the form of extracting to apply as conservatives of foods is very promising to values collect to the foods, principally those of low commercial value.

Key words: antifungal, mycotoxins, phenolic.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por fungos causa mudanças, tanto na composição química, quanto na estrutura e aparência representando perda econômica e/ou desperdício da matéria-prima e alimentos. Além de que algumas espécies fúngicas em condições de estresse produzem micotoxinas que podem ocasionar danos à saúde de humanos e animais (TANIWAKI e SILVA, 2001)

As micotoxinas são metabólitos secundários que podem ser produzidos em qualquer época do cultivo, colheita ou estocagem de matérias-primas agrícolas e/ou alimentos. Estas substâncias podem ser carcinogênicas, neurotóxicas e teratogênicas e a ocorrência delas em alimentos têm sido mencionada em diferentes países, inclusive no Brasil (ABDULKADAR et al., 2004; AYCICEK et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2005; GARDA et al., 2004; NUNES et al., 2003). As espécies de fungos micotoxigênicos envolvidos na cadeia alimentar humana, pertencem com mais frequência a três gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Muitas estratégias têm sido sugeridas para prevenir o crescimento dos fungos toxigênicos e conseqüente produção de micotoxinas em produtos agrícolas e alimentos processados, tais como as aplicações de fungicidas e preservantes químicos, respectivamente na lavoura e nos produtos alimentícios (FONSECA, 2007; NAIDU, 2000; YOSHIZAWA, 2001;).

A preocupação de produzir alimentos saudáveis e seguros vêm norteando a busca por conservantes naturais na forma nativa ou extraídos de suas fontes. Diante disto, a ênfase das pesquisas está voltada para a identificação e purificação de novos compostos com atividade antifúngica provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhos ou sinergisticamente inibindo a deterioração de alimentos, limitando o uso dos antifúngicos químicos (BRUL e KLIS, 1999; MELO e GUERRA, 2002).

Os compostos antifúngicos de ocorrência natural empregam diferentes mecanismos de defesa nos vegetais em que são produzidos. Os compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais e outros podem atuar na inibição da biossíntese de componentes da parede celular, destruindo a membrana e dificultando a entrada de nutrientes; inibir a biossíntese de proteínas e aminoácidos fúngicos; alterar a biossíntese de esfingolípídios e interferir no transporte de elétrons, inviabilizando a integridade da célula. Os antifúngicos químicos exercem mecanismos similares, porém estes tendem a estar em quantidades excedentes que podem se acumular no organismo dos consumidores (BRUL e KLIS, 1999).

Entre estes compostos, aos quais se atribui propriedades antifúngicas estão os fenólicos. Estes compostos também são denominados polifenóis e constituem uma classe de substâncias químicas que inclui diversas estruturas simples e complexas, derivados da fenilalanina e tirosina. A síntese dos mesmos pode ocorrer em quase todos os tecidos vegetais e há evidências que as estruturas fenólicas presentes naturalmente em diferentes porções dos vegetais possuem além de atividade antifúngica a possibilidade de controlar a produção de micotoxinas. Usualmente estes compostos localizam-se nas porções do vegetal mais expostas a contaminação microbiana, na região superficial e tecidos de proteção (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Algumas matérias-primas de origem vegetal são descartadas por não apresentarem as características sensoriais adequadas para a comercialização *in natura* desperdiçando-se com isto uma fonte importante de compostos bioativos. Os resíduos gerados na atividade agroindustrial vem sendo foco nas políticas recentes de produção empregando tecnologias limpas, despertando o interesse da comunidade acadêmica e empresarial no sentido de encontrar usos mais eficientes e menos danosos ao meio ambiente. Assim, considerando-se o contexto da agroindústria regional é interessante conhecer o potencial de resíduos de cebola e arroz como fonte de conservadores naturais para extração e utilização na preservação de alimentos.

Em levantamento realizado pela CONAB em 2007, a produção brasileira de arroz na safra 2006/2007 chegou a 11,94 milhões de toneladas de arroz beneficiado, deste aproximadamente 1,2 milhões de toneladas foram geradas de farelo de arroz que por suas características sensoriais e pela disponibilidade discutível de nutrientes são comercializadas a valores pouco compensadores para o setor industrial (CONAB, 2008).

A cebola apresentou aumento na produção de aproximadamente 25% na última década, no entanto, o mercado “*in natura*” apresenta padrões que nem sempre são atingíveis por variedades cultivadas em algumas regiões do país pelas suas características genéticas inerentes ou pelas condições climáticas e manejo de pós-colheita. As perdas atingem aproximadamente 18% do total da produção anual, sendo 9% do tipo sem casca (fora do padrão) e 9% (menor que 35 mm de maior diâmetro transversal), fora do padrão; 82% do tipo comercializável (EMATER, 2007).

A microalga *Chlorella* tem as condições de cultivo bem conhecidas, e vem sendo cultivada no Laboratório de Engenharia e Bioquímica da FURG, para uso em formulações de

alimentos ou extração de biocompostos. Diferentes ações biológicas foram identificadas nos componentes desta microalga, mas as suas propriedades como conservadora ainda são pouco exploradas (DERNER et al., 2006).

O conhecimento da presença de substâncias que possuam atividade antifúngica e antimicotoxinas em matérias-primas vegetais abre a possibilidade de se utilizar suas porções não comestíveis para extração de compostos bioativos que possam ser empregados na preservação de outros alimentos, agregando valor em diferentes etapas da produção e conferindo a estes maior aporte de compostos funcionais na dieta.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Determinar a atividade antifúngica e antimicotoxinas de extratos de farelo de arroz, cebola e microalga *Chlorella*.

1.2.2 Objetivos específicos

Adaptar procedimento para determinação de compostos fenólicos totais em cebola;

Verificar a atividade antifúngica dos extratos aquosos, alcoólicos e aceto-etílicos de cebola e alcoólicos de farelo de arroz e *Chlorella phyrenoidosa* sobre o desenvolvimento dos fungos *Rhizopus sp*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, e *Fusarium graminearum*;

Avaliar o efeito dos extratos vegetais sobre a produção de aflatoxinas B₁ e B₂ por *Aspergillus flavus*.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS

Fungos são microrganismos aeróbios, altamente disseminados no meio ambiente, podendo ser encontrados no solo, água e no ar. Todos os fungos são heterotróficos, ou seja, precisam de compostos orgânicos como fonte de energia e carbono. Estes microrganismos são saprófitas e atuam decompondo a matéria orgânica, auxiliando a fertilização do solo. Devido a sua grande versatilidade, podem crescer em substratos de composição variada, onde talvez, outros microrganismos não mostrassem crescimento (PUTZKE e PUTZKE, 2002; TANAWAKI e SILVA, 1996). São ubíquos encontrados no solo, vegetação e águas. Em função disto podem causar efeitos indesejáveis para a agricultura e indústria de alimentos. Embora os microrganismos possam ser inativados ou retirados durante o processamento e estar ausentes no produto manufaturado, as toxinas permanecem estáveis (MOSS, 1992).

A morfologia dos fungos, sua forma e estrutura, são determinadas mediante observação macroscópica e microscópica. O corpo dos fungos está formado por uma massa de filamentos ramificados e entrelaçados, chamados hifas, cujo conjunto é denominado micélio. As hifas crescem rapidamente e podem atingir mais de 1 km de micélio em 24 horas. A partir de um pedaço de micélio transplantado podem originar-se novos indivíduos que se reproduzem por meio de esporos assexuados, ou sexuados em algumas espécies (GRIFFIN, 1994; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1996).

Fisiologicamente, os fungos se adaptam a sobrecargas mais severas que a maioria dos microrganismos, podendo crescer em substratos com alta concentração de açúcar, uma vez que são pouco sensíveis a altas pressões osmóticas; toleram pH entre 2,0 e 9,0, enquanto o pH ótimo para a maior parte das espécies se situa em torno de 5,6. Também podem se desenvolver numa ampla faixa de temperatura, além da faixa ótima entre 22 e 30 °C para a maioria das espécies. Há espécies que se desenvolvem entre 35 e 37 °C, ou em temperaturas superiores e outros ditos psicrófilos, ou seja, que crescem bem à temperatura de refrigeração (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; PUTZKE e PUTZKE, 2002).

A produção de biomassa por fungos leva em conta que estes são capazes de degradar uma ampla variedade de produtos vegetais complexos. As pesquisas ao longo do tempo vêm demonstrando que os gêneros de fungos mais promissores na produção de biomassa são: *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor* (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

2.1.1 Gênero *Rhizopus*

Estes fungos são classificados como zigomicetos, da ordem *Mucorales* e são considerados os fungos mais primitivos. Morfologicamente, são fungos com hifas contínuas, formam uma massa citoplasmática multinucleada (hifas cenocíticas) e não formam corpo de frutificação. Na reprodução assexuada algumas hifas crescem na vertical e se diferenciam na extremidade, formando esporângios, estruturas constituintes dos esporos. Os esporângios são grandes e negros; quando maduros se desintegram liberando os esporos que germinam e formam novas massas de hifas (PITT e HOCKING, 1997; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1996).

A reprodução sexuada, menos freqüente ocorre com a aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes. As extremidades dessas hifas se encostam e se fundem, originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigospóro. O zigospóro, passado o período de dormência, sofre meiose e germina, originando um novo micélio (PITT e HOCKING, 1997; RAVEN et al., 1996). Este gênero não possui espécies toxigênicas, fato que pode justificar a grande facilidade de contaminação de materiais onde eles se desenvolvem por outras espécies fúngicas (PITT e HOCKING, 1997).

2.1.2 Gênero *Aspergillus*

Os fungos deste gênero são classificados como ascomicetos, a classe mais numerosa do reino *Fungi*. Suas hifas são septadas, seus septos ou paredes transversais são perfurados por um poro central, por onde o citoplasma e o núcleo podem passar facilmente. Sua reprodução é realizada por meio de esporos, tanto na fase assexuada quanto na sexuada. Na forma assexuada, os esporos especializados (conídios) formam-se nas extremidades das hifas especializadas e denominam-se conidióforos. Os esporos, ao entrarem em contato com o meio, germinam e originam novos micélios. Foram identificados em torno de 200 espécies de *Aspergillus* na natureza, isoladas de frutas, vegetais e outros substratos, especialmente os ricos em carboidratos (PUTZKE e PUTZKE, 2004; RAVEN et al., 1996).

Os *Aspergillus* são membros ubíquos da microflora do ar e, por isso, são encontrados freqüentemente como contaminantes dos meios de cultivo. Estes fungos crescem em altas concentrações de açúcar e sal, indicando que são capazes de extrair água de substâncias relativamente secas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; WAINWRIGHT, 1995).

Espécies deste gênero são economicamente importantes, pois são utilizadas em numerosas fermentações, incluindo a produção de ácidos cítrico e glutâmico pelo *Aspergillus*

niger, que também é citado como o microrganismo mais usado para enriquecimento protéico de substratos. No Japão, *Aspergillus wentii* é utilizado para produção de alimentos fermentados (GREWAL e KALRA, 1995; HAQ, ALI e IQBAL, 2003; SCHIRICKX et al., 1995; WAINWRIGHT, 1995).

Quanto a produção de enzimas, *Aspergillus oryzae* vem sendo utilizado principalmente para a produção de α – amilase, mas também de outras enzimas, como poligalacturonase e polimetilgalacturonase (NEMEC, JERNEJC e CIMERMAN, 1997).

Algumas espécies contaminam os alimentos produzindo micotoxinas, como é caso do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Com relação ao crescimento fúngico e formação de micotoxinas, estes são dependentes de uma série de fatores, como a umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento fúngico, constituição do substrato, lesões à integridade dos grãos causados por insetos ou dano mecânico/térmico, quantidade de inóculo fúngico, bem como a interação/competição entre as linhagens fúngicas.

2.1.3 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium sp.* é classificado como um fungo imperfeito, caracterizado por um micélio hialino, ramificado e tabicado, com esporóforos em forma de fiálides e conídios de forma e tamanho variável. Apresenta macroconídeas fusiformes, com vários septos (LEAL et al., 2005).

Apesar de intensas pesquisas, esforços para controlar e prevenir infecções fúngicas, em especial por *Fusarium*, em vegetais e animais, não tem havido grande sucesso. O *Fusarium* causa danos a plantações e prejuízos que geram perdas de bilhões de dólares nos Estados Unidos e no mundo. Além disso, a ingestão de alimentos que contenham micotoxinas produzidas por este fungo pode causar grandes prejuízos para saúde humana e vegetal (DOYLE, 1997).

As espécies de *Fusarium*, que são conhecidas como fitopatógenos, são saprófitas do solo com distribuição mundial. O registro de incidência de infecções humanas por *Fusarium* tem aumentado consideravelmente na medicina contemporânea. O *Fusarium sp.* destaca-se não só pela sua agressividade, mas por levar ao óbito a maioria dos pacientes com infecção disseminada. As lesões provocadas por *Fusarium* nos seres humanos podem ser locais ou sistêmicas. As primeiras ocorrem principalmente em decorrência de lesões traumáticas ou infecções secundárias a queimaduras. As manifestações mais freqüentes são queratites, úlceras, de pele, micetomas, osteomielites e osteoartrites (HENNEQUIN et al., 1999). Em

humanos, o fungo geralmente penetra pela pele ou conjuntiva ocular, levando a efeitos sistêmicos, principalmente em imunocomprometidos, com grande potencial carcinogênico, que podem levar à morte (LEAL et al., 2005).

O *Fusarium* e suas micotoxinas, em especial fumonisinas, deoxinivalenol e zearalenona, são detectados com grande frequência em grãos que servem de preparo para ração destinada ao consumo animal. Tanto em plantações quanto nos animais que se alimentam de tais grãos, os efeitos do fungo são graves, levando a um prejuízo econômico e à saúde dos mesmos (LEAL et al., 2005). Estas toxinas no Brasil são relativamente pouco estudadas e a maioria dos relatos de contaminação provém de matérias-primas produzidas nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, devido a alternância de noites frias e dias quentes (SANTURIO, 2002).

Vários trabalhos têm sido realizados com o intuito de melhorar a resistência das plantações ao *Fusarium* e suas micotoxinas. Programas procuram variedades de espécies de plantas que tenham resistência ao fungo por melhoramento genético. Também tem sido estudadas espécies de microrganismos que tenham antagonismo competitivo pelo *Fusarium* (LEAL et al., 2005).

2.1.4 Contaminação dos alimentos por fungos e micotoxinas

Apesar das utilidades e benefícios do emprego dos fungos, em processos industriais diversos, quando estes contaminam os produtos alimentícios podem representar perigo à saúde pública, pois além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, alterarem as características sensoriais e podem produzir substâncias tóxicas (MENEZES, 1992).

As principais espécies fúngicas deteriorantes de alimentos e os produtos onde ocorrem com mais frequência ocasionando perdas de nutrientes estão exemplificados na Tabela 1 (BRUL e KLIS, 1999).

Tabela 1: Fungos deteriorantes de alimentos e produtos tipicamente afetados

Fungos	Produtos afetados
<i>Aspergillus versicolor</i>	Pães, laticínios
<i>Aspergillus flavus</i>	Cereais, nozes
<i>Aspergillus niger</i>	Especiarias
<i>Fusarium oxysporum</i>	Frutas
<i>Penicillium roqueforti</i>	Carnes, ovos e queijos
<i>Penicillium expansum</i>	Frutas e vegetais
<i>Penicillium commune</i>	Margarinas
<i>Penicillium discolor</i>	Queijo
<i>Saccharomyces spp.</i>	Bebidas suaves
<i>Trichoderma harzianum</i>	Margarinas

Fonte: BRUL & KLIS, 1999.

Dentre as espécies fúngicas toxigênicas encontradas nos alimentos destacam-se os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, cujas espécies e toxinas estão apresentadas na Tabela 2. Estes três grupos são classificados em função do habitat e substrato preferencial para o seu desenvolvimento. Enquanto as espécies de *Fusarium* são patógenas destrutivas das plantas produzindo micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são mais comumente encontradas como contaminantes de equipamentos e alimentos durante a secagem e posterior estocagem (SWEENEY e DOBSON, 1998). Estes fungos também estão largamente distribuídos na natureza e, portanto, muitas vezes contaminam alimentos frescos e processados.

Tabela 2: Principais espécies de fungos toxigênicos e suas micotoxinas

Espécie fúngica	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ácido Ciclopiazônico
<i>Penicillium viridicatum</i> ; <i>Penicillium cyclopium</i>	Ocratoxina A
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Deoxivalenol
<i>Fusarium sporotrichioides</i> ; <i>Fusarium poae</i>	Toxina T-2
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. poae</i>	Deacetoxiscerpenol
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisinias

Fonte: D'MELLO e MACDONALD, 1997.

A quantificação do crescimento fúngico é bastante complexa, considerando que os fungos crescem como hifas e não como células simples, o micélio pode penetrar nos substratos sólidos e as colônias tendem a se espalhar tornando difícil a quantificação em placas. Muitos autores destacam o fato de que os aspectos relacionados a deterioração de matérias-primas e produtos e a produção de toxinas justificam a necessidade de detectar, quantificar e identificar fungos em alimentos para garantir a qualidade e diminuir o risco de deterioração ou de produção de toxinas fúngicas (TANAWAKI, IAMANAKA e BANHE, 1999).

O potencial de produção de micotoxinas pode unicamente ser estabelecido pelo isolamento de espécies toxigênicas e sua inoculação em meios com nutrientes e condições de temperaturas e umidade adequadas ou pela detecção da micotoxina na matriz analisada (OSBORNE, 1982).

Em estudo da microflora e espécies aflatoxigênicas em derivados de arroz, Lima et al., (2000), avaliaram a capacidade de produção de micotoxinas por cepas de *Aspergillus flavus*, isoladas de arroz e derivados. Os microrganismos foram inoculados em ágar contendo leite de coco e incubados por 7 dias a 25°C. A determinação das micotoxinas feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), revelou que 53% das cepas foram aflatoxigênicas e produziram aflatoxinas B₁ e B₂. Nunes et al., (2003) avaliaram o potencial de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de amostras de arroz, demonstrando potencial toxigênico com

produção de aflatoxina B₁ e ocratoxina A, respectivamente. Sendo que a ocratoxina A foi produzida em maior nível (43 ppb) quando inoculada em farelo de arroz.

2.2 MICOTOXINAS

A contaminação dos alimentos por fungos depende do crescimento destes e pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (SABINO, 1996). O estresse, o desbalanço de nutrientes e as condições ambientais propiciam que espécies toxigênicas produzam micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos em alguma etapa do desenvolvimento fúngico, podendo ser tóxico aos animais e ao homem (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Pode-se assumir que aproximadamente 20% dos produtos alimentícios (principalmente de origem vegetal) estão substancialmente contaminados por micotoxinas. Algumas das mais relevantes micotoxinas (aflatoxina B₁ e ocratoxina A) podem ser detectadas em produtos alimentícios e rações animais originários de diferentes países. Do total de 300 micotoxinas que vem sendo descritas, produzidas por cerca de 200 espécies de fungos, apenas 20 são normalmente encontradas em alimentos e rações em níveis considerados de risco para a saúde de humanos e animais (ANKLAM, STROKA e BOENKE, 2002).

A comprovada natureza tóxica das micotoxinas, torna necessária a prevenção da contaminação de alimentos por fungos toxigênicos, e o controle do crescimento fúngico mediante a manipulação do ambiente que se encontra o alimento. Os métodos de controle são utilizados para reduzir a concentração de micotoxinas a níveis seguros, ou a utilização de produtos de degradação não tóxicos, sem que promovam a diminuição do valor nutritivo dos alimentos descontaminados. Os métodos de controle podem ser classificados dentro de duas categorias principais: prevenção da contaminação e do crescimento fúngico e detoxificação dos compostos produzidos pelos fungos.

As micotoxinas mais freqüentes encontradas em alimentos de consumo rotineiro e com limites de consumo estabelecidos por muitos países são: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol, toxina T-2 e fumonisina (FONSECA, 2007).

A Tabela 3 apresenta as principais micotoxinas estudadas em função de aspectos econômicos e toxicológicos, fungo produtor da contaminação, estrutura química, os alimentos mais freqüentemente contaminados por micotoxinas e os sintomas das micotoxinas em animais e humanos.

Tabela 3: Aspectos econômicos e toxicológicos das principais micotoxinas

	Aflatoxinas	Ocratoxina A	Zearalenona	Tricotecenos
Fungo produtor	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Stachbotrys</i> , <i>Trichoderma</i>
Estrutura Química	Cumarinas substituídas e ligadas ao deidrofurano	β -fenilalanina ligada a isocumarina	Derivadas do ácido resorcílico	Sesquiterpenóides substituídos por éster e álcool
Sintomas em animais	Hepatotoxicose, carcinogênese hepática, baixa conversão alimentar, redução da lipase pancreática.	Nefrotóxica, hepatotóxica, desidratação.	Efeitos estrogênicos, infertilidade.	Perda de apetite, vômito, diarreia, perda de peso.
Sintomas em humanos	Aflatoxicose, hepatocarcinogênese, síndrome de Reye, endofalopatia e degeneração gordurosa nas vísceras.	Nefropatia dos Balkans, tumor renal.	Aborto, câncer cervical.	Aleucia tóxica alimentar (ATA), doença de akakabi-bio, estaquiobotriotoxicose.
Alimentos de ocorrência	Amendoim, pistache, nozes, castanha do Brasil, trigo, cevada, aveia, painço, milho, caroço de algodão	Trigo, cevada, aveia, centeio, milho, sorgo, arroz, feijão, noz, ervilhas, grãos de café, ração, produtos animais (rim, carne, produtos cárneos e lácteos);	Milho, trigo, cevada, aveia, centeio, sorgo, arroz	Trigo, cevada, aveia, centeio, milho, sorgo, arroz, condimentos, ração.

Fonte: SCUSSEL (2000); YOSHIZAWA (2001).

2.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFL) são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes, produzidas, sobretudo por diferentes espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, tendo sido identificados quatro tipos estruturais principais, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por apresentarem fluorescências azul, violeta e esverdeada, respectivamente quando observadas sob luz ultravioleta de ondas longas (365nm) (SWEENEY e DOBSON, 1998). Estas são as micotoxinas mais estudadas em alimentos e rações, no mundo inteiro sendo os grãos mais frequentemente contaminados, amendoim, nozes, milho, arroz, frutas, figo, cacau e temperos (YOSHIZAWA, 2001).

Estruturalmente elas se constituem em cumarinas substituídas ligadas a deidrofurano, sendo estas substituições fatores que conferem diferentes graus de toxicidades. O efeito tóxico delas mais característico é a carcinogenicidade, verificada para muitas espécies animais, inclusive para humanos. Teratogenicidade e mutagenicidade foram observadas em algumas espécies (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

As aflatoxinas são solúveis em metanol, clorofórmio e outros solventes polares, mas parcialmente solúveis em água (10-30 µg/mL). Tais toxinas absorvem fortemente luz ultravioleta (362-363nm) com absortividade molar de 14700 para aflatoxina B₂ e 21800 para aflatoxina B₁. A emissão de fluorescência para aflatoxina B₁ e B₂ ocorre em 425nm e 450nm para aflatoxina G₁ e G₂ (CACCIAMANI et al., 2007).

Segundo Yoshizawa (2001), as aflatoxinas são potencialmente hepatotóxicas, teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas. O efeito da toxicidade varia com a dose, tempo de exposição e espécie animal. A aflatoxina B₁ induz a formação de tumores malignos em diferentes espécies animais, incluindo ratos, macacos, patos e trutas. A carcinogenicidade da aflatoxina B₁ é explicada em função da ativação metabólica por enzimas microsossomais hepáticas susceptíveis aos epóxidos, que interagem com o DNA, podendo desta forma interferir na transcrição e síntese de proteínas.

2.2.2 Determinação de micotoxinas

Conforme o exposto as micotoxinas são um grupo de substâncias que apresentam certa variabilidade nas características físico-químicas, e por isso o desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea tem sido um desafio para os analistas. Em adição, o desempenho dos métodos analíticos pode ser influenciado pela matriz do alimento, ou seja, pela composição

química do alimento. Portanto, um grande número de métodos para triagem, inspeção e controle de micotoxinas em alimentos tem sido proposto. Métodos para determinação de aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos e zearalenona em alguns tipos de alimentos já foram validados interlaboratorialmente em estudos colaborativos promovidos por organizações como AOAC International (Association of Official Analytical Chemists), AOCS (American Oil Chemists' Society), AACC (American Association of Cereal Chemists) e IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

A metodologia analítica para a determinação de micotoxinas em alimentos geralmente é composta pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação. As etapas vão diferir dependendo dos equipamentos, reagentes disponíveis e dos requerimentos analíticos (sensibilidade, exatidão, precisão, tempo de análise e custo).

Dentre os métodos mais utilizados para a determinação de micotoxinas, estão os imunoensaios e os métodos cromatográficos. Os métodos de imunoensaios mais empregados são os de ELISA e a cromatografia por imunoafinidade, esta utilizada para limpeza dos extratos antes da determinação por cromatografia, principalmente para a detecção de aflatoxinas. Dentre métodos cromatográficos podem ser citadas a cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), dependendo da estrutura química e sua adequabilidade ao sistema separativo (SYDENHAM e THIEL, 1996; SCUSSEL, 2000). Algumas micotoxinas podem ser facilmente quantificadas por sua fluorescência outras apresentam baixa interação com a radiação eletromagnética necessitando de sistemas especiais de detecção (detectores de chama, espectrometria de massa, captura eletrônica e outros) e derivação química para torná-las mais interativas (SYDENHAM e THIEL, 1996).

Testes de confirmação são recomendados, principalmente quando se emprega cromatografia de camada delgada. Dentre estes testes está mencionado o emprego de solventes e reveladores distintos, além de reações químicas de derivação. Para a cromatografia gasosa, o tempo de retenção através de reações de redução e acetilação que alteram as propriedades cromatográficas, o uso de diferentes fases estacionárias e detectores tem auxiliado no processo de confirmação. Para a cromatografia líquida tem se utilizado diferentes fases móveis, colunas, detectores e ainda reações de derivação pré e pós-coluna (TANAKA, 2001). Detectores de Massa estão sendo recomendados para resolver a dificuldade com a identificação conclusiva nas técnicas cromatográficas.

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos constituem um amplo grupo de substâncias químicas, considerados metabólitos secundários das plantas, com diferentes estruturas químicas e atividades, englobando mais de 8000 compostos distintos. A distribuição dos compostos fenólicos nos tecidos e células vegetais varia consideravelmente de acordo com espécie e tipo de função a exercer, situando-se no interior de células ou na parede celular (MARTINEZ-VALVERDE; PERIOGO; ROS, 2000).

Alguns compostos fenólicos vegetais podem estar envolvidos no metabolismo primário durante o desenvolvimento normal da planta ou em resposta a condições de estresse para proteção dos constituintes das células contra radiação UV, injúrias e infecções (NACZK e SHAHIDI, 2004). Contribuem para a resistência mecânica da parede celular, exercem papel regulatório no crescimento do vegetal e morfogêneses em resposta ao estresse e patógenos. A atividade antimicrobiana dos fenólicos é indicada pelo seu papel na resistência das plantas a doenças. Os compostos fenólicos interferem com a integridade da membrana celular microbiana ou inibem a germinação dos esporos, portanto atuam como metabólitos essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e como agentes protetores frente a ação de patógenos, sendo secretados como mecanismo de defesa (ANTOLOVICH et al., 2000; MARTINEZ-VALVERDE; PERIOGO; ROS, 2000; NACZK e SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos ou polifenóis pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas derivados da fenilalanina e tirosina (NACZK e SHAHIDI, 2004). Em plantas são essenciais para o crescimento e reprodução, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuir na pigmentação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (ANGELO e JORGE, 2007).

Quimicamente, os fenóis são definidos como substâncias que possuem anel aromático, com um ou mais grupos substituintes hidroxilícos, incluindo seus derivados funcionais (ésteres, metil ésteres, glicosídeos, etc). A natureza dos polifenóis varia desde moléculas simples como os ácidos fenólicos até compostos altamente polimerizados, como os taninos. Nas plantas se apresentam na forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcar unidos aos grupos hidroxilícos, ainda que em alguns casos se possam produzir uniões diretas entre uma molécula de açúcar e um carbono aromático. A forma mais comum de encontrá-los na natureza é na forma de glicosídeos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos (MARTINEZ-VALVERDE; PERIOGO; ROS, 2000; ANGELO e JORGE, 2007).

Estes compostos são classificados em três categorias, aqueles pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza. Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002). Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas. Os fenólicos largamente distribuídos na natureza podem se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING e YOUNG; 1999)

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas a exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos (PIMENTEL, FRANCKI e GOLLÜCKE, 2005).

As funções bioativas são exercidas por estruturas fenólicas variadas, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, ligninas, taninos, flavonóides, alcalóides e terpenóides (SANTOS e FREITAS, 2003), que podem atuar como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir, simultaneamente, mais de uma destas funções (MELO e GUERRA, 2002).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas (AGUIAR et al., 2007; KING e YOUNG; 1999)

A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade deles varia com os substituintes das cadeias carbonadas cíclicas, o grau de polimerização e suas interações com outros constituintes dos tecidos onde se encontram. Os solventes mais utilizados para a extração são:

metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes (ANGELO e JORGE, 2007).

Estudos têm indicado um efeito inibitório dos compostos fenólicos no crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Os ácidos fenólicos como o ferúlico, cinâmico e vanílico e seus derivados presentes em plantas são inibidores do crescimento fúngico e desenvolvimento dos esporos fúngicos. Os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico e protocatequínico são inibidores somente em concentrações relativamente altas. No entanto, o metil éster ácido *cis*-ferúlico e o metil éster ácido *cis*-3,4-dimetoxicinâmico, derivados do ácido cinâmico, são encontrados como inibidores em pequenas concentrações na faixa de 1nM a 10nM, evidenciando que a atividade inibitória depende não só da concentração, mas também da estrutura do composto. O composto metil éster ácido *cis*-3,4-dimetoxicinâmico aparece por afetar particularmente o estágio de germinação dos esporos fúngicos (GRIFFIN, 1994).

Bakan et al. (2003) determinaram o efeito de substratos naturais como grãos de milho, grãos de milho degerminado e o gérmen de milho, sobre a produção de micotoxinas por espécies de *Fusarium graminearum*. Observaram que no gérmen de milho ocorreu baixa ou não detectável biossíntese de tricotecenos. A partir disto foi investigada a presença de compostos inibidores da produção de micotoxinas de caráter fenólico ficando demonstrado que concentrações de hidroxamato 4-acetilbenzoxazolin-2-one (4-ABOA) nos grãos inteiros e degerminados e no gérmen foram encontrados outros compostos fenólicos solúveis como os ácidos hidroxicinâmico.

Compostos fenólicos extraídos do óleo essencial das frutas cítricas e da planta da oliveira apresentaram atividade antifúngica sobre espécies de *Phytophthora*, *Penicillium* e *Geotrichum* (DEL RÍO et al., 2003). Vasquez et al. (2001) utilizou o eugenol e o timol, principais componentes dos óleos essenciais do cravo para inibir o desenvolvimento do *Penicillium citrium* em queijo. O óleo essencial de thyme, o qual possui vários compostos fenólicos na sua composição, apresentou forte efeito fungicida sobre o *Aspegillus parasiticus* (RASOOLI e ABYANEH, 2004).

A fração lipídica do farelo de arroz contém orizanois, tocoferóis, esteróis e lecitina. Os orizanois estão presentes no farelo com cerca de 3000 mg/kg e têm sido preconizados como potentes antioxidantes naturais, de alto valor comercial (GONG-YUANSSHENG e YAO-HUIYUAN, 2001; ZHIMIN, NA HUA e GODBER, 2001). Tian et al., (2005) determinaram os compostos fenólicos presentes no arroz, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 1.

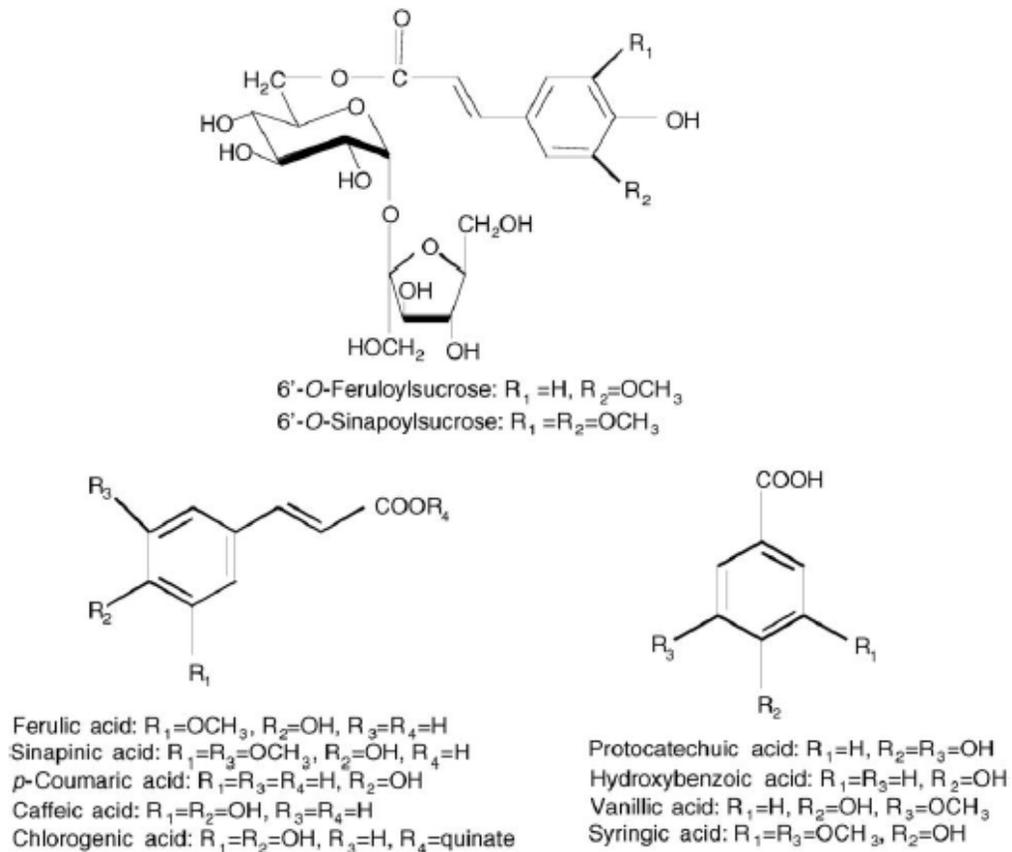


Figura 1: Estrutura química dos compostos fenólicos presentes no arroz (TIAN et al., 2005)

2.4 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Rotineiramente, a indústria de alimentos vêm empregando agentes antimicrobianos para aumentar a vida de prateleira e preservar produtos processados. No entanto o uso destes produtos é rigorosamente controlado por normas legais em diferentes países (DAVIDSON e PARISH, 1989).

Os agentes fungistáticos (que inibem a multiplicação de fungos) e os fungicidas (eliminam os fungos) se diferenciam na magnitude da taxa de mortalidade, ou seja, na velocidade de destruição dos microrganismos.

Agentes antifúngicos de baixa toxicidade podem ser utilizados no controle do crescimento fúngico e formação de micotoxinas, são eles os ácidos orgânicos (acetatos, propianatos, sorbatos e benzoatos para alimentos), antibióticos (natamicin para queijo), ervas, especiarias, óleos essenciais, antioxidantes e metilxantinas (FONSECA, 2006).

Segundo Belitz e Grosch (1988), desde muito tempo tem-se conservado os alimentos com ácidos, especialmente o ácido acético (CH_3COOH) sob a forma de vinagre e seus sais o acetato de sódio (CH_3COONa), acetato de potássio (CH_3COOK), acetato de cálcio [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$] e o diacetato de sódio ($\text{CH}_3\text{-COONa} \cdot \text{CH}_3\text{-COOH} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$). Estes sais são usados em panificação para inibir o crescimento fúngico sem afetar as leveduras fermentadoras. A atividade antimicrobiana do ácido acético, igual aos demais ácidos graxos alifáticos, aumenta ao diminuir o pH.

O ácido propiônico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$) e seus sais de sódio e cálcio tem atividade antimicrobiana frente aos fungos e a um número reduzido de bactérias. Este composto se produz de forma natural no queijo suíço por ação do *Propionibacterium shermanii*. O ácido propiônico tem ampla utilização em panificação, inibindo com eficiência o desenvolvimento de bolores e leveduras. A toxicidade do ácido propiônico para os mofo e certas bactérias esta relacionada com a incapacidade dos organismos afetados para metabolizar o esqueleto de três átomos de carbono na sua forma ácida (BELITZ e GROSCH, 1988).

Extratos de alguns condimentos, ervas de importância medicinal e outros vegetais exibem propriedades antifúngicas. Estes agentes antifúngicos naturais vêm sendo explorados por seu potencial no controle do crescimento de fungos e conseqüente inibição da produção de micotoxinas (SELVI, JOSEPH e JAYAPRAKASHA, 2003).

Outras medidas clássicas para prevenir danos fúngicos e estender a vida-de-prateleira dos produtos alimentícios envolvem, por exemplo, a associação de aquecimento a altas temperaturas para inativar os esporos, e emprego de ácidos fracos como preservantes (ácido ascórbico). Apesar dos fungos serem controlados por estes métodos, existem várias razões para a necessidade de novas estratégias antifúngicas. Por exemplo, o aquecimento envolve efeitos negativos na qualidade sensorial e nutricional dos produtos alimentícios, e o mercado exige alimentos frescos com pouco ou nada de preservantes químicos (BRUL e KLIS, 1999).

2.5 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal tornam o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeitos tóxicos, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de compostos de origem vegetal no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos, veiculados por alimentos. Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos vegetais (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; SELVI, JOSEPH e JAYAPRAKASHA 2003)

Pesquisas mostram que é crescente o número de consumidores que tem exigido da indústria de alimentos a adoção de uma política de uso limitado de aditivos químicos para minimizar os riscos para a segurança alimentar, através do retardamento das ações microbianas de caráter deteriorante. Seguindo esta tendência e tomando como base a toxicidade ou suspeita de toxicidade de alguns aditivos químicos aos consumidores e o abuso de utilização destes compostos, os órgãos legislativos e de saúde pública tem recomendado uma diminuição nos índices de utilização de aditivos químicos na indústria de alimentos (BRULL e COOTE, 1999; MELO e GUERRA, 2002).

Em vista disto tem sido crescente a investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais que também é impulsionada pela preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia. O abuso por longos anos da utilização de compostos antimicrobianos apresenta-se como o fator principal de pressão para o surgimento de tal fenômeno de resistência (ANDREMONT, 2001).

Vários estudos tem comprovado o efeito de compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e, um

número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz. Em estudos de cunho científico as especiarias e seus produtos derivados (extratos, óleos essenciais e outros) tem sempre mostrado resultados satisfatórios na inibição de microrganismos patógenos oportunistas, patógenos primários, deteriorantes, e/ou na inibição da produção de toxinas microbianas (ARORA e KAUR, 1999; AL-JEDAH, ALI e ROBINSON, 2000; CHAO e YOUNG, 2000; JUGLAL, GOVINDEN e ODHAV, 2002; KIZIL e SOGUT, 2003; PEREIRA et al., 2006).

Estudos sobre atividade antimicrobiana de substâncias de ocorrência natural em vegetais podem ser usados para o desenvolvimento de alimentos funcionais e para extração e emprego como preservantes de alimentos (PUUPONEN-PIMIA et al., 2001). Extratos de alguns condimentos, ervas de importância medicinal e outros vegetais que exibem propriedades antifúngicas vêm sendo explorados por seu potencial no controle do crescimento de fungos e conseqüente inibição da produção de micotoxinas (YIN e TSAO, 1999).

A atividade inibitória de extrato alcoólico de cebola wesh foi testada contra o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e a produção de aflatoxinas, sendo verificado que 10mg extrato/mL de cultura inibiram o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (FAN e CHEN, 1999). A atividade antifúngica de três espécies de alho, cebolinha, cebola, escarola e chalota foi testada contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*, sendo o alho e a cebolinha os melhores inibidores do crescimento fúngico (YIN e TSAO, 1999).

Quiroga et al. (2001) verificaram a atividade antifúngica de metabólitos secundários extraídos de 10 espécies de plantas medicinais da Argentina e observaram, através de crescimento radial dos fungos, discos de difusão e crescimento em ágar contendo os extratos das plantas, que alguns extratos alcoólicos estudados inibiram o desenvolvimento de fungos e leveduras. A concentração mínima de extratos necessária contra leveduras variou de 100 a 400 μg extrato seco/mL de ágar.

Os óleos essenciais de alho, canela, cravo, tomilho e orégano foram testados sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus sp*, *Penicillium sp*, *Aspergillus niger* e *Fusarium proliferatum* sendo constatada uma inibição total do óleo de canela sobre os fungos testados, e uma redução de produção de fumonisina B₁ no tratamento com óleo essencial de orégano (CHALFOUN et al., 2004; VELLUTI et al. 2003).

A algumas biomoléculas com atividade antimicrobiana presente em cebola e alho atribui-se a capacidade de inativar enzimas extracelulares através da clivagem oxidativa das ligações

dissulfetos (BRUL e COOTE, 1999). O Fistulosin (octadecil 3-hidroxiindol), composto antifúngico extraído da raiz da cebola, atua inibindo a síntese de proteínas e possui efeito inibitório na síntese de DNA do fungo *Fusarium oxysporum* (PHAY et al., 1999).

2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAR A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade antimicrobiana de alimentos, que podem ser divididos em testes *in vitro* e de aplicação. Estes podem ser chamados de métodos de triagem e incluem alguns testes, nos quais os compostos não são aplicados diretamente no produto sob condições de uso. Geralmente, estes testes produzem informações preliminares para determinar o uso potencial do composto teste. O segundo tipo inclui testes, onde um antimicrobiano é aplicado diretamente em um produto alimentício (DAVIDSON e PARISH, 1989). Os métodos de triagem podem ser divididos em testes de ponto final e descritivos. Os testes de ponto final são aqueles que o organismo é submetido ao antimicrobiano por um período arbitrário. O resultado reflete o poder inibitório do composto somente por um tempo específico. Nos testes descritivos, o microrganismo também é submetido ao antimicrobiano, mas amostras periódicas são conduzidas para determinar mudanças no número de células viáveis com o passar do tempo. Os testes descritivos fornecem informação sobre o efeito do composto na dinâmica de crescimento do microrganismo.

Existem também os ensaios bioautográficos que são aqueles que empregam placas de cromatografia de camada fina (CCF) para a análise. Os compostos separados por CCF são colocados em placas de ágar previamente inoculadas com o microrganismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas (BRANDÃO, 2004).

A avaliação da atividade antifúngica de compostos extraídos de fontes naturais como ervas, plantas medicinais, especiarias, frutas e vegetais tem sido realizada utilizando o teste de ágar difusão, onde discos de papéis são impregnados com o extrato teste e colocados sobre um meio de crescimento já inoculado com o microrganismo. O tempo de incubação depende do fungo que está sendo submetido (ARAÚJO et al., 2003; RASOOLI e ABYANEH, 2004; VENTURINI, BLANCO e ORIA, 2002) ou também bactéria (RAUHA et al., 2000). O teste de ágar diluído pode ser realizado com o extrato natural ou composto ao meio de crescimento, adicionando ao meio o fungo, inoculado a partir de uma solução de esporos ou um disco de meio com um micélio de fungo para avaliar o crescimento radial (DEL RÍO et al., 2003; NGUEFACK et al., 2004; QUIROGA, SAMPIETRO e VATTUONE, 2001; VÁSQUEZ et al.,

2001). O inóculo pode ser espalhado no meio de crescimento e a avaliação é realizada a partir do número e tamanho das colônias desenvolvidas (GOWDA et al., 2004). Este teste é usado para determinar a concentração mínima de inibição, a qual o crescimento visual não é detectado, ou a concentração mínima fungicida, a qual a inibição é permanente (SÁNCHEZ, HEREDIA e GARCÍA, 2004; YIN e TSAO, 1999).

A substância a ser testada pode ser incorporada ao meio de cultura nas concentrações a serem pesquisadas e os microrganismos, no caso fungos, são inoculados no meio solidificado no centro de cada placa de Petri em discos de material micelial de 0,5 cm (culturas de sete dias) e são feitos controles negativos contendo somente a substância teste e o meio sem presença de microrganismo. As placas são incubadas à temperatura de 22 ± 1 °C por sete dias. A efetividade é avaliada pela medida do diâmetro de crescimento das colônias. A porcentagem de inibição é calculada pela equação: $I = 100 (C - T) / C$, sendo I = inibição, C = medida do diâmetro de crescimento do fungo no meio controle e T = medida do diâmetro de crescimento do fungo no meio contendo a substância (RICCI et al., 2005; TUBEROSO et al., 2005).

O método de diluição em meio líquido é o que apresenta procedimento mais complicado, entretanto é o mais sensível. Esse método é recomendado na determinação da MIC. A MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em tubos ou placas de microdiluição. Concentrações decrescentes do agente antimicrobiano são colocadas em tubos ou placas de microtítulo com poços contendo meio de cultura, com o inóculo padronizado e estes são, em seguida, incubados. As placas de microtítulo têm a vantagem de nelas poderem ser testadas três ou mais concentrações de uma mesma substância e diferentes microrganismos (RIOS et al., 1988).

A determinação da concentração fungicida mínima (MFC) pode ser realizada pela diluição em caldo RPMI-1640 em placas de microtítulo por filtração de membrana. Na determinação da MFC a técnica utilizada é da filtração de membrana. Neste o inóculo é adicionado à substância, e essa mistura é mantida a temperatura ambiente por um determinado tempo de contato. Após o tempo de contato, a mistura é transferida para um aparelho de filtração estéril sendo lavado por duas vezes com solução neutralizante (água destilada com tween estéril). As membranas são transferidas para placas contendo ágar e após a incubação as colônias são contadas na membrana. A MFC corresponde a menor concentração da substância a qual inibe a multiplicação de fungos (RICCI et al., 2005).

2.7 MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS INIBIDORES DO CRESCIMENTO FUNGICO

A célula microbiana é uma estrutura altamente organizada, contendo sistemas biossintéticos altamente controlados e integrados para reproduzir-se. Porém, quando são danificados pontos específicos, pode resultar em desorganização e morte do organismo. Esta toxicidade pode surgir da interferência sobre a síntese ou função de uma proteína simples, ácido nucléico, ou particular complexo lipoprotéico (CRUZ, 1994).

As plantas podem produzir compostos antifúngicos para proteger-se de ataques bióticos que podem ser essencialmente por fungos infecciosos resistentes. O entendimento do mecanismo inibitório pode prover melhor direcionamento favorável ao desenvolvimento da produção eficiente e aplicação de tecnologias associadas com antifúngicos naturais de vegetais (QUIROGA, SAMPIETRO e VATTUONE, 2001).

Os compostos antifúngicos de ocorrência natural exercem diferentes mecanismos de defesa nos vegetais. Os compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais e outros compostos podem atuar na inibição da biossíntese de componentes da parede celular como o glucan, a quitina, o ergosterol e as manoproteínas, destruindo a membrana e dificultando a entrada de nutrientes. Podem atuar inibindo a biossíntese de proteínas e aminoácidos fúngicos, na biossíntese de esfingolipídios e interferir no transporte de elétrons, inviabilizando a integridade da célula (BRUL e KLIS, 1999; MARINO, BERSANI e COMI, 2001). Os antifúngicos químicos exercem mecanismos similares, porém estes tendem a estar em quantidades excedentes e produzir residual tóxico em vista de que a adição nem sempre gera uma atuação específica e eficiente.

Algumas ações específicas de antifúngicos ocasionam danos na membrana pela inibição da síntese de ergosterol. Os óleos essenciais que possuem compostos com núcleo aromático e um grupo OH fenólico reativo, são capazes de formar pontes de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas alvo inibindo-as (VELLUTI et al., 2003).

2.8 FARELO DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*, L.) é dentre os cereais cultivados um dos que mais se destaca, por ser alimento básico de boa parte da população mundial. Segundo a FAO (2007) já foram identificadas 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são: origem genética (japônica ou índica), dimensões (curto, médio e longo) e composição

do amido quanto ao teor de amilose (baixo, médio ou alto), o que está relacionado com suas características de cozimento: arroz solto ou arroz grudento.

Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado. O arroz é considerado o cultivo alimentar de maior importância (valor econômico) em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,7 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050 haverá uma demanda para atender o dobro desta população (IRGA, 2007).

Em levantamento realizado pela CONAB (2008), a produção brasileira de grãos na safra 2006/2007 chegou a 128,8 milhões de toneladas destacando-se a soja, o milho e o arroz. Sendo que o país colheu aproximadamente 11,94 milhões de toneladas de arroz, e o Rio Grande do Sul, 7,1 milhões de toneladas, sendo a cidade de Pelotas o maior centro de beneficiamento de arroz do Brasil.

O arroz é um cereal consumido principalmente como grão inteiro, constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas. O arroz, para ser consumido, deve passar por um processo de beneficiamento, onde o produto principal é o arroz polido, destinado ao consumo humano. Como resíduos são produzidos a casca e o farelo gordo. A casca pode ser utilizada como combustível para caldeiras ou em rações animais ricas em fibras. Do farelo gordo se extrai o óleo de arroz, desta extração resulta um novo subproduto, o farelo de arroz desengordurado (LEMOS e SOARES, 1999; VIEIRA e CARVALHO, 1999; ZDRADEK, 2001).

Farelo de arroz é proveniente da cobertura externa do grão de arroz logo abaixo da casca, sendo removido do arroz branco ou parboilizado, previamente descascado, durante o processo de polimento, o qual quebra a cobertura em pequenas partículas. É composto em grande parte pelo gérmen, o qual contém o sistema reprodutivo do grão de arroz, sendo por isso considerado uma excelente fonte natural de nutrientes alimentares e micronutrientes (MALEKIAM et al., 2000, citado por MESSIAS 2003).

O farelo constitui de 8 a 10% do grão de arroz, e é rico em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais. A composição química média do farelo de arroz é muito diversificada, sendo

influenciada por diversos fatores como variedade e lote do arroz, tamanho, forma e resistência a quebra do grão, tipo de moinho, presença ou ausência de gérmen, uniformidade de moagem, além do processo de beneficiamento que tenha sofrido o grão ou farelo (tratamento térmico, estabilização, extração do óleo e outros) (LEMOS e SOUZA-SOARES, 2000).

Mesmo contando com a presença de nutrientes importantes, alguns inconvenientes limitam sua aplicação na alimentação. A principal dificuldade é a presença de lipases, que acidificam o farelo em poucas horas, causando deterioração e sabor desagradável. Um segundo inconveniente é o fato de ser um pó fino, o que dificulta seu processamento (LEMOS e SOARES, 1999; SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001).

No Brasil, o uso do farelo se restringe principalmente a aplicação como matéria-prima para a extração de óleo, para a produção de ração animal e, em menor escala, como produto dietético e na composição da “multimistura”. Nos Estados Unidos, o farelo é empregado como produto alimentício há 20 anos, a partir de técnicas de beneficiamento industrial, com controle de qualidade e critérios de segurança alimentar, além de servir de matéria-prima para a extração de componentes valiosos, como os antioxidantes (SILVA, SANCHES e AMANTE 2001).

2.9 CEBOLA

A composição da cebola é influenciada pelas condições de cultivo (sistema de produção, tipo de solo, clima) e por fatores genéticos. Bulbos de cebola para consumo fresco são pouco calóricos (em torno de 40-50 calorias) e contém de 89 a 95% de água, além de mono e dissacarídeos (açúcares totais em torno de 6%), proteínas (1,6%), gordura (0,3%) e sais minerais (0,65%). Possuem também alguns compostos fenólicos, bem como ácidos málico, cítrico, succínico, fumárico, quínico, biotínicos, nicotínicos, fólicos, pantotênicos e ascórbico. A cebola possui diferentes minerais, como cálcio, ferro, fósforo, magnésio potássio, sódio e selênio, este de contribuição significativa para a dieta (EMBRAPA, 2007).

As variedades de cebola existentes no mercado são inúmeras e os modos de classificar seus cultivares são: quanto ao fotoperíodo (de dias curtos, longos ou intermediário a estes); quanto ao formato do bulbo (periforme, chato, redondo, bojudo, outros); quanto a coloração das escamas (amarelas, brancas, roxas, verdes); quanto ao sistema de plantio (sistema de mudas, semeadura direta); quanto a finalidade (para mesa, conservas, molhos, outros) (EMATER, 2007).

Na alimentação a cebola é basicamente empregada como condimento, devido aos seus compostos organossulfurados que apresentam atividades terapêuticas, anti-arteriosclerótica e anti-microbiana. Embora não seja considerada uma boa fonte nutritiva devido a seus baixos teores de proteínas e açúcares, a cebola é rica em vitaminas do complexo B, principalmente B₁ e B₂, e vitamina C (GOLDMAN et al., 1996).

O consumo da cebola tem aumentado, especialmente em países mais desenvolvidos, devido à sua associação com características funcionais. Pesquisas recentes têm procurado comprovar os benefícios da cebola para a saúde, além de identificar os compostos responsáveis por eles. Segundo Goldman et al. (1996), as plantas do gênero *Allium*, como cebola e alho, são consumidas frequentemente por inibirem a atividade de deposição de gordura nas artérias do organismo humano e diminuir a incidência de doença cardiovascular. Outras atividades foram relatadas tais como: antimutagênica, anticarcinogênica, antiviral, antifungos, antibacteriológica e antialérgica, inibidor de agregação plaquetária, inibidor do acréscimo da pressão sangüínea, além de atividade antiúlcera.

A cebola é particularmente rica em dois grupos de compostos com comprovado benefício à saúde humana: flavonóides e sulfóxidos de cisteína (compostos organossulfurados). Dois sub-grupos de compostos do tipo flavonóide predominam em cebolas: as antocianinas (que conferem a coloração avermelhada ou roxa aos bulbos) e as quercetinas e seus derivados (que conferem coloração amarelada ou cor de pinhão aos bulbos). As antocianinas, quercetinas e seus derivados são de grande interesse pelas suas propriedades anticarcinogênicas.

Matinez et al., (1998) comprovaram o efeito antimutagênico e anticarcinogênico “in vivo” de uma grande variedade de compostos específicos presentes em cebolas e outras espécies do gênero *Allium*. Aos compostos fenólicos se atribui a possibilidade de reduzir a oxidação “in vitro” de lipoproteínas de baixa densidade, particularmente aqueles fenólicos com múltiplos grupos hidroxil que são geralmente mais eficientes para a prevenção da oxidação de lipídios e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Recentes estudos científicos provaram que antioxidantes são capazes de proteger as células de radicais livres (MARTINS, 2003).

2.9.1 Legislação comercial da cebola

Segundo a portaria n° 529, o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária aprovou em 1995 o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade da Cebola, o qual apresentou as seguintes normas para o comércio da cebola *in natura*. A cebola é

bulbo pertencente à espécie *Allium cepa L* , cujos defeitos graves apresentados neste são o talo grosso, brotado, podridão, mancha negra e mofado. Os defeitos leves são o colo mal formado ou deformado do bulbo, a falta de revestimento externo, falta de turgência e os danos mecânicos (EMATER, 2007)

A cebola é classificada de acordo com as dimensões e a qualidade do bulbo. A Tabela 4 apresenta a classificação comercial dos bulbos em relação ao seu diâmetro transversal, composta por quatro classes de tamanho.

Tabela 4: Classificação comercial da cebola quanto às dimensões do bulbo.

Classes ou calibres	Maior diâmetro transversal do bulbo (mm)
2	Maior que 35 até 50
3	Maior que 50 até 70
4	Maior que 70 até 90
5	Maior que 90

Fonte: EMATER (2007)

A cebola que não atender aos requisitos da norma é classificada como “fora do padrão” e comercializada somente com tal designação na embalagem de comercialização, no que diz respeito ao comércio em território nacional. São desclassificadas e proibidas para comercialização toda a cebola que apresentar resíduos de substâncias nocivas a saúde (acima dos níveis admitidos no âmbito do MERCOSUL) e que apresentar mau estado de conservação, sabor e odor estranho (EMATER, 2007).

2.10 MICROALGA CHLORELLA

O termo microalgas não tem valor taxonômico, engloba microrganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos e sua caracterização (sistemática) implica a consideração de uma série de critérios (DERNER et al., 2006).

As culturas comerciais de microalgas em grande escala iniciaram por volta de 1960 no Japão, com a *Chlorella*, seguida pela cultura de *Spirulina* em 1970 no México, ambas para emprego como suplemento alimentar; *Dunaliella salina* para produção de β -caroteno na Austrália em 1986, *Haematococcus pluvialis* para produção de caroteno e várias outras espécies para a aquicultura. Após, o cultivo de microalgas se espalhou pelo mundo, em países como Israel, EUA e Índia. Nos anos 80, cerca de 46 fábricas na Ásia produziam mais de 1000

Kg de microalgas por mês e em 1996 cerca de 2000 toneladas de *Chlorella* foram produzidas comercialmente somente no Japão (BOROWITZKA, 1999).

Muitos estudos vem sendo realizados com relação as aplicações relacionadas ao emprego das microalgas e dos produtos extraídos destas na indústria de alimentos tais como: no tratamento de águas residuais de inúmeros processos industriais, para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados, como bioindicadores, na detecção de nutrientes e substâncias tóxicas. As microalgas podem produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, antiinflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras propriedades farmacêuticas. O conteúdo lipídico confere potencial para seu emprego na produção de biocombustíveis (biodiesel, por exemplo) (DERNER et al., 2006).

As microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, etc, tanto como suplemento alimentar quanto como corantes naturais, no entanto sua atividade como conservante não vem sendo explorada (COLLA et al., 2004; PULZ e GROSS, 2004).

A *Chlorella* ou (clorella - clorela), é uma microalga unicelular esférica e seu diâmetro varia de 5-10 μm , dependendo da espécie (ILLMAN, SCRAGG e SHALES, 2000). Com 15 espécies conhecidas, sendo a *Chlorella vulgaris* a mais extensamente estudada. Esta espécie tem uma conformação esférica com 2 a 10 μm de diâmetro, pertencente a classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae* (QUEIROZ et al., 2002; TANAKA et al., 1997; YASUKAWA et al., 1996). A *Chlorella* é uma microalga encontrada espontaneamente em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar a fotossíntese. É rica em proteínas (53%), carboidratos (23%), lipídios (9%) e minerais (5%), ela contém ainda mais de 2% de clorofila o que lhe permite rápido crescimento (HENRIKSON, 1994; VONSHAK, 1997).

A microalga *Chlorella* é a alga unicelular mais completa em termos de aminoácidos, contém mais de 20 tipos de vitaminas e minerais, com destaque para beta-caroteno (precursor da vitamina A) e vitamina B₁₂, difícil de ser obtida por meio de outros alimentos. Promove a desintoxicação orgânica, inclusive de metais pesados como o chumbo e cádmio. Elimina toxinas retidas nos tecidos orgânicos, provenientes de alimentação industrializada, tem ação protetora contra agentes tóxicos, poluentes e contra diversos tipos de radiação, principalmente

atômica e solar (raios ultravioletas). Sua alta concentração em clorofila indica que possui capacidade desintoxicante, e auxiliar no sistema digestivo. Pode ainda ser usado como auxiliar no controle da obesidade promovendo uma sensação de saciedade quando ingerida antes das refeições, além de fornecer elementos normalmente ausentes nos regimes de emagrecimento.

Também tem demonstrado excelentes resultados no combate á hipertensão, na redução dos níveis de colesterol e triglicérides e pelo bom funcionamento do organismo. No entanto, não há menção na literatura sobre sua atividade antimicrobiana (CHLORELLA, 2007).

Para que seus nutrientes sejam integralmente aproveitados pelo organismo, as células nucleadas de *Chlorella*, que estão protegidas por uma parede celular, devem ser desintegradas durante o processo de secagem, possibilitando que seus nutrientes sejam absorvidos pelo metabolismo (HENRIKSON, 1994).

A microalga *Chlorella*, é de grande interesse comercial, pois além da rápida velocidade de crescimento, pode ser cultivada em tanques ao ar livre, como os tanques localizados na estação de Cultivo de *Chlorella* da Ilha de Ishigaki, Okinawa. Ilha de recifes de corais de clima subtropical, propício ao cultivo de clorela de qualidade superior. A radiação solar durante o ano todo também estimula os altos níveis de clorofila (RADMANN et al., 2004)

2.11 ESTUDOS RELATIVOS AO TEMA DESCONTAMINAÇÃO DESENVOLVIDOS NO LABORATÓRIO DE MICOTOXINAS DA FURG

A motivação para as pesquisas em micotoxicologia, no Sul do Brasil, como em outras regiões do mundo, decorre do fato de que a contaminação fúngica e a produção de substâncias tóxicas (micotoxinas) são, direta ou indiretamente, responsáveis por grandes prejuízos na agropecuária regional (CRUZ, 1994; BADIALE-FURLONG, 1995).

Com o intuito de conhecer a qualidade micotoxicológica dos produtos destinados ao consumo humano, os pesquisadores do Laboratório de Micotoxinas da FURG vêm realizando trabalhos como os que são descritos a seguir, que visaram adaptar ou desenvolver metodologia para determinação de micotoxinas, caracterizar o perfil micotoxicológico de alimentos de consumo diário, o efeito de processos nos níveis de micotoxinas, formas de descontaminação biológica de micotoxinas e mais recentes na busca por conservantes naturais.

CACCIAMANI, J. L ; PEREZ, G. L ; GARDA, J ; FURLONG, E. B. . Tratamento térmico seco e úmido e os efeitos nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e

farinhas cereais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba - Paraná, v. 25, p. 157-164, 2007.

FURLONG, E. B. ; GARDA, J ; MARTINS, R. M. ; FARIAS, R . Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, Brasil, v. 24, n. 4, p. 664-668, 2004.

FURLONG, E. B. ; NUNES, I. L. ; MAGAGNI, G. Arroz comercializado na região sul do Brasil: Aspectos Micotoxicológicos e Microscópicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

FURLONG, E. B.; REIHNER, C. O. Profile of the alcohols produced in fermentations with malt contaminated with tricothecenes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba - Parana, v. 46, n. 4, p. 12-18, 2003.

FURLONG, E. B.; BARAJ, E. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos: desoxinivalenol e toxina T2. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** - São Paulo, v. 62, n. 2, p. 18-26, 2003.

FURLONG, E. B.; BAISCH, A. L. M.; COLLA, E.; SOARES, L. A. S. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Vetor**, FURG - Rio Grande, RS, v. 13, n. 1, p. 105-114, 2003.

GARDA, J.; FURLONG, E. B. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. **Revista Vetor**, FURG, Rio Grande, RS, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2003.

PINHO, B. H.; MACHADO, M. I. ; FURLONG, E. B. . Propriedades Físico-químicas das massas de pizza semi-prontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, Brasil, v. 60, n. 1, p. 35-41, 2001.

NOLL, I. B.; FURLONG, E. B. ; TRINDADE, E. . Incidência de ocratoxina A em produtos derivados de milho comercializados na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ata Toxicológica Argentina**, Buenos Aires, Argentina, v. 9, n. 1, p. 2-3, 2001.

PINHO, B. H. ; FURLONG, E. B. The occurrence of molds yeasts and mycotoxins in pre-cooked dough sold in southern Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 31, n. 1, p. 99-102, 2000.

FURLONG, E. B. ; COELHO, C. S. P. ; ALMEIDA, T. L. Migração de micotoxinas durante o processo de parboilização do arroz. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, SP, Brasil, v. 2, n. 1,2, p. 43-50, 1999.

FURLONG, E. B. ; VIEIRA, A. P. ; SOARES, Leonor Almeida de Souza ; DADALT, Geraldine . Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, Brasil, v. 58, n. 2, p. 27-33, 1999.

FURLONG, E. B. ; VIEIRA, A. P. ; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, Brasil, v. 19, n. 2, p. 258-263, 1999.

FURLONG, E. B. ; SOARES, L. M. V. Tricothecenes in wheat: a gas chromatographic method for quantitation and confirmation in wheat of deoxynivalenol, nivalenol, diacetoxyscirpenol, T2, HT2 toxins, T2 triol and T2 tetraol. **Journal Association Official Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 78, n. 2, p. 386-396, 1995.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. M. V. Mycotoxins and fungi in the wheat cultivar harvested during 1990 test plot in the state of São Paulo, Brasil. **Mycopathologia**, v. 131, p. 185-190, 1995.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. M. V. Tricothecenes in wheat stored elevators in the state of Rio Grande do Sul. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. M. V.; SALAS-MELLADO, M. Variáveis bióticas e abióticas e a incidência de tricotecenos. **Revista Vetor**, Rio Grande, RS, Brasil, v. 5, n. 1, p. 21-31, 1995.

OLIVEIRA (2005) estudou a inibição do crescimento fúngico e a produção de micotoxinas através da utilização de compostos fenólicos extraídos de porções comestíveis e resíduos de produtos agrícolas. Os produtos vegetais escolhidos para o estudo foram limão, laranja, maçã, berinjela, banana, batata e grãos de trigo e arroz. Foi determinado que 50 e 70% dos extratos fenólicos inibiram totalmente o desenvolvimento do *Aspergillus oryzae* e do *Rhizopus ssp*, respectivamente. Os extratos inibiram a produção de biomassa dos dois fungos, no entanto, o *Rhizopus ssp* foi mais resistente a ação inibitória dos extratos fenólicos. Os menores crescimentos ocorreram quando foram utilizados os extratos de cascas de batata, arroz e trigo após 7 dias de incubação. Quando em presença dos extratos fenólicos de polpas

de banana, berinjela e batata, o *A. flavus* produziu pequena quantidade de aflatoxina B₁, porém os demais extratos inibiram totalmente a produção de micotoxinas em relação ao controle.

DORS (2006) avaliou a contaminação de arroz parboilizado com micotoxinas e as relações entre as condições de parboilização e os níveis de DON e ZEA. Foram analisadas 5 marcas comerciais diferentes, perfazendo um total de 8 lotes com 32 amostras. Foram encontradas 22% das amostras contaminadas com DON, 19% com ZEA, 12,5% com Ocratoxina A e 9% com aflatoxina B₁. Estes resultados sugeriram que a parboilização pode possibilitar a migração de micotoxinas para o endosperma amiláceo.

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NA CEBOLA ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Michele Moraes de Souza; Vânia Machado Recart; Meritaine da Rocha; *Eliana Badiale Furlong*

Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos - Departamento de Química

Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Caixa Postal 474

CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil – Tel. (53) 3233 8663

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi usar a técnica de planejamento experimental para estabelecer as melhores condições de extração de compostos fenólicos em cebola (*Allium cepa L.*). As variáveis estudadas foram: natureza do solvente, agitação, tempo de extração e tempo com e sem interrupções de processo. A melhor combinação resultou um modelo preditivo, sendo a mesma obtida com emprego de metanol, agitação de 120 minutos e com rotação de 3,13 G. O maior conteúdo fenólico em diferentes classes foi 2274,8 µg fenóis/g de cebola, a recuperação foi de 88% e o limite de quantificação foi 30,7 µg fenóis/g de cebola.

Palavras-chave: cebola, compostos fenólicos, metodologia.

ABSTRACT

The objective of this work was using the experimental planning technique to establish great phenolic extraction conditions on onions (*Allium cepa L.*). The studied variables were; solvent nature, agitation, extraction time and process time with and without interruption. The best combination allowed a predicated model. The best combination was employing methanol agitated for 120 minutes in a roll with 3,13 G. The average phenolic content in different classes was 2274,8 µg phenolic/ g de onion, the recovery was 88% and the detection quantification limit was 30.7 µg phenolic/ g de onion.

Key words: methodology, phenolic compounds, onion.

1. INTRODUÇÃO

O interesse em identificar compostos químicos que desempenham atividades funcionais, vem disponibilizando uma série de metodologias para extrair e quantificar diferentes estruturas químicas em tecidos vegetais. Entre os compostos que poderiam prevenir danos a saúde destacam-se os fenólicos, tais como os ácidos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico, e os flavonóides, que mesmo presentes em pequenas quantidades num alimento, poderiam ter efeitos preventivos e/ou curativos de sintomas patológicos causados por situações oxidativas (ANTOLOVICH, PRENZLER, RYAN, 2000; JORGE et al., 1998). A determinação dos níveis de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade, avaliação biológica e estímulo ao consumo, visando a prevenção de doenças crônico-degenerativas (TORRES et al., 1987).

As substâncias fenólicas podem aparecer livres ou na forma de glicosídeos. A posição do açúcar na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas. Estas diferenças podem ser usadas para separá-los, quantificá-los e desenvolver estudos sobre suas atividades fisiológicas (ANTOLOVICH, PRENZLER, RYAN, 2000; BADIALE-FURLONG et al., 2003; CHEN et al., 1998).

Para a extração dos compostos fenólicos vêm sendo mencionados sistemas aquosos, alcoólicos e aceto-etílicos sob diferentes condições de interação, aplicados a raízes, tubérculos e frutas, tais como feijão mungo; gêneros de *Acácia*, *Terminália*, *Copernicia*, maçãs, ameixas, peras e outros (IMEH e KHOKBAR, 2002; LIMA et al., 2004; SOUSA et al., 2007). A quantificação dos compostos fenólicos nos diferentes extratos, em geral, é feita empregando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este consiste numa mistura de ácidos fosfotungstíco e molibídico, nos quais o molibdênio e o tungstênio no estado de oxidação 6+, e em presença de redutores, tais como fenóis, passam ao estado de oxidação variando entre 5 e 6 (forma azul) permitindo a quantificação de substâncias redutoras que não necessariamente os fenóis (SOUSA et al., 2007). Poucos são os trabalhos que descrevem adaptações do procedimento básico para matrizes específicas e/ou condições críticas de preparo de amostra e extração dos compostos fenólicos para a quantificação. Cabe ressaltar que o processo de extração sob diferentes condições para distintas matrizes e analitos é fundamental para a estimativa mais exata do potencial de redução decorrente de compostos fenólicos.

Os estudos sistematizados de alimentos com alegações funcionais vem sendo norteados pela cultura popular que atribui efeitos benéficos a estes em diversas regiões do

país. Entre estes esta a cebola (*Allium cepa* L.), empregada pelo seu papel de conferir características organolépticas a alimentos, além do seu poder preventivo e curativo de diversas doenças crônico-degenerativas (CHEN et al., 1998; JORGE et al., 1998). Apesar do conhecimento milenar dos benefícios deste vegetal de diversos estudos sobre seus efeitos bioativos, algumas regiões produtoras tem dificuldades em comercializar suas safras em condições satisfatórias para consumo “in natura” ou em formulações industriais, resultando em descarte de material e desestímulo aos produtores.

Diante desta inconsistência entre a importância sócio-econômica do vegetal e o estímulo a sua produção é interessante estudar condições que permitam valorar esta matéria-prima buscando formas de aproveitar o seu potencial funcional de forma eficiente, partindo da determinação de seus compostos bioativos como subsídio para sua cultura, conservação e preparo doméstico e industrial preservando suas qualidades funcionais.

A otimização de metodologia de extração de um analito em especial é fundamental, visto que pequenos detalhes podem resultar em efeitos que comprometem a confiabilidade dos resultados. Para atingir esta meta com o mínimo de experimentos, podem ser empregados planejamentos fatoriais completos. Estes permitem otimizar metodologias considerando variáveis críticas para alguns tipos de matrizes avaliando seus efeitos e possíveis interações com outros fatores nas repostas desejadas (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; RODRIGUES, IEMMA, 2005).

Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou usar a técnica de planejamento experimental para otimizar uma metodologia de extração para a determinação de compostos fenólicos totais na cebola (*Allium cepa* L.).

Para tal, foram avaliadas diferentes variáveis na etapa de extração e os extratos foram quantificados quanto ao conteúdo fenólico empregando o reagente de Folin-Ciocalteau (FC). As condições otimizadas também foram avaliadas quanto a sua performance analítica e aplicabilidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos experimentais gerais

Todos os solventes e reagentes utilizados durante os testes foram analiticamente puros. O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Polipur (Pró-análise Química e Diagnostico Ltda) e a quercetina da Sigma Chemical Company (EUA). As medidas de absorção foram realizadas em espectrofotômetro VARIAN CARY/100 UV-VISIBLE (EL 98033579).

2.2 Amostras

As cebolas foram coletadas no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2007 e foram cedidas pela EMATER – RS, classificadas segundo Regulamento Técnico de qualidade da cebola (1995) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2.3 Planejamento para estudo das condições de Extração de fenóis

A partir de condições estudadas por Lima et al (2004), Baptista et al (1999), Andrade et al (2007), Premzler et al (2001) e Velioglu (1998) foram avaliados os efeitos das variáveis: solvente (metanol e acetato de etila), tempo de extração (120, 150 e 180 minutos), rotação (0,78, 1,76 e 3,13 G) e tempo com e sem interrupções do processo de extração (0, 15 e 30 minutos), através de planejamento fatorial 2^4 , ou seja, quatro variáveis ou fatores testados em dois níveis (-1 e +1) e 6 pontos centrais (0) resultando em 22 experimentos (Tabela 1 - ANEXO 1).

Obtido o solvente que possibilitou a extração mais precisa (Tabela 2 - ANEXO 1), foram estudados os efeitos do tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, utilizando planejamento fatorial completo 2^3 , com três variáveis em dois níveis (-1 e +1) e 3 pontos centrais (0) resultando em 11 experimentos (Tabela 3 - ANEXO 1).

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Statistica 6.0, considerando o conteúdo de fenóis totais (μg de fenóis/g de cebola) como resposta das variáveis em estudo.

2.4 Preparação dos extratos nas condições otimizadas

As cebolas foram secas em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C , até atingirem valores de umidade de 13%. Foram pesadas 10g de cebola e adicionados 50 mL de solvente (metanol ou acetato de etila) e agitados em temperatura ambiente em mesa agitadora

orbital TE - 141 da marca TECNAL, o extrato foi filtrado com papel de filtro Wathman nº1 e clarificado com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%, a solução foi filtrada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL, sendo o volume final completado com o solvente utilizado na extração.

2.5. Determinação de fenóis totais nos extratos

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos metanólicos e de acetato de etila da cebola foi realizada por espectrometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e o procedimento consistiu em tomar alíquotas de 500µL do extrato agitar com 500µL de água destilada e 4,5mL de Na₂CO₃ 4% por 1 min, colocada em banho-maria a 40 °C por 15 min. A mistura foi agitada por 30 segundos em banho ultra som com 500µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada. Após 10 min, foi medida a absorbância das soluções a 660nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com uma solução padrão de Quercetina contendo 100 µg/mL a partir da qual foram preparadas diluições variando entre 2 e 16 µg/mL. Os resultados dos conteúdos fenólicos das amostras foram expressos como µg de fenóis totais/ g de cebola.

Para estudar a performance do método foram determinados o limite de quantificação e a recuperação de quercetina nas condições otimizadas de extração. O limite de quantificação foi estimado pela menor concentração absorvida pela curva padrão de quercetina. A recuperação foi testada em amostras de cebola seca as quais tinham sido previamente adicionadas soluções metanólicas de quercetina em níveis 1,0; 1,2 e 1,5 mg/ g de cebola.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de cebola foram secas para concentrar os sólidos e facilitar o processo de extração mantendo a proporção de massa seca/solvente, mas sem a necessidade de grande volume destes. A temperatura de 60°C minimizou o escurecimento dos tecidos por escurecimento enzimático ou caramelização.

Apesar dos inúmeros trabalhos que determinam fenóis em raízes, tubérculos, cereais, porções distintas de plantas medicinais e frutos, mencionando variação de fenóis que vão desde 40 µg fenóis/ g de amostra no arroz a 5500 µg fenóis/ g de amostra nas cascas de limão (IMEH e KHOKBAR, 2002; LIMA et al., 2004; OLIVEIRA, 2005; SOUSA et al., 2007), quando se trata de cebola estes valores não estão disponíveis. As referências são unânimes em informar que o principal componente fenólico das diferentes espécies de cebola é a quercetina que

apresentou maior capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino, bem como indicadora de compostos fenólicos em cebola. Este composto foi escolhido para indicar os fenóis totais em cebolas neste trabalho.

O planejamento experimental foi utilizado para possibilitar a inferência estatística e fornecer informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis das variáveis em estudo, evidenciando a qualidade da repetibilidade, minimizando custos e tempo ao não se repetir todos os experimentos, demanda e desgaste de equipamento, menor exposição do analista e menor volume de descarte (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

As variáveis testadas foram aquelas que são mais diversas nos relatos da literatura, para determinação dos teores de fenóis totais ou para posterior separação das diferentes famílias de redutores fenólicos presentes em matrizes vegetais. Cabe considerar também que para a escolha do solvente pode ser levado em consideração a sua toxicidade. A primeira etapa do estudo do efeito das variáveis solvente de extração, tempo, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, tem seus resultados apresentados na Tabela 1 como conteúdo de fenóis totais expressos em μg de fenóis totais/ g de cebola.

A análise estatística mostrou que os solventes utilizados na extração dos fenóis apresentaram efeito significativo nos níveis determinados ($p = 0,015$), como pode ser observado nos resultados da Tabela 2. O solvente que propiciou a extração de maiores teores de fenóis foi o metanol, esta resposta pode ser atribuída ao fato de que os compostos fenólicos solúveis em metanol são mais abundantes em cebola, o que é promissor considerando-se que os flavonóides podem estar neste conjunto em função da solubilidade. Nos extratos obtidos com acetato de etila os valores detectados estavam próximos do limite de quantificação, o que sugere baixas concentrações de fenóis polimerizados e determinou a necessidade de evaporar o solvente antes da quantificação dos fenóis.

As variáveis tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, foram estudadas em um planejamento completo 2^3 com três pontos centrais para obtenção do ponto ótimo de extração dos compostos fenólicos (Tabela 3). O comportamento verificado permitiu otimizar e construir modelo preditivo dentro da faixa ótima para extração dos fenóis em função das variáveis estudadas.

A Tabela 4 (ANEXO 1) apresenta os resultados da análise estatística dos efeitos estudados no planejamento 2^3 , tendo como resposta o rendimento em fenóis totais na cebola. A observação dos resultados da Tabela 3 e da Tabela 4, confirmam que ocorrem diferentes conteúdos de fenóis na cebola em função das associações de condições avaliadas demonstrada pelos conteúdos obtidos em fenóis totais nos diferentes experimentos. Lima et al., (2004) também mencionaram estas variações e atribuíram a formas químicas distintas de fenóis presentes na matriz.

A Tabela 4 mostra que entre as três variáveis estudadas, rotação, tempo de agitação e a interação da rotação com o tempo de agitação foram estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%, quando a resposta foi o conteúdo de fenóis totais (μg fenóis/ g de cebola). A rotação (G) apresentou efeito positivo ao passar do menor valor para a maior, assim como indicou o aumento na média desta resposta. A variável tempo de agitação teve efeito contrário, ou seja, o menor tempo resulta em maior conteúdo de fenóis totais. A interação da variável rotação com o tempo de agitação apresentou efeito negativo diminuindo a média do conteúdo de fenóis totais em $362 \mu\text{g}$ fenóis /g de cebola. Os efeitos das demais variáveis não foram significativos.

Através dos resultados obtidos, foi possível obter os coeficientes de regressão (Tabela 5 ANEXO 1) de um modelo de terceira ordem para as variáveis e desta maneira analisar a validade do modelo de conteúdo de fenóis em função das variáveis estudadas por meio da análise de variância. Estes foram significativos e preditivos para a ação combinada dos parâmetros tempo de agitação, rotação e a interação da rotação com o tempo de agitação, no conteúdo de fenóis totais (Tabela 5) originando a Equação 1 e a Figura 1 (ANEXO 1).

$$\text{Conteúdo de fenóis } (\mu\text{g fenóis/g de cebola}) = 2109,9 + 171,9R + 86,6T - 181R \cdot T \quad (1)$$

Onde: R = rotação (G), T = tempo (minutos)

O teste F, mostrou um F calculado de 31,1, que foi 7 vezes maior do que o F tabelado, 4,35 (Tabela 6 – ANEXO 1), permitindo que o modelo expresso na Equação 1 fosse utilizado para gerar a superfície de resposta para o rendimento de fenóis (Figura 1).

A Figura 1 mostrou que o rendimento dos fenóis foi maior utilizando rotação de aproximadamente 3,13G e tempo de agitação de 120 minutos, atingindo valores de $2372,4 \mu\text{g}$ fenóis/ g de cebola quando a extração e quantificação são realizadas nestas condições de rotação e tempo de agitação. O que indica que o aumento no tempo de agitação pode

ocasionar uma diminuição no conteúdo de extração dos compostos fenólicos presentes na cebola. Isto pode ser atribuído à degradação dos fenóis por ação de enzimas óxido redutases do tecido ou reversão do equilíbrio dos compostos entre as frações sólido-líquido do sistema.

Em vista deste resultado, menor tempo de extração resultando em maior conteúdo de fenóis totais, foi avaliada a cinética do processo (Figura 2 - ANEXO 1), diminuindo o tempo de extração até que este não fosse mais significativo ao nível de confiança de 95%. A diminuição a partir de 120 minutos não foi significativa no intervalo de confiança estabelecido, comprovando a adequacidade do tempo estabelecido para a extração dos compostos.

3.1 Indicativos de Mérito para o Método de Folin Ciocalteu

O procedimento de extração otimizado foi executado para determinar os indicativos de performance limite de quantificação e recuperação, cujas avaliações foram realizadas em triplicata.

A Equação da curva de calibração da quercetina foi $C = 0,0352A$ onde C é a concentração de quercetina, A é a absorbância a 660nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$ demonstrando a linearidade da relação nas concentrações da curva analítica.

O limite de quantificação determinado foi de 30,7 μg fenóis. O teor médio de recuperação para o método completo usando a extração otimizada foi de 88% e variou entre 84 e 92 % da menor para a maior concentração testada. As condições de extração resultam em valores que estão fora dos valores dos pontos críticos para a confiabilidade de resultados analíticos e neste caso os teores obtidos para limites de quantificação e recuperação sugerem que o método adaptado é promissor para determinar fenóis em cebolas, expressando como μg de fenóis (quercetina)/ g de cebola.

O procedimento foi testado quanto à sua aplicabilidade adotando-o para quantificar fenóis em cebolas cultivadas na região de São José do Norte, na safra de 2007 e classificadas conforme a legislação do MAPA. A classificação comercial dos bulbos de cebola adota como critério o diâmetro transversal distribuindo em quatro classes, cujos tamanhos variam entre 35 a 90 mm. Nesta classificação não estão considerados nenhum outro aspecto que possa refletir a qualidade do conteúdo do tecido.

Nas cebolas analisadas o teor de fenóis extraídos com metanol variou entre 2244,3 e 2306,4 μg de fenóis totais/ g de cebola (Tabela 7 – ANEXO 1) e as umidades entre 86,8 e

87,4% para as diferentes classes, que ao nível de significância de 95% apresentou diferença significativa entre as classes no aporte de fenóis na dieta do consumidor (Tabela 8 – ANEXO 1). Considerando o total obtido com o metanol, a classe 4 apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos. Comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana 310 µg fenóis/ g amostra, maçã 1000 µg fenóis/ g amostra e batata 990 µg fenóis/ g amostra (equivalente de tirosina) (OLIVEIRA, 2005), a cebola parece ser bem promissora quando se investiga vegetais com maior conteúdo fenólico.

4. CONCLUSÃO

O planejamento experimental é uma ferramenta que melhorou a qualidade da informação através dos resultados, permitindo otimizar e construir o modelo preditivo dentro da faixa ótima para a extração de fenóis, representado pela equação obtida para o conteúdo fenólico.

Empregando duas etapas de planejamento experimental para o rendimento de fenóis totais, foi possível determinar as condições ótimas de extração de cebola para emprego das variáveis, tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções do processo de extração, com resultados preditivos e significativos para o conteúdo de fenóis. As condições otimizadas ocorriam quando foi utilizado o tempo de extração de 120 minutos e a rotação de 3,13 G em mesa agitadora orbital. Sendo que a classe 4 foi a melhor para incorporar fenol na dieta com um conteúdo de 2387,6 µg fenóis/ g de cebola.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. A.; COSTAL, C. K.; BORAL, K.; MIGUELL, M. D.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João pessoa, v. 17, n. 2, abri/jun, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds en fruits. **Analyst**, n. 125, p. 989-1009, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Vetor**, n. 13, p. 105-114, 2003.

- BAPTISTA, M. J.; GLORIA, B. A.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, 1999.
- CHEN, Z, Y.; CHAN, P, T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemeay extract. **Journal Analytical Official Chemistry Society**, v. 75, n. 9, p. 327-333, 1998.
- IMEH, U.; KHOKBAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6301-6306, 2002.
- JORGE, P, A, R.; NEYRA, R, M, O.; ALMEIDA, E.; BRAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lipídios plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.
- LIMA, V, L, A, G.; MELO, E, A.; MACIEL, M, A, S.; SILVA, B, S, G.; LIMA, D, E, S.; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vignaradiata*L.). **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, jan/mar, 2004.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2º ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
- OLIVEIRA, M. S. **Inibição do crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos**. Rio Grande: FURG, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.
- PRENZLER, M, S.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, n. 73, p. 73, 84, 2001.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed, Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SOUSA, C. M.; ROCHA e SILVA, M. H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.; ARAÚJO, P. B.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

TORRES, A, M.; MAU LASTOVICKA, T.; REZAALYAN, R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 35, p. 921-925, 1987.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 19, n. 46, p. 4113-4117, 1998.

ARTIGO 2

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE CEBOLA, FARELO DE ARROZ E MICROALGA CHLORELLA

Michele Moraes de Souza; Melissa dos Santos Oliveira; Meritaine da Rocha; *Eliana Badiale Furlong*

Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos - Departamento de Química

Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Caixa Postal 474

CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil – Tel. (53)3233 8663

RESUMO

Os compostos fenólicos de vegetais vêm sendo estudados pelo seu possível uso na indústria de alimentos como conservadores especificamente para evitar a contaminação fúngica. Objetivou-se com este trabalho relacionar os níveis de fenóis totais em cebola, farelo de arroz e microalga chlorella com a atividade antifúngica testada contra o fungo *Rhizopus sp.* Os compostos fenólicos da cebola foram extraídos em três sistemas solventes: aquoso, metanólico e com acetato de etila, o farelo de arroz e a microalga chlorella extraídos com metanol. Os extratos foram quantificados colorimetricamente com reagente de Folin-Ciocalteu. O método para avaliar a atividade antifúngica empregou a técnica de ágar diluído. O *Rhizopus sp.* teve seu desenvolvimento inibido em presença de extratos metanólico e aceto-etílicos de cebola e metanólico de farelo de arroz que continham as maiores concentrações de compostos fenólicos testadas, 86; 2,6 e 46 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{meio}}$, respectivamente. O extrato aquoso de cebola e metanólico de chlorella não inibiram o crescimento fúngico em nenhuma das concentrações fenólicas testadas.

Palavras chave: atividade antifúngica, fenóis, vegetais.

ABSTRACT

The phenolics compounds of vegetables are studied by your possible use in the industry of foods a conservatives specifically to avoid the fungal contamination. The objective study was connect the levels of total phenolic in onion, brand of rice and chlorella with the antifungal activity tested against the fungal *Rhizopus sp.* the phenolic compounds of the onion were extracted in three systems solvent: aqueous, methanolic and with ethila acetate, the brand f rice and the chlorella extracted with methanol. The extracts were quantified with Folin-Ciocalteu reagent. The method to value the antifungal activity employed the technique of diluted Agar. The *Rhizopus sp* had your development inhibited in presence of methanolic extracts and aceto-ethylic of onion and methanolic of brand rice that the biggest concentrations of compounds were containing phenolic tested, 86; 26 and 46 $\mu\text{g}_{\text{phenolic}}/\text{mL}_{\text{Agar}}$, respectively. The aqueous extracted of onion and methanolic of chlorella did not inhibit the fungal growth in any of the concentration phenolic tested.

Key words: antifungal activity, phenolic, vegetable.

1. INTRODUÇÃO

Na produção de alimentos é necessário sempre buscar medidas adequadas para assegurar estabilidade dos produtos durante a vida de prateleira e a sua segurança microbiológica, principalmente quando se refere à contaminação por fungos (BRUL e COOTE, 1999).

A preocupação em produzir alimentos saudáveis e seguros vêm norteando a busca por conservantes naturais na forma nativa ou extraídos de suas fontes. A ênfase das pesquisas está voltada para a identificação e purificação de novos compostos com atividade antifúngica que possam atuar sozinhos ou sinergisticamente inibindo a deterioração de alimentos, limitando o uso dos antifúngicos químicos (BRUL & KLIS, 1999; MELO e GUERRA, 2002).

Estudos têm indicado um efeito inibitório de compostos fenólicos no crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Os ácidos fenólicos como o ferúlico, cinâmico e vanílico e seus derivados presentes em vegetais demonstram capacidade inibidora do crescimento e produção de esporos fúngicos. Os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico e protocatequínico são inibidores somente em concentrações relativamente altas. O metil éster ácido *cis*-ferúlico e o metil éster ácido *cis*-3,4-dimetoxicinâmico, derivados do ácido cinâmico, são inibidores em pequenas concentrações, na faixa de 1nM a 10nM, evidenciando que a atividade inibitória depende não só da concentração, mas também da estrutura do composto (BAKAN et al., 2003; GRIFFIN, 1994; RASSOLI e ABYANEH, 2004).

Para a extração dos compostos fenólicos de raízes, tubérculos, frutas, espécies dos gêneros de *Acácia*, *Terminália*, *Copernicia*, maçãs, ameixas, peras e outros vêm sendo usados sistemas aquosos, alcoólicos e aceto-etílicos sob diferentes condições de interação (LIMA et al. 2004, SOUSA et al. 2007). A quantificação dos compostos fenólicos nos diferentes extratos, em geral, é feita empregando o reagente de Folin-Ciocalteu.

Agentes antifúngicos presentes em vegetais comestíveis parecem uma alternativa interessante para substituir os aditivos químicos atualmente empregados em alimentos (BRUL e KLIS, 1999). A inibição microbiana por óleos essenciais (ARAÚJO et al., 2003; BURT, 2004; VELLUTI, 2004;) extratos e plantas medicinais (QUIROGA et al., 2001), especiarias (YIN e TSAO, 1999), vegetais, frutas e outras ervas (BAGAMBOULA et al., 2003) tem sido bastante investigada e na maioria dos casos com resultados positivos.

A cebola é utilizada na alimentação basicamente como condimento, devido a sua composição química, sendo os compostos organossulfurados os maiores responsáveis pelas suas características de sabor e odor (BELITZ & GROSCH, 1988; GOLDMAN et al., 1996).

Apesar do conhecimento milenar dos benefícios da cebola, de diversos estudos sobre seus efeitos bioativos, algumas regiões produtoras tem dificuldades em comercializar suas safras em condições satisfatórias para consumo “in natura” ou em formulações industriais, resultando em descarte de material e desestímulo aos produtores.

O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária baixou a portaria nº529 em 1995, que descreve o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade da Cebola, onde prevê a classificação da cebola de acordo com as dimensões, a qualidade dos bulbos e as características visuais como indicativos de qualidade, dividindo em quatro classes variando de 35 a 90 mm de diâmetro transversal. Na classificação comercial da cebola para o mercado “in natura” é retida, junto às zonas produtoras, uma considerável fração de bulbos, devido aos seus tamanhos e qualidade (EMATER, 2007).

Em levantamento realizado pela CONAB em 2007, a produção brasileira de arroz na safra 2006/2007 chegou a 11,94 milhões de toneladas de produto beneficiado, resultando em aproximadamente 1,2 milhões de toneladas de farelo que por suas características sensoriais e pela disponibilidade discutível de nutrientes são comercializadas a valores pouco compensadores para o setor industrial (CONAB, 2008).

Assim, considerando-se o contexto da agroindústria regional é interessante conhecer o potencial de resíduos de cebola e arroz como fonte de conservadores naturais para extração e utilização na preservação natural de alimentos.

A microalga *Chlorella* tem as condições de cultivo bem conhecidas, e vem sendo cultivada no Laboratório de Engenharia e Bioquímica da FURG, para uso em formulações de alimentos ou extração de biocompostos. Diferentes ações biológicas foram identificadas nos componentes desta microalga, mas as suas propriedades como conservadora ainda são pouco exploradas (DERNER et al., 2006).

Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou determinar o teor de compostos fenólicos totais na cebola, no farelo de arroz e na microalga *Chlorella*, além de investigar a atividade antifúngica dos extratos sobre o desenvolvimento do fungo *Rhizopus sp.* utilizando o método de ágar diluído.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As cebolas foram coletadas no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2007 e foram cedidas pela EMATER – RS, classificadas segundo Regulamento Técnico de qualidade da cebola (1995) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O farelo de arroz foi obtido de grãos cultivados nos campos experimentais do Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), e a microalga chlorella foi obtida na forma de pastilhas em lojas especializadas em produtos naturais na cidade de Rio Grande – RS, estas foram moídas com o auxílio de grau e pistilo até ficarem na forma de pó com granulometria de 0,35 mm.

2.2 Caracterização físico-química das amostras

O pH e a acidez dos extratos das diferentes classes de cebola, do farelo de arroz e da chlorella foram determinados segundo procedimentos da AOAC (2000). O material vegetal foi homogeneizado em água previamente fervida na proporção de 1:9; sob agitação por 30 minutos. No sobrenadante foram determinados os pHs potenciométricamente, utilizando um pHmetro marca Hanna modelo 200. A acidez foi determinada por titulometria de neutralização com NaOH 0,1N e expressa como porcentagem dos ácidos orgânicos predominantes.

Os teores de umidade das diferentes classes de cebola foram determinados em estufa com circulação de ar sob temperatura de 60 °C. Os teores de umidade para o farelo de arroz e para a microalga chlorella foram determinados a 105 °C em estufa com circulação de ar, segundo a AOAC (2000).

Os carboidratos das diferentes classes de cebola e do farelo de arroz foram determinados conforme método do 3,5-DNS (MILLER, 1959), a microalga chlorella foi determinada por diferença.

Cinzas das diferentes classes de cebola, do farelo de arroz e da microalga chlorella foram determinadas por método gravimétrico em mufla 550 °C, conforme AOAC (2000).

Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl (AOAC, 2000), empregando como fator de conversão de nitrogênio o valor de 6,25, para todas as amostras.

A determinação de lipídios das diferentes classes de cebola, do farelo de arroz e da microalga chlorella foi realizada pelo método de Bligh & Dyer (1959).

A fibra bruta das diferentes classes de cebola, do farelo de arroz e da microalga chlorella foi determinada conforme método descrito pela AOAC (2000).

A extração dos compostos fenólicos das cebolas foi realizada a frio com água, acetato de etila e metanol, o farelo de arroz e a microalga chlorella com metanol, sob agitação em agitador horizontal a temperatura ambiente, seguida de partição com hexano, clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5% e filtração. Os extratos foram secos em rotaevaporador e armazenados em freezer até quantificação e/ou posterior uso. O conteúdo de fenóis totais, das diferentes matrizes, foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, tendo como padrões a quercetina, a tirosina e o ácido ferúlico (BADIALE-FURLONG et al., 2003). O método está descrito em detalhes no ANEXO 2.

2.3 Avaliação da atividade antifúngica

O fungo filamentosso utilizado neste estudo foi o *Rhizopus sp.*, cedido pelo Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade de Passo Fundo (CEPA - UPF). Este foi mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA) a 4°C até o uso. A suspensão de esporos utilizada no teste antifúngico foi obtida pela propagação do fungo em meio BDA, após incubação por 10 dias a 30°C, seguida de extração dos esporos do meio com solução 0,2% de Tween 80, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer.

2.3.1 Teste de atividade antifúngica

O método utilizado foi o bioanalítico “in vitro” observando o desenvolvimento ou inibição dos microrganismos em placas contendo no meio BDA (Batata Dextrose Agar) três concentrações diferentes de fenóis totais dos extratos. O meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 120°C, após o resfriamento foram adicionados os extratos fenólicos diluídos diretamente no meio de cultura em três concentrações de compostos fenólicos totais (concentrações conhecidas), preparando-se para cada concentração 20 mL de meio mais o extrato fenólico, operações estas realizadas sob condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, tipo B2). Para as placas controle foram adicionadas as mesmas quantidades de água estéril. Após a solidificação dos meios, foram adicionados ao centro das placas 5µL da solução de esporos contendo $1,6 \times 10^7$ esporos/mL. A incubação ocorreu em câmara de germinação modelo Tecnal TE – 403, com temperatura de 30°C durante 5 dias. As análises foram feitas em triplicata para cada condição em estudo.

Durante o desenvolvimento dos fungos, foram efetuadas medições ortogonais dos diâmetros das colônias nos 3º e 5º dias de incubação. A inibição foi avaliada pelo crescimento

do diâmetro e pela observação visual do crescimento do micélio, comparada com placas controle (DEL RÍO et al., 2003; NGUEFACK et al., 2004).

Os extratos fenólicos testados foram a cebola extraída em três sistemas solventes: metanol, água e acetato de etila, o farelo de arroz e a microalga *Chlorella* extraídos com metanol.

2.4 Análise estatística

Os resultados do aporte de nutrientes, dos compostos fenólicos das diferentes classes de cebolas e do teste de atividade antifúngica foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das amostras

A Tabela 1 apresenta os resultados das médias das determinações das características físico-químicas nas diferentes classes de cebola, ou seja, pH, acidez, umidade, carboidratos, cinzas, proteínas, lipídios e fibra bruta.

A classificação comercial dos bulbos de cebola adota como critério o diâmetro transversal distribuindo em quatro classes, cujos tamanhos variam entre 35 a 90 mm. Nesta classificação não estão considerados nenhum outro aspecto que possa refletir a qualidade do conteúdo do tecido. Na literatura não há estudos relatando a composição centesimal obtida nas diferentes classes comerciais de cebola, conforme a legislação em vigor.

Tabela 1: Composição Centesimal em diferentes Classes de Cebolas Comerciais

Composição/Classes	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Umidade (%)	88,5 ^a	88,4 ^a	88,3 ^a	88,6 ^a
Cinzas (%)	0,75 ^a	0,73 ^a	0,76 ^a	0,75 ^a
Proteínas (%)	0,86 ^a	1,04 ^b	0,98 ^c	0,91 ^a
Carboidratos (%)	3,73 ^a	5,27 ^b	4,76 ^c	4,67 ^c
Fibra bruta (%)	0,61 ^a	0,62 ^a	0,70 ^b	0,70 ^b
Lipídios (%)	0,17 ^a	0,18 ^a	0,19 ^b	0,16 ^a
Acidez (% de ácido pirúvico)	0,31 ^a	0,38 ^b	0,31 ^a	0,29 ^c
pH	5,23 ^a	5,08 ^b	5,2 ^c	5,16 ^c

*Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$)

Os resultados das características físico-químicas das classes estudadas mostram que não houve diferença significativa, entre elas, ao nível de confiança de 95%, nas frações de umidade e cinzas. As demais frações diferiram significativamente entre as classes. O que sugere que em termos aporte nutricional seria interessante considerar outros critérios para a classificação de cebolas.

A Tabela 2 apresenta os resultados das médias das determinações das características físico-químicas do farelo de arroz e da microalga chlorella, ou seja, umidade, carboidratos, cinzas, proteínas, lipídios, fibra bruta, pH e acidez.

Tabela 2: Composição centesimal do farelo de arroz e da microalga chlorella

Matriz	Umidade (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Fibra bruta (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)	pH	Acidez(%)
Farelo de arroz	9,6	10,5	44,3	6,3	15,4	12,7	6,1	0,1
Chlorella	4,1	6,3	22,3	2,8	56,9	7,6	5,7	0,2

A composição centesimal determinada para o farelo de arroz foi semelhante à apresentada por outros autores, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de solo, do cultivar, do beneficiamento e da forma de estabilização do farelo (NAVES, 2007; SILVA et al., 2001). Os valores encontrados para a microalga chlorella também foram condizentes com a

literatura levando-se em conta as diferentes condições de apresentação (pastilhas, pó, cápsulas e etc) (CHLORELLA, 2007; HENRIKSON, 1994).

A acidez da maioria dos vegetais, geralmente confere proteção suplementar contra a contaminação por microrganismos provenientes do solo, pó ou insetos. Entre os vegetais estudados nenhum pode ser considerado com elevada acidez, visto que em nenhum deles a acidez foi superior a 0,5%, desta forma dificilmente o teor de ácidos potencialmente ionizáveis poderia estar associado a propriedades antifúngicas ou conservadoras. Os vegetais com baixa acidez, possuem outras barreiras para evitar a contaminação por microrganismos, que podem ser constituídas pelo conteúdo de compostos fenólicos presentes nos vegetais (BECKMAN, 2000).

A Tabela 3 apresenta os fenóis totais da cebola nos três solventes (média), no farelo de arroz e na microalga chlorella.

Tabela 3: Resultados dos Fenóis Totais presentes nos extratos estudados

Extrato	Fenóis Totais ($\text{mg}_{\text{fenóis}} \cdot \text{g}_{(\text{bs})}^{-1}$)
Cebola seca (metanol)	2,274
Cebola seca (água)	2,833
Cebola seca (acetato de etila)	0,077
Farelo de arroz	0,522
Chlorella	0,202

O conteúdo de fenóis totais variou entre $0,077 \text{ mg}_{\text{fenóis}} \cdot \text{g}_{(\text{bs})}^{-1}$ na cebola extraída com acetato de etila e $2,833 \text{ mg}_{\text{fenóis}} \cdot \text{g}_{(\text{bs})}^{-1}$ na cebola extraída com água. A variabilidade na distribuição e composição dos compostos fitoquímicos fenólicos é grande para os diferentes extratos estudados neste trabalho e nos de outros autores, cabe lembrar que isto pode ser influenciado pela variedade, espécie, procedimento de plantio, condições de estocagem e processo ao qual o tecido é submetido (KIM et al., 2003).

Comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura, como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana $0,31 \text{ mg}_{\text{fenóis}} / \text{g}$ amostra, maçã $1,0 \text{ mg}_{\text{fenóis}} / \text{g}$ amostra e batata $0,99 \text{ mg}_{\text{fenóis}} / \text{g}$ amostra (equivalente de tirosina), $0,061\text{-}0,084 \text{ mg}_{\text{fenóis}} / \text{g}$ de amostra (ácido ferúlico) (ZHOU et al., 2004), $0,69$ e $0,35 \text{ mg}_{\text{fenóis}} / \text{g}$ de amostra em bagaço de laranja e polpa de berinjela (BADIALE-FURLONG et al., 2003), a cebola e o farelo de arroz

parecem ser bem promissores quando se investiga vegetais com potencial de aporte de compostos fenólicos na dieta.

Os solventes que propiciaram a extração de maiores teores de fenóis na cebola foram o metanol e a água, esta resposta mostrou que os compostos fenólicos solúveis em metanol e água são mais abundantes em cebola, o que é promissor considerando-se que flavonóides podem estar neste conjunto em função da solubilidade. Nos extratos obtidos com acetato de etila os valores indicam que houveram baixas concentrações de fenóis polimerizados.

3.2 Atividade antifúngica

Em estudos de compostos antifúngicos de origem vegetal são utilizadas as ervas medicinais, especiarias (orégano, cravo, canela e pimenta) e outras plantas comestíveis ou não. Os resultados tem mostrado que extratos e óleos essenciais de cebola, alho e outros vegetais de uso na dieta da população tem potencial para inibir o desenvolvimento de fungos (BENKEBLIA, 2004; OLIVEIRA, 2005; YIN e TSAO, 1999). No caso deste estudo a cebola foi considerada pela sua riqueza em compostos fenólicos e disponibilidade local e nacional a valores comerciais pouco compensadores aos produtores. O farelo de arroz foi um subproduto escolhido para estudo a partir dos resultados promissores de Oliveira (2005) com extratos de grãos de arroz com atividade antifúngica considerável. A microalga *Chlorella* foi considerada a partir de informes da literatura sobre seu conteúdo de compostos funcionais.

Os diâmetros das colônias do fungo *Rhizopus sp.* nos meios de cultura contendo os extratos em estudo aparecem na Tabela 4, especificando as avaliações nos 3° e 5° dias de incubação.

Tabela 4: Diâmetros médios de crescimento do *Rhizopus* sp em presença dos extratos de fenólicos de cebola, farelo de arroz e chlorella.

Extratos	Concentração de fenóis no meio $\mu\text{g fenóis}\cdot\text{mL}^{-1}$	Diâmetro da colônia (cm)	
		3° dia	5° dia
Cebola (extrato metanólico)	70	8,0 ^a	8,5 ^a
	77	4,4 ^b	8,5 ^a
	86	2,1 ^b	5,3 ^b
Cebola (extrato aceto-etílico)	2,0	8,5 ^a	8,5 ^a
	2,3	6,0 ^b	8,5 ^a
	2,6	4,1 ^b	6,0 ^b
Cebola (extrato aquoso)	120	8,5 ^a	8,5 ^a
	150	8,5 ^a	8,5 ^a
	185	8,5 ^a	8,5 ^a
Farelo de arroz (extrato metanólico)	28	8,5 ^a	8,5 ^a
	35	7,7 ^a	8,5 ^a
	46	3,6 ^b	7,1 ^a
Chlorella (extrato metanólico)	3,0	8,5 ^a	8,5 ^a
	3,3	8,5 ^a	8,5 ^a
	3,7	8,5 ^a	8,5 ^a
Controle (água destilada)	-	8,5	8,5

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de confiança de 95% em relação ao controle.

Cabe salientar que para evitar o efeito dos solventes no desenvolvimento fúngico estes foram evaporados e ressuspensos em água nos casos de obtenção dos extratos com metanol e acetato de etila.

Nenhum dos extratos exerceu inibição total sobre o *Rhizopus* sp., mesmo aumentando os níveis de extrato fenólicos adicionados ao meio de crescimento, o que sugere que estes extratos precisariam ser mais concentrados para inibir esta espécie fúngica.

Segundo a literatura os grupos hidroxílicos presentes nos compostos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio com enzimas do metabolismo microbiano desativando-as e inibindo o desenvolvimento da biomassa fúngica (JUGLAL et al., 2002; PORTE e GODOY, 2001). Ao relacionar a medida do diâmetro de crescimento da colônia com o conteúdo fenólico

dos extratos de cebola em metanol e acetato de etila e de farelo de arroz, foi verificado que estes promoveram uma redução na velocidade de crescimento do *Rhizopus sp*, quando as concentrações no meio foram respectivamente superiores a 77; 2,3 e 35 $\mu\text{g fenóis}\cdot\text{mL}^{-1}$ meio.

Em alguns casos pode ser observado que a inibição fúngica não esta relacionada com a concentração dos fenóis nos extratos, como por exemplo, o extrato aquoso que apesar de possuir concentrações de fenólicos até 60 vezes superiores aos demais não inibiu o desenvolvimento do halo das colônias em todo o período de incubação, o que não foi observado em nenhum outro extrato de cebola ou no farelo de arroz. Estes resultados indicam a necessidade de se identificar os diferentes compostos presentes nos extratos, pois a estrutura destes compostos pode estar relacionada com o maior ou menor poder de inibição fúngica

O acompanhamento do crescimento das colônias em presença dos extratos de cebola extraída nos três sistemas solventes, do farelo de arroz e da chlorella, medidas no 3° e 5° dia de incubação está ilustrado na Figura 1. Nos conjuntos apresentados os controles aparecem acima (1A) e da esquerda para a direita as concentrações são crescentes sendo 1(B) os extratos aquosos de cebola, 1(C) o extrato aceto-etílico de cebola, 1(D) o extrato metanólico de farelo de arroz e 1(E) o extrato metanólico de chlorella.

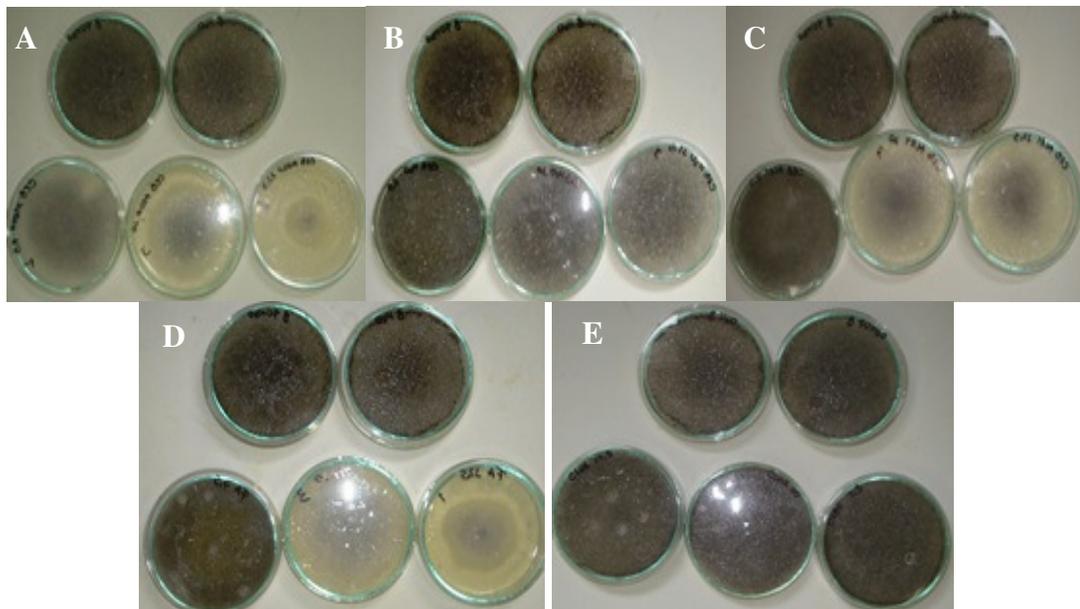


Figura 1: Halos de crescimento fúngico nos meios contendo extrato metanólico de cebola (A), cebola aquoso (B), cebola aceto-etílico (C), farelo de arroz metanólico (D), chlorella metanólico (E).

A Figura 1, assim como os números da Tabela 4 permitiram verificar uma acentuada diferença no desenvolvimento das hifas nos extratos metanólicos da cebola, aceto-etílico da cebola e no extrato de farelo de arroz a medida que foram adicionadas as maiores concentrações de extratos fenólicos aos meios de cultura. Nos extratos aquosos de cebola e metanólico de chlorella não pode ser observada a inibição do crescimento fúngico em nenhuma das condições testadas. Isto sugere que para inibir o desenvolvimento de *Rhizopus sp.*, abundantes em algumas matrizes, estes extratos como foram obtidos não foram eficientes, embora fosse observado macroscopicamente menor desenvolvimento de hifas.

A Figura 1, também permite perceber a tendência de que ao aumentar a concentração de extratos metanólicos e aceto-etílicos de cebola e metanólicos de farelo de arroz ocorre uma diminuição do halo de desenvolvimento fúngico que poderia estar determinado pela concentração de compostos fenólicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al., (2006); Chalfoun et al., (2004); Velluti et al., (2003 e 2004), que também salientaram que este tipo de comportamento requer um estudo específico, pois fatores tais como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos podem interferir sobre o comportamento dos fungos.

O teste de diferença de médias (DMS) mostrou que no 3° e 5° dia de incubação a inibição dos extratos aquosos em todas as concentrações utilizadas (120; 150 e 185 $\mu\text{g fenóis}\cdot\text{mL}^{-1}$) e os demais extratos nas menores concentrações utilizadas 2,0 $\mu\text{g fenóis}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a cebola (acetato de etila) e 69 $\mu\text{g fenóis}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o extrato de cebola (metanol), além dos extratos de chlorella em todas as concentrações testadas, não foi significativa em relação ao controle. Nos demais extratos nas outras concentrações testadas a diferença foi significativa no intervalo de 95% de confiança entre as médias dos diâmetros de crescimento nos 3° e 5° dias de incubação com relação ao controle.

Pereira et al., (2006), estudando o efeito da adição do óleo essencial de cebola sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium sp* verificaram que não havia inibição fúngica nas concentrações de 500 a 2000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de meio, o que sugere que o óleo essencial não contém os compostos com atividade antifúngica. Quando se comparou os resultados encontrados com os obtidos por Pereira et al., (2006), pode ser verificado que os extratos de cebola são mais eficientes na inibição fúngica que os óleos essenciais, pois apresentaram inibição em concentrações bem menores.

No caso deste trabalho, o teste de atividade antifúngica empregando o fungo *Rhizopus sp.* realizado em placas, mostrou-se promissor para triagem da ação fungicida/fungistática de extratos vegetais, incluindo as questões quantitativas de níveis de efeito. Demonstrada pelas diferenças detectadas nas ações dos extratos e pelas respostas as alterações de crescimento fúngico em relação às variações de concentração dos extratos fenólicos.

4. CONCLUSÃO

As diferentes classes de cebola apresentaram diferença significativa entre todas as frações dos macrocomponentes com exceção da umidade e dos teores de cinzas.

Os extratos da cebola extraídos com os diferentes solventes continham uma faixa ampla de compostos fenólicos totais variando entre 0,077 e 2,833 mg_{fenóis.g_(bs)⁻¹}. Nos extratos de chlorella e de farelo de arroz a faixa de variação nos teores fenólicos foi mais estreita, entre 0,202 e 0,522 mg_{fenóis.g_(bs)⁻¹} amostra, respectivamente.

O teste de atividade antifúngica em ágar diluído mostrou que os extratos fenólicos da cebola extraídos com metanol e acetato de etila e o extrato de farelo de arroz apresentaram atividade antifúngica sobre o fungo *Rhizopus sp.*, atingindo no 5º dia 38, 30 e 17% de inibição para o extrato metanólico de cebola, extrato aceto-etílico de cebola e extrato metanólico de farelo de arroz, respectivamente. Os extratos aquoso de cebola e metanólico de chlorella não apresentaram atividade antifúngica contra o fungo testado.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, C.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, M. F.; LEÃO, C. Activity of essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* species against food spoilage yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 625-632, 2003.

Association of Official Analytical Chemists. AOAC (2000). Official Methods of analysis international, 17 th, CD-ROM, Willian Horwitz.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, n. 13, p. 105-114, 2003.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 668-673, 2003.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 57, p. 101-110, 2000.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Editorial ACRIBIA, S.A., 2ªEdição, 1988.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and (*Allium sativum*). **Lebensm.-Wiss. U. Technol.**, n. 37, p. 263-268, 2004.

BLIGH & DYER, E. C. a rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, n. 37, p. 911-917, 1959.

BRUL, S.; KLIS, F. M. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. **Fungal Genetics and Biology**, n. 27, p. 199-208, 1999.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International journal of food microbiology**, n. 94, p. 223-253, 2004.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, [S.I.], v. 12, p. 630-649, 2000.

DEL RÍO, J. A.; BÁIDEZ, A. G.; BOTÍA, J. M.; ORTUNO, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora sp.* **Food Chemistry**, n. 83, p. 75-78, 2003.

EMATER/RS – Classificação Comercial da Cebola. Disponível: <http://www.emater.tche.br>, acessado em 06/12/2007

FAN, J. J.; CHEN, J. H. Inhibition of Aflatoxin-producing fungi by *Welsh* onion extracts. **Journal of Food Protection**, v.62, n. 4, p. 414-417, 1999.

GOLDMAN, I. L.; KOPELBERG. M.; DEBAENE JEP; SCHWARTZ B. S. Antiplatele activity in onion (*Allium cepa L.*) is sulfur dependent, **Thrombosis and Haenostasis**, v. 76, n 3, p. 450-452, 1996.

- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* – Superalimento del futuro**. Barcelona. Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.
- KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agric. Food Chem.**, n. 47, 3954-3962, 1999.
- KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, n. 81, p. 321-326, 2003.
- LIMA, V, L, A, G.; MELO, E, A.; MACIEL, M, A, S.; SILVA, B, S, G.; LIMA, D, E, S.. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (vignaradiatal). **Revista Nutrição**, v. 17, n. 1, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 31, p. 326-428, 1959.
- NAVES, M, M, V. Características químicas e nutricionais do arroz. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 51-60, jan./jun., 2007.
- OLIVEIRA, M. S. **Inibição do crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos**. Rio Grande: FURG, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.
- PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R. SOARES-COSTA, L. A.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. N.; PICCOLI, R. H. inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 4, 731-738, jul/ago., 2006.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O.; Alecrim (*Rosmarinus officinallis L.*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. Curitiba, **B. CEPPA**, v. 19, n. 2, 2001.
- QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 74, p. 89-96, 2001.
- SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz – Composição e propriedades. **Revista Óleos & Grãos**, p. 34-42, jul-ago, 2001.
- SOUSA, C, M,; ROCHA e SILVA, M, H.; VIEIRA, G, M.; AYRES, M, C.; COSTA, C, L, S.; ARAÚJO, D, S.; CAVALCANTE, L, C, D.; BARROS, E, D.; ARAÚJO, P, B.; BRANDÃO, M, S.;

CHAVES, M, S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

VELUTTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, n. 89, p. 145-154, 2003.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, Lleida, v. 21, p. 649-656, Aug, 2004.

YIN, Mei-Chin; TSAO, Shih-Ming. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Journal of food microbiology**, n. 49, p. 49-56, 1999.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, n. 87, 401-406, 2004.

ARTIGO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIMICOTOXIGÊNICA DE EXTRATOS DE CEBOLA, FARELO DE ARROZ E CHLORELLA

Michele Moraes de Souza; Melissa dos Santos Oliveira; Meritaine da Rocha; *Eliana Badiale Furlong*

Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos - Departamento de Química

Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Caixa Postal 474

CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil – Tel. (53)3233 8663

RESUMO

As propriedades antifúngicas e antimicotoxinas de extratos fenólicos de farelo de arroz, cebola e microalga chlorella, foram testadas pelo método de ágar diluído, utilizando como resposta o diâmetro de crescimento do *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum* e *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas B₁ e B₂ pelo primeiro. Durante os 14 dias de incubação as maiores inibições de crescimento fúngico foram alcançadas em presença do extrato de chlorella, 83% de inibição, que também inibiram totalmente a produção de micotoxinas. Os demais extratos inibiram significativamente o crescimento fúngico com relação ao controle, até 65% de inibição utilizando os extratos metanólicos de cebola, além de inibirem em até 90% a produção de aflatoxinas B₁ e B₂. Os resultados indicam as matrizes estudadas como potenciais fonte de compostos fenólicos que podem exercer um efeito inibitório no desenvolvimento fúngico e na produção de micotoxinas.

Palavras chave: aflatoxinas, fenóis, fungos.

ABSTRACT

The antifungal and antimycotoxins properties of phenolics extracts of brand of rice, onion and chlorella, they were tested by the method Agar dilution, using like answer the diameter of growth of the *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum* and *Aspegillus flavus* and aflatoxins B₁ and B₂ production for the first one. During 14 days of incubation the biggest inhibitions of fungal growth were reached in presence of the extract of chlorella, 83% of inhibition, which also inhibited significanthy the fungal growth regarding the control, up to 65% of inhibition using the methanolic extracts of onion, besides inhibiting in up to 90% of production of aflatoxin B₁ and B₂. The results indicate the studied vegetables as you potentiate source of phenolics compounds what can practise na inhibitory effect in the development fungal and in the mycotoxins productions.

Key works: aflatoxins, fungal, phenolic.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por fungos causa mudanças, tanto na composição química, quanto na estrutura e aparência representando perda econômica e/ou desperdício das matérias-primas e alimentos. Além disso algumas espécies são responsáveis pela produção de micotoxinas em determinadas condições, e estas causam problemas à saúde de humanos e de animais, que consomem os alimentos contaminados (TANIWAKI e SILVA, 2001)

As micotoxinas são metabólitos secundários de alguns fungos que contaminam os tecidos vegetais em qualquer época do cultivo, colheita ou estocagem de matérias-primas agrícolas e/ou alimentos, usualmente quando o meio propicia condições de estresse metabólico ao microrganismo. Estas substâncias podem ser carcinogênicas, neurotóxicas e teratogênicas e a ocorrência delas em alimentos têm sido mencionada em diferentes países, inclusive no Brasil (ABDULKADAR et al., 2004; AYCICEK et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2005; GARDA et al., 2004; NUNES et al., 2003).

Os conhecimentos científicos atuais ao mesmo tempo que geram tecnologias para melhor prevenir a contaminação microbiana, em geral disparam com as exigências de consumidores esclarecidos sobre a toxicidade ou suspeita toxicidade de alguns aditivos químicos inclusive sobre a possibilidade de uso abusivo deles para mascarar qualidade inadequada de alguns alimentos. Isto tem levado as autoridades que legislam sobre produção de alimentos a recomendar a diminuição nos índices de utilização de aditivos químicos pela indústria de alimentos. Esta por sua vez demanda por soluções de conservação menos drásticas como o uso de conservadores naturais (BRULL e COOTE, 1999). Neste panorama muitas pesquisas em todo o mundo vêm sendo desenvolvidas enfatizando a busca de úteis e viáveis compostos naturais em diferentes fontes para um emprego racional como conservadores na produção de alimentos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; CHAO e YANG, 2000; CUNICO et al., 1999; MYTLE et al, 2004).

A investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais tem sido intensificada e incentivada também pela preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia. O abuso por longos anos da utilização de compostos antimicrobianos é tido como o fator principal de pressão para o surgimento de tal fenômeno de resistência (ANDREMONT, 2001). A presença e detecção de cepas de microrganismos patogênicos resistentes a antimicrobianos é no campo da microbiologia de alimentos uma grande demanda

para garantir a segurança alimentar (TEUBER, 1999). Estudos científicos sobre especiarias e seus produtos derivados (extratos, óleos essenciais, constituintes químicos) tem sempre mostrado resultados satisfatórios quanto à inibição de microrganismos patógenos oportunistas, patógenos primários, deteriorantes, e/ou na inibição da produção de toxinas microbianas (AL-JEDAH et al., 2000; ARORA e KAUR, 1999; JUGLAL et al., 2002; KIZIL e SOGUT, 2003).

Dentre as substâncias às quais a literatura atribui este potencial inibitório está um grande grupo químico, os fenólicos, encontrados em diversas famílias vegetais em pontos susceptíveis aos danos ambientais decorrentes de efeitos físicos, químicos e biológicos. Os compostos fenólicos são sintetizados em quase todos os tecidos vegetais, caracterizando-se além de atividade antifúngica a capacidade de controlar a produção de micotoxinas. Estes compostos, em função de sua estrutura podem se dissolver dentro da membrana microbiana e penetrar dentro da célula, onde podem interagir com mecanismos do metabolismo microbiano e dificultar a síntese de ergosterol, glucan, quitina e outros (BRUL e KLIS, 1999; MARINO et al., 2001).

Dentre muitas matérias-primas para obtenção de compostos com esta propriedade antifúngica, destaca-se a cebola pela sua produção mundial que apresentou aumento de cerca de 25% na última década e constitui-se numa das bases da agricultura local. Além disto, possui compostos fenólicos, bem como ácidos málico, cítrico, succínico, fumárico, quínico, biotínicos, nicotínicos, fólicos, pantotênicos e ascórbico. Além da cebola destaca-se o farelo de arroz, que apresenta baixo valor comercial, por suas características sensoriais e disponibilidade discutível de nutrientes, poderia ter outro tipo de aplicação na indústria de alimentos especialmente pela presença de antioxidantes em sua composição (IRGA, 2007). A chlorella é também de grande interesse comercial, pois além da rápida velocidade de crescimento, pode ser cultivada em tanques ao ar livre. A identificação de propriedade antifúngica para esta microalga é mais um argumento para incentivar políticas e processos para a produção dela, principalmente em regiões de recursos hídricos abundantes, como é o caso da região Sul do Rio Grande do Sul.

Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito inibitório dos extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e chlorella sobre o crescimento micelial “in vitro” dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum* e *Aspergillus oryzae* e a produção de aflatoxina B₁ e B₂, pelo primeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tecidos Vegetais

Os tecidos vegetais estudados neste trabalho foram cebola (*Allium cepa L.*), sem casca, coletadas no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2007 e cedidas pela EMATER – RS, farelo de arroz, com granulometria de 0,5 mm, obtido de uma variedade de arroz BR 417 de campos experimentais do IRGA (instituto Riograndense do Arroz) e a microalga chlorella, em pó, obtida de lojas especializadas em produtos naturais da cidade de Rio Grande, RS.

2.2 Determinação de umidade

Os teores de umidade das matrizes vegetais foram determinadas por perda gravimétrica em estufa à vácuo a 60°C para a cebola e 105°C para o farelo de arroz e para a chlorella, segundo a AOAC (2000).

2.3 Preparo dos extratos vegetais

As cebolas foram secas em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C, até atingirem valores de umidade de 13%. A chlorella foi utilizada na forma em pó com umidade de 4% e o farelo de arroz com 10% de umidade. Foram pesadas 10g de cebola seca, farelo de arroz e 5 g de chlorella aos quais foram adicionados 50 mL de solvente (metanol), agitados em temperatura ambiente em mesa agitadora orbital da marca TECNAL durante 2 horas a 3,13 G de agitação, em seguida o extrato foi evaporado em rotaevaporador a 50°C, seguindo solubilização com 50 mL de água destilada e clarificação com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%. A mistura foi filtrada com papel de filtro Wathman n°1 e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL, sendo o volume final completado com água destilada. As cebolas também foram submetidas ao mesmo tratamento tendo o acetato de etila e a água como solventes.

2.4 Determinação de fenóis totais nos extratos

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos foi realizada por espectrometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e o procedimento consistiu em tomar alíquotas de 500µL do extrato agitar com 500µL de água destilada e 4,5mL de Na₂CO₃ 4% por 1 min, repouso em banho-maria a 40°C por 15 min. A mistura foi agitada por 30 segundos em banho ultra som com 500µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada.

Após 10 min, foi medida a absorvância das soluções a 750nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva analítica construída com uma solução padrão de Quercetina contendo 100 µg/mL a partir da qual foram preparadas diluições variando entre 2 e 16 µg/mL, para os extratos de cebola. Os extratos de farelo de arroz foram quantificados com uma curva padrão de ácido ferúlico (2 e 16 µg/mL) e para os extratos de chlorella foi empregada uma curva de tirosina (2 e 16 µg/mL), nas mesmas condições. Os resultados dos conteúdos fenólicos das amostras foram expressos como µg de fenóis totais/ g de amostra.

2.5 Fungos

Os fungos utilizados neste estudo foram o *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus* cedidos pelo Laboratório de Micotoxicologia (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria, RS e o *Fusarium graminearum* cedido pelo Laboratório de Fitopatologia da UFRGS ambos mantidos em Ágar Batata Dextrose (BDA) a 4°C até o uso. A suspensão de esporos utilizada nos testes antifúngicos foi obtida pela propagação em meio BDA, após incubação por 10 dias a 30°C, seguida de extração dos esporos do meio com solução 0,2% de Tween 80, filtração e contagem de esporos em câmara de Neubauer.

2.6 Efeito in vitro de extratos vegetais sobre o desenvolvimento fúngico.

O método utilizado foi o bioanalítico “in vitro” observando o desenvolvimento ou inibição dos microrganismos em duas concentrações diferentes de fenólicos totais dos extratos usando o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose e Agar). Ao meio de cultura autoclavado por 15 minutos a 120°C, após o resfriamento foram adicionados dois volumes conhecidos dos extratos vegetais, 20 e 25 mL de extratos (concentrações conhecidas de compostos fenólicos) que foram diluídos diretamente no meio de cultura, em seguida foram vertidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro), operações estas realizadas sob condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, Tipo B2). Após a solidificação dos meios, foram adicionados ao centro das placas 5µL da solução de esporos, contendo $2,4 \times 10^5$ esporos/mL do *Aspergillus oryzae* e $5,2 \times 10^7$ esporos/mL do *Aspergillus flavus*. A incubação ocorreu em câmara de germinação modelo TECNAL TE – 403, com temperatura de 30°C durante 14 dias e umidade relativa de 40%.

Durante o desenvolvimento dos fungos, foram efetuadas medições ortogonais dos diâmetros das colônias nos 3º, 5º, 7º e 14º dia de incubação, tendo como referência o

desenvolvimento controle do fungo no meio de cultura da placa sem adição dos extratos (NGUEFACK et al., 2004). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A fórmula utilizada para calcular a porcentagem de inibição fúngica esta mostrada na Equação 1:

$$I = 100*(C-T)/C$$

Onde:

I = Porcentagem de inibição

C = Medida do diâmetro de crescimento do fungo no meio controle

T = Medida do diâmetro de crescimento do fungo no meio contendo o extrato.

Também foi calculada e expressa a porcentagem de inibição do crescimento fúngico por µg de composto fenólico total, levando-se em consideração os diferentes teores de compostos fenólicos totais nas matrizes.

Após o 7°, 14° e o 21° dia de incubação do experimento contra *Aspergillus flavus* as placas foram congeladas para posterior determinação de aflatoxinas no meio de crescimento.

2.7 Efeito in vitro de extratos vegetais sobre a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*

Durante a realização do experimento as placas com crescimento do *Aspergillus flavus* foram coletadas no 7°, 14° e o 21° dia de incubação para avaliar o efeito dos extratos vegetais sobre a produção de aflatoxina B₁ e B₂ no meio de crescimento (NUNES, 2003; OLIVEIRA, 2005).

As micotoxinas foram extraídas com solução de acetonitrila-água (3:1) sob agitação, seguida de partição com hexano. A acetonitrila foi separada da água com adição de cloreto de sódio e evaporada a 50°C sob vácuo. O resíduo foi ressuscendido com 3 mL de metanol e 27 ml de clorofórmio, centrifugado e separado em três alíquotas de 10 mL em vidro âmbar. Estas alíquotas foram evaporadas em banho-maria a 40°C e corrente de nitrogênio e guardadas a -10°C (TANAKA et al., 2000 adaptado por GARDA, 2002). Os extratos evaporados foram aplicados em cromatofolhas de sílica gel G60 de 0,25 mm de espessura para triagem e estimativa da concentração das aflatoxinas B₁ e B₂ sob luz UV (SOARES, 1989).

2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos no teste de atividade antifúngica foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e comparação dos diâmetros médios de desenvolvimento pelo teste de Diferenças Mínimas Significativas (DMS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das amostras

O conteúdo de compostos fenólicos totais nas diferentes matrizes foi extraído com três diferentes solventes (metanol, água e acetato de etila) para as amostras de cebola e com o metanol para o farelo de arroz e a chlorella, aparecem na Tabela 1, bem como a umidade empregada para estimativa em base seca. Tais procedimentos foram adotados em função de experiências anteriores no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FURG realizadas por Oliveira (2005), Dors (2006) e Colla et al., (2007). Estes autores demonstraram a recuperação de compostos fenólicos em farelo de arroz e *Spirulina platensis*, superior a 80% nos sistemas solventes adotados.

Tabela 1: Resultados de Umidade (%) e Fenóis Totais presentes nas matrizes estudadas

Matriz	Umidade %	Fenóis Totais (mg _{fenóis} ·g _(bs) ⁻¹)
Cebola seca (metanol)	13	1,741
Cebola seca (água)	13	3,012
Cebola seca (acetato de etila)	13	0,068
Farelo de arroz (metanol)	10	0,536
Chlorella (metanol)	4	0,231

Nas frações aquosas e metanólicas dos extratos de cebola estavam os maiores teores de compostos fenólicos, atingindo valores até 50 vezes superiores aos demais extratos. Este fato é promissor visto que em função da solubilidade os compostos mais prováveis de estarem presentes nos extratos aquosos e metanólicos são os flavonóides e ácidos fenólicos, sabidamente abundantes em cebolas. A extração de compostos fenólicos com acetato de etila foi a que recuperou os menores teores de compostos reativos com reagente de Folin-Ciocalteu e possivelmente nesta fração estejam presentes os fenóis polimerizados. O conteúdo de fenólicos nos extratos de farelo de arroz foram semelhantes aos registrados por Dors (2008). A microalga chlorella apresentou um conteúdo fenólico menor que a *Spirulina platensis* (COLLA et al 2007).

3.2 Efeito Antifúngico dos extratos fenólicos

Os gráficos das Figuras 1, 2 e 3 apresentam a cinética do crescimento fúngico durante os 14 dias de incubação dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*. Foi observado que em presença dos extratos fenólicos dos vegetais ocorria uma tendência a diminuição da velocidade do crescimento fúngico com relação ao controle.

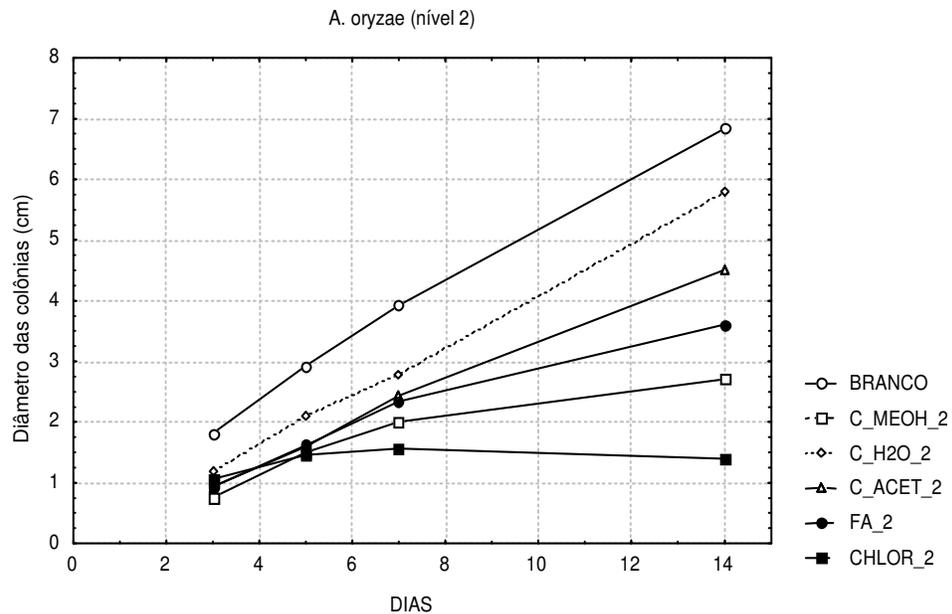


Figura 1: Acompanhamento do crescimento fúngico do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos vegetais

A comparação das médias pelo teste de Tukey (ANEXO 3) realizado para os dias das medidas dos diâmetros mostraram que no 3º, 5º, 7º e 14º dia de incubação do *Aspergillus oryzae* ocorreu inibição significativa em relação ao controle, quando o fungo foi cultivado na presença de todos os extratos vegetais testados. O maior efeito inibitório sobre o crescimento do *Aspergillus oryzae* no 14º dia de incubação foi do extrato de chlorella. Relatos sobre efeito inibidor de crescimento fúngico de compostos extraídos de cebola, em diferentes condições e de arroz estão disponíveis na literatura (OLIVEIRA, 2005; PEREIRA et al., 2006; PHAY et al., 1999), mas não foram encontrados menção de compostos provenientes da microalga chlorella. Um trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FURG, empregando *Spirulina platensis* como conservador em multimisturas não preveniu o desenvolvimento fúngico.

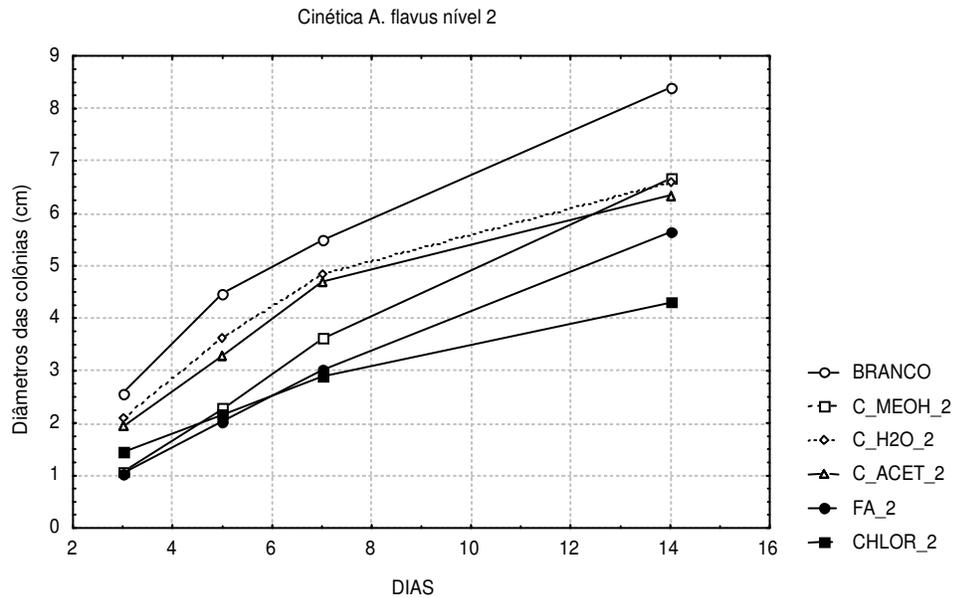


Figura 2: Acompanhamento do crescimento do *Aspergillus flavus* em presença dos extratos vegetais

A presença dos extratos vegetais nos meios de crescimento do *Aspergillus flavus* inibiu significativamente o crescimento deste fungo nos 3°, 5°, 7° dias. No 14° dia de incubação o comportamento se manteve com exceção do extrato de farelo de arroz na concentração de fenóis de $20 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{agar}}$ que não inibiu significativamente o crescimento do *Aspergillus flavus* em relação ao controle.

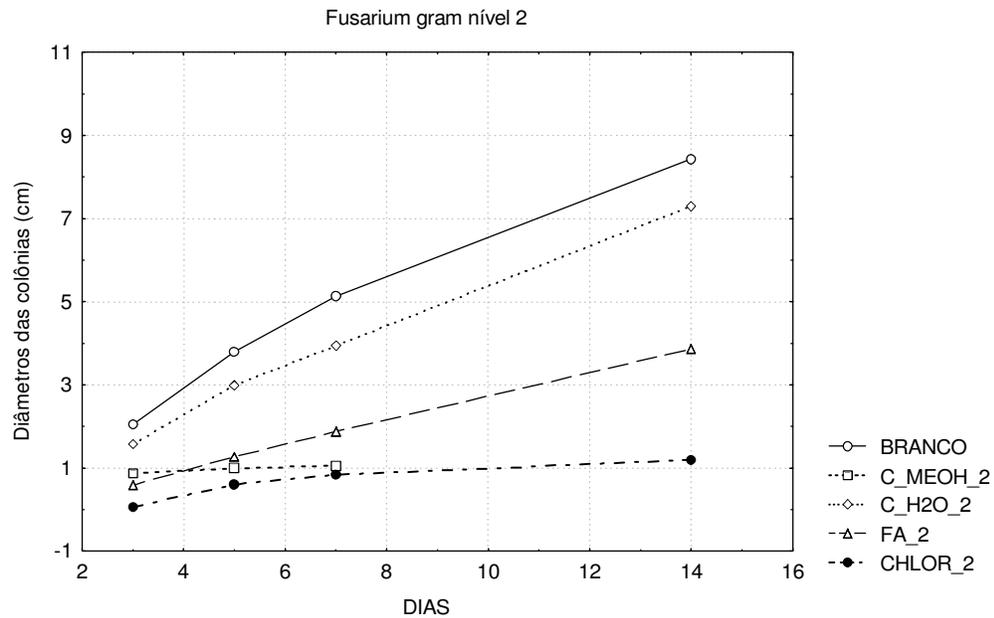


Figura 3: Acompanhamento do crescimento do *Fusarium graminearum* em presença dos extratos vegetais

O crescimento do *Fusarium graminearum* também foi significativamente inibido na presença dos extratos vegetais durante os 14 dias de incubação. No experimento realizado com *Fusarium graminearum* não foi possível calcular a média do diâmetro das colônias do extrato aceto-etílico, e do extrato metanólico no 14º dia de incubação, pois ambas sofreram contaminação com outros fungos e seu desenvolvimento foi afetado pela competição. Isto sugere que este fungo pode ser menos competitivo que os demais em matrizes com atividade de água superior a 70%, como é o caso do meio de cultura empregado.

Na Tabela 2 estão os resultados da inibição percentual/ $\mu\text{g}_{\text{fenol total}}$ contra os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum* em presença dos extratos fenólicos da cebola, farelo de arroz e chlorella nos 3º, 5º, 7º e 14º dias de incubação.

Tabela 2: Inibição fúngica dos extratos contra *A. flavus*, *A. oryzae* e *F. graminearum*

Extrato	% inibição/ μg fenol total		
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. graminearum</i>
Cebola (metanol)			
3° dia	0,35	0,7	0,36
5° dia	0,30	0,63	0,47
7° dia	0,30	0,44	0,47
14° dia	0,35	0,35	Nr
Cebola (acet. eti.)			
3° dia	20,0	8,4	Nr
5° dia	18,0	9,4	Nr
7° dia	15,5	5,1	Nr
14° dia	12,3	4,4	Nr
Cebola (água)			
3° dia	0,15	0,17	0,04
5° dia	0,11	0,16	0,07
7° dia	0,12	0,09	0,07
14° dia	0,07	0,16	0,05
Farelo de arroz			
3° dia	0,72	2,3	1,6
5° dia	0,73	2,3	1,5
7° dia	0,70	1,73	1,5
14° dia	0,71	1,6	1,2
Chlorella			
3° dia	16,0	12,0	12,6
5° dia	18,6	12,6	11,5
7° dia	24,1	14,4	12,3
14° dia	31,0	14,4	12,8

Nr = medição do halo não realizada

Os resultados referentes a adição dos extratos metanólicos e aquosos de cebola e metanólico de farelo de arroz ao meio de cultura, demonstraram uma tendência de prevenir o desenvolvimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*. Os extratos aceto-etílicos de cebola e metanólico de chlorella se apresentaram mais eficazes na inibição do *Aspergillus oryzae*. O fungo *Fusarium graminearum* foi o que se mostrou menos afetado pelos extratos estudados.

Em alguns casos pode ser observado que a inibição fúngica não está relacionada com a concentração dos fenóis nos extratos, como por exemplo, os extratos aquosos da cebola, que apresentaram a maior concentração de fenóis e a menor estimativa de inibição de crescimento fúngico. Este perfil se manteve até o 14º dia de incubação, o que não ocorreu com os demais extratos que possuíam menores concentrações de fenóis. A maior inibição fúngica foi exercida pelo extrato de chlorella, onde a concentração de fenóis é menor comparado com a maioria dos demais extratos.

Segundo Juglal et al., (2002) os grupos hidroxilícos presentes nos compostos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio com enzimas ativas, resultando na sua desativação e deste modo causa um efeito no desenvolvimento da biomassa fúngica e na produção de micotoxinas. Os resultados deste trabalho indicam a necessidade de se identificar os diferentes compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais, pois a estrutura destes compostos pode estar relacionada com o poder maior ou menor de inibição fúngica.

Este comportamento de inibição fúngica em relação às diferentes concentrações de fenóis foi observado para os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*, como está ilustrado nas Figuras 4, 5 e 6.

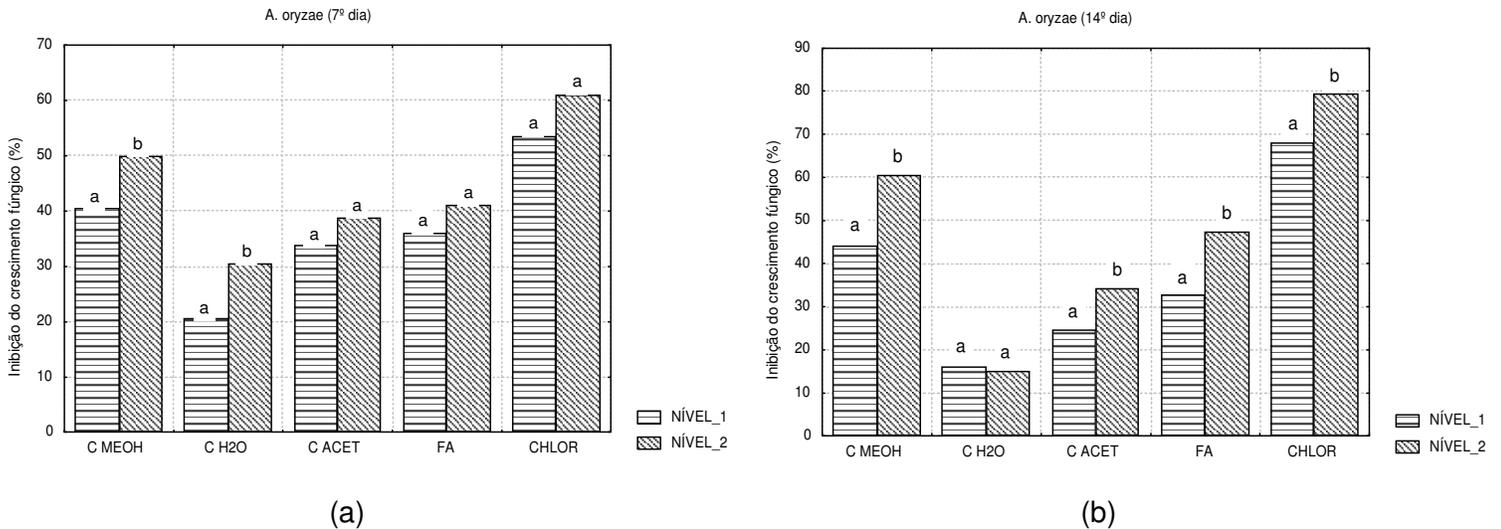


Figura 4: Efeito inibitório dos extratos naturais sobre o crescimento do *Aspergillus oryzae* a) após 7 dias e b) 14 dias de incubação.

NÍVEL_1 = menor nível de fenóis totais adicionados ao meio de crescimento (143; 197; 2,2; 51; 2,2 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}$, para os extratos metanólico de cebola, aquoso de cebola, aceto-etílico de cebola, metanólico de farelo de arroz e metanólico de chlorella, respectivamente) ; NÍVEL_2 = maior nível de fenóis totais adicionados ao meio de crescimento (165; 227; 2,5; 59; 2,6 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}$, para os extratos metanólico de cebola, aquoso de cebola, aceto-etílico de cebola, metanólico de farelo de arroz e metanólico de chlorella, respectivamente).

O teste de diferença de médias (DMS), nível de confiança de 95% (ANEXO 3), indicou que no 7º dia de incubação do *Aspergillus oryzae* não existiu diferença significativa entre a inibição ocorrida na menor e na maior concentração de fenóis provenientes dos extratos de farelo de arroz, chlorella e cebola extraída com acetato de etila, testados sobre o diâmetro da colônia. No 14º dia, mostrou que todos os extratos apresentaram diferença significativa entre a inibição ocorrida na menor e na maior concentração de fenóis, com exceção do extrato aquoso da cebola.

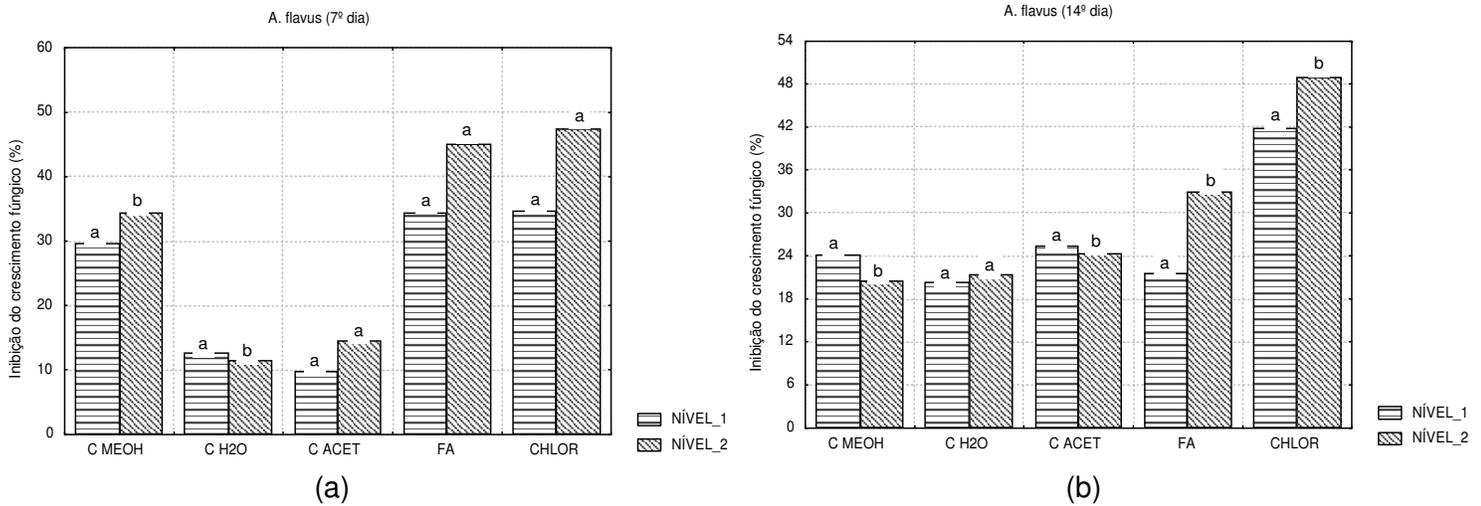


Figura 5: Efeito inibitório dos extratos naturais sobre o crescimento do *Aspergillus flavus* a) após 7 dias e b) 14 dias de incubação.

NÍVEL_1 = menor nível de fenóis totais adicionados ao meio de crescimento (108; 142; 2,2; 39; 2,8 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$, para os extratos metanólico de cebola, aquoso de cebola, aceto-etílico de cebola, metanólico de farelo de arroz e metanólico de chlorella, respectivamente) ; NÍVEL_2 = maior nível de fenóis totais adicionados ano meio de crescimento (119; 178; 2,5; 47; 3,2 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$, para os extratos metanólico de cebola, aquoso de cebola, aceto-etílico de cebola, metanólico de farelo de arroz e metanólico de chlorella, respectivamente).

O teste de diferença de médias (DMS), nível de confiança de 95% (ANEXO 3), indicou que no 7º dia de incubação do *Aspergillus flavus* não ocorria diferença significativa entre a inibição ocorrida na menor e na maior concentração de fenóis provenientes de todos os extratos vegetais testados sobre o diâmetro da colônia. No 14º dia, havia diferença significativa entre os níveis maiores e menores de todos os extratos, com exceção do extrato aquoso da cebola.

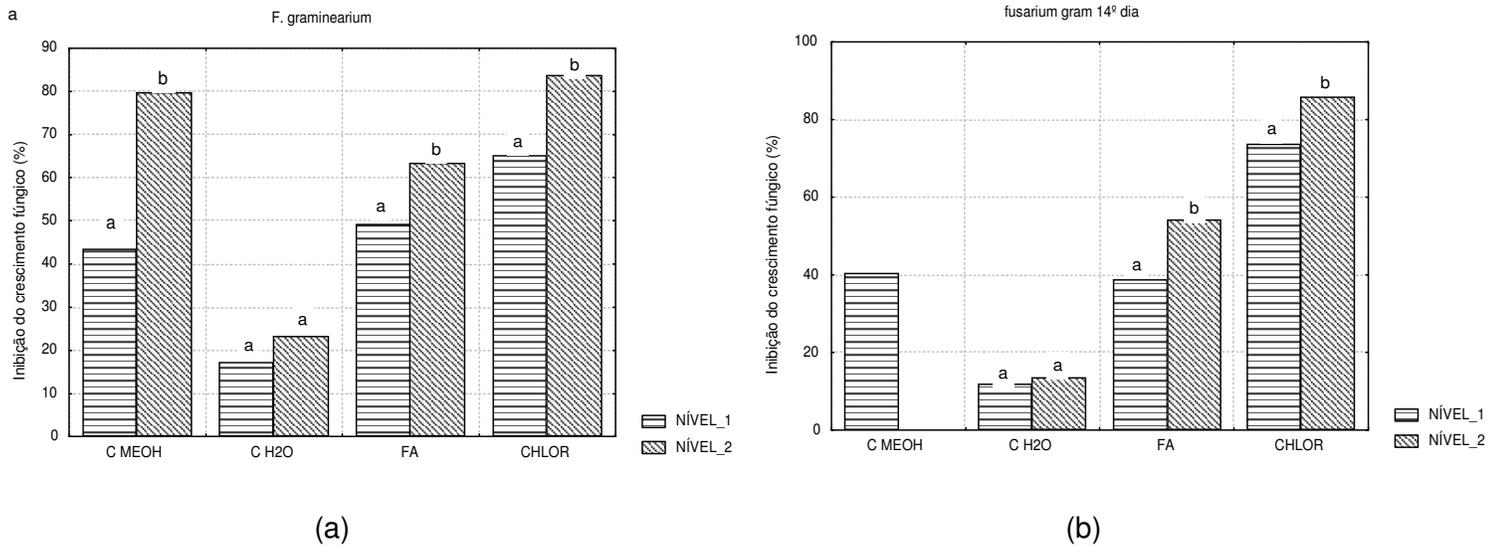


Figura 6: Efeito inibitório dos extratos naturais sobre o crescimento do *Fusarium graminearum* a) após 7 dias e b) 14 dias de incubação.

NÍVEL_1 = menor nível de fenóis totais adicionados ao meio de crescimento (117; 201; 37; $3,4 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$, para os extratos metanólico de cebola, aquoso de cebola, metanólico de farelo de arroz e metanólico de chlorella, respectivamente); NÍVEL_2 = maior nível de fenóis totais adicionados ao meio de crescimento (141; 224; 45; $3,9 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$, para os extratos metanólico de cebola, aquoso de cebola, metanólico de farelo de arroz e metanólico de chlorella, respectivamente).

O teste de diferença de médias (DMS), nível de confiança de 95% (ANEXO 3), indicou que no 7º dia de incubação do *Fusarium graminearum* não existia diferença significativa entre a inibição ocorrida na menor e na maior concentração de fenóis provenientes do extrato aquoso da cebola, nos demais havia diferença significativa, testados sobre o diâmetro da colônia. No 14º dia, todos extratos apresentavam diferença significativa entre os níveis maiores e menores de fenóis, com exceção do extrato aquoso da cebola.

Pode ser observado que em geral o aumento da concentração de fenóis do mesmo extrato vegetal, acarretou a maior inibição fúngica, ou seja, observou-se uma tendência de aumento nos índices de inibição de desenvolvimento micelial proporcional ao aumento das concentrações testadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al., (2006); Chalfoun et al., (2004) e Velluti et al., (2003 e 2004). Estes autores também salientaram que este tipo de comportamento requer um estudo específico, pois pode estar relacionado a vários fatores tais como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de

compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo. No caso deste trabalho o fator substrato pode ser desconsiderado visto que a composição dos meios só diferia quanto ao extrato e sua origem.

Pereira et al., (2006) estudaram o efeito da adição de óleo essencial de cebola em concentrações que variaram de 500 a 2000 mg/mL de meio com relação aos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium sp.* e observaram que em nenhuma das concentrações estudadas havia inibição fúngica. Tais resultados colaboram com a hipótese original deste trabalho de atribuir a atividade antifúngica a compostos fenólicos extraíveis em sistemas solventes polares, ou seja, flavonoides e ácidos fenólicos.

3.3 Efeito dos extratos fenólicos sobre a produção de aflatoxina B₁ e B₂ por *Aspergillus flavus*

As micotoxinas mais importantes produzidas por *Aspergillus flavus* são as aflatoxinas B₁ e B₂, produzidas por cerca de 40% dos isolados (TANAWAKI e SILVA, 2001). A determinação de aflatoxinas foi determinada através do método de cromatografia de camada delgada (CCD), este método de Tanaka (2000) e Soares (1989) foi adaptado no Laboratório de Micotoxinas da FURG para avaliar a produção de micotoxinas em um meio de cultura e para uma triagem de efeito dos compostos fenólicos sobre a produção de aflatoxinas, vem se mostrando um método eficiente por apresentar limites de detecção comparáveis a outros métodos mais sofisticados, aplicabilidade a várias matrizes, baixo custo, rapidez e boa performance. Este procedimento apresentou limite de detecção de 2,0 ppb, recuperação de 96,5% para aflatoxina B₁ e 91,5% para Aflatoxina B₂ e coeficiente de variação de 8%.

Na Tabela 5 estão os resultados das inibições da produção das aflatoxinas B₁ e B₂ por *Aspergillus flavus* em meio BDA (ágar batata dextrose) em presença de extratos fenólicos de vegetais, no 7°, 14° e 21° dias de incubação. As porcentagens de inibição foram calculadas considerando a não detecção das toxinas nos limites de quantificação do método com 100% de inibição.

Tabela 3: Inibição da produção de aflatoxina B₁ e B₂ pelo *Aspergillus flavus* na presença dos extratos fenólicos de vegetais.

Extrato	Fenóis μg _{fenóis} / mL _{agar}	Inibição da produção de aflatoxinas (%)					
		7° dia		14° dia		21° dia	
		AFLA B ₁	AFLA B ₂	AFLA B ₁	AFLA B ₂	AFLA B ₁	AFLA B ₂
C. MeoH	108	33,3	100	33,3	100	83,3	100
C. MeoH	119	66,6	100	66,6	100	100	100
C. Água	142	33,3	91	33,3	92,3	41,5	73,5
C. Água	178	100	92,3	58,5	92,3	100	92,3
C. ac.et.	2,2	0	77,7	16,3	92,3	16,3	67,6
C. ac.et.	2,5	8,1	86,9	33,3	92,3	33,3	92,3
F. arroz	39	33,3	91	74,9	100	54	91
F. arroz	47	58,5	91	100	100	89,3	100
Chlorella	2,8	100	100	100	100	100	100
Chlorella	3,2	100	100	100	100	100	100

C. MeoH = cebola metanol

C. Água = cebola água

C. ac.et. = cebola acetato de etila

F. arroz = farelo de arroz

O efeito inibitório sobre a produção de aflatoxina B₁ e B₂ por *Aspergillus flavus* foi observado em presença de todos os extratos nas duas concentrações estudadas, com exceção do extrato aceto-etílico de cebola (2,2 μg_{fenóis}/mL_{agar}), no 7° dia de incubação. Cabe salientar que houve, em alguns casos, uma variabilidade dos resultados de inibição da produção de micotoxinas quando se estudou a cinética de inibição.

Os extratos de chlorella nas duas concentrações fenólicas estudadas inibiram totalmente a produção de aflatoxina B₁ e B₂ em todos os dias analisados. Os extratos metanólicos de cebola inibiram totalmente a produção de aflatoxina B₂ e de 66,6% B₁, neste mesmo período inibiram de 21 a 34% o desenvolvimento da colônia fúngica. Quando foram utilizados os extratos aquosos de cebola houve uma variação da produção de aflatoxinas B₁ de 33% (142

$\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{agar}}$) a 100% ($178 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{agar}}$) e 73 a 92 de aflatoxina B_2 , e uma inibição de 21% no desenvolvimento da colônia fúngica. Nos extratos de farelo de arroz houve uma maior variabilidade entre os dias variando 33% ($39 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{agar}}$) a 100% ($47 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{agar}}$) e 91 a 100% a produção de aflatoxina B_2 , contra uma inibição de 32% sobre o crescimento fúngico. O extrato de cebola extraído com acetato de etila ocasionou inibição da produção de aflatoxina B_1 variando de 0 a 33% e de 68 a 92 a produção de B_2 , tendo o desenvolvimento fúngico inibido em 25%.

Estes resultados podem indicar que os extratos vegetais contendo compostos fenólicos ao inibirem o fungo conseqüentemente não ocorre a produção de micotoxinas. No caso da inibição ocorrer sobre a síntese das micotoxinas propriamente os extratos fenólicos podem atuar inibindo o estresse oxidativo que é um processo pré-requisito para a produção de aflatoxinas conduzindo para o aumento da peroxidação lipídica e a geração de radicais livres (JAYASSHREE e SUBRAMANYAM, 2000). Resultado similar foi obtido por Selvi et al., (2003) que inocularam o *Aspergillus flavus* em presença do extrato da *Garcinia indica*, planta rica em flavonóides e ácidos fenólicos, e obtiveram uma inibição de 40 a 60% na produção de aflatoxina B_1 e inibição de 10 a 20% do crescimento fúngico.

Extratos de alguns outros condimentos, ervas de importância medicinal e outros vegetais também exibem propriedades antifúngicas. Os resultados apresentados indicam que a atividade antifúngica e antimicotoxinas dos extratos vegetais estão relacionados com o seu conteúdo de compostos fenólicos (YIN e TSAO, 1999).

Yin e Tsao (1999) estudaram a atividade antifúngica de três espécies de alho, cebolinha, cebola, escarola e chalota, plantas comestíveis utilizadas freqüentemente na culinária, contra os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. Concluíram que o alho e a cebolinha foram considerados os melhores agentes antifúngicos e a combinação do ácido acético com extratos das plantas do gênero *Allium* obteve um grande efeito inibidor do crescimento fúngico e na produção de micotoxinas.

Rassoli e Abyaneh (2004) testaram o efeito inibitório do óleo essencial de *Thymus ericalyx*, o qual possui na sua composição 65,3% do composto fenólico timol, contra o desenvolvimento do *Aspergillus parasiticus* e a produção de aflatoxinas.

Bakan et al.,(2003) estudaram os efeitos dos substratos naturais em três frações do milho, grãos integrais, grãos degerminado e o gérmen de trigo sobre a produção de tricotocenos

por *Fusarium graminearum* e verificaram que a produção de micotoxinas foi menor ou não detectável no gérmen de trigo, fração esta que apresentou a maior concentração de ácidos p-cumárico e ferúlico.

Os resultados aqui apresentados estão consistentes com estes relatos e podem ser estudadas formas de aplicação deles como conservadores na formulação de alimentos susceptíveis a contaminação fúngica.

4. CONCLUSÃO

Todos os extratos apresentaram atividade antifúngica sobre os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*.

Os extratos de chlorella inibiram em 100% a produção de aflatoxina B₁ e B₂. O extrato aceto-etílico de cebola foi o que apresentou a menor inibição da produção de aflatoxina B₁, chegando a inibir três vezes menos que os demais extratos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDULKADAR, A. H. W.; AL-ALI, A. A.; AL-KILDI, A. M.; AL-JEDAH, J. Mycotoxins in food products available in Qatar. **Food Control**, n. 15, p. 543-548, 2005.

AL-JEDAH, J.H., ALI, M.Z, ROBINSON, R.K. The inhibitory action of spices against pathogens that might be capable of growth in a fish sauce (mehiawah) from the Middle East. **International Journal of Food Microbiology**, n. 57, p. 129-133, 2000.

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, n. 29, p. 256-25, 2001.

ARORA, D., KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 12, p. 257-262, 1999.

AYCICEK, H.; AKSOYA, A. SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, n. 16, p. 263-266, 2005.

BAPTISTA, M. J.; GLORIA, B. A.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, 1999.

- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERMANDEZ L.,M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**. v. 22, p. 1087-1092, 2003.
- BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORREA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, n. 16, p. 117-120, 2005.
- BRULL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, n. 50, p. 1-17, 1999.
- BRUL, S.; KLIS, F. M. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. **Fungal Genetics and Biology**, n. 27, p. 199-208, 1999.
- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.
- CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, [S.I.], v. 12, p. 630-649, 2000.
- COLLA, L. M.; BADIALE-FURLONG, E.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; CARVALHO,J.L.S.; PEITZ, C.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biociência** v. 11, p. 16 -21, 1999.
- DORS, G. C.; PINTO, R. H.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, *in press*, 2008.
- GARDA, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG,E. Determinação de Tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 4, n. 24, p. 657-663, 2004.
- IRGA. **Arroz: um alimento nobre e econômico**. Disponível em: www.irga.rs.gov.br/coma-arroz/paginas/nutricao.php. Acessado em: 03/09/2007.

JAYASHREE, T.; SUBRAMAYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology Med.**, v. 29, p. 981-985, 2000.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring micotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 683-687, 2002.

KIZIL, S.; SOGUT, T. Investigation of antibacterial effects of spices. **Crop Research**, n. 3, p. 86-90, 2003.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, n. 67, p. 187-195, 2001.

MYTLE N., ANDERSON G. L., DOYLE M.P., SMITH M.A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**.v. 17, p. 102-107, 2004.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO, P. H.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, n. 94, p. 329-334, 2004.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos, SBCTA**, v. 2, n. 23, p. 190-194, 2003.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R. SOARES-COSTA, L. A.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. N.; PICCOLI, R. H. inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KAHKONEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, n. 15, p. 479-483, 2004.

SELVI, A.T.; JOSEPH, G. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. **Food Microbiology**, n. 2, p. 455-460, 2003.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin-layer chromatographic method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 1, n. 72 p. 22-26, 1989.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 882, p. 23-28, 2000.

TANAWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção. **Núcleo de Microbiologia/ITAL**, 82 p, 2001.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, n. 56, p. 755-763, 1999.

VELUTTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, n. 89, p. 145-154, 2003.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, Lleida, v. 21, p. 649-656, Aug. 2004.

YIN, Mei-Chin; TSAO, Shih-Ming. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Journal of food microbiology**, n. 49, p. 49-56, 1999.

YOSHISAWA, T. Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil. **Training Course**, p. 283, Japão, 2001.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÃO GERAL

As condições ótimas de extração de compostos fenólicos totais empregando duas etapas de planejamento experimental para emprego das variáveis, solvente, tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções do processo de extração, apresentou resultados preditivos e significativos para o conteúdo de fenóis totais. As condições otimizadas ocorriam quando foi utilizado o metanol, tempo de extração de 120 minutos e a rotação de 3,13 G em mesa agitadora orbital. Sendo que a classe 4 foi a melhor para incorporar fenol na dieta com um conteúdo de 2387,6 µg fenóis/ g de cebola.

As diferentes classes de cebola apresentaram diferença significativa ao nível de confiança de 95%, entre todas as frações dos macrocomponentes estudadas, com exceção da umidade e dos teores de cinzas.

Os extratos da cebola extraídos com os diferentes solventes continham uma faixa ampla de compostos fenólicos totais variando entre 0,077 no extrato aceto-etílico e 2,833 mg_{fenóis·g_(bs)⁻¹} no extrato aquoso. Nos extratos de chlorella e de farelo de arroz a faixa de variação nos teores fenólicos foi mais estreita, entre 0,202 e 0,522 mg_{fenóis·g_(bs)⁻¹} amostra, respectivamente.

O teste de atividade antifúngica em ágar diluído mostrou que os extratos fenólicos da cebola extraídos com metanol e acetato de etila e o extrato de farelo de arroz apresentaram atividade antifúngica sobre o fungo *Rhizopus sp.*, atingindo no 5º dia 38, 30 e 17% de inibição para o extrato metanólico de cebola, extrato aceto-etílico de cebola e extrato metanólico de farelo de arroz, respectivamente. Os extratos aquosos de cebola e metanólico de chlorella não apresentaram atividade antifúngica contra o fungo testado.

Todos os extratos apresentaram atividade antifúngica sobre os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*. Os extratos metanólicos e aquosos de cebola e metanólico de farelo de arroz apresentaram melhor tendência de prevenção do crescimento fúngico contra o fungo *Aspergillus flavus*, os extratos aceto-etílicos de cebola e metanólico de chlorella se apresentaram mais eficazes na inibição do *Aspergillus oryzae*. O fungo *Fusarium graminearum* foi o que se mostrou menos afetado pelos extratos estudados.

Os extratos de chlorella inibiram em 100% a produção de aflatoxina B₁ e B₂. O extrato aceto-etílico de cebola foi o que apresentou a menor inibição da produção de aflatoxina B₁, chegando a inibir três vezes menos que os demais extratos.

CAPÍTULO V

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

ABDULKADAR, A. H. W.; AL-ALI, A. A.; AL-KILDI, A. M.; AL-JEDAH, J. Mycotoxins in food products available in Qatar. **Food Control**, n. 15, p. 543-548, 2004.

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.

AL-JEDAH, J.H., ALI, M.Z, ROBINSON, R.K. The inhibitory action of spices against pathogens that might be capable of growth in a fish sauce (mehiawah) from the Middle East. **International Journal of Food Microbiology**, n. 57, p. 129-133, 2000.

ANDRADE, C. A.; COSTAL, C. K.; BORAL, K.; MIGUELL, M. D.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João pessoa, v. 17, n. 2, abri/jun, 2007.

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, n. 29, p. 256-25, 2001.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz.**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, n. 3, p.173-183, 2002.

ANTOLOVICH, M.; PRENZELER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the analysis of phenolic compounds in fruits. **Analyst.**, v.125, p. 989-1009, 2000.

ANUPAMA e RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.

A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of International**. 17 th, CD-ROM, Wilian Horwitz, 2000.

ARAÚJO, C.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, M. F.; LEÃO, C. Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 625-632, 2003.

- ARORA, D., KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n.12, p. 257-262, 1999.
- AYCICEK, H.; AKSOYA, A. SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, n. 16, p. 263-266, 2005.
- BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxin and fungi in wheat stored in elevators in State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.5, p. 683-688, 1995.
- BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, n. 13, p. 105-114, 2003.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 668-673, 2003.
- BAKAN, Bénédicte; et al. Possible role of Plant Phenolics in the Production of Trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different Fractions of Maize Kernels. **Journal Agric. Food Chem.**, n. 51, p. 2826-2831, 2003.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERMANDEZ L.,M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**. v. 22, p. 1087-1092, 2003.
- BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 57, p. 101-110, 2000.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Editorial ACRIBIA, S.A., 2ªEdição, 1988.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and (*Allium sativum*). **Lebensm.-Wiss. U. Technol.**, n. 37, p. 263-268, 2004.
- BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORREA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, n. 16, p. 117-120, 2005.
- BLIGH & DYER, E. C. a rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, n. 37, p. 911-917, 1959.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.

BRANDÃO, G.C. **Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de *Polygonum spectabilis* Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana.** Minas Gerais: UFMG, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

BRUL, S.; KLIS, F. M. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. **Fungal Genetics and Biology**, n. 27, p. 199-208, 1999.

BRULL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, n. 50, p. 1-17, 1999.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International journal of food microbiology**, n. 94, p. 223-253, 2004.

CANCIAMANI, J. L. ; PEREZ, G. L. ; GARDA, J. ; FURLONG, E. B. . Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A presentes em farelo e farinha cereais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, p. 157-164, 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul.-ago. 2004.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essential Oil Research**, [S.l.], v. 12, p. 630-649, 2000.

CHLORELLA, **Tudo sobre a alga chlorella, Rio de Janeiro, 2007.** Disponível em: <<http://www.chlorella.com.br/>>. Acesso em 12 set. 2007.

COLLA, L.M. et al. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59c, p.55-59, 2004.

COLLA, L. M.; BADIALE-FURLONG, E.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of Spirulina (Arthospira) platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.

CONAB – **Produção e consumo no Brasil de arroz**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra>> Acesso em 8 jan. 2008.

CRUZ, A. B. **Utilização do extrato alcoólico de própolis como inibidor do crescimento de fungos e leveduras na superfície de salames tipo italiano**. Florianópolis: UFSC, 1994. Dissertação (Mestrado em Centro de Ciências Agrárias), Universidade Federal de Santa de Catarina, 1994.

CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; CARVALHO, J.L.S.; PEITZ, C.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 11, p. 16 -21, 1999.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. **Food Technology**, p. 148-155, January, 1989.

DEL RÍO, J. A.; BÁIDEZ, A. G.; BOTÍA, J. M.; ORTUNO, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora sp.* **Food Chemistry**, n. 83, p. 75-78, 2003.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas Produtos e Aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, nov-dez, 2006.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, 69, p.155-166, 1997.

DORS, G. C. **Arroz parboilizado: situação micotoxicológica e suas relações com as condições de parboilização**. Rio Grande: FURG, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

DORS, G. C.; PINTO, R. H.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, *in press*, 2008.

DOYLE, M. E. *Fusarium* Mycotoxins. **Food Research Institute**. University of Wisconsin.Madison; 1997.

EMATER/RS – **Classificação Comercial da Cebola**. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br>>, Acesso em 06 dez. 2007.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos – uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510p.

FAN, J. J.; CHEN, J. H. Inhibition of Aflatoxin-producing fungi by Welsh onion extracts. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 4, p. 414-417, 1999.

FAO - **Produção mundial de grãos e arroz**. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/j3877e/j3877e05.htm>, Acesso em: 14 out. 2007.

FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago., 2006.

FONSECA, H. **Micotoxinas on line**. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 21 out. 2007.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de Tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 4, n. 24, 657-663, 2004.

GOLDMAN, I. L.; KOPELBERG. M.; DEBAENE JEP; SCHWARTZ B. S. Antiplatele activity in onion (*Allium cepa L.*) is sulfur dependent, **Thrombosis and Haenostasis**, v. 76, n 3, p. 450-452, 1996.

GONG- YUANSSHENG; YAO-HUIYUAN. Purification and identification of gamma-oryzanol from rice bran. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, v.16, p. 30-34, 2001.

GOWDA, N. K. S.; MALATHI, V.; SUGANTHI, R. U. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. **Animal Feed Science Technology**, n. 116, p. 281-291, 2004.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 209-234, 1995.

GRIFFIN, David H. **Fungal Physiology**. 2^a edition, 458 pág., 1994.

HAQ, I.; ALI, S. e IQBAL, J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 921-924, 2003.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro**. Barcelona. Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.

HENNEQUIN, C.; ABACHIN, E.; SYMOENS, F.; LAVARDE, V.; REBOUX, G.; NOLARD, N.; BERCHE, P. Identification of *Fusarium* Species Involved in Human Infections by 28S rRNA Gene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3586-3589, 1999.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S.W. Increase in *Chorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

IMEH, U.; KHOKBAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6301-6306, 2002.

IRGA. **Arroz: um alimento nobre e econômico**. Disponível em: <www.irga.rs.gov.br/coma-arroz/paginas/nutrição.php>. Acesso em: 3 set. 2007.

JAYASHREE, T.; SUBRAMAYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology Med.**, v. 29, p. 981-985, 2000.

JORGE, P, A, R.; NEYRA, R, M, O.; ALMEIDA, E.; BRAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lipídios plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endoelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring micotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 683-687, 2002.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agric. Food Chem.**, n. 47, 3954-3962, 1999.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, n. 81, p. 321-326, 2003.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**, v. 2, n. 50, p. 213-218, 1999.

- KIZIL, S.; SOGUT, T. Investigation of antibacterial effects of spices. **Crop Research**, v. 3, p. 86-90, 2003.
- LEAL, P. C.; CANTANHEDE, K. L.; SILVA, L. M.; BEZERRA, G. F. B; VIANA, G. M. C.; NASCIMENTO, M. S. B. Micotoxinas do *Fusarium* e seu potencial carcinogênico. **Revista Newslab**, edição 70, 2005.
- LEMOS, M. R. J.; SOARES, L. A. S. Farelo de arroz: um subproduto em estudo. **Revista Óleos & Grãos**, p. 40-47, nov-dez, 1999.
- LEMOS, M. R. J. & SOUZA-SOARES, L. A. Arroz e seus produtos e subprodutos na região sul do Brasil. **Vetor**, v. 10, p. 21-36, 2000.
- LIMA, C. A. P.; ORSI, R. B.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycoflora and aflatoxigenic in derivatives of milled rice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 20, p. 37-39, jan/abr., 2000.
- LIMA, V, L, A, G.; MELO, E, A.; MACIEL, M, A, S.; SILVA, B, S, G.; LIMA, D, E, S.. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (vignaradiatal). **Revista Nutrição**, v. 17, n. 1, 2004.
- MALMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. **Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213-224, 2006.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, n. 67: p. 187-195, 2001.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIOGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrucion*, v. 50, n. 1, 2000.
- MARTINS, I. G. **Secagem de cebola (*Allium cepa* L.) em leito de jorro: operação do equipamento e características do produto final**. Rio Grande: FURG, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2003.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 36, p. 1-11, 2002.

- MENEZES, T. J. B. Fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, 1992.
- MESSIAS, R. S. Fracionamento enzimático do farelo de arroz parboilizado integral (**Dissertação de mestrado**). Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, FURG, RS, 2003.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 31, p. 326-428, 1959.
- MOSS, O. M. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 73, p. 80S-88S; 1992.
- MYTLE N., ANDERSON G. L., DOYLE M.P., SMITH M.A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**. v. 17, p. 102-107, 2004.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). **Journal of Chromatography A**, n. 1054, p. 95-111, 2004.
- NAIDU, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press, 2000.
- NAVES, M, M, V. Características químicas e nutricionais do arroz. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 51-60, jan./jun., 2007.
- NEMEC, T.; JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 201-205, 1997.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2° ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
- NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO, P. H.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, n. 94, p. 329-334, 2004.
- NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos, SBCTA**, v. 2, n. 23, p. 190-194, 2003.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu desenvolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v. 4, n. 31, 1997.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. P.; COSTA, F. B. Plantas Tóxicas - conhecimento e prevenção de acidentes. Pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), 2006.

OLIVEIRA, M. S. **Inibição do crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos**. Rio Grande: FURG, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the cereals industry. **Journal Food Technology**, v.17, p. 1-9, 1982.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R. SOARES-COSTA, L. A.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. N.; PICCOLI, R. H. inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PHAY, N.; HIGASHIYAMA, T.; TSUJIB, M.; MATSUURA, H.; FUKUSHI, Y.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. An antifungal compound from roots os Welsh onion. **Phytochemistry**, n. 52, p. 271-274, 1999.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo, Editora Varela; 2005.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2ªed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593p.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O.; Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. Curitiba, **B. CEPPA**, v. 19, n. 2, 2001.

PRENZLER, M, S.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, n. 73, p. 73, 84, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p.635-648, 2004.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos – volume 1**. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 2004. 603p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos – volume 2**. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 2002. 226p.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KAHKONEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.

QUEIROZ, M. L. S.; BIANCOLETTO, C.; VALADARES, M. C.; DANTAS, D. C. M.; SANTOS, L. M. B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines productions in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacol immunotoxicol**, n. 24, p. 483-496, 2002.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 74, p. 89-96, 2001.

RADMANN, E.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M.; CERQUEIRA, V. **Produção e extração de ácidos graxos a partir de microalgas**. Rio Grande: FURG, 2004. Projeto de graduação (Engenharia de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2004.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, n. 56, p. 3-12, 2000.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, n.15, p. 479-483, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 5^a ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S. A.**, 1996. 728p.

RICCI, D.; FRATERNALE, D.; GIAMPERI, L.; BUCCHINI, A.; EPIFANO, F.; BURINI, G.; CURINI, M. Chemical composition antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils of *Teucrium marum* (*Lamiaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 195-200, 2005.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed, Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SABINO, M. **Micotoxinas em Alimentos**. In: **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

SAMSON, R. A.; REENEN-HOEKSTRA, E. S. Introduction to Food-Borne Fungi. Es. **Centraalbureau Voor Schimmelcultures**, 299p, 1988.

SANCHEZ, E.; HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. **International Journal of Food Microbiology**, 2004, in press.

SANTOS, K. A.; FREITAS, R. J. S. Cafeína e compostos fenólicos em erva-mate. Anais do VIII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos – “Alimentos, Tecnologia e Cidadania”. Resumo n°QBA402, Setembro, 2003, Curitiba/PR – Brasil.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2. n. 1. 2002.

SCHIRICKX, J. M.; RAEDTS, M. J. H.; STOUTHAMER, A. H.; VAN VERSEVELD, H. W. Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzed by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 231, p. 175-181, 1995.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R.; DALEY, E. F.; FARBER, J. M. Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. **Mycotoxin Research**, v. 8, p. 58-66; 1992.

SCUSSEL, V. M. **Atualidades em micotoxinas e armazenamento de grãos**. Ed. Florianópolis - SC, 382p., 2000.

SELVI, A.T.; JOSEPH,G. S.;JAYAPRAKASHA, G. K. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. **Food Microbiology**, n. 2, p. 455-460, 2003.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz – Composição e propriedades. **Revista Óleos & Grãos**, p. 34-42, jul-ago, 2001.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin-layer

chromatographic method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 1, n. 72, p. 22-26, 1989.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 1, n. 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M.; ROCHA e SILVA, M. H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.; ARAÚJO, P. B.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, n. 43, p.141-158, 1998.

SYDENHAM, E. & THIEL, P. G. Physicochemical Data from some selected *Fusarium* toxins. **Journal A. O. A. C. International**, v. 79, n. 6, p. 1365-1379; 1996.

TANAKA, T. Analysis of Mycotoxins. Textbook for contry focused training course: Mycotoxins Analysis for federative republic of Brazil. Hyogo International Centre Japan International Cooperation Agency: F. Y, 40 p., 2001.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 882, p. 23-28, 2000.

TANAKA, K., YAMADA, A., NODA, K., SHOYAMA, Y., KUBO, C., NOMOTO, K. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress induced ulcer. **Planta Med**, n. 63, p. 465-467, 1997.

TANAWAKI, M.; IAMANAKA, B. T.; BANHE, A. A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulps. **Journal Food Micology**, v. 2, n. 1, p. 291-302; 1999.

TANIWAKI, M.; SILVA, N. Fungos Deterioradores de Alimentos – Ocorrência e Detecção; **Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL**; 74 p.; Campinas – SP; 1996.

TANAWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção. **Núcleo de Microbiologia/ITAL**, 82 p, 2001.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, n. 56, p. 755-763, 1999.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; CUI, T.; KAYAHARA, H. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. **Journal of Chromatography A**, n. 1063, p.121-128, 2005.

TORRES, A, M.; MAU LASTOVICKA, T.; REZAALYAN, R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 35, p. 921-925, 1987.

TUBEROSO, C. L. G.; KOWALCZYK, A.; CORONEO, V.; RUSSO, M. T.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10148-10153, 2005.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza, Espanha: Editora Acribia S. A., 1995. 228p.

VASQUEZ, B. I.; FENTE, C.; FRANCO, C. M.; VASQUEZ, M. J.; CEPEDA, A. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. **International Journal of food Microbiology**, n. 67, p. 157-163, 2001.

VELUTTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, n. 89, p. 145-154, 2003.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 19, n. 46, p. 4113-4117, 1998.

VENTURINI, M.E.; BLANCO, D.; ORIA, R. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. **Journal of Food Protection**, vol.65, nº5, 834-839, 2002.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica do Arroz; In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P.; A cultura de Arroz no Brasil. Embrapa Arroz e Feijão: Goiás, 633 p., 1999.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira). Physiology, Cell-biology and Biotechnology, London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KANNO, H.; KAMINAGA, T.; IZUMIDA, M.; SAKOH, T.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. **Biol Pharm Bull**, 19 (4): 573-576, 1996.

YIN, Mei-Chin; TSAO, Shih-Ming. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Journal of Food microbiology**, n°49, p. 49-56, 1999.

YOSHISAWA, T. Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil. Training Course, p. 283, Japão, 2001.

ZDRADEK, C. P. **Otimização de crescimento dos fungos comestíveis *P.ostreatus* e *P. sajor caju* utilizando resíduos agroindustriais**. Rio Grande: FURG, 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2001.

ZHIMIN, X.; NA HUA; GODBER, J. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols and γ -orizanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride. **Journal Agric. Food Chemistry**, v. 49, p. 2077-2081, 2001.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, n. 87, 401-406, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 - Tabelas e figuras do artigo 1

Tabela 1: Valores de conteúdo de fenóis (μg fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial 2^4 e 6 pontos centrais.

Ensaio	Solvente	Intervalo descanso(min)	Rotação(G)	Tempo(min)	Fenóis(μg fenóis/g cebola)
1	Metanol	0(-1)	0,78(-1)	120(-1)	1556,6
2	Metanol	30(+1)	0,78(-1)	120(-1)	1767,6
3	Metanol	0(-1)	3,13(+1)	120(-1)	2363,6
4	Metanol	30(+1)	3,13(+1)	120(-1)	2372,4
5	Metanol	0(-1)	0,78(-1)	180(+1)	2263,2
6	Metanol	30(+1)	0,78(-1)	180(+1)	2131,4
7	Metanol	0(-1)	3,13(+1)	180(+1)	2119,6
8	Metanol	30(+1)	3,13(+1)	180(+1)	2238,5
9	Acet etl	0(-1)	0,78(-1)	120(-1)	97,1
10	Acet etl	30(+1)	0,78(-1)	120(-1)	63,1
11	Acet etl	0(-1)	3,13(+1)	120(-1)	95,1
12	Acet etl	30(+1)	3,13(+1)	120(-1)	85,3
13	Acet etl	0(-1)	0,78(-1)	180(+1)	88,9
14	Acet etl	30(+1)	0,78(-1)	180(+1)	82,4
15	Acet etl	0(-1)	3,13(+1)	180(+1)	45,9
16	Acet etl	30(+1)	3,13(+1)	180(+1)	49,3
17	Metanol	15(0)	1,76(0)	150(0)	2160,9
18	Metanol	15(0)	1,76(0)	150(0)	2101,5
19	Metanol	15(0)	1,76(0)	150(0)	2134,3
20	Acet etl	15(0)	1,76(0)	150(0)	81,6
21	Acet etl	15(0)	1,76(0)	150(0)	80,4
22	Acet etl	15(0)	1,76(0)	150(0)	81,8

Tabela 2: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico.

	Efeito	Desvio padrão	p
Média/interação	1093,66	239,5349	0,006025
(1)Solvente (L)	-2025,73	561,7592	0,015445
(2)Intervalo (L)	20,00	561,7592	0,972977
(3)Rotação (L)	164,93	561,7592	0,780870
(4)Tempo(L)	77,30	561,7592	0,895923
1L com 2L	-31,73	561,7592	0,957151
1L com 3L	-178,90	561,7592	0,763006
1Lcom 4L	-95,82	561,7592	0,871242
2L com 3L	10,32	561,7592	0,986047
2L com 4L	-24,00	561,7592	0,967576
3L com 4L	-193,07	561,7592	0,745055

Tabela 3: Valores de conteúdo de fenóis (μg fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial 2^3 e 3 pontos centrais.

Ensaio	Intervalo descanso(min)	Rotação(G)	Tempo(min)	Fenóis(μgfenóis/g de cebola)
1	0(-1)	0,78(-1)	120(-1)	1556,6
2	30(+1)	0,78(-1)	120(-1)	1767,6
3	0(-1)	3,13(+1)	120(-1)	2363,6
4	30(+1)	3,13(+1)	120(-1)	2372,4
5	0(-1)	0,78(-1)	180(+1)	2263,2
6	30(+1)	0,78(-1)	180(+1)	2131,4
7	0(-1)	3,13(+1)	180(+1)	2119,6
8	30(+1)	3,13(+1)	180(+1)	2238,5
9	15(0)	1,76(0)	150(0)	2160,9
10	15(0)	1,76(0)	150(0)	2101,5
11	15(0)	1,76(0)	150(0)	2134,3

Tabela 4: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico

	Efeito	Desvio padrão	p
Média/Interação	2109,964	8,97113	0,000018
(1)INTERVALO(L)	51,725	21,03917	0,133181
(2)ROTAÇÃO (L)	343,825	21,03917	0,003724
(3)TEMPO(L)	173,125	21,03917	0,014449
1L com 2L	12,125	21,03917	0,622622
1L com 3L	-58,175	21,03917	0,109689
2L com 3L	-362,075	21,03917	0,003359

Tabela 5: Coeficiente de regressão para as variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico

	Coef. regressão	Desvio padrão	p
Média/interação	2109,964	8,97113	0,000018
(2)Rotação(L)	171,913	10,51958	0,003724
(3)Tempo (L)	86,563	10,51958	0,014449
2L com 3L	-181,037	10,51958	0,003359

Tabela 6: Dados de ANOVA para planejamento experimental avaliando rotação, tempo e interação da rotação com o tempo

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau Liberdade	Média quadrática	Teste F	F_{tab} (95%)	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	558572,4	3	186190,8	31,1	4,35	7,15
Resíduo	41869,8	7	5981,4			
Falta de ajuste	40099,2					
Erro puro	1770,6					
Total	600442,2	10				

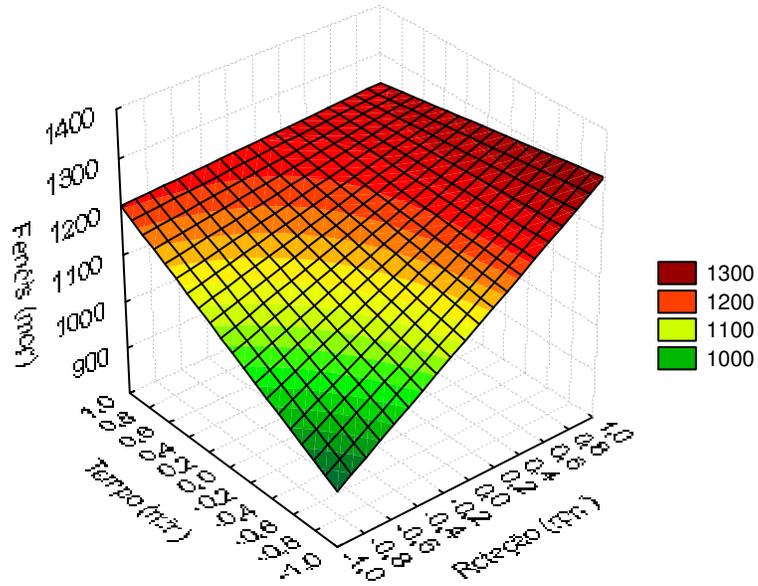
Tabela 7: Conteúdo de fenóis totais em cebola nas diferentes classes

Classes	Conteúdo (μg fenóis/ g de cebola)
Classe 2	2265,9 ^a
Classe 3	2244,3 ^b
Classe 4	2306,4 ^c
Classe 5	2282,9 ^a

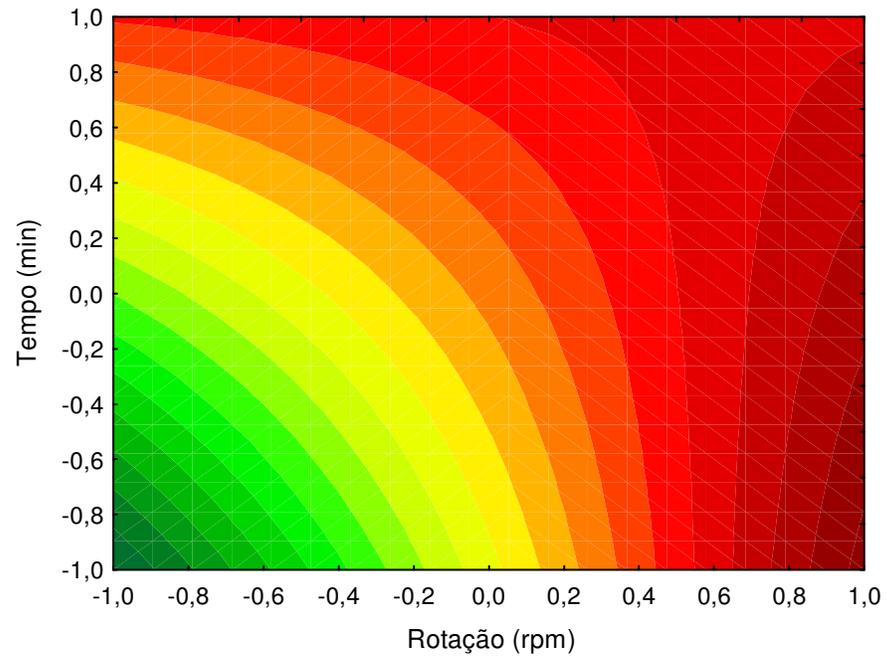
Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$)

Tabela 8: Teste de Tukey entre as variações médias dos fenóis extraídos com metanol nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	2265,9	2244,3	2306,4	2282,9
Classe 2 {1}		0,001492	0,000242	0,010301
Classe 3 {2}	0,001492		0,000231	0,000242
Classe 4 {3}	0,000242	0,000231		0,001480
Classe 5 {4}	0,010301	0,000242	0,001480	

Superfície de resposta e condições de contorno para os fenóis

(a)



(b)

Figura 1: Superfície de resposta (a) e curva de contorno para Fenóis (b).

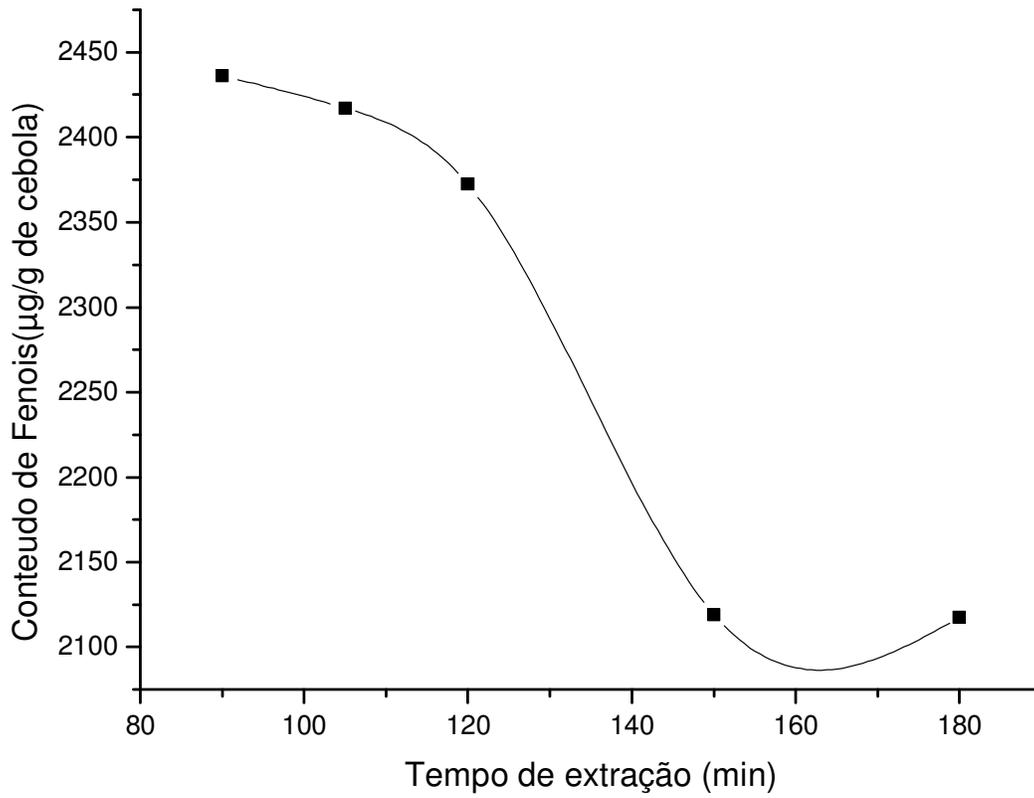


Figura 2: Cinética de rendimento de extração de fenóis por tempo

ANEXO 2 - Descrição dos procedimentos analíticos e tabelas estatísticas do Artigo 2

Determinação de açúcares em cebolas (*Allium cepa* L.) utilizando a propriedade redutora através do método de redução do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS).

Esta análise foi efetuada baseada no método de MILLER (1959), conforme as seguintes etapas:

Preparo dos reagentes:

a) Reagente de 3,5 dinitrossalicílico:

- Solução A: 13,5 g de NaOH em 300 mL de água destilada.
- Solução B: 8,8 g de DNS, 255 g de tartarato de sódio e potássio em 800 mL de água destilada (dissolver o reagente de 3,5 DNS em 400 mL de água e depois adicionar aos poucos a solução de tartarato).
- Solução C: misturar as soluções A e B.

b) Soluções de Carrez I e II:

- Carrez I: 150 g de $K_4Fe(CN)_6$, completar o volume em balão volumétrico de 1 L.
- Carrez II: 300 g de $ZnSO_4$ completar o volume em balão volumétrico de 1 L.

c) Solução estoque de glicose:

- Pesar 0,05 g de glicose padrão seca, diluir em 50 mL de água destilada, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

1ª etapa) Preparo da amostra:

- Pesar 10 gramas de cebola (seca)
- Colocar a cebola seca (10g) em béquer e adicionar 40 mL de água destilada, levando-se a banho-maria por 30 minutos a 50 °C.
- Passar a solução do béquer para balão volumétrico de 100mL, adicionar 10mL da solução de Carrez I e 10mL da solução de Carrez II, completando a seguir o volume do balão (até 100mL) com água destilada.

- Centrifugar a solução obtida (suspensão turva e floculada) até se obter a perfeita separação das fases límpida (sobrenadante) e a suspensão turva e floculada (precipitado).
- Recolher o sobrenadante em proveta e tomar nota do volume obtido, o que se constituirá no volume da amostra preparada para os ensaios de hidrólise ácida (VOLUME DA AMOSTRA PREPARADA).

2ª etapa) Determinação da curva padrão de glicose:

Preparar uma solução estoque de $0,5 \text{ mg. mL}^{-1}$ de glicose padrão seca (levada a estufa e dessecador).

Num conjunto de 10 tubos de ensaio, transferir 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL e 1 mL para cada tubo e, em seguida, adicionar água destilada elevando o volume a 1 mL. Na seqüência, adicionar 1 mL da solução do ácido 3,5 dinitrossalicílico a estes, como também ao branco da determinação. Colocar os tubos de ensaio em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Finalizado o período, retirar os tubos de ensaio e adicionar 8 mL de água destilada em cada tubo e esfriar rapidamente. Realizar as leituras das respectivas absorvâncias em espectrofotômetro a 546 nm.

3ª etapa) Hidrólise ácida dos açúcares contidos na amostra preparada:

Num conjunto de 6 tubos de ensaio transferir 1 mL da solução obtida na primeira etapa, adicionar 1 mL de HCl 2N (também ao branco) e levar a banho-maria (100°C) por 40 minutos. Adicionar 1 mL de NaOH 2N a todos os tubos.

4ª etapa) Determinação dos açúcares redutores totais:

Após a hidrólise ácida aplicar o mesmo tratamento dado as alíquotas da solução de glicose preparadas para a determinação da curva padrão, ou seja, adicionar 1 mL da solução do ácido 3,5 dinitrossalicílico a todos os tubos incluindo uma prova em branco. Colocar os tubos de ensaio em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Finalizado o período, colocar 6 mL de água destilada em cada tubo, esfriar rapidamente sob água corrente ler as absorvâncias das amostras analíticas em espectrofotômetro a 546 nm.

Determinação de proteínas em tecidos vegetais, segundo método de Kjeldahl

Preparo dos reagentes:

a) Padronização do HCl

- Colocar 2g de Na_2CO_3 para secar em estufa a 300°C por 1 hora;
- Pesar 0,15g e adicionar 25 mL de água (fazer quadruplicata deste procedimento);
- Adicionar 4 gotas de indicador misto;

OBS: o indicador misto é mistura das soluções alcoólicas de vermelho de metila 0,1% e vermelho de bromocresol 0,1%, proporção 1:1.

- Titular com HCl 0,1N

Cálculo do fator de correção:

$$\text{Fator} = \frac{P_c \times 1000}{V \times 5,2995}$$

P_c = peso do carbonato
 V = volume gasto de HCl

b) Ácido bórico 4%

- Pesar 40 g de ácido bórico e levar a uma balão de 1000 mL completando o volume com água destilada.

c) Hidróxido de Sódio 40%

- Pesar 400 g de hidróxido de sódio e diluir em um béquer aos poucos com água destilada (em banho de gelo), transferir para um balão volumétrico de 1L e completar o volume com água destilada.

Procedimento de digestão e destilação:

Em um tubo de digestão colocar 0,2 g de amostra embrulhada em papel de seda ou filtro, juntar 0,7 g de catalisador (3 g de sulfato de potássio e 0,03 g de selênio em pó). Adicionar 3 mL de peróxido de hidrogênio e 7 mL de ácido sulfúrico (adicionar o ácido aos poucos). Colocar os tubos em um bloco digestor e efetuar a digestão a quente até a solução se tornar clara. Após esta etapa, esfriar a solução a temperatura ambiente.

Destilar em um destilador de arraste a vapor todo o conteúdo do digerido passando para o recipiente coletor do destilador. Adicionar 50 mL de NaOH 40%, para conferir a neutralidade do meio adicionar 3 gotas de indicador de fenolftaleína na mistura. Recolher o destilado em um erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico 4% (adicionado de 4 gotas de indicador misto), coletar 125 mL e titular com HCl 0,1N padronizado até viragem do indicador.

Determinação de Cinzas

Tarar o cadinho de porcelana e pesar 3 g da amostra seca ou com teor de umidade inferior a 30%. Efetuar em seguida a calcinação da amostra em capela. Terminada esta etapa, transferir o cadinho para uma mufla (550 °C) e deixar até que as cinzas estejam brancas. Desligar a mufla e quando estiver a 250 °C retirar o cadinho, colocar em dessecador, deixar esfriar até temperatura ambiente e pesar. Pesquisar o conjunto amostra + cadinho, retornando a mufla para conferir a constância de peso. Calcular a relação percentual entre a massa final e a massa inicial da amostra.

Determinação de fibra bruta

- Pesquisar 2 g de amostra conforme o teor de fibra bruta estimada em relação a amostra analisada (consultar a literatura ou pelos teores dos componentes maiores);
- Adicionar 200 mL de ácido sulfúrico 1,25% em ebulição (sistema de refluxo) e algumas gotas de solução anti-espumante (álcool amílico/ isoamílico – 5 gotas).
- Deixar em refluxo por exatamente 30 minutos;
- Filtrar quantitativamente sob vácuo em funil de Buchner provido de tela de náilon, ou poliéster, ou aço inox, ou cadinho de vidro sintetizado em sistema automático de filtração;
- Lavar o resíduo com água fervente até completa neutralização;
- Passar o resíduo quantitativamente para o erlenmeyer já usado, lavando a tela ou o recipiente filtrante com 200 mL de NaOH 1,25N em ebulição, adicionar algumas gotas de solução anti-espumante;
- Deixar em refluxo por exatamente 30 minutos;
- Filtrar diretamente em cadinho de vidro sintetizado ou no sistema filtrante adotado utilizando água destilada para a transferência;
- Lavar com aproximadamente 20 mL de álcool etílico ou acetona e 20 mL de acetona ou éter de petróleo;
- Colocar em estufa a 105 °C até peso constante (4 a 6 horas), retirar, deixar em dessecador até temperatura ambiente e pesar;

- Queimar em mufla a 560 °C por 3 horas (colocar o cadinho na mufla ainda fria e então iniciar o aquecimento);
- Desligar a mufla e quando estiver a 250 °C retirar o cadinho, colocar em dessecador, deixar esfriar até temperatura ambiente e pesar;

Determinação de lipídios em cebola, farelo de arroz e chlorella - Método de Bligh & Dyer (1959) adaptado.

- Pesar 10 gramas da amostra (até 10% de umidade);
- Colocar a amostra em um erlenmeyer de 250mL e adicionar 50mL de metanol, 25mL de clorofórmio e 30mL de água,
- Tampar o erlenmeyer e coloca-lo sob agitação rigorosa em mesa agitadora por 20 minutos,
- Em seguida, adicionar mais 25 mL de clorofórmio e 25 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%,
- Agitar a mistura por mais 4 minutos,
- Filtrar,
- Transferir o filtrado para um funil de separação, onde ocorrerá a formação do sistema bifásico,
- Agitar e deixar em repouso por 5 minutos,
- Remover a camada inferior (que contém os lipídeos) para um erlenmeyer de 125mL,
- Medir o volume da camada inferior, Valor: _____
- Retirar uma alíquota de 6mL e transferir para uma balão de fundo chato para a quantificação dos lipídeos totais,
- Evaporar o solvente em rotaevaporador e colocar o balão em estufa com circulação de ar a 50 °C por 1 hora e 30 minutos,
- Retirar da estufa e colocar o balão em dessecador para resfriar por 20 minutos,
- Pesar o balão com a amostra em balança analítica;
- Estimar o conteúdo de lipídios em percentual relativo massa inicial da amostra e/ou volume de clorofórmio obtido.

Metodologia para determinação de fenóis totais na cebola

Curva padrão de quercetina

Preparo dos reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman nº1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.

- Solução padrão de quercetina: pesar 0,01 g de solução padrão de quercetina e diluir com metanol, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com metanol.

A partir de uma solução padrão de quercetina $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguir o procedimento da Tabela 1.

Tabela 1: Procedimento da curva padrão de quercetina

Tubo	Quercetina (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a 40°C por 15 minutos, em seguida adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (em água), ler a absorbância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 750nm.

- Fazer triplicata para todos os tubos.

Procedimento de determinação de fenóis totais em cebola

- Pesar 10g de cebola com 13% de umidade;
- Adicionar 50 mL de solvente (metanol ou acetato de etila ou água);
- Agitar a temperatura ambiente em mesa agitadora da marca TECNAL durante duas horas a 3,13 G;
- Filtrar para balão de fundo chato e evaporar o solvente;
- Ressuspender os resíduos do balão com 40 mL de água e agitar em banho ultra som durante 5 minutos;
- Clarificar o extrato com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;
- Deixar em repouso durante 20 minutos e filtrar para um balão volumétrico de 100mL completando o volume com água;

Quantificação dos fenóis totais em cebola

Tomar 4 tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato. Completar o volume de 1mL com água. Adicionar 4,5 mL da solução alcalina (Tabela 1) e deixar 15 minutos em banho-maria a 40°C. Em seguida adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2, deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente e realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 750nm. Fazer triplicata para todas as leituras.

Metodologia para determinação de fenóis totais em farelo de arroz

Curva padrão de ácido ferúlico

Preparo dos reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman nº1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.
- Solução padrão de quercetina: pesar 0,01 g de solução padrão de ácido ferúlico e diluir com metanol, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com metanol.

A partir de uma solução padrão de ácido ferúlico $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguir o procedimento da Tabela 2.

Tabela 2: Procedimento da curva padrão de ácido ferúlico

Tubo	Ácido Ferúlico (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a 40°C por 15 minutos, em seguida adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:2 (em água), ler a absorvância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 750nm.

- Fazer triplicata para todos os tubos.

Preparo de Amostra de farelo de arroz para determinação de conteúdo fenólico

- Pesar 10g de farelo de arroz com 10% de umidade;

- Adicionar 40 mL de metanol;

- Agitar a temperatura ambiente em mesa agitadora durante duas horas a 3,13 G;

- Interromper a agitação por 15 minutos e reiniciar, após a adição de 10 mL de metanol, durante 1 hora;

- Filtrar e passar o extrato para um funil de separação e lavar três vezes com 10 mL de hexano;

- Transferir o filtrado para balão de fundo chato e evaporar o solvente;

- Ressuspender os resíduos do balão com 40 mL de água e agitar em banho ultra som durante 5 minutos;

- Clarificar o extrato com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;
- Deixar em repouso durante 20 minutos e filtrar para um balão volumétrico de 100mL completando o volume com água;

Quantificação dos fenóis totais no farelo de arroz

Tomar 4 tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato ressuspenso em água. Completar o volume dos frascos até 1mL com água. Adicionar 4,5 mL da solução alcalina e deixar 15 minutos em banho-maria a 40°C. Em seguida adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2, deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente e realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 750nm. Fazer triplicata para todas as leituras.

Metodologia para determinação de fenóis totais na microalga chlorella

Curva padrão de tirosina

Preparo dos reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman nº1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.
- Solução padrão de tirosina: pesar 0,01 g de solução padrão de tirosina e diluir com água destilada, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

A partir de uma solução padrão de tirosina $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, seguir o procedimento da Tabela 3.

Tabela 3: Procedimento da curva padrão de tirosina

Tubo	Tirosina (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a 40°C por 15 minutos, em seguida adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:2 (em água), ler a absorbância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 660nm.

- Fazer triplicata para todos os tubos.

Preparo de amostra analítica de chlorella para determinação de fenóis totais

- Pesar 5g de microalga chlorella com 4% de umidade;

- Adicionar 30 mL de metanol;

- Agitar a temperatura ambiente em mesa agitadora durante uma hora, com agitação de 3,13 G;

- Interromper a agitação por 15 minutos e reiniciar, após a adição de 20 mL de metanol, durante 1 hora;

- Filtrar, passar o extrato para um funil de separação e lavar cinco vezes com 10 mL de hexano;

- Transferir o filtrado para balão de fundo chato e evaporar o solvente;

- Ressuspender os resíduos do balão com 40 mL de água e agitar em banho ultra som durante 5 minutos;

- Clarificar o extrato com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;

- Deixar em repouso durante 20 minutos e filtrar para um balão volumétrico de 100mL completando o volume com água;

Quantificação dos fenóis totais na microalga chlorella

Tomar 4 tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato anteriormente obtido. Completar o volume até 1mL com água em cada tubo. Adicionar 4,5 mL da solução alcalina (Tabela 1) e deixar 15 minutos em banho-maria a 40°C. Em seguida adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2, deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente e realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 750 nm. Fazer triplicata para todas as leituras.

Tabelas estatísticas utilizadas no artigo 2

Tabela 4: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de proteínas nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,86	1,04	0,98	0,91
Classe 2 {1}		0,000247	0,001148	0,066115
Classe 3 {2}	0,000247		0,024712	0,000659
Classe 4 {3}	0,001148	0,024712		0,040262
Classe 5 {4}	0,066115	0,000659	0,040262	

Tabela 5: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de umidade nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	88,5	88,4	88,3	88,6
Classe 2 {1}		0,742886	0,414172	0,975579
Classe 3 {2}	0,742886		0,925364	0,517532
Classe 4 {3}	0,414172	0,925364		0,250366
Classe 5 {4}	0,975579	0,517532	0,250366	

Tabela 6: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de fibra bruta nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,61	0,62	0,70	0,70
Classe 2 {1}		0,768002	0,000265	0,000299
Classe 3 {2}	0,768002		0,000334	0,000428
Classe 4 {3}	0,000265	0,000334		0,913114
Classe 5 {4}	0,000299	0,000428	0,913114	

Tabela 7: Teste de Tukey entre as variações médias dos teores de cinzas nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,75	0,73	0,76	0,75
Classe 2 {1}		0,805738	0,929411	0,998739
Classe 3 {2}	0,805738		0,480690	0,727349
Classe 4 {3}	0,929411	0,480690		0,967898
Classe 5 {4}	0,998739	0,727349	0,967898	

Tabela 8: Teste de Tukey entre as variações médias de pH nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	5,23	5,08	5,2	5,16
Classe 2 {1}		0,008279	0,800907	0,257290
Classe 3 {2}	0,008279		0,27407	0,129869
Classe 4 {3}	0,027407	0,800907		0,693342
Classe 5 {4}	0,129869	0,257290	0,693342	

Tabela 9: Teste de Tukey entre as variações médias nos teores de carboidratos nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	3,73	5,27	4,76	4,67
Classe 2 {1}		,000230	,000230	,000231
Classe 3 {2}	,000230		,000518	,000300
Classe 4 {3}	,000518	,000230		,585017
Classe 5 {4}	,000300	,000231	,585017	

Tabela 10: Teste de Tukey entre as variações médias nos teores de lipídios nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,17	0,18	0,19	0,16
Classe 2 {1}		,656793	,164718	,445340
Classe 3 {2}	,656793		,656793	,095337
Classe 4 {3}	,656793	,164718		,018608
Classe 5 {4}	,095337	,445340	,018608	

Tabela 11: Teste de Tukey entre as variações médias nos teores de acidez nas diferentes classes de cebola.

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,31	0,38	0,31	0,29
Classe 2 {1}		,001550	1,000000	,037275
Classe 3 {2}	,001550		,001550	,000263
Classe 4 {3}	,001550	1,000000		,037275
Classe 5 {4}	,000263	,037275	,037275	

ANEXO 3 – Tabelas estatísticas do artigo 3

Tabela 1: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos vegetais no 3º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	1,81	0,93	0,75	1,30	1,20	1,00	0,93	1,26	0,93	1,18	1,05
Controle{1}		,000151	,000151	,000200	,000152	,000151	,000151	,000164	,000151	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	,000151		,730881	,007934	,141928	,999963	1,00000	,022284	1,00000	,226980	,979397
C.MeOH_2{3}	,000151	,730881		,000163	,000727	,244209	,723513	,000198	,723513	,001317	,064582
C.H ₂ O_1{4}	,000200	,007934	,000163		,996636	,060533	,008188	1,00000	,008188	,980838	,232051
C.H ₂ O_2{5}	,000152	,141228	,000727	,996636		,548982	,145466	,999969	,145466	1,0000	,908630
C.acet_1{6}	,000151	,999963	,244209	,060533	,548982		,999969	,145466	,999969	,706079	,999969
C.acet_2{7}	,000151	1,00000	,723513	,008188	,145466	,999969		,022985	1,00000	,232051	,980838
F.arroz_1{8}	,000164	,022284	,000198	1,0000	,999969	,145466	,022985		,022985	,999287	,445334
F.arroz_2{9}	,000151	1,00000	,723513	,008188	,145466	,999969	1,00000	,022985		,232051	,980838
Chlorel_1{10}	,000151	,226980	,001317	,980838	1,0000	,706079	,232051	,999287	,232051		,969665
Chlorel_2{11}	,000151	,979397	,064582	,232051	,908630	,999969	,980838	,445334	,980838	,969665	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 2: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos vegetais no 5º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	2,9	1,71	1,50	2,31	2,10	1,75	1,60	1,88	1,62	1,74	1,45
Controle{1}		,0002	,0002	,0002	,0002	,0002	,0002	,0002	,0002	,0002	,0002
C.MeOH_1{2}	,0002		,4315	,0002	,0031	1,000	,9887	,6970	,9988	1,000	,1693
C.MeOH_2{3}	,0002	,4315		,0002	,0002	,1639	,9959	,0032	,9739	,2194	1,000
C.H ₂ O_1{4}	,0002	,0002	,0002		,4391	,0002	,0002	,0011	,0002	,0002	,0002
C.H ₂ O_2{5}	,0002	,0031	,0002	,4391		,0137	,0002	,4290	,0003	,0093	,0002
C.acet_1{6}	,0002	1,000	,1639	,0002	,0137		,8428	,9508	,9428	1,000	,0497
C.acet_2{7}	,0002	,9887	,9959	,0002	,0002	,8428		,0707	1,000	,9064	,9064
F.arroz_1{8}	,0002	,6970	,0032	,0011	,4290	,9508	,0707		,1275	,9064	,0008
F.arroz_2{9}	,0002	,9988	,9739	,0002	,0003	,9428	1,000	,1275		,9733	,7806
Chlorel_1{10}	,0002	1,000	,2194	,0002	,0093	1,000	,9064	,9064	,9733		,0707
Chlorel_2{11}	,0002	,1693	1,000	,0002	,0002	,0497	,9064	,0008	,7806	,0707	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 3: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos vegetais no 7º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	3,97	2,36	2,00	3,16	2,76	2,63	2,43	2,54	2,34	1,85	1,55
Controle{1}		,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	,000151		,19230	,000151	,007360	,231982	,999989	,815181	1,00000	,000363	,000151
C.MeOH_2{3}	,000151	,019230		,000151	,000151	,000153	,002753	,000214	,035342	,953800	,001993
C.H ₂ O_1{4}	,000151	,000515	,000151		,007360	,000245	,000151	,000154	,000151	,000151	,000151
C.H ₂ O_2{5}	,000151	,007360	,000151	,007360		,975722	,047837	,504282	,003851	,000151	,000151
C.acet_1{6}	,000151	,231982	,000153	,000245	,975722		,667692	,999603	,144166	,000151	,000151
C.acet_2{7}	,000151	,999989	,002753	,000151	,047837	,667692		,995601	,999620	,000170	,000151
F.arroz_1{8}	,000151	,815181	,000214	,000154	,504282	,999603	,995601		,670086	,000151	,000151
F.arroz_2{9}	,000151	1,00000	,035342	,000151	,003851	,144166	,999620	,670086		,000585	,000151
Chlorel_1{10}	,000151	,000362	,953800	,000151	,000151	,000151	,000170	,000151	,000585		,117072
Chlorel_2{11}	,000151	,000151	,001993	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,110722	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 4: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos vegetais no 14º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	6,84	3,83	2,71	5,75	5,81	5,17	4,51	4,60	3,61	2,20	1,40
Controle{1}		0,000151	,000151	,000151	,000152	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	0,000151		,000151	,000151	,000151	,000151	,002813	,000565	,950525	,000151	,000151
C.MeOH_2{3}	0,000151	0,000151		,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000169	,055502	,000151
C.H ₂ O_1{4}	0,000151	0,000151	,000151		1,00000	,016246	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.H ₂ O_2{5}	0,000151	0,000151	,000151	1,0000		,006013	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.acet_1{6}	0,000151	0,000151	,000151	,016246	,006013		,003190	,017263	,000151	,000151	,000151
C.acet_2{7}	0,000151	,002813	,000151	,000151	,000151	,003190		,013529	,000151	,000151	,000151
F.arroz_1{8}	0,000151	,000565	,000151	,000151	,000151	,017263	,999998		,000169	,000151	,000151
F.arroz_2{9}	0,000151	,950525	,000169	,000151	,000151	,000151	,000169	,000153		,000151	,000151
Chlorel_1{10}	0,000151	,000151	,055502	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151		,000342
Chlorel_2{11}	0,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	0,000342	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 5: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus flavus* em presença dos extratos vegetais no 3º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	2,55	1,31	0,77	1,91	2,04	2,11	1,85	1,32	1,07	1,75	1,44
Controle{1}		,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	,000151		,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	1,00000	,005065	,000151	,421678
C.MeOH_2{3}	,000151	,000151		,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000254	,000151	,000151
C.H ₂ O_1{4}	,000151	,000151	,000151		,492002	,038025	,995174	,000151	,000151	,137742	,000151
C.H ₂ O_2{5}	,000151	,000151	,000151	,492002		,992004	,044511	,000151	,000151	,000338	,000151
C.acet_1{6}	,000151	,000151	,000151	,038025	,992004		,001506	,000151	,000151	,000153	,000151
C.acet_2{7}	,000151	,000151	,000151	,995174	,044511	,001506		,000151	,000151	,809470	,000151
F.arroz_1{8}	,000151	1,00000	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151		,003001	,000151	,547729
F.arroz_2{9}	,000151	,005065	,000254	,000151	,000151	,000151	,000151	,003001		,000151	,000152
Chlorel_1{10}	,000151	,000151	,000151	,137742	,000338	,000153	,809470	,000151	,000151		,000206
Chlorel_2{11}	,000151	,421678	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,547729	,000152	,000206	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 6: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus flavus* em presença dos extratos vegetais no 5º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	4,57	2,50	2,06	3,28	3,76	3,45	3,16	2,32	2,03	2,71	2,28
Controle{1}		,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	,000151		,000155	,000151	,000151	,000151	,000151	,272150	,000151	,155540	,093945
C.MeOH_2{3}	,000151	,000155		,000151	,000151	,000151	,000151	,02033	1,00000	,000151	,085652
C.H ₂ O_1{4}	,000151	,000151	,000151		,000151	,391828	,887098	,000151	,000151	,000151	,000151
C.H ₂ O_2{5}	,000151	,000151	,000151	,000151		,003009	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.acet_1{6}	,000151	,000151	,000151	,391828	,003009		,006896	,000151	,000151	,000151	,000151
C.acet_2{7}	,000151	,000151	,000151	,887098	,000151	,006896		,000151	,000151	,000153	,000151
F.arroz_1{8}	,000151	,272150	,024033	,000151	,000151	,000151	,000151		,006010	,000215	1,00000
F.arroz_2{9}	,000151	,000151	1,00000	,000151	,000151	,000151	,000151	,006010		,000151	,024033
Chlorel_1{10}	,000151	,155540	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000215	,000151		,000162
Chlorel_2{11}	,000151	,093945	,085652	,000151	,000151	,000151	,000151	1,0000	,024033	,000162	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 7: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus flavus* em presença dos extratos vegetais no 7º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	5,55	3,85	3,47	4,94	4,83	4,62	4,35	3,55	3,02	3,60	2,90
Controle{1}		,000151	,000151	,000515	,000166	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	,000151		,101623	,000151	,000151	,000154	,006746	,382864	,000151	,676265	,000151
C.MeOH_2{3}	,000151	,101623		,000151	,000151	,000151	,000151	,999994	,019061	,997570	,001362
C.H ₂ O_1{4}	,000515	,000151	,000151		,999620	,290642	,000890	,000151	,000151	,000151	,000151
C.H ₂ O_2{5}	,000166	,000151	,000151	,999620		,873924	,011660	,000151	,000151	,000151	,000151
C.acet_1{6}	,000151	,000154	,000151	,290642	,873924		,538672	,000151	,000151	,000151	,000151
C.acet_2{7}	,000151	,006746	,000151	,000890	,011660	,538672		,000152	,000151	,000158	,000151
F.arroz_1{8}	,000151	,382864	,999994	,000151	,000151	,000151	,000152		,002978	1,00000	,000294
F.arroz_2{9}	,000151	,000151	,019061	,000151	,000151	,000151	,000151	,002978		,000916	,999516
Chlorel_1{10}	,000151	,676265	,997570	,000151	,000151	,000151	,000158	1,0000	,000916		,000184
Chlorel_2{11}	,000151	,000151	,001362	,000151	,000151	,000151	,000151	,000294	,999516	,000184	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 8: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus flavus* em presença dos extratos vegetais no 14º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
Médias	8,40	6,81	6,77	6,70	6,60	5,98	6,03	7,04	5,77	5,01	4,24
Controle{1}		,049699	,040570	,026763	,014880	,000418	,000519	,160586	,000206	,000151	,000151
C.MeOH_1{2}	,049699		1,00000	1,00000	1,00000	,847407	,844019	1,00000	,547647	,014880	,000235
C.MeOH_2{3}	,040570	1,00000		1,00000	1,00000	,884846	,923733	,999999	,604005	,018488	,000261
C.H ₂ O_1{4}	,026763	1,00000	1,00000		1,00000	,941521	,965396	,999975	,714126	,028348	,000345
C.H ₂ O_2{5}	,014880	1,00000	1,00000	1,00000		,982942	,991764	,999430	,843714	,049699	,000536
C.acet_1{6}	,000418	,847407	,884846	,941521	,982942		1,00000	,522188	1,00000	,639710	,020388
C.acet_2{7}	,000519	,894019	,923733	,965396	,991764	1,00000		,593757	,999999	,568121	,015482
F.arroz_1{8}	,160586	1,00000	,999999	,999975	,999430	,522188	,593757		,242913	,003652	,000165
F.arroz_2{9}	,000206	,547647	,604005	,714126	,843714	1,00000	,999999	,242913		,905534	,067492
Chlorel_1{10}	,000151	,014880	,018488	,028348	,049699	,639710	,568121	,003652	,905534		,899880
Chlorel_2{11}	,000151	,000235	,000261	,000345	,000536	,020388	,015482	,000165	,067492	,899880	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; C.acet = aceto-etílico de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 9: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Fusarium graminearum* em presença dos extratos vegetais no 3º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
Médias	2,12	1,22	1,93	1,01	0,65	0,87	1,59	0,59	0,10
Controle{1}		,000174	,465709	,000174	,000174	,000174	,000413	,000174	,000174
C.MeOH_1{2}	,000174		,000175	,324047	,000254	,016575	,009541	,000193	,000174
C.H ₂ O_1{3}	,465709	,000175		,000174	,000174	,000174	,22671	,000174	,000174
F.arroz_1{4}	,000174	,324047	,000174		,013082	,781484	,000234	,002960	,000174
Chlorel_1{5}	,000174	,000254	,000174	,013082		,272555	,000174	,997466	,000291
C.MeOH_2{6}	,000174	,016575	,000174	,781484	,272555		,000175	,076447	,000174
C.H ₂ O_2{7}	,000413	,009541	,022671	,000234	,000174	,000175		,000174	,000174
F.arroz_2{8}	,000174	,000193	,000174	,002960	,997466	,076447	,000174		,000713
Chlorel_2{9}	,000174	,000174	,000174	,000174	,000291	,000174	,000174	,000713	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 10: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Fusarium graminearum* em presença dos extratos vegetais no 5º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
Médias	3,88	2,14	3,24	1,95	1,31	1,01	3,00	1,26	0,72
Controle{1}		,000174	,000407	,000174	,000174	,000174	,000175	,000174	,000174
C.MeOH_1{2}	,000174		,000174	,679346	,000177	,000174	,000175	,000175	,000174
C.H ₂ O_1{3}	,000407	,000174		,000174	,000174	,000174	,418723	,000174	,000174
F.arroz_1{4}	,000174	,679346	,000174		,000392	,000174	,000174	,000263	,000174
Chlorel_1{5}	,000174	,000177	,000174	,000392		,167724	,000174	,999965	,000811
C.MeOH_2{6}	,000174	,000174	,000174	,000174	,167724		,000174	,337426	,196783
C.H ₂ O_2{7}	,000175	,000175	,418723	,000174	,000174	,000174		,000174	,000174
F.arroz_2{8}	,000174	,000175	,000174	,000263	,999935	,337426	,000174		,001800
Chlorel_2{9}	,000174	,000174	,000174	,000174	,000811	,196783	,000174	,001800	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 11: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Fusarium graminearum* em presença dos extratos vegetais no 7º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
Médias	5,08	2,90	4,28	2,60	1,76	1,03	3,91	1,89	0,89
Controle{1}		,000174	,000176	,000174	,000174	,000174	,000174	,000174	,000174
C.MeOH_1{2}	,000174		,000174	,118382	,000174	,000174	,000174	,000174	,000174
C.H ₂ O_1{3}	,000176	,000174		,000174	,000174	,000174	,030286	,000174	,000174
.arroz_1{4}	,000174	,118382	,000174		,000175	,000174	,000174	,000198	,000174
Chlorel_1{5}	,000174	,000174	,000174	,000175		,000183	,000174	,912281	,000174
C.MeOH_2{6}	,000174	,000174	,000174	,000174	,000183		,000174	,000174	,888409
C.H ₂ O_2{7}	,000174	,000174	,030286	,000174	,000174	,000174		,000174	,000174
F.arroz_2{8}	,000174	,000174	,000174	,000198	,912281	,000174	,000174		,000174
Chlorel_2{9}	,000174	,000174	,000174	,000174	,000174	,888409	,000174	,000174	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

Tabela 12: Teste de DMS entre os diâmetros médios de crescimento do *Fusarium graminearum* em presença dos extratos vegetais no 14º dia de incubação

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
Médias	8,50	5,03	7,43	5,15	2,23	0,00	7,30	3,86	1,20
Controle{1}		,000186	,000378	,000186	,000186	-	,000222	,000186	,000186
C.MeOH_1{2}	,000186		,000186	,998031	,000186	-	,000186	,00240	,000186
C.H ₂ O_1{3}	,000378	,000186		,000186	,000186	-	,995110	,000186	,000186
F.arroz_1{4}	,000186	,998031	,000186		,000186	-	,000186	,000199	,000186
Chlorel_1{5}	,000186	,000186	,000186	,000186		-	,000186	,000186	,000467
C.MeOH_2{6}	-	-	-	-	-		-	-	-
C.H ₂ O_2{7}	,000222	,000186	,995110	,000186	,000186	-		,000186	,000186
F.arroz_2{8}	,000186	,000240	,000186	,000199	,000186	-	,000186		,000186
Chlorel_2{9}	,000186	,000186	,000186	,000186	,000467	-	,000186	,000186	

Extratos: C.MeOH = metanólico de cebola; C.H₂O = aquoso de cebola; F.arroz = metanólico de farelo de arroz; Chlorel = metanólico de chlorella; 1 = menor nível de fenóis; 2 = maior nível de fenóis.

